

平成 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	新規低酸素培養技術による間葉系幹細胞機能亢進メカニズムの解析 ～真に臨床研究に有用な間葉系幹細胞の創成を目指して～	
研究者所属・氏名	研究代表者：薬学総合研究所 准教授 森山 博由 共同研究者：なし	

1. 研究目的・内容

申請者は、間葉系幹細胞を低酸素状態のストレス環境にて培養することにより、間葉系幹細胞の能力が賦活されるばかりか、未分化性を維持したままの高い増殖能および多分化能の獲得、更に様々なサイトカイン産生能の獲得を成し遂げた新規の間葉系幹細胞プロトタイプ (hADMPC) の樹立に成功している。今回、本研究に於いて新規低酸素培養技術が間葉系幹細胞機能の亢進を促すメカニズムの解明の一端を、サイトカイン産生能を中心に置き展開した。同時に、新規低酸素培養技術から産生されたサイトカインの再生医療への応用に繋がる可能性を探究するための基礎研究を展開し、その現象を詳らかにすることも目指した。なぜなら、われわれが本法を介して開発した新規 hADMPC は従来の脂肪由来幹細胞 (ADSC) や骨髄由来幹細胞 (BMSC) と比べ、増殖能、分化能いずれも高く、細胞治療の材料として最も有用な細胞の一つとして注目を集めているからである。

我々は、hADMPC を細胞治療として用いる際の生体内環境に着目し、hADMPC にさまざまなストレスを負荷している。最近、それらのストレスのうち、酸化ストレスを負荷した hADMPC では、少なくとも BMP2 と FGF2 の2つの成長因子の発現量・分泌量が上昇していることが判明した。BMP2 や FGF2 は神経、心筋をはじめ、さまざまな細胞への分化に関与することが報告されている。また、脳虚血や心虚血では、再灌流の際、酸化ストレスがかかることも分かっている。つまり、hADMPC はそのような病変部位で酸化ストレスを受け、内在性の幹細胞から神経や心筋への効率的な分化誘導を誘起する可能性がある。また、hADMPC 自身がそれらの細胞へと分化する可能性も十分高い。このように本研究を通じて、hADMPC を用いた新たな細胞治療へとつながる基礎研究を十分おこない、臨床応用へ道が開けていくことが最終目的である。

そこで、本研究では以下のことを研究指針 (研究内容) とし、新規間葉系幹細胞プロトタイプ (hADMPC) が有する幹細胞を用いた再生医療のための機能亢進メカニズム解析を展開した。

- ・ 酸化ストレスに暴露された hADMPC のサイトカイン産生メカニズムを解明し、標的細胞への分化誘導法を開発する。
- ・ これにより hADMPC を細胞治療に適用するために必要な技術基盤を築く。そのため研究期間内には以下のことを明らかにすることを目的とした。
- ・ ①酸化ストレスが BMP2、FGF2 の発現を上昇させるメカニズムを解明する。
- ・ ②酸化ストレスを与えた hADMPC の培養上清が PC12 の神経伸長を誘起したメカニズムを解明する

2. 研究経過及び成果

研究成果(1)

・酸化ストレスを負荷したヒト脂肪組織多系統前駆細胞の培養上清によりラット副腎髄質由来褐色細胞腫は神経へ分化する

L-Buthionine-sulfoximine (BSO)は、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオンの濃度を低下させることによって、酸化ストレスを与える作用がある薬剤である。そこで、実際に BSO によって酸化ストレスが負荷されるのか確認を行った。ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC)に BSO (1 mM)を添加し、GSH/GSSG Glo Assay Kit を用いて還元型グルタチオン (GSH)と酸化型グルタチオン (GSSG)の比を測定した。その結果、BSO を加えたものはコントロールに比べ GSH/GSSG 比が顕著に減少していた。また、hADMPC に活性酸素の一種である過酸化水素 (H_2O_2)と反応し蛍光を発する CM- H_2DCFDA (10 μM)を添加し、hADMPC 内の過酸化水素量を測定したところ、BSO を添加したものは細胞内の過酸化水素量が増加していた。次に、BSO により酸化ストレスを負荷した hADMPC から産生された分化誘導因子により、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫である PC12 細胞が神経へ分化するのを確認するために、hADMPC から回収した培養上清 (conditioned medium, 以下 CM) を使用して PC12 細胞の培養実験を行った。コントロールとして通常の PC12 細胞分化用培地、hADMPC から回収した CM、BSO を添加した hADMPC から回収した CM、神経分化のポジティブコントロールとして NGF (50 ng/mL)を添加した分化用培地を用いて、2 日間分化誘導を行った。hADMPC からは、NGF をはじめとした多種の成長因子やサイトカインが分泌されていることが知られている。実験の結果、hADMPC から回収した CM で培養した PC12 細胞では、コントロールの分化用培地を用いた PC12 細胞よりも多くの神経突起が確認できた。しかし興味深いことに、酸化ストレスを負荷した hADMPC から回収した CM では、さらに多くの神経突起が確認できた(Figure 1E)。このことから hADMPC から神経分化に関わる分化誘導因子が産生されており、その分化誘導因子の産生が BSO により促されることが示唆された。

研究成果(2)

・PC12 細胞は Erk1/2 と Smad1/5/8 を介して神経へ分化する

hADMPC から回収した CM による PC12 細胞の神経伸長がなぜ誘起されたのかを調べるために、主な神経伸長シグナル経路である Erk1/2 MAP キナーゼ (MAPK)、p38 MAPK、Smad1/5/8、Akt 経路で活性化される因子をウエスタンブロッティング法により確認した。サンプルは、PC12 細胞を 2 日間 37°C、CO₂濃度 5%の条件下で培養し、上記項目 I で示した培地と同様の 4 種類の培地で 1 時間分化誘導した後、回収された。ウエスタンブロッティング法の結果、分化誘導した PC12 細胞において、Erk1/2 と Smad1/5/8 が hADMPC の CM で活性化していることが示された。さらに酸化ストレスを負荷した hADMPC の CM ではより活性化していた。このことから、hADMPC からは Erk1/2 と Smad1/5/8 を活性化するような因子が産生されていることが示唆された。

研究成果(3)

・hADMPC に酸化ストレスを負荷することで BMP2 と FGF2 が産生される

hADMPC から産生される分化誘導因子の同定を行うために、リアルタイム PCR 法と ELISA 法を用いた網羅的な定量解析を行った。hADMPC を播種してから 2 日後に BSO (0, 1, 2 mM) を添加し、その 2 日後に PC12 細胞分化用培地に置き換え、さらにその 2 日後にサンプルを回収した。回収したサンプルより mRNA を抽出し、網羅的にリアルタイム PCR 法を行った結果、酸化ストレスを負荷した hADMPC では BSO の濃度依存的に骨形成促進因子(bone morphogenetic protein 2; BMP2)と繊維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor 2; FGF2)の遺伝子発現量が顕著に増加していることを見出した。同様に ELISA 法にて定量解析を行った結果、BSO を添加した hADMPC の培養上清において、BMP2 と FGF2 の分泌量が顕著に増加していた。さらに、この発現量の増加が本当に酸化ストレスによる影響なのかを確認するために、抗酸化作用のある N-アセチルシステイン (NAC)を最終濃度 5 mM で添加し、リアルタイム PCR 法にて確認した。その結果、NAC を添加したことによって、BSO による BMP2 と FGF2 の発現上昇がコントロールレベルにまで抑制されたことより、酸化ストレスの影響で BMP2 と FGF2 の発現量が増加したことが確認された。また、BMP2 と FGF2 の発現により神経分化を促すという報告があるが、実際に両者の精製タンパクを用いて PC12 細胞の神経分化を確認したところ、BMP2 だけを添加したものでは短い神経伸長が確認でき、FGF2 だけを添加したものでは、長い神経伸長が確認できた。

さらに、BMP2 と FGF2 の両方を添加したものでは長い神経突起が多く確認できたため、PC12 細胞は BMP2 と FGF2 により神経分化したことが示唆された。

研究成果(4)

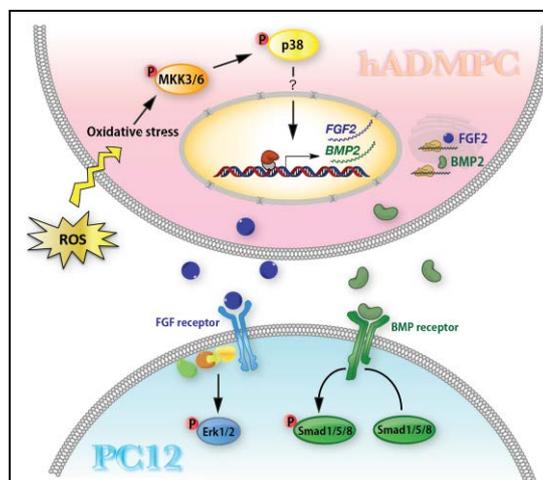
hADMPC では p38 MAPK を介して BMP2 と FGF2 が産生される

hADMPC において、酸化ストレスが負荷されたときの BMP2 と FGF2 の産生上昇に関わる機序を調べるために、様々なストレスに対して活性化することが知られている p38 MAPK に着目した。ファイブロネクチンコート処理した 6 ウェルプレートに hADMPC を播種し、2 日後に p38 MAPK の阻害剤である SB203580 (10 μ M) を添加した後、4 時間後に BSO (2 mM) を加え、1 日後に培地交換を行い BSO を取り除いた。その 2 日後にもう一度培地交換を行い、阻害剤も取り除いた。その 2 日後に PC12 細胞分化用培地に置き換え、さらにその 2 日後にサンプルを回収した。回収したサンプルに含まれる活性化 p38 MAPK をウエスタンブロッティング法により確認した。その結果、酸化ストレスを負荷することで p38 MAPK が活性化することがわかった。また、同じ MAPK 経路である Erk1/2 および SAPK/JNK MAPK の活性化も確認した。ファイibroネクチンコート処理した 6 ウェルプレートに hADMPC を播種してから 2 日後に Erk1/2 MAPK の阻害剤である U0126 (10 μ M) と SAPK/JNK MAPK の阻害剤である JNK inhibitor II (1 μ M) をそれぞれ添加し、1 時間後に BSO (2 mM) を添加し、1 日後に培地交換を行い、その 1 日後にサンプルを回収し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、酸化ストレスの負荷により Erk1/2 MAPK は活性化されるが SAPK/JNK MAPK の活性化には影響がないことがわかった。BMP2 と FGF2 の産生には p38 MAPK の活性と Erk1/2 MAPK の活性化が必要なのかを確認するために p38 MAPK の阻害剤である SB203580 と Erk1/2 の阻害剤である U0126 をそれぞれ添加し、BMP2 と FGF2 の発現をリアルタイム PCR により定量した。その結果、p38 MAPK を阻害することで BMP2 と FGF2 の発現が抑制されたことから、hADMPC では p38 MAPK を介して BMP2 と FGF2 が産生されていることが示唆された。

(5) 恒常活性型 MKK3/6 により p38 MAPK が活性化し、BMP2 と FGF2 の発現が上昇する

p38 MAPK の活性化が BMP2 と FGF2 の産生に関わっていることが示唆されたが、そのことをさらに確かめるために、hADMPC に p38 MAPK シグナルの上流因子である MKK6 の恒常活性型 (MKK6 (glu)) をレンチウイルスベクターにて導入した。MKK6 (glu) の発現により、以前の報告どおり、p38 MAPK の活性化が確認され、それにともなった BMP2 と FGF2 の発現上昇が示された。以上の結果より、p38 MAPK の活性化により BMP2 と FGF2 の発現が上昇するといえた。

上述の結果から、hADMPC に酸化ストレスを負荷すると MKK3/6 を介して p38MAPK が活性化し、分化誘導因子である BMP2 と FGF2 が産生されることがわかった。そして、産生された BMP2 と FGF2 は PC12 細胞において Erk1/2 と Smad1/5/8 を介して神経伸長を促すことが示唆された。以上の結果をまとめたのが右図である。



3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究により、我々が開発した新規低酸素培養技術ならびにそこから作製された脂肪由来新規間葉系幹細胞の臨床応用への発展性が垣間見られたことは非常に大きな成果である。また、神経系疾患の臨床応用に繋がる様々なアプリケーションを提供しうる可能性には、今後更なる飛躍が期待できる。今後は、新規低酸素培養技術の高精度化、脂肪由来新規間葉系幹細胞の性状解析、これらを用いた臨床応用を見据えたアプリケーションの拡充等を充足させ、近畿大学発の再生医療分野に有用な技術基盤、臨床応用に直結した幹細胞ラインナップ、左記の適応疾患にコミットした基礎データの提供を積極的に推進していく予定である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
<i>BMC Cell Biol</i>	雑誌	2012年8月7日
<i>Cancer Sci</i>	雑誌	2012年11月1日
<i>Plos One</i>	雑誌	2013年6月12日
<i>Plos One</i>	雑誌	2014年1月28日
<i>Stem Cells Dev</i>	雑誌	2014年5月30日
<i>J Invest Dermatol.</i>	雑誌	2014年6月1日
第7回 Notch meeting	口頭	2013年2月15日
JST 関西8私大新技術開発説明会	口頭	2013年3月1日
第12回日本再生医療学会総会	口頭	2013年3月23日
第11回国際幹細胞学会総会	口頭	2013年6月15日
第13回日本再生医療学会総会	口頭	2014年3月16日
第12回国際幹細胞学会総会	口頭	2014年6月19日
他 10件		