

Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived
as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells

(骨髄由来間葉系幹細胞投与マウスは脂肪由来間葉系幹細胞投与マウスと比較して生存率が高い)

氏名 白築 祥吾

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用分子生命科学系専攻 消化器病態内科学分野

平成 28 年 2 月

目次

1. 要旨	1
2. 諸言	1
3. 方法	2
(1) マウス	2
(2) 幹細胞	2
(3) DNA-chip 解析	2
(4) PCR・定量リアルタイム PCR	2
(5) Western-blotting・ELISA	3
(6) Flow cytometry	3
(7) 凝固分析	3
(8) プロトロンビン時間	4
(9) 細胞移植	4
(10) 統計解析	4
4. 結果	4
5. 考察	5
6. 結語	5
7. 謝辞	5
8. 参考文献	6

1. 要旨

【目的】 肝硬変症患者に対する間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells : MSC)を用いた低侵襲再生治療の研究・開発が様々な施設で行われている。MSC は再生治療における有望な細胞源であり、主に骨髄あるいは脂肪組織から分離される。本研究では、これら 2 種類の MSC の特性及び生体への細胞投与の安全性を評価した。

【方法】 in vitro では、ヒト(h)骨髄由来 MSC (Bone-marrow derived MSC : BMSC) とヒト(h)脂肪由来 MSC (Adipose derived MSC : ASC) を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行い、その後 mRNA 及びタンパク質の発現解析を行った。in vivo では、マウスにマウス(m)BMSC または mASC を末梢静脈から投与し、24 時間生存率・死亡原因を解析した。

【結果】 PCR・Western blotting・ELISA および Flow cytometry の結果、hBMSC と比較して hASC において、組織因子の発現が高かった。プロトロンビン時間は、細胞未投与マウス群 (6.5±1.7 秒) 及び mBMSC 投与マウス群 (6.7±0.8 秒) と比較して mASC 投与マウス群において有意に延長した(>120 秒)。また、凝固促進能は mASC 投与マウス群で増強された。

マウスの間葉系幹細胞投与 24 時間後生存率は、mBMSC 投与群で 95.5%(21/22)、mASC 投与群で 46.4%(13/28)であった。mASC 投与群では、細胞投与数が多くなるほどに生存率は低下したが、mBMSC 投与群では細胞投与数による生存率の変化は認められなかった。組織病理学的には、mASC 投与後死亡マウスの肺及び肝臓の血管内に多数の血栓が認められた。

【考察】 両細胞間の表現型に明らかな相違は認められないが、TF発現はASCにおいて顕著であり、TFによって増強された凝固促進能が、致命的な多臓器血栓塞栓症を引き起こしたと考えられる。

【結論】 上記の結果より、ASC と比較して BMSC の方がより安全性に優れた細胞源であることが示唆された。

2. 諸言

再生医療は臓器不全患者の治療法として期待されている。我々は、肝硬変に対する治療法として自己骨髄細胞投与療法[autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy]を開発し¹、その有効性と安全性を報告してきた^{2,3}。しかし、現行の ABMi 療法は全身麻酔下で骨髄採取を行うため、患者の全身状態の厳格な基準を満たす必要がある。そのため、治療効果を有し免疫反応のない MSC を用いた肝再生療法の開発に着手した⁴。MSC は骨髄由来と脂肪由来に大別される。これらは類似した特徴を有するが、より詳細な特性の把握は、治療に最適な細胞源を決定する一助となり得る。本研究では、BMSC あるいは ASC 投与の安全性を比較した。

3. 方法

(1) マウス

C57BL/6 野生型マウス(SLC Japan)を実験に使用した。すべての動物実験は、山口大学動物実験委員会が定めるガイドラインに従って実施した。

(2) 幹細胞

6人の異なるドナー由来のhBMSC・hASCをLonza社より購入した(BMSC1: 22歳男性 1F4287, BMSC2 21歳男性 7F3915, BMSC3 20歳男性 8F3520, ASC1 26歳女性 1F3651, ASC2 52歳女性 0F4505, ASC3 38歳女性 1F3737)。細胞を10cm培養皿に播種し、室温37°C・5% CO₂環境の加湿インキュベーター内で一晚培養した。翌日浮遊細胞を除去するために培養液を交換した。接着細胞を10%FBS・ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDMEM培養液を用いてnon-coating培養皿上で細胞占拠率が80%に達するまで培養し、0.05%trypsin-EDTAを用いて細胞を剥離し、継代した。

mBMSCは、C57BL/6マウス由来mBMSCをCyagen Biosciences社より購入した。

mASCはC57BL/6マウスの鼠径部皮下脂肪組織より採取し、0.03%コラゲナーゼを添加したDMEM培養液中に播種・懸濁し、500×gで遠心分離した。ペレットを再懸濁・培養し、2-3継代した細胞を解析に使用した。

hBMSC、hASC、mBMSC、mASCの脂肪、軟骨・骨への分化能を、Oil Red O染色、アルカリホスファターゼ染色、アルシアンブルー染色によってそれぞれ確認した(supplementary Fig 1, 3)。

(3) DNA-chip 分析

hBMSC・hASCのDNA発現をDNA-chip system(Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)を用いて比較し、発現パターンをIPA software system (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA)を用いて解析した。

(4) PCR・定量リアルタイムPCR

ISOGEN 試薬(NipponGene, Tokyo, Japan)を用いその製品説明書に従ってhBMSC及びhASCからRNAを抽出した。混入したDNAはDNaseキットを用いて除去し、RNAはRNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いて精製した。第1鎖cDNAをReverTra Ace-α system (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて500ngの全RNAから合成した。遺伝子発現はFast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)とTaKaRa Ex Taq DNAポリメラーゼ (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)を用い StepOnePlus™リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)で評価した。PCRの熱サイクルは、94°C60秒に引き続き、94°C, 60°C, 72°C各30秒を1サイクルとし、35回繰り返した。定量リアルタイムPCRは95°C3秒, 60°C30秒を1サイクルとして蛍光シグナルが閾値を超えるまで繰り返した。下記のプライマー配列を使用した。

ヒトTissue factor (TF) : 5'-CAG ACA GCC CGG TAG AGT GT-3'(forward), 5'-CCA CAG CTC CAA TGA TGT AGA A-3'(reverse)

マウス TF : 5'-TCC AGG AAA ACT AAC CAA AAT AGC-3'(forward), 5'-CCC ACA ATG ATG AGT

GTT TCT C-3'(reverse)

ヒト β -actin : 5'-CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3'(forward), 5'-CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3'(reverse)

マウス β -actin : 5'-TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA-3'(forward), 5'-GCT GGA AGG TGG ACA GTG AG-3'(reverse)

MSCの同一性は細胞表面マーカーの発現解析で確認した。

(5) Western blotting · ELISA

hBMSC, hASC, mBMSC, mASC サンプルは、n-octyl- β -D-glucopyranoside の最終濃度が 20mM になるように放射免疫沈降緩衝液に溶解した細胞溶解緩衝液 400 μ L を調整した。タンパク質サンプルは、添加液(5% 2-mercaptoethanol, 95% Laemmli sample buffer)と等量で混合し、100°Cで3分間加熱し、12%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動によりタンパク質を分離した。分離したタンパク質をイモビロン P メンブレン(Millipore, Billerica, MA, USA)に転写し、ブロッキング液(0.1% I-BLOCK in PBS with Tween [PBST])中で30分間ブロッキングし、PBSTで洗浄後、TF 一次抗体(Abcam, Tokyo, Japan)と β -actin (Becton Dickinson)を含むブロッキング液中で12-16時間室温で振盪した。膜に二次抗体を添加して30分間室温で振盪し、バンドを増強化学発光及びオートラジオグラフィによって検出した。

hBMSC 及び hASC 中の TF 発現は Tissue Factor Human ELISA キット(Abcam)を用いて定量した。サンプルは Western blotting と同じものを使用した。

(6) Flow cytometry

培養接着細胞を 0.05% trypsin-EDTA で剥離し、10%FBS 含有 DMEM 培地中に懸濁した。細胞を PBS で洗浄後、10% Fc 受容体ブロッキング試薬(MACS Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)含有 PBS 中で 20 分間氷上で反応させた。その後、抗 TF モノクローナル抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、PE 標識抗 CD11b·CD44·CD45·CD90(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)、CD105 (eBioscience, San Diego, CA, USA)、CD73 (R&D Systems)抗体、及び FITC 標識抗 CD34 抗体(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)と各々氷上で 20 分間反応させた。アイソタイプ IgG をコントロールとして使用した。フローサイトメトリーは Garios システム(Beckman Coulter)を用いて行った。解析から死細胞を除去するためにヨウ化プロピジウム(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)で染色した。各サンプルは少なくとも 3 回評価した。データは Kaluza flow analysis software (Beckman Coulter) または FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて分析した。

(7) 凝固分析

接着細胞を 0.01% trypsin-EDTA で剥離し、PBS中に希釈する。DMEMに再懸濁後、細胞を氷冷 PBSとHBSA(20mM HEPESNaOH, pH7.5; 100mM NaCl; 0.02% NaN₃; 1mg/mL bovine serum albumin)で洗浄した。細胞懸濁液を-80°Cで凍結し、37°Cで解凍した。この溶解過程を3回繰り返した後、細胞溶解液100 μ Lを凝固キュベットに移し、正常ヒト血漿100 μ Lと混和した。同混和液中に

25mM塩化カルシウム100 μ Lを添加した。塩化カルシウムを添加してからの血栓形成時間をKCI Delta semiautomatic coagulation analyzer (Tcoag, Bray, Ireland)を用いて測定した。

(8) プロトロンビン時間

細胞投与したマウスから得られた血液に3.2%クエン酸ナトリウムを添加・混和し、遠心分離した。血清を-80 $^{\circ}$ Cで保存した。この手技はシリコンコーティングチューブを用いて行われ、プロトロンビン時間は委託業者(Monolis, Tokyo, Japan)のプロトコルを使用して測定された。

(9) 細胞移植

培養mBMSC・mASCはトリプシンにより剥離した。細胞をPBSで懸濁し $3.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^6/200\mu\text{L}$ に調整した。27G針を用いてC57BL/6マウス尾静脈に各細胞密度の細胞懸濁液200 μ Lを投与した。

(10) 統計解析

スチューデントT検定を用いて統計解析を行った。p<0.05で統計学的有意差があるものとした。データは平均値 \pm 標準偏差として表示した。

4. 結果

hBMSC・hASC間には、細胞表面マーカー・分化能(Supplementary Fig. 1-3)・微分干渉顕微鏡で観察した形態(Fig. 1a)に明らかな相違は認められなかった。凝血促進及び血栓塞栓の引き金となる α TFの発現は、hBMSC・hASCのDNA-Chipによって解析した。TFはhBMSCよりhASCでより高い発現が認められた(Fig. 1b)。細胞継代によるTF発現の変動を定量リアルタイムPCRで評価したところ、TF転写レベルは第2,3,4継代で持続的に高値を示した(Fig. 1c)。TFタンパクの発現も同様にhBMSCよりhASCで高値であった(Fig. 2a-c)。凝固時間は、hBMSCよりhASCでより短く、添加細胞数を増やすほどに短くなる傾向が認められた(Fig. 3)。

BMSC・ASCの生体投与の安全性をマウスで比較検討した。我々はマウス骨髄細胞を培養するとMSCだけでなくマクロファージも容易に増殖すると以前に報告した⁷。我々はmBMSC・mASCが脂肪細胞及び骨細胞に分化することを確認した(Supplementary Fig. 3)。ヒトでの知見と同様に、mBMSC・mASCは類似の発現プロファイルを有する(Supplementary Fig. 4)が、TF mRNAはmASCで高発現を示した(Supplementary Fig. 5)。

mBMSC・mASCを用いた細胞投与実験では、mASC投与24時間後生存率は46.4%(Table. 1)であり、死亡マウスはそのほとんどが10分以内に死亡した。生存率は投与細胞密度に反比例した(Fig. 4)。対照的にmBMSC投与24時間後生存率は95.5%(Table. 1)であり、投与細胞密度による生存率の変化は認められなかった(Fig. 4)。

プロトロンビン時間測定は、mASC投与後死亡マウス、mBMSC投与後10分以上生存したマウス及び細胞未投与マウスより採取された血液を使用した。mBMSC投与マウスと細胞未投与マウスのプロトロンビン時間に有意差は認められなかった(6.7 \pm 0.8秒 vs 6.5 \pm 1.7秒; P = 0.79)。一方、mASC投与マウスは細胞未投与マウスと比べプロトロンビン時間が著しく延長した(120秒以上 vs 6.5 \pm 1.7秒; P<0.001) (Fig. 5)。

組織病理学的には、mASC投与後死亡マウスでは肺及び肝臓の血管内に血栓が無数に認められたのに対して、mBMSC投与マウスには血栓は認められなかった(Fig. 6)。

5. 考察

本研究では、BMSCとASCを特性と生体投与時の安全性の観点から比較した。細胞表面マーカー・分化能はBMSC・ASCで同様であった。しかし、TFの発現及び凝固能は両細胞間で相違が認められた。両細胞間に明らかな表現型の相違がないにもかかわらず、TF遺伝子発現はASCにおいて顕著であった。また、TFタンパクにおいてもASCで高発現が認められ、凝固時間はBMSCより短かった。これらの結果から、ASCは凝固活性を促進するTFの高発現により特徴づけられる。ASC投与マウス群において、24時間生存率は低く、プロトロンビン時間は延長した。TFは第Ⅶ因子と結合することで活性化し、外因系凝固反応を刺激することが知られている⁶。したがって、ASC細胞膜上のTFによって増強された凝固促進能が、致命的な多臓器血栓塞栓症を引き起こしたと考えられる。また、血栓形成により外因系凝固因子が消費されることで、プロトロンビン時間が延長したと考えられる。

我々は、今までABM療法安全性と有効性を示してきた²。また、NOD/SCIDマウス四塩化炭素肝線維化モデルにおいてBMSCが肝線維化及び肝機能を改善することも報告した^{8,9}。これらの結果はBMSCを用いた細胞治療の更なる発展に寄与すると考えられる。

6. 結語

本研究で得られた結果は、間葉系幹細胞を末梢静脈投与する際、ASCよりもBMSCがより優れた細胞源であることを示し、細胞治療の際にBMSCを使用する根拠となる。

7. 謝辞

我々は、山田 磨理子 女史、藤本 五百子 女史、福隅 陽子 女史、黒瀬 弘美 女史、大田 久美江 女史の技術支援に感謝する。本研究は、日本学術振興会の科学研究費助成事業、厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金、科学技術振興機構から支援を受けた。

8. 参考文献

1. Terai S, Ishikawa T, Omori K et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24: 2292–8.
2. Terai S, Tanimoto H, Maeda M et al. Timeline for development of autologous bone marrow infusion (ABMi) therapy and perspective for future stem cell therapy. *J Gastroenterol* 2012; 47: 491–7.
3. Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med* 2012; 14: 7–12.
4. Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28: 203–8.
5. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46: 219–28.

6. Tatsumi K, Ohashi K, Matsubara Y et al. Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 431: 203–9.
7. Iwamoto T, Terai S, Hisanaga T et al. Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. *Cell Tissue Res* 2013; 351: 487–95.
8. Tanimoto H, Terai S, Taro T et al. Improvement of liver fibrosis by infusion of cultured cells derived from human bone marrow. *Cell Tissue Res* 2013; 354: 717–28.
9. Terai S, Takami T, Yamamoto N et al. Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. *Tissue Eng Part B Rev* 2014; 20: 206–10.

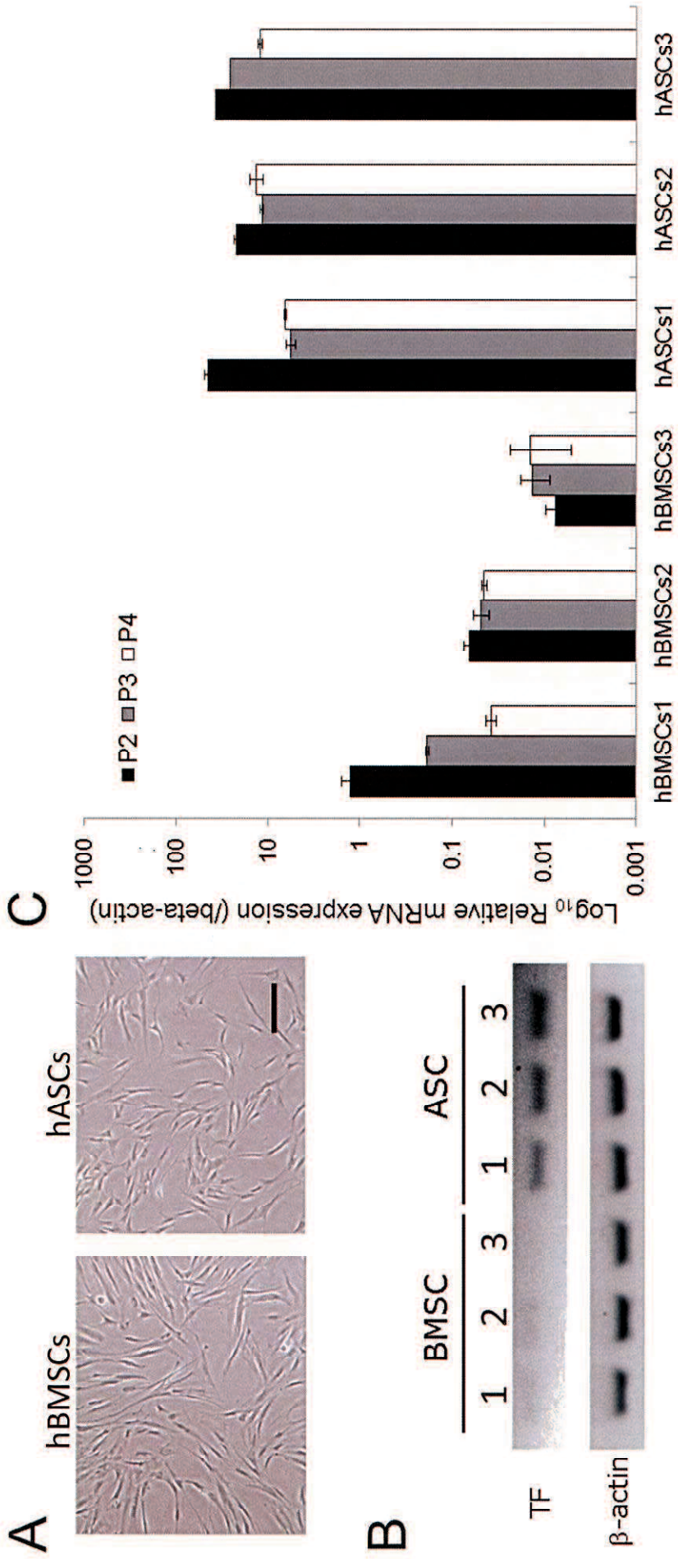


Fig. 1 hBMSC·hASCの顕微鏡写真・TF mRNA発現: (A)微分干渉顕微鏡にてhBMSC·hASCの類似形態が確認できる。Scale bar = 200 μ m (B) PCRによるhBMSC·hASC各3ドナーのTF mRNA発現。TFはhASCにおいて高発現が認められた。(C) 各ドナー細胞の2,3,4継代におけるPCR定量解析。hASCのTF mRNA発現は継代を経ても高水準で維持された。

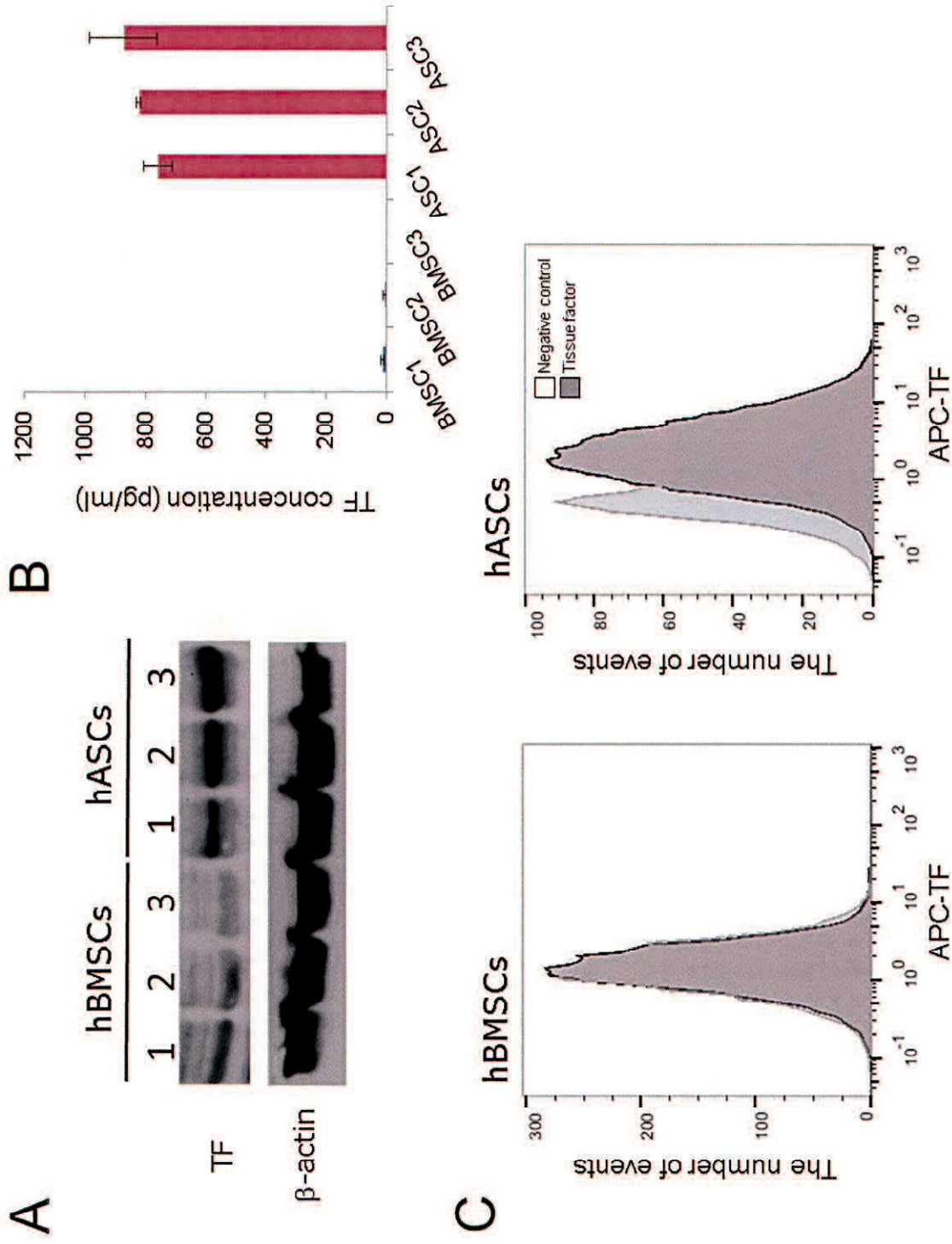


Fig. 2 hBMSC・hASCのTFタンパク発現: hBMSC・hASC各3ドナーのTFタンパクを、(A) ウェスタンブロットティング (B) ELISAで検出した。(C) 細胞表面のTFタンパク発現をフローサイトメトリーで解析した。

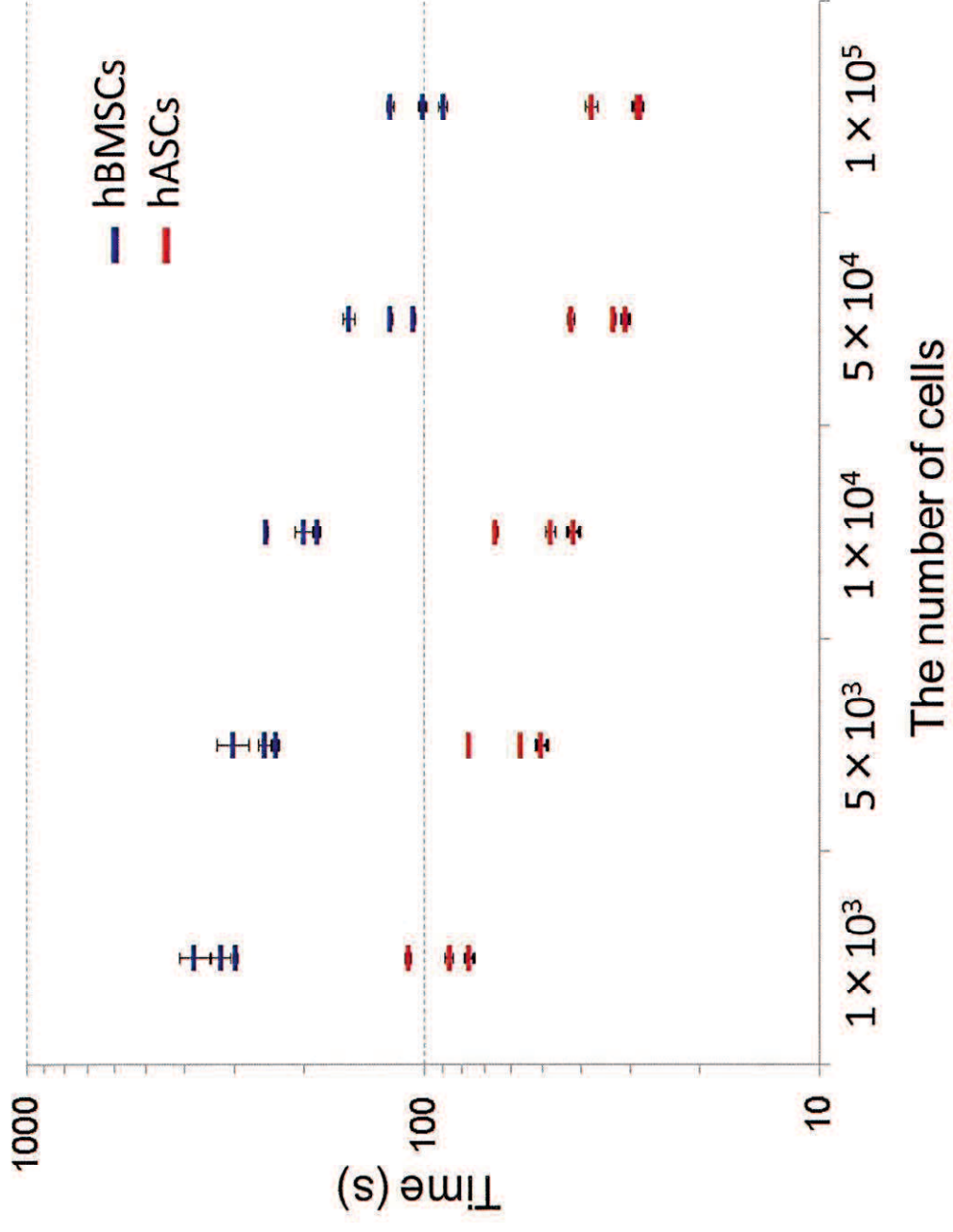


Fig. 3 クエン酸添加ヒト血漿を用いたhBMSC・hASCの凝固時間測定: 細胞密度域 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ で測定した。解析は各ドナーで3回ずつ施行した。

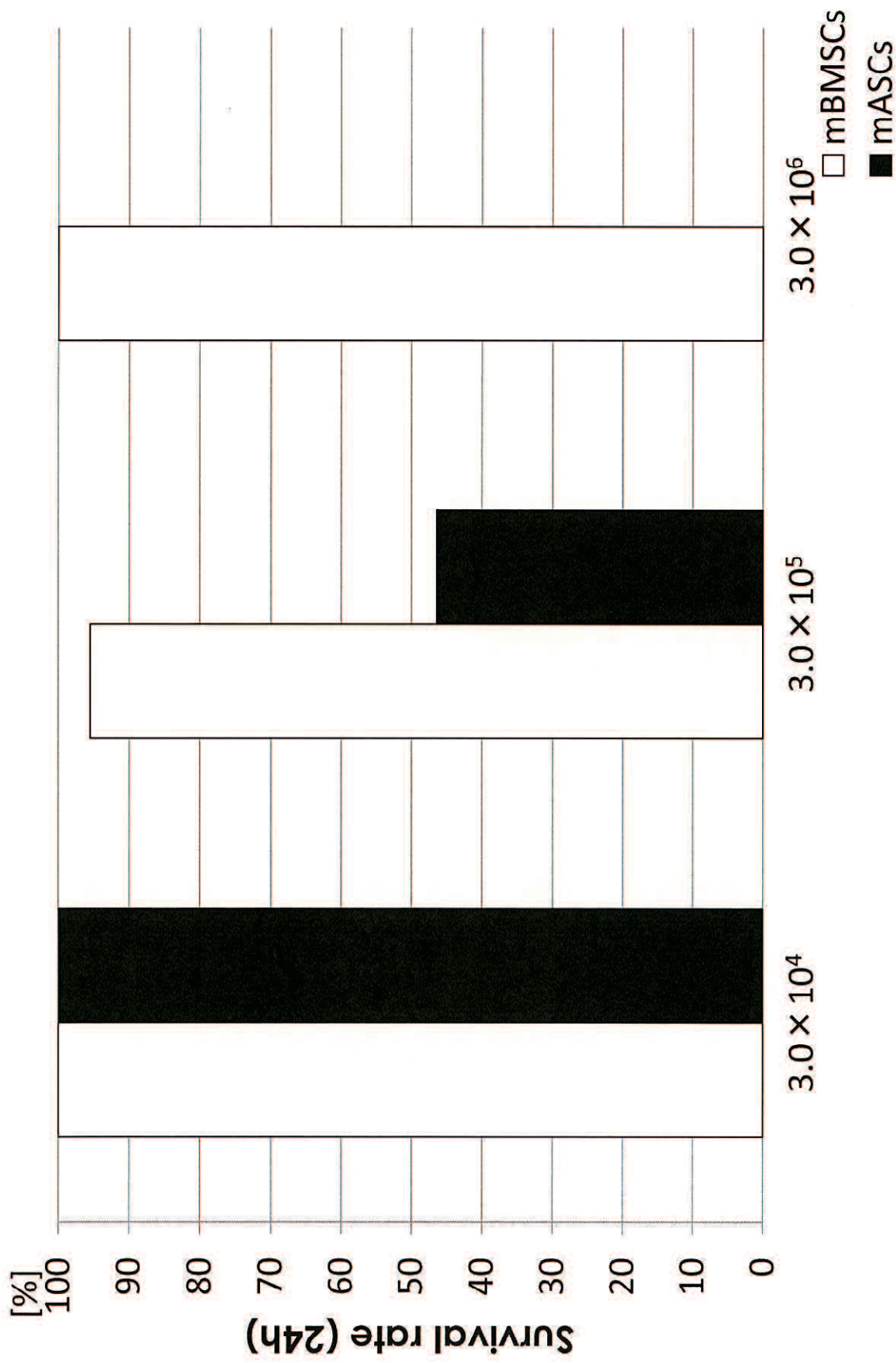


Fig. 4 mBMSC・mASC投与マウスの生存率: mASC投与群の生存率は投与細胞数の増加により著しく低下した。一方、mBMSC投与群の生存率は投与細胞数による変化は見られなかった。

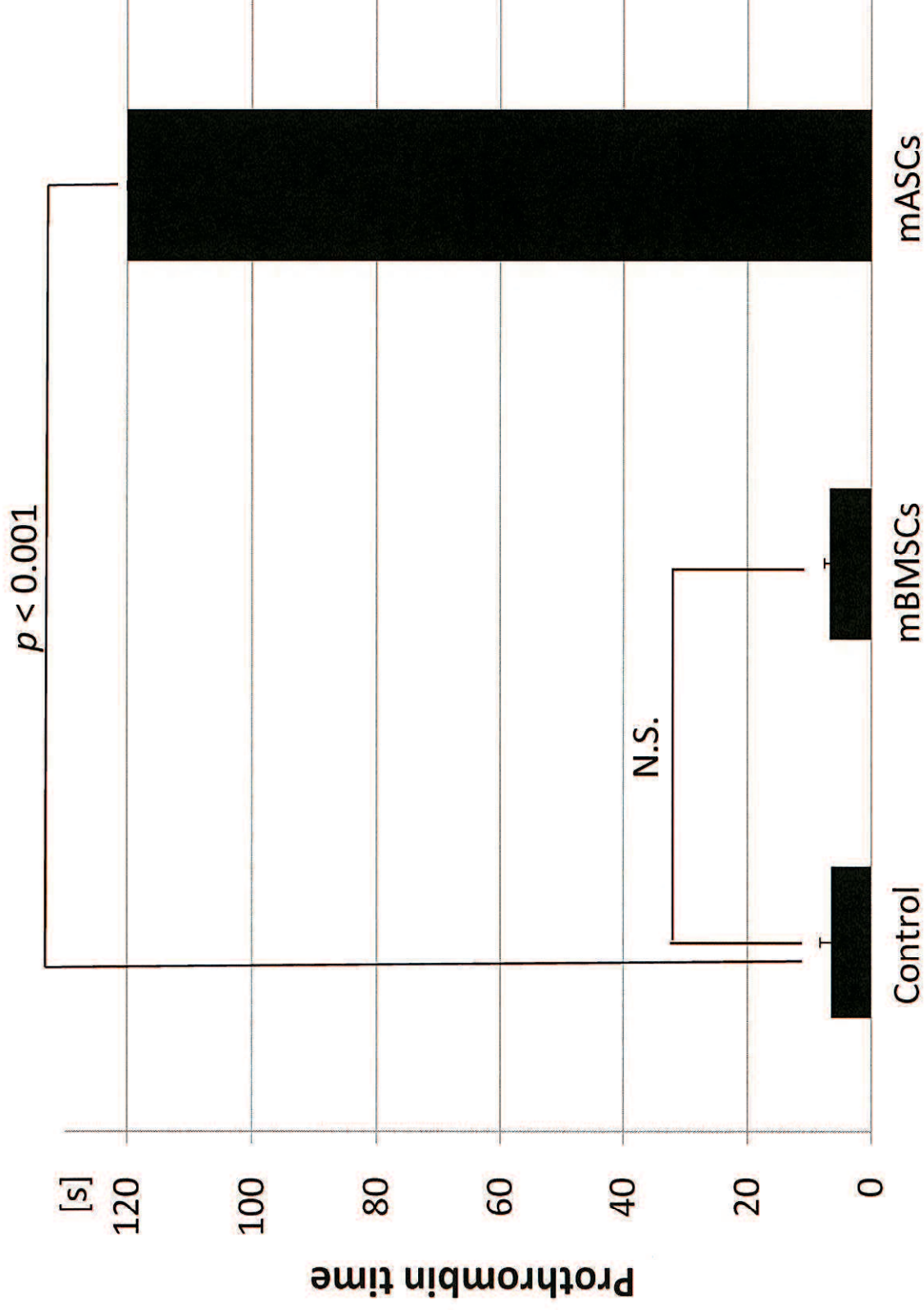
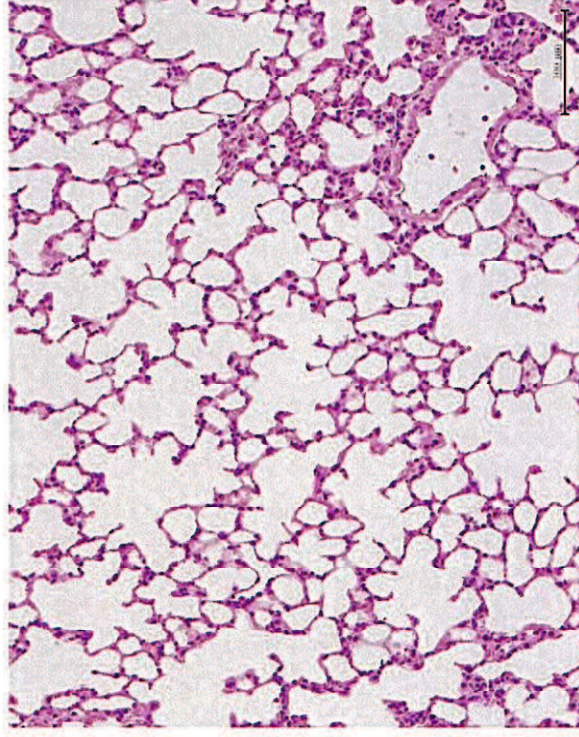


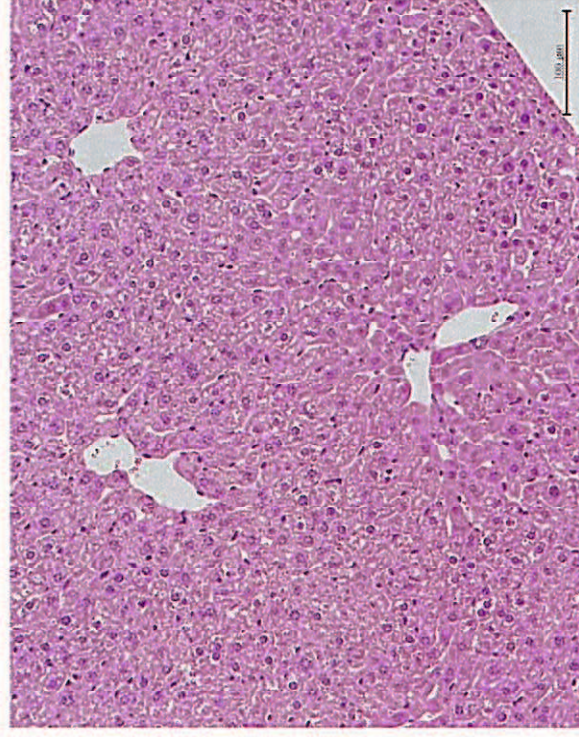
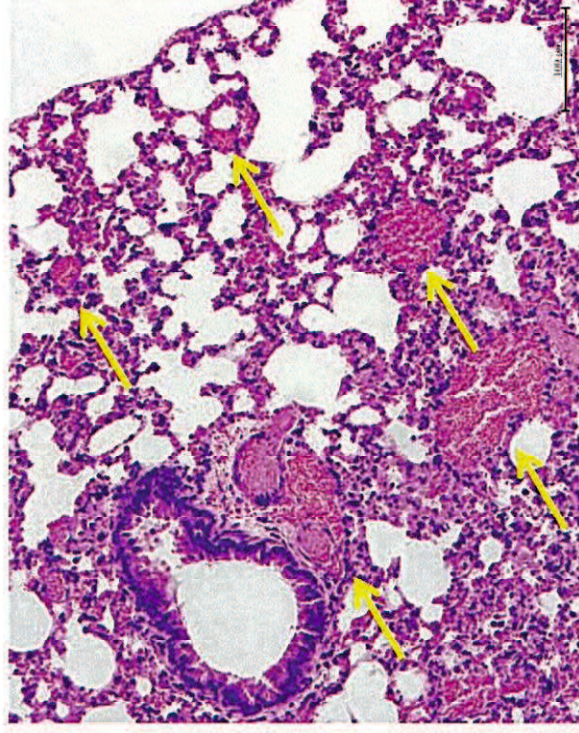
Fig. 5 mBMSC・mASC投与後マウスのプロトロンビン時間: マウスの尾静脈より細胞投与を行った。プロトロンビン時間はmASC投与後死亡マウス(投与後10分以内に死亡)・mBMSC投与後マウス(投与後10分以内)・細胞未投与マウスから採取した血液を使用して測定した。mASC群のプロトロンビン時間は他2群と比較して著明に延長した。

mBMSCs



Lung

mASCs



Liver

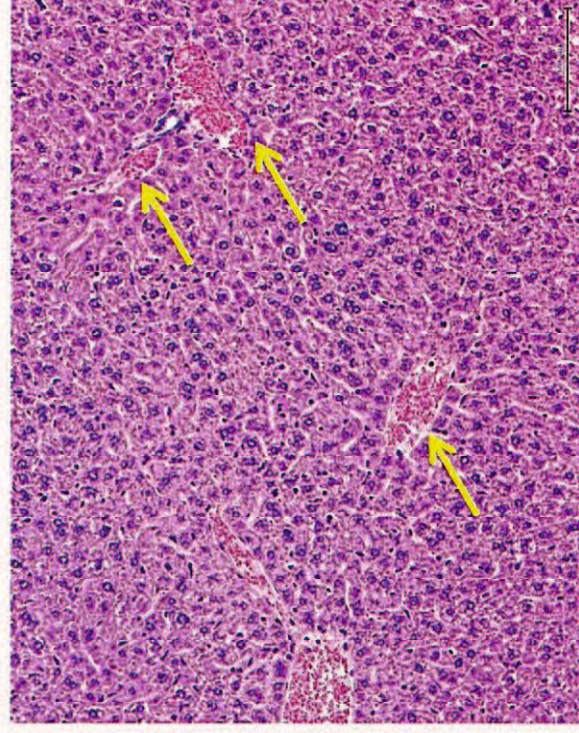


Fig. 6 mBMSC・mASC投与マウスの肺・肝組織の組織病理学的解析(ヘマトキシリン-エオジン染色): mASC投与マウスでは肺・肝組織の血管内に血栓を認めた(矢印)。対照的に、mBMSC投与マウスでは血栓は認められなかった。Scale bar = 100μm

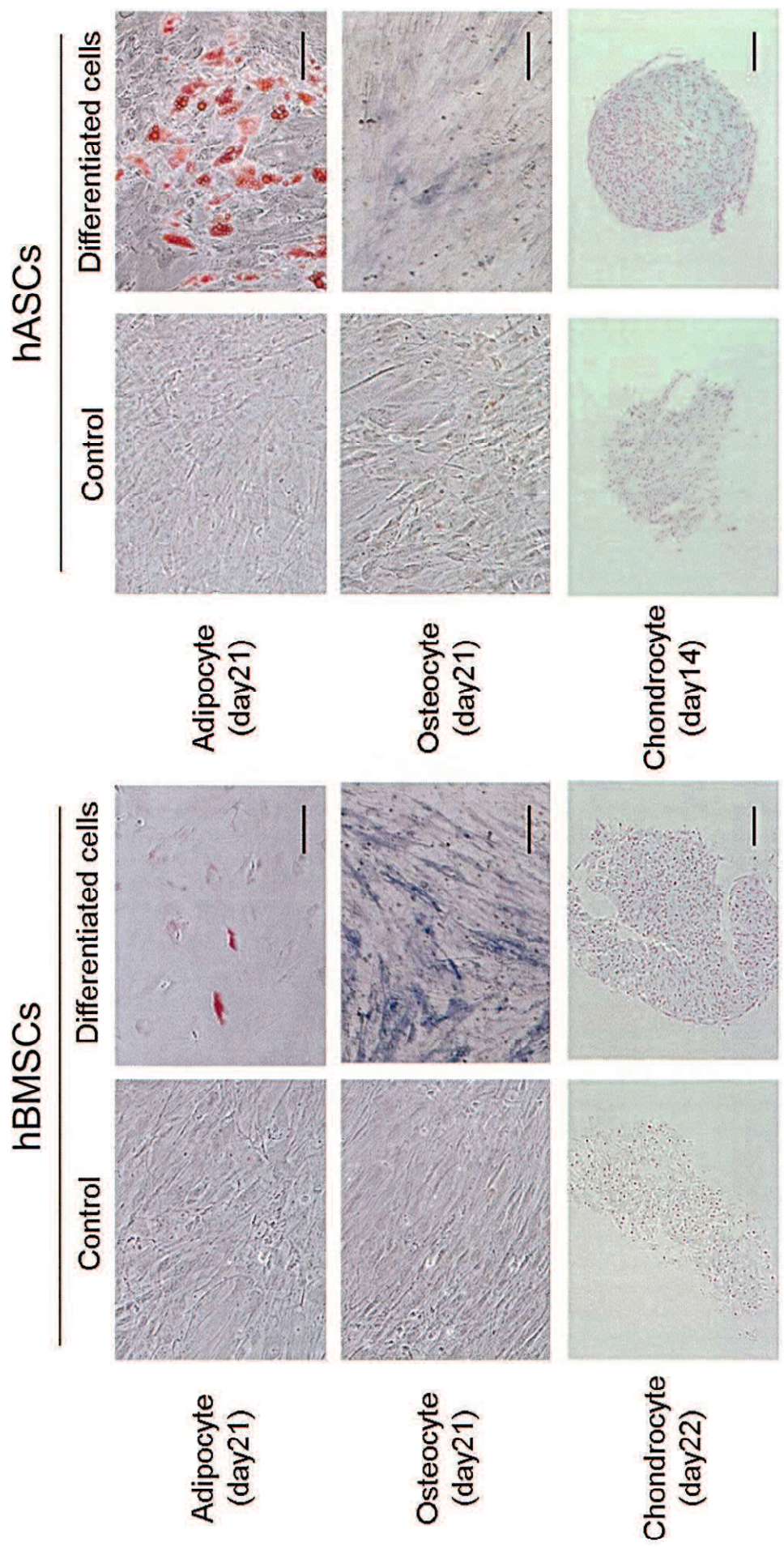
Table. 1 mBMSC·mASC投与後24時間生存率

The number of injected cells	Total mouse number	The number of survived mice (24h)	Survival rate (%)
3.0×10^5 mBMSCs [†] / mouse	22	21	95.5%
3.0×10^5 mASCs [‡] / mouse	28	13	46.4%
PBS [§] (same volume)	8	8	100%

† Bone marrow-derived mesenchymal stem cell

‡ Adipose-derived mesenchymal stem cell

§ Phosphate buffered saline

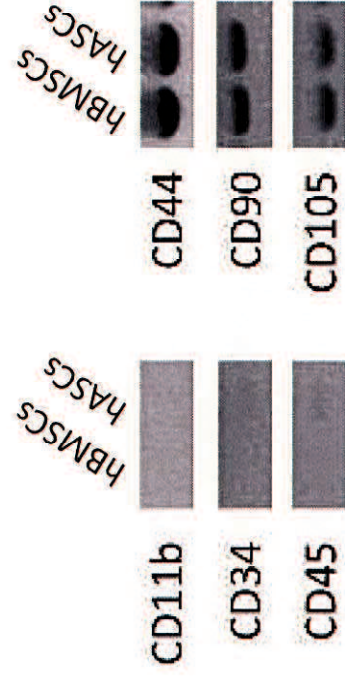


Supplementary Figure 1

A

CD marker	hBMSCs	hASCs
CD11b	-	-
CD34	-	-
CD45	-	-
CD44	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+

B



Supplementary Figure 2

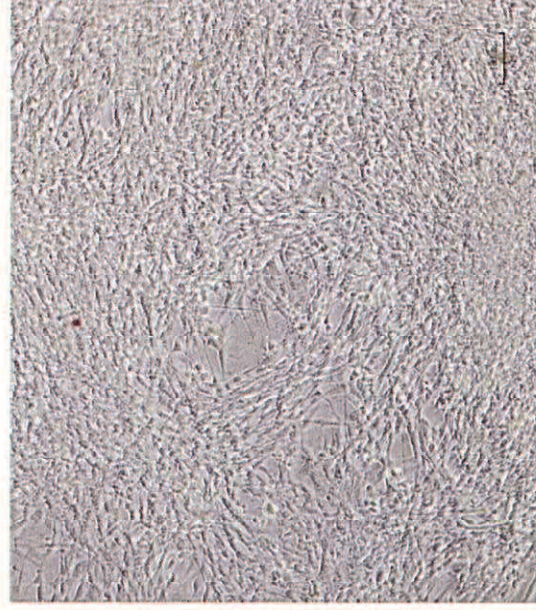
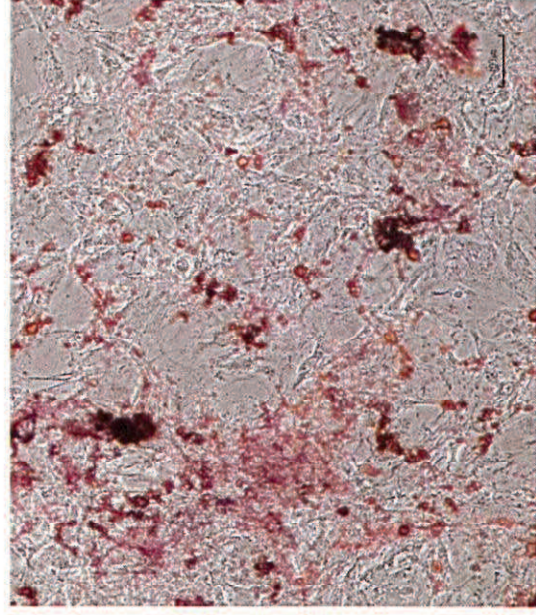
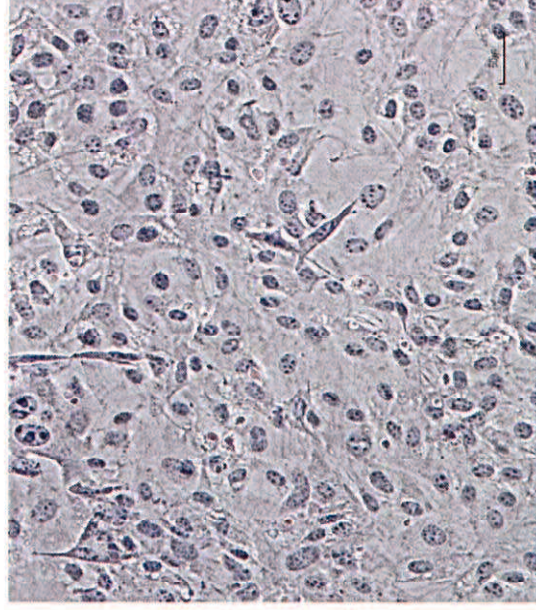
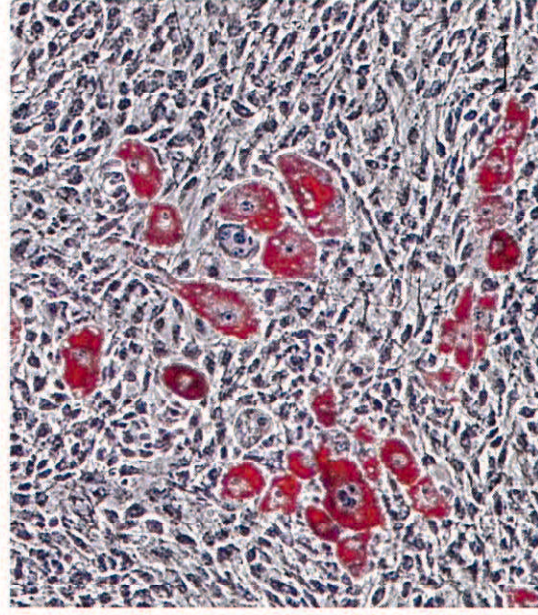
mBMSCs

Adipocyte
(day14)

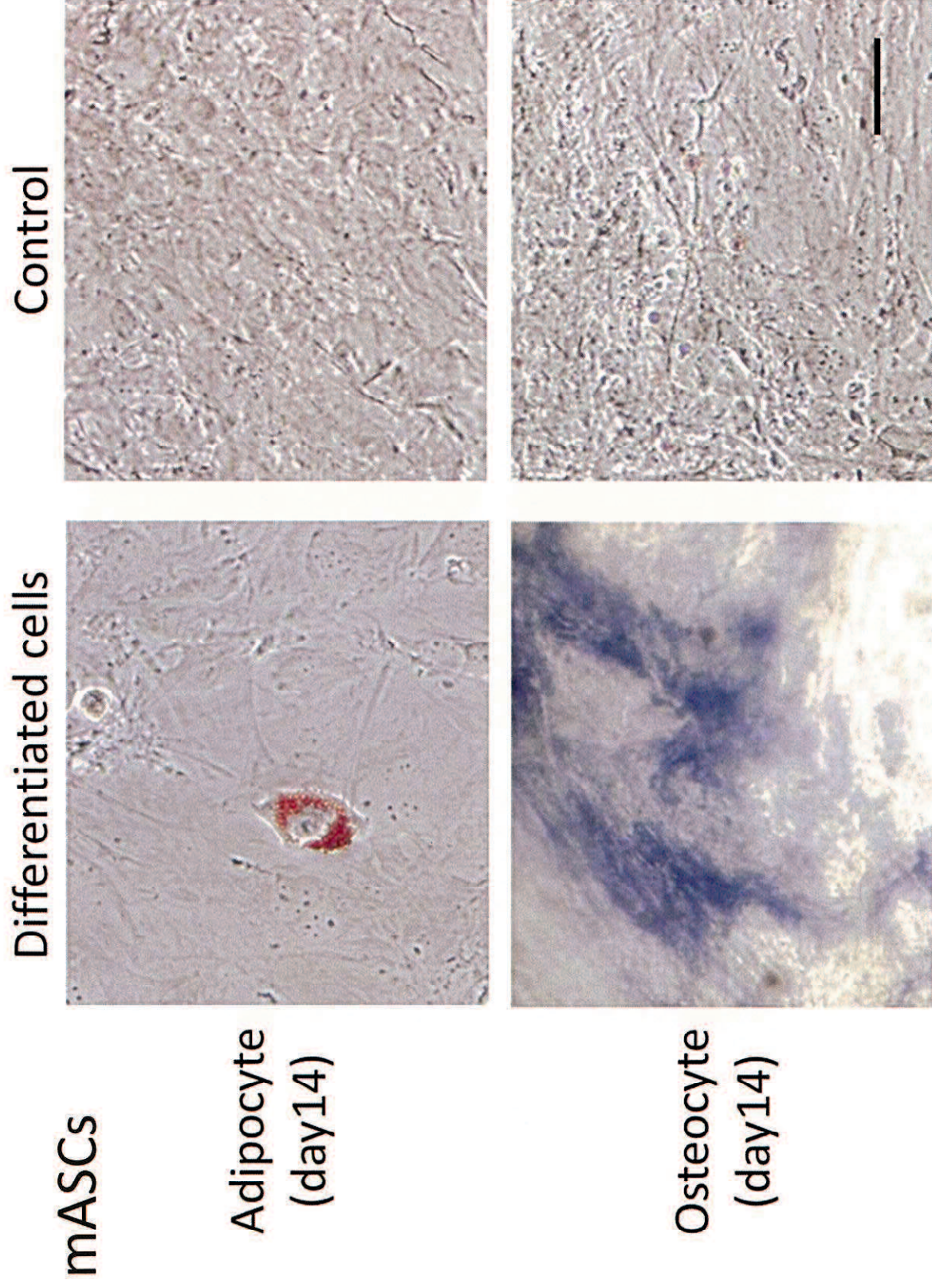
Osteocyte
(day14)

Differentiated cells

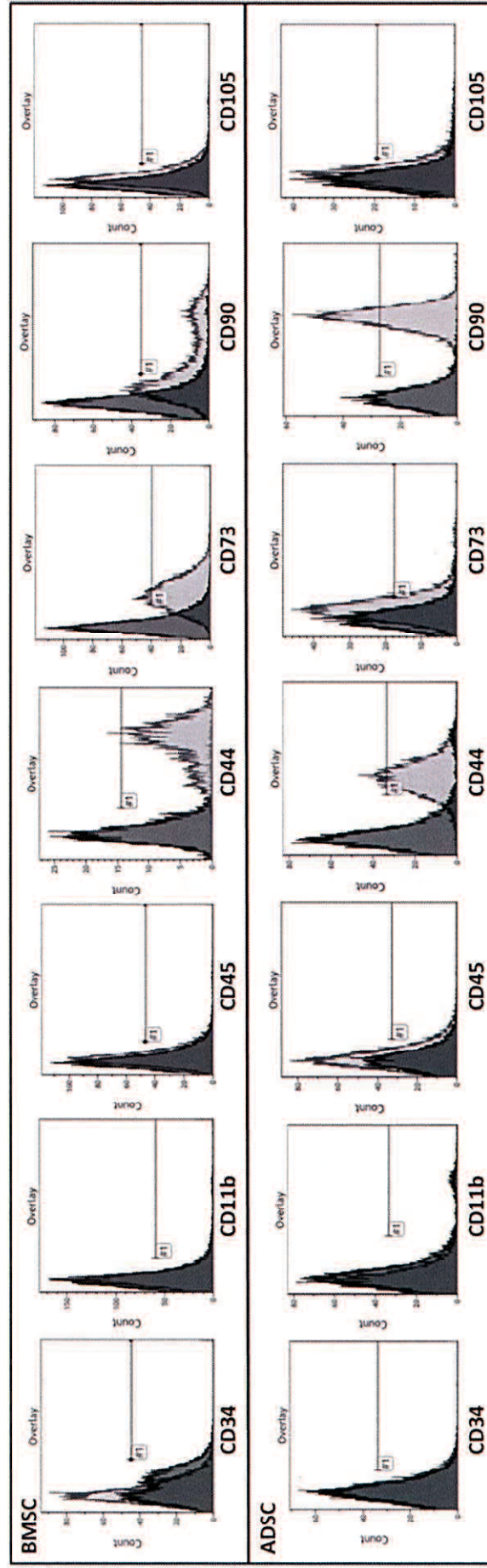
Control



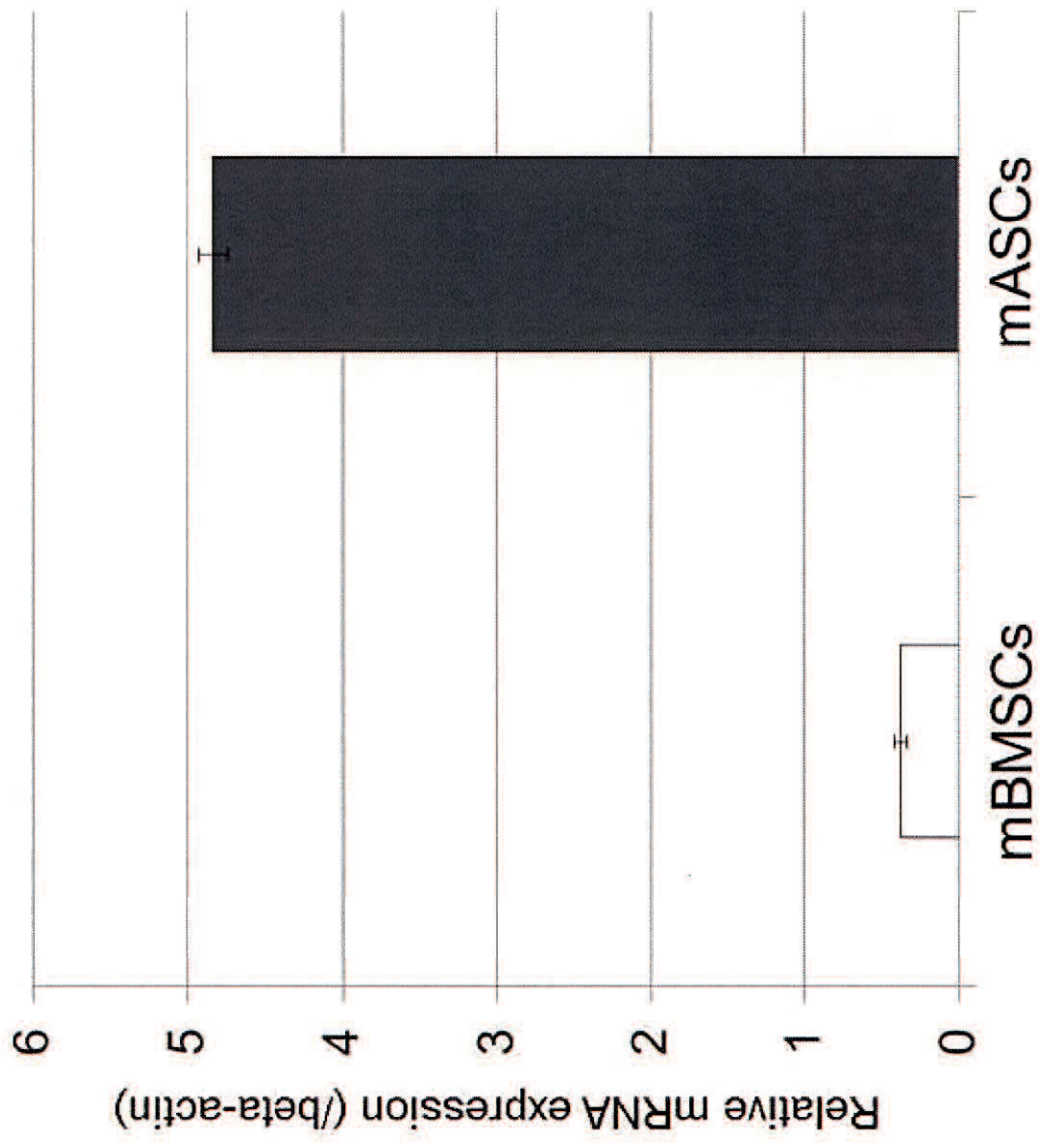
Supplementary Figure 3A



Supplementary Figure 3B



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5