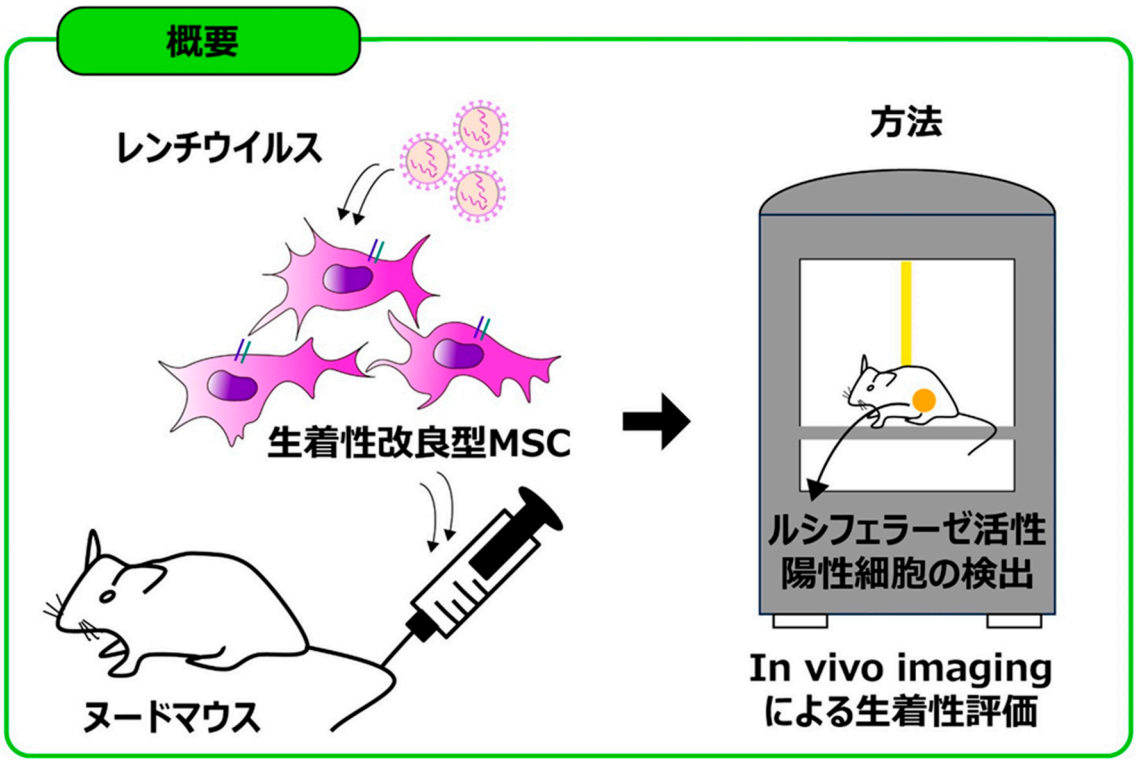
169　細胞工学的に生着性を改変した人工幹細胞の開発	井原　大

【目的】これまでに、間葉系幹細胞（MSC）の生体組織への完全な生着および分化は認められていない。そこで我々は、MSC の生体組織への接着性・遊走性を細胞工学的手法に改善することで、MSC の生体内の生着期間を劇的に延長させ、抗炎症作用の持続期間を伸長すると共に、本来有する多分化能を発揮させ、組織再生を誘導することが可能となると考えた。本研究では、細胞接着因子をレンチウイルスベクターによって MSC に発現させ、生着性を改良した MSC（生着能改良型 MSC）を開発する事を目的とする。

【方法】生着性の高い若齢ホスト由来の MSC と老齢ホスト由来の MSC の遺伝子発現比較を RNA-seq によって行う。その後、生着性の高い若齢ホスト由来の MSC で高発現の細胞接着分子に注目し、独自に開発した Luciferase および Venus 発現レンチウイルスベクターによって強制発現させる。回収した MSC をマウスに尾静脈注射し、*in vivo* イメージングを行うことで生体内での生着性が亢進したか測定する。

【結果】RNA-seq の解析結果から、生着性の高い若齢ホスト由来の MSC の細胞接着分子は既報の論文の生着性に寄与する分子ではなかった。そのために、人工的に MSC の生着性を亢進させることが知られている hCXCR4 および細胞の血管外輸送に機能する hPSGL1 をクローニングし、MSC に強制発現させた。しかしながら、MSC はレンチウイルスの感染効率が悪く、十分な発現誘導を行うことができなかった。最終的には PiggyBac Transposon Vector System を導入し遺伝子発現効率を向上させることに成功した。

生着性亢進型 MSC の開発



169. 細胞工学的に生着性を改変した人工幹細胞の開発

井原　大

滋賀医科大学 解剖学講座 神経形態学部門

Key words：間葉系幹細胞（MSC），細胞接着分子，生着性，遺伝子改変，再生医療

緒　言

間葉系幹細胞（MSC）は、ヒトの骨髄または脂肪組織から回収することができる中胚葉由来の幹細胞である。MSC は、自身の由来である細胞だけでなく、異なる胚葉由来である神経細胞・血管内皮細胞などの様々な細胞へ分化することができる［1］。また、MSC は高い遊走能を有しており、体内の炎症部位に自動で遊走することができる。さらに、iPS 細胞などの他の多能性幹細胞と比較して、MSC は生体移植した際のがん化のリスクが低い。これらの事実から、MSC は再生医療としての細胞療法への応用が期待されており、組織再生が必須な様々な疾患に対して臨床応用が試みられている。しかしながら、現在の臨床の現場で用いられる MSC の細胞療法としての治療効果は、細胞外に分泌する増殖因子や抗炎症性因子によるものであり［2］、本来期待されている MSC の多分化能は十分に発揮できていない。これは MSC の生体組織への生着能力が低いことが原因である。そのため、これまでに MSC の生着性を亢進させる取り組みが複数なされてきた。その 1 つとして、MSC の低酸素前処理を行うことによって、生体内での MSC 生着期間が亢進し、特発性肺線維症、心筋梗塞の治療効果を促進できることが報告された。しかし、MSC の低酸素前処理のみでは MSC 体内での生存期間の亢進による治癒効果の促進は明らかになったものの、MSC の生体組織への生着・分化については認められておらず、本来の組織再生を誘導するまでには至っていない。そこで我々は、MSC の生体組織への接着性・遊走性を細胞工学的手法に改善することで、MSC の生体内の生着期間を劇的に延長させ、抗炎症作用の持続期間を伸長すると共に、本来有する多分化能を発揮させ、組織再生を誘導することが可能となるのではないか想定した。本研究では、細胞接着因子をレンチウイルスベクターによって MSC に発現させ、生着性を改良した MSC（生着性改良型 MSC）を開発する事を目的とする。

方法および結果

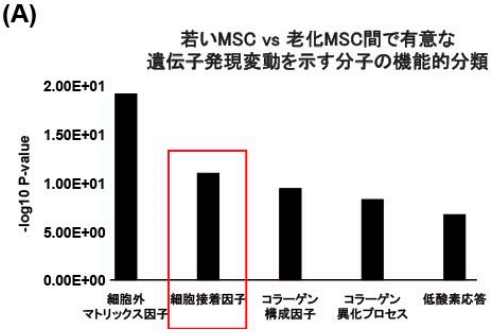
1. 細胞接着因子のクローニング

これまでに若齢ホストの MSC は、老齢ホストの MSC と比較して遊走性・接着性が高いことが報告されている［3］。我々は若齢ホストの MSC では生着性が高い原因を遺伝子発現レベルで解析するために、ヒトの若齢ホストの MSC と老齢ホストの MSC との遺伝子発現変動を RNA-seq によって比較した（図 1）。その結果、細胞接着に関連する機能を持つ遺伝子の発現変動に大きな差があった（図 1A）。

またこの結果から、細胞接着因子の中でも細胞外マトリクスであるコラーゲン等を基質とするインテグリン分子の発現変動が顕著に観察された。この結果は、MSC の生着性にはインテグリン分子が重要である事を示唆しており、インテグリン分子の強制発現によって MSC の生着性を劇的に亢進させることができると考えた。発現変動があった遺伝子の中でも、5 つのインテグリンファミリー分子の発現が細胞老化に伴い有意に低下していた（図 1B）。しかしながら、これらのインテグリン分子は細胞の接着に機能する事が報告されていなかった。そこで我々は当初の実験計画を変更した。MSC の生着性を中心に考えた際に、大きく遊走性と接着性に分類する事ができた。そこで、これらの遊走性と接着性に機能する分子として白血球の血管外輸出に機能する PSGL-1

および遊走に機能する CXCR4 のクローニングを実施した。その後、レンチウイルスベクターにクローニングした遺伝子を導入し、スクリーニングの準備を完了した。このベクターは細胞接着因子を発現させた際に、同時に蛍光蛋白質である Venus および化学発光を酵素基質反応で誘導できる Luciferase の融合タンパク質を発現させることのできるベクターであり、既に MSC へのトランスフェクションによって検証済みである（図 2）。

(A)



(B)

Gene	Fold change	FDR
ITGA4	-2.15	0.04
ITGB8	-2.43	0.07
ITGA11	-2.57	0.01
ITGAV	-3.41	0.01>
ITGA10	-6.69	0.01>

図 1. 若齢ホスト MSC と老齢ホスト MSC の遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に比較した

A） 若齢ホスト MSC と老齢ホスト MSC を回収し、遺伝子の発現レベルが有意に変動した遺伝子を Gene Ontology の Biological Process 毎にクラスタリングした。赤枠で示す様に細胞接着に機能する遺伝子の発現が有意に変動していた。

B） 細胞接着分子の主要分子であるインテグリンに関して RNA-seq の結果、老齢ホスト MSC で有意に発現が低下した分子をリスト化した。

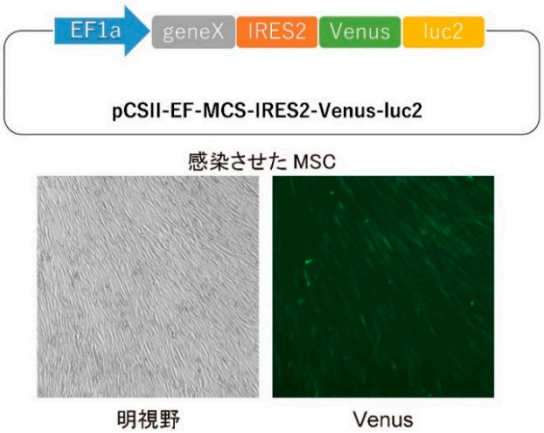


図 2. 本実験で準備した *in vivo* イメージングに使用するレポーター

EF1alpha プロモーターの下流で細胞接着分子を発現させる事ができるレポーターの図。IRES 以下で蛍光タンパク質 Venus と Luciferase2 の融合タンパク質を発現させる事ができる。実際にこれを用いてレンチウイルスを作製し、MSC に感染させた際には Venus の蛍光タンパク質が観察される（下図）。

本ベクターは Venus および Luciferase の 2 種類レポーターを使用することで、マウスの生体内での生着性評価と組織再生の評価を可能としている。

2. 生着性亢進型 MSC の作製

上記で作製したレポータープラスミドを用いてレンチウイルスを作製し、MSC に導入した。しかしながら、レポーターである Venus の蛍光は非常に軽微であった（図 2）。過去の報告から、CAG プロモーターまたは CMV プロモーターなどの別のプロモーターに切り替えることによって下流遺伝子の発現をより強力にすることで蛍光タンパク質の蛍光を観察できるのではないか検討したが、差は得られなかった（未発表データ）。最終的に我々はパッケージ容量の範囲内に収まるように IRES を P2A に変更し、Venus を EGFP に変更したレンチウイルスベクターを作製し、これを用いて MSC への感染実験を実施した。しかしながら、こちらの結果も同様に、MSC において蛍光タンパク質の蛍光輝度は非常に軽微であった。Luciferase の感度は非常に高いため、*in vivo* イメージングによるスクリーニングを実施し、本実験系で十分にスクリーニングができるか検討した。残念ながら、マウスを用いた *in vivo* イメージングによって Luciferase を発現する MSC を検出する事はできなかった（図 3）。このことから、レンチウイルスベクターを用いた実験では遺伝子導入が非常に厳しいと判断した。



図 3. 本実験計画で実施した *in vivo* イメージングの結果
6 か月例の ICR マウスに MSC を静脈注射した後に Luciferin を腹腔内投与し、*in vivo* イメージングを行った結果。左から pCSII-EF1a-MCS-IRES-EGFP-luc2 を感染させた MSC、pCSII-CMV-MCS-IRES-Venus-luc2 を感染させた MSC、pCSII-EF1a-hCXCR4-IRES- EGFP -luc2 を感染させた MSC、pCSII-EF1a-hPSGL1-IRES- EGFP-luc2 を感染させた MSC を導入した結果を示す。いずれの個体においても Luciferase 活性を検出する事はできなかった。

考　察

本実験結果では、生着性改良型 MSC の開発は達成に到らなかった。その原因として MSC にレンチウイルスを十分に感染させることができなかったことが最大の要因である。MSC にレンチウイルスを適応する事は可能であるが、Luciferase と蛍光タンパク質の 2 つを同じプラスミドに導入することでプラスミドのサイズが大きくなりレンチウイルスのパッケージ容量である 8.8 kbp を超えることになった。しかしながら、パッケージ容量を小さくしたとしても *in vivo* イメージングで Luciferase を検出する事ができるほど Luciferase を発現させることができず、実験手法を全体的に変更する事が余儀なくされた。本実験計画にはなかったが、PiggyBac Transposon Vector System を導入した。本ベクターは現在も設計中であるが、大幅に遺伝子発現を改善させることが期待される。現在は Luciferase のサブクローニングなどを行い、Vector 調製中であるが既に MSC への TransIT-X2® Dynamic Delivery System を用いたトランスフェクションも実施しており、十分な遺伝子導入効率が確認できている。その他の実験試料も十分に備わっているため、今後 *in vivo* イメージングで検証を重ねていく。

文　献

1） Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143. PubMed PMID: 10102814.

2） Cheng Z, Ou L, Zhou X, Li F, Jia X, Zhang Y, et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. Mol Ther. 2008;16(3):571-9. Epub 20080205. doi: 10.1038/sj.mt.6300374. PubMed PMID: 18253156.

3） Chen H, Liu O, Chen S, Zhou Y. Aging and Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Opportunities and Challenges in the Older Group. Gerontology. 2022;68(3):339-52. Epub 20210623. doi: 10.1159/000516668. PubMed PMID: 34161948; PubMed Central PMCID: PMC8985028.