

ヒト間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析
—無血清培地を用いた *in vitro* 培養期間中の遺伝子発現の変化について—

澤田留美,^{*,a} 山田貴史,^a 土屋利江,^b 松岡厚子^a

A Microarray Analysis of the Effects of Serum-free Medium on Gene Expression Changes in Human Mesenchymal Stem Cells during the *in Vitro* Culture

Rumi SAWADA,^{*,a} Takashi YAMADA,^a Toshie TSUCHIYA,^b and Atsuko MATSUOKA^a

^aDivision of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, and ^bMedical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, 2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received June 18, 2010; Accepted July 5, 2010; Published online July 6, 2010)

We examined the effects of serum-free medium on the gene expression changes in human mesenchymal stem cells (hMSCs) during the *in vitro* culture using a DNA microarray analysis. In this study, we cultured hMSCs with two kinds of medium; 1) MSCGM (contain 10% fetal bovine serum) or 2) STK2 (serum-free medium developed for mesenchymal stem cells multiplication), and compared hMSCs proliferation, cell morphology, and gene expression changes until 50 days culture. Expression analysis was performed with Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. hMSC proliferation was significantly higher in STK2 medium than in MSCGM medium. The cell morphology of hMSC cultured with STK2 was not significantly changed in 50 days culture. The gene expression changes in hMSCs during the *in vitro* culture were significantly higher in STK2 than in MSCGM. After 50 days culture, 1991 genes were significantly changed the expression levels compared with 3 days in STK2 but not MSCGM. The expressions of genes related to cell cycle, cancer, proliferation, and cell growth were significantly changed by STK2 for 50 days culture. It was also changed by STK2 that the expressions of genes related to the signaling pathways contain various growth factors, such as IGF-1, FGF, TGF- β , EGF, proliferation, and cell cycle. These results suggest that STK2 may be useful to obtain an enough number of hMSC cells for tissue engineered medical devices in short-term, however, it should be recognized that STK2 would alter the expressions of genes related to a variety of signaling pathways in hMSC if the culture period would be extended to obtain a large number of cells.

Key words—human mesenchymal stem cell; gene expression; serum-free medium; proliferation; *in vitro* culture

緒 言

近年、iPS細胞樹立の発表が世界的に脚光を浴び、iPS細胞の再生医療への応用に大きな期待が寄せられている。しかしながら、iPS細胞は「万能」と呼ばれる多分化能を持つ一方で、組織再生の目的に沿ったiPS細胞の適切な作製法や制御法の確立の必要性、さらにはがん化の可能性といった安全性の問題もあり、再生医療への臨床応用や実用化にはまだ少し時間を要するであろう。一方、成体幹細胞の一種である間葉系幹細胞は、骨、軟骨、筋、腱、脂肪、さらには神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚葉を

越えた分化も報告されており幅広い再生医療分野での利用が期待され、実用化に向けた研究開発が進められている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞が、その採取技術及び*in vitro*での培養技術も確立されており、細胞組織医療機器の材料として現段階で最も実用に近いものの1つであると考えられる。実際に細胞組織医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して*in vitro*で培養して増殖させるという工程を経なければならないため、*in vitro*での培養期間中に幹細胞が目的以外の形質を持った細胞に変化しないことを確認し、患者に戻される細胞の安全性を担保する方法を確立することは大変重要であろう。

*in vitro*での様々な細胞培養条件は間葉系幹細胞の性質に影響を及ぼすため、本研究では細胞の培養

^a国立医薬品食品衛生研究所医療機器部, ^b大阪大学医学部附属病院未来医療センター

*e-mail: rsawada@nihs.go.jp

液に着目し *in vitro* 培養による細胞の変化について検討した。間葉系幹細胞の培養には一般的に牛血清又は自家ヒト血清が培地に添加されるが、牛血清使用による病原性ウイルスやプリオンなどの混入の危険性やヒト血清使用のための患者への身体的負担等の回避のために無血清培地を用いる方法も検討されており、間葉系幹細胞の増殖培養に適した無血清培地も研究開発されている。^{1,2)} そこで本研究では、間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された無血清培地を用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を細胞組織医療機器の材料として臨床現場で利用されることを想定した *in vitro* 培養期間 (50 日以内) を設定して培養し、このような短期間でも培養期間中に細胞に変化が生じるのかどうか調べるために、増殖能、細胞の形態を検討するとともに、網羅的遺伝子発現解析を行い遺伝子発現の変化について検討した。

実験方法

1. 細胞及び培養 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) (Lonza Walkersville, Inc.) を、1) Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) (Lonza Walkersville, Inc.) : Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (10% 牛胎児血清を含む) 又は 2) STK2 (DS ファーマバイオメディカル) : 間葉系幹細胞用無血清培地でそれぞれ培養した。無血清培地である STK2 は、間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された培地であり、FGF, PDGF などの成長因子が添加されている。培養期間は、実際に細胞組織医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し妥当な培養期間 (多少長めに設定し 50 日以内) とした。

2. Total mRNA の調製 培養期間が 3 日間、20 日間、50 日間の細胞からそれぞれ RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。

3. 網羅的遺伝子発現解析 2 種類の培地 (MSCGM 又は STK2) にてそれぞれの期間培養した hMSC から調製した totalRNA を用いて、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。それぞれ Technical replicate (Duplicate) にて行った。遺伝子発現解析は、GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent Technologies) を用いて行った。パスウェイ解析は、

Ingenuity Pathway Analysis Software (Ingenuity Systems) を用いて行った。

結 果

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を、10% 牛胎児血清を含む培地 (MSCGM) と無血清培地 (STK2) それぞれの培地で培養した際の増殖曲線を Fig. 1 に示す。hMSC の増殖能は STK2 の方が MSCGM に比べて著しく高かった。MSCGM では 50 日間の培養で約 14000 倍の細胞を得られたが、STK2 では 20 日間で得られており、STK2 を用いることにより MSCGM と比較して 30 日間の培養期間短縮が可能であった。

さらに、hMSC の培養 50 日以内の細胞形態の変化についてそれぞれの培地による影響を比較した。Figure 2 に各培養期間の hMSC の位相差顕微鏡像を示す。培養期間 28 日頃までは培養期間及び培地による細胞形態の変化はあまりみられなかった。培養 50 日後の hMSC は、STK2 では培養初期の形態を比較的保っていたが、MSCGM では細胞が少し広がり扁平化しているのが観察された。

次に、hMSC における *in vitro* 培養 50 日以内の遺伝子発現の変化について、MSCGM と STK2 とを比較した。まずは、培養開始時としてそれぞれ培養 3 日における mRNA 発現レベルを 1 とし、20 日、50 日における変化を Fig. 3 に示した。50 日間の培養期間中のそれぞれの遺伝子発現の変化は、STK2 の方が MSCGM よりも非常に大きかった。実際に

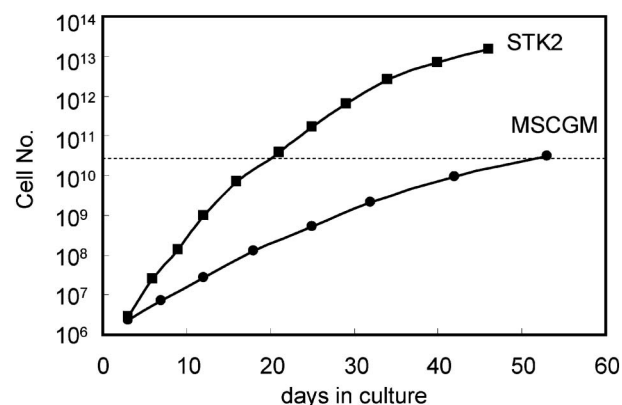


Fig. 1. Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)

hMSCs were cultured in MSCGM or STK2. They were seeded at a density of 6000 cells/cm² and when they were just subconfluent, they were subcultured and the number of cells was counted.

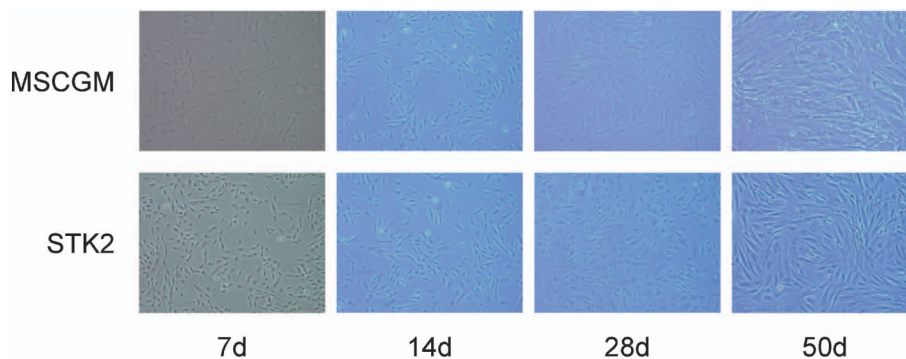


Fig. 2. Cell Morphology of hMSCs Cultured in MSCGM or STK2
They were observed in 7, 14, 28, and 50 days.

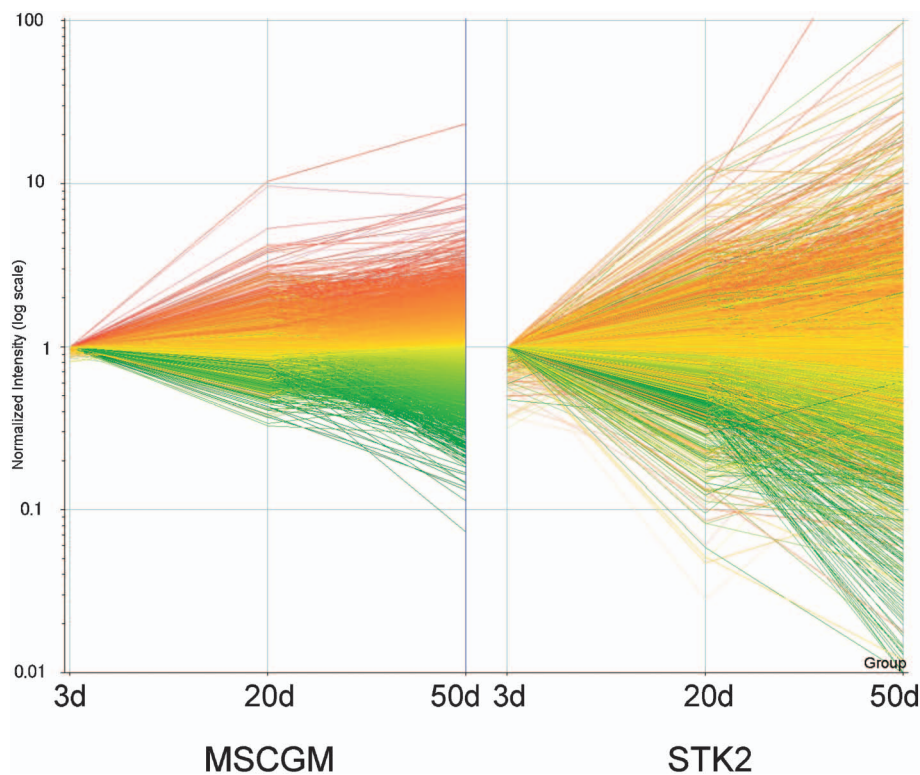


Fig. 3. Changes in Gene Expressions of hMSCs Cultured in MSCGM or STK2 during the *in Vitro* Culture
Each mRNA expression in hMSCs for 3 days culture is expressed as 1, and those for 20 and 50 days are expressed relative to that for 3 days.

培養開始時と比較して有意 (2 倍以上又は 1/2 以下) に mRNA 発現が変化した遺伝子数を Fig. 4 に示した. どちらの培地を用いた場合でも, 培養開始時と比較して有意に mRNA 発現が変化した遺伝子数は培養日数に依存して増加した. hMSC 培養 20 日, 50 日それぞれにおいて, 有意に mRNA 発現レベルが変化した遺伝子数は STK2 の方が多く, 培養 50 日では 2000 以上の遺伝子の発現レベルが培養開始時と比較して有意に変化していた. 有意に変化した遺伝子数は, MSCGM での培養 50 日と STK2 での

培養 20 日とがほぼ同程度であった.

では, このように *in vitro* 培養過程でその発現レベルが変化した遺伝子は, どのような性質 (機能) を持つ遺伝子なのだろうか? 変化した遺伝子をそれぞれ抽出してリスト化し, GeneSpring GX 7.3.1 にて変化した遺伝子群と同様の機能を持つ遺伝子群を検索することによって hMSC の *in vitro* 培養過程でどのような機能を持つ遺伝子群が変化したのか検討した. それぞれの培地で 20 日及び 50 日間培養した際に培養開始時と比較して有意に変化した遺伝

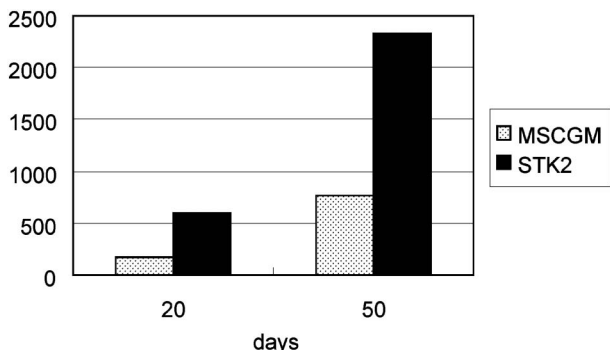


Fig. 4. Number of Genes Whose mRNA Expressions in hMSCs Were Significantly Different from Those for 3 Days Culture

Table 1. The Similar Gene Lists to the Genes Whose mRNA Expressions Significantly Changed during the *in Vitro* Culture of hMSCs

culture period (days)	Media	Number of Genes	Similar List ^a	overlap	p-value
20	MSCGM	174	—	—	—
	STK2	603 (395)	Cell Cycle	73	5.35E-23
			Cancer	121	5.26E-21
			Proliferation	54	1.08E-08
			(Cancer)	(69)	(1.38E-08)
			(Proliferation)	(32)	(9.56E-04)
50	MSCGM	762	Cell Cycle Proliferation Cancer	101 75 117	8.15E-34 1.01E-14 3.57E-11
	STK2	2329 (1991)	Cancer	318	1.37E-23
			Cell Cycle	152	3.92E-17
			Proliferation	151	2.60E-13
			Cell Growth	40	1.33E-02
			(Cancer)	(259)	(4.40E-16)
			(Proliferation)	(116)	(4.52E-07)
	(Cell Cycle)	(94)	(2.90E-03)		

^a The name of lists that resemble the selected list or contain a statistically significant number of overlapping genes. The overlap is calculated using a standard Fisher's exact test and the p-value is adjusted with a Bonferroni multiple testing correction.

子数と、それぞれの遺伝子群に有意に重複する遺伝子群を Similar List として Table 1 に示した。() 内は、STK2 培養により変化した遺伝子のうち、MSCGM では有意な変化がみられず STK2 でのみ有意な変化がみられた遺伝子について表した。STK2 培養では、20 日の培養から Cell Cycle, Cancer, Proliferation に係わる遺伝子の発現に変化がみられ、50 日では遺伝子数の増加に伴いさらに Cell

Growth に係わる遺伝子に変化が認められた。STK2 のみで変化した遺伝子は、50 日では 2000 近く確認された。MSCGM 培養では、50 日間で Cell Cycle, Proliferation, Cancer に係わる遺伝子の変化がみられた。次に、MSCGM では 50 日間の培養中にその mRNA 発現に変化がなかった遺伝子のうち STK2 では *in vitro* 培養により有意に変化した遺伝子群について、どのようなパスウェイに係わる遺伝子に変化しているのか調べた。Ingenuity Pathway Analysis により検討し、Table 2 に上位 20 のパスウェイとそこに含まれる遺伝子を示した。IGF-1, FGF, TGF- β , EGF, HGF, PDGF, MYC, JUN, SMAD3, TP53 等、様々な成長因子や細胞増殖又は細胞周期等に係わる遺伝子の発現が変化しており、多くのシグナル伝達系が STK2 培養によって変化することがわかった。

考 察

様々な疾病などによる組織や器官の機能不全に対して組織再生又は機能回復を目指した「再生医療」の早期実現が待望されており、現在その材料の 1 つとして間葉系幹細胞の有用性が期待されている。幹細胞の大きな特徴としては、多分化能を保ちつつ増殖能を持つ点であり、実際に再生医療を目的として幹細胞を利用するためには幹細胞を体内から取り出した後、必要細胞数まで *in vitro* で培養して増殖させなければならない。安全性の観点から最も懸念されるのは、*in vitro* 培養中の細胞のがん化である。これまで、脂肪由来³⁾又は骨髄由来⁴⁾の間葉系幹細胞を 4,5 ヶ月-2 年といった長期間培養することによって細胞のがん化が起こるといった報告がある一方で、骨髄由来⁵⁾でも脂肪由来⁶⁾でも hMSC の長期培養による形質転換はみられないとの報告もなされている。これらの報告の違いは、細胞のドナーの個体差も大きく係わるとも考えられる。実際、hMSC の多くが早いものでは 5 週間程度の培養期間で細胞老化の現象を示す。いずれにしろ、*in vitro* 培養期間が短い方ががん化のような好ましくない変化の可能性をより低減できると考えてよいであろう。そのためには短期でより多くの細胞を得る必要があり、その目的に合った培養条件は重要なポイントである。本研究で用いた無血清培地 (STK2) は、牛血清使用による危険性の回避と同時に間葉系幹細胞の

Table 2. The Related Pathways to the Pathways that Contain Any of the Genes Whose mRNA Expressions Significantly Changed during the *in Vitro* Culture of hMSCs

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	Molecules
IGF-1 Signaling	1.38E-05	IGFBP6, NRAS, CTGF, YWHAH, PIK3R1, IGFBP7, NEDD4, PIK3R3, JUN, FOXO3, MRAS, IGFBP3, IRS2, SFN
Hepatic Fibrosis/Hepatic Stellate Cell Activation	2.00E-05	CTGF, TGFBR1, FGF2, SMAD3, ACTA2, SMAD7, VEGFC, FAS, TGFBR2, MYL9 (includes EG:10398), VEGFA, CSF1, HGF, IGFBP3, PDGFRA, EDNRA, EGFR
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	2.63E-05	DNAJB12, NRAS, PIK3R1, ACTA2, MAP3K1, DNAJC13, GCLC, MAP3K5 (includes EG:4217), TXNRD1, PIK3R3, SOD2, JUN, ABCC1, MRAS, CCT7, MAP2K3, AOX1, SQSTM1, GCLM, PRKD1
Acute Phase Response Signaling	7.76E-05	IL6ST, TCF4, NRAS, C1S, PIK3R1, MAP3K1, SERPINF1, BCL3, MAP3K5 (includes EG:4217), NR3C1, C1R, PIK3R3, JUN, SOD2, NFKBIA, MRAS, MAP2K3, SERPINE1, SOCS5
Antigen Presentation Pathway	1.26E-04	PSMB9, HLA-A, HLA-B, PSMB8, HLA-G, HLA-C, HLA-F
Virus Entry <i>via</i> Endocytic Pathways	2.04E-04	PIK3R3, FLNB, NRAS, HLA-A, PIK3R1, ACTA2, MRAS, HLA-B, AP1B1, PRKD1, HLA-C, FOLR1
p53 Signaling	2.82E-04	PIK3R3, JUN, GADD45B, THBS1, FASN, PIK3R1, PERP, C12ORF5, SFN, HIPK2, SERPINE2, TP53I3
PI3K/AKT Signaling	2.88E-04	NRAS, YWHAH, PIK3R1, BCL3, MAP3K5 (includes EG:4217), EIF4EBP1, PIK3R3, NFKBIA, GAB1, PPP2R3A, FOXO3, MRAS, HLA-B, SFN
Neurotrophin/TRK Signaling	3.72E-04	PIK3R3, JUN, NRAS, GAB1, BDNF, SPRY2, PIK3R1, MRAS, MAP2K3, MAP3K5 (includes EG:4217)
TGF- β Signaling	4.17E-04	TGFBR2, JUN, NRAS, TGFBR1, SMAD3, SMAD7, MRAS, SMURF2, VDR, SERPINE1, INHBA
Glutamate Metabolism	7.94E-04	EARS2, GLS, CCDC92 (includes EG:80212), GLUL, GCLC, GCLM, GOT2
LPS-stimulated MAPK Signaling	8.51E-04	PIK3R3, JUN, NRAS, NFKBIA, PIK3R1, MRAS, BCL3, MAP2K3, MAP3K5 (includes EG:4217), PRKD1
Biosynthesis of Steroids	9.33E-04	FDPS, SQLE, FDFT1, IDI1, LSS, SC5DL
Thrombopoietin Signaling	1.82E-03	PIK3R3, MYC, JUN, NRAS, PIK3R1, MRAS, IRS2, PRKD1
Insulin Receptor Signaling	1.95E-03	NRAS, PIK3R1, ACLY, EIF4EBP1, PIK3R3, GAB1, PPP1R7, FOXO3, PTPN1, MRAS, HLA-B, IRS2, STX4
CD27 Signaling in Lymphocytes	2.00E-03	JUN, NFKBIA, MAP3K1, BCL3, MAP2K3, TRAF5, MAP3K5 (includes EG:4217)
B Cell Receptor Signaling	2.24E-03	CALM3, NRAS, PIK3R1, MAP3K1, BCL3, MAP3K5 (includes EG:4217), PIK3R3, JUN, NFKBIA, GAB1, BCL10, MRAS, LYN, MAP2K3
Nucleotide Sugars Metabolism	2.29E-03	UGDH, UGP2, GLCE
NF- κ B Activation by Viruses	3.16E-03	PIK3R3, NRAS, NFKBIA, PIK3R1, MAP3K1, ITGAV, MRAS, BCL3, PRKD1
Neuregulin Signaling	3.31E-03	PIK3R3, MYC, NRAS, PIK3R1, DCN, MRAS, HBEGF, ERFF1, PRKD1, EGFR

増殖培養に適した培地として開発されたものである。そこで本研究では、この STK2 を用いて、hMSC を実際に細胞組織医療機器の材料として用いる場合を想定した妥当な培養期間内（50 日以内）で培養し、このような短期間でも hMSC に変化が生じるのかどうか調べるために、増殖能、細胞の形態、遺伝子発現について検討した。

hMSC の増殖能については STK2 の方が MSCGM に比べて著しく高かった (Fig. 1)。MSCGM では

50 日間で約 14000 倍の細胞を得られたが、STK2 では 20 日間で得られており、STK2 は MSCGM が 50 日間の培養で得られる細胞数を 1 ヶ月程度短い培養期間で得られることがわかった。また、われわれはこれまでに MSCGM 以外の牛血清使用培地 (DMEM) と比較しても STK2 の方が hMSC の増殖能が高かったことを確認している。⁷⁾ 細胞形態の変化については、培養 50 日後の hMSC は、STK2 では MSCGM と比較して培養初期の形態を比較的保っていたが、

MSCGM では細胞が少し広がり扁平化しているのが観察された (Fig. 2). 一方, 50 日間の hMSC 培養期間中のそれぞれの遺伝子発現の変化は, STK2の方が MSCGM よりも非常に大きかった (Figs. 3 and 4). これまでにわれわれは本研究で用いた hMSC とは別の複数のロットを用いて MSCGM での培養における遺伝子発現の変化について検討している⁸⁾が, どのロットの hMSC も本研究における MSCGM 培養と同様な変化の程度であった. またどちらの培地を用いた場合でも, 培養開始時と比較して有意に mRNA 発現が変化した遺伝子数は培養日数に依存して増加した (Figs. 3 and 4). このように STK2 による 50 日間の *in vitro* 培養では, 細胞の形態に MSCGM と比較して一見変化がみられなかったものの, 遺伝子発現は培養開始時に比べて大きく変化しており, 20 日間培養と比較しても変化した遺伝子数は約 4 倍にも増加していた. さらに, STK2 による培養により変化した遺伝子は Cell cycle, Proliferation, Cancer に係わる遺伝子が多く (Table 1), また, FGF, TGF- β , EGF など様々な成長因子に係わるシグナル伝達系が変化していた (Table 2). これらの変化は, STK2 では MSCGM と比較して hMSC 増殖能が上昇したことに関連する変化であろう. STK2 での 20 日間培養時と MSCGM の 50 日間培養時ではどちらも同レベル (約 14000 倍) の細胞が得られており (Fig. 1) かつ遺伝子発現の変化の程度も同レベルであった (Fig. 4) ことから窺える. そして, MSCGM と比較して STK2 では細胞の形態変化はあまりみられない培養期間においても細胞の性質が変化している可能性も示唆された. 細胞組織医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いるためにはその必要細胞数を得るために体内から細胞を取り出したのち *in vitro* での増殖培養過程を経なければならない. *in vitro* での培養は, 細胞にとってある種のストレスとなることは明らかで, その期間が短い方がよいであろうことは容易に想像できる. その点, STK2 培養により MSCGM と比較して短期間で多くの細胞を得ることができるのは大きな利点であると思われる. 短期間培養で同じ細胞数を得られることは, 患者の治療に緊急を要する場合には特に望まれることである. しかしながら, より多くの細胞を得るために STK2 での培養期間を伸ばしていくとそれに伴い遺

伝子発現等の変化がより大きくなることも認識すべきであろう.

本研究の結果から, 間葉系幹細胞培養用無血清培地 STK2 は, *in vitro* の培養期間を短縮するのに有効であるが, 使用の際に培養期間を延長することにより細胞の性質が変化する可能性も否定できないことがわかった. 体内から取り出してきた細胞と細胞組織医療機器の材料として用いられる際の細胞の性質が全く変化していないことが理想ではあるが, 現実的には, *in vitro* 培養過程において細胞にどのような変化が起こっているのかを認識することが重要であり, その上で, その変化をなるべく抑えるにはどのような培養条件で行うのがよいのか等を検討すべきであろう. 間葉系幹細胞だけでなく iPS 細胞も含む再生医療分野において, 血清を含まない合成培地開発が重要研究課題の 1 つとなっている. 今後は, 様々な研究機関により開発された無血清培地を用いることによって得られた細胞の安全性や再生能力等の有効性などの品質レベルが問われることになるだろう.

謝辞 本研究は, NEDO 「基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発/間葉系幹細胞を用いた再生医療早期実用化のための橋渡しプロジェクト」にて実施された研究の一部である.

REFERENCES

- 1) Mannello F., Tonti G. A., *Stem Cells*, **25**, 1603-1609 (2007).
- 2) Liu C.-H., Wu M.-L., Hwang S.-M., *Biochem. Eng. J.*, **33**, 1-9 (2007).
- 3) Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A., *Cancer Res.*, **65**, 3035-3039 (2005).
- 4) Røslund G. V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCracken E., Immervoll H., Mysliwicz J., Tonn J.-C., Goldbrunner R., Lønning P. E., Bjerkvig R., Schichr C., *Cancer Res.*, **69**, 5331-5339 (2009).
- 5) Bernardo M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cmeta A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M. G., Zuffardi O., Locatelli F., *Cancer Res.*, **67**, 9142-9149 (2007).
- 6) Merza-Zepeda L. A., Noer A., Dahl J. A.,

-
- Micci F., Myklebost O., Collas P., *J. Cell Mol. Med.*, **12**, 553–563 (2008).
- 7) Ishikawa I., Sawada R., Kato Y., Tsuji K., Shao J., Yamada T. Kato R., Tsuchiya T., *Yakugaku Zasshi*, **129**, 381–384 (2009).
- 8) Sawada R., Matsuoka A., Matsuda Y., Tsuchiya T., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1851–1856 (2008).