

- plasma mass spectrometry detection: Estimation of daily dietary intake. *Food Addit Contam* 2003;20:44–56.
9. Ysart G, Miller P, Croasdale M, Crews H, Robb P, Baxter M, de L'Argy C, Harrison N. 1997 UK Total Diet Study—Dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. *Food Addit Contam* 2000;17:775–786.
  10. Jonker D, Woutersen RA, van Bladeren PJ, Til HP, Feron VJ. Four-week oral toxicity study of a combination of eight chemicals in rats: Comparison with the toxicity of the individual compounds. *Food Chem Toxicol* 1990;28:623–631.
  11. Yokel RA. Blood–brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 2006;10:223–253.
  12. Zheng W. Neurotoxicology of the brain barrier system: New implications. *J Toxcol* 2001;9:711–719.
  13. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press; 1986.
  14. Volonte C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G. Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003;2:403–412.
  15. Nadler JV. Role of excitatory pathways in the hippocampal damage produced by kainic acid. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981;27:395–402.
  16. Anderson MC, Chung E, Van Woert MH. Strychnine seizure potentiation by azaspirodecanedione anxiolytics in rats. *Eur J Pharmacol* 1988;155:279–283.
  17. Narahashi T, Frey JM, Ginsburg JS, Roy ML. Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicol Lett* 1992;64/65:429–436.
  18. Bouwknecht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behavior: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull* 2007;72:32–43.
  19. Liu Y, Nakamura S. Stress-induced plasticity of monoamine axons. *Front Biosci* 2006;11:1794–1801.
  20. Chaney DS. Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry* 1998;59:11–14.
  21. Schultz W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 2007;30:203–210.
  22. Taylor DP, Riblet LA, Stanton HC, Eison AS, Temple DL. Dopamine and antianxiety activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1982;17:25–35.
  23. Blows WT. Neurotransmitters of the brain: Serotonin, nor-adrenaline (norepinephrine), and dopamine. *J Neurosci Nurs* 2000;32:234–238.
  24. Tessitore A, Hariri RA, Fera F, Smith GW, Chase NT, Hyde MT, Weindenger RD, Mattay SV. Dopamine modulates the response of the human amygdala: A study in Parkinson's disease. *J Neurosci* 2002;22:9099–9103.
  25. Prediger RD, Batista LC, Medeiros R, Pandolfo P, Florio JC, Takahashi R. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2006;202:391–403.
  26. Carlezon WA, Begin C, DiNieri JA, Baumann MH, Richards MR, Todtenkopf MS, Rothman RB, Ma Z, Lee DY, Cohen BM. Depressive-like effects of the  $\kappa$ -opioid receptor agonist salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:440–447.
  27. Olson EB, Morgan WP. Rat brain monoamine levels related to behavioral assessment. *Life Sci* 1982;30:2095–2100.
  28. Checkley S. Monoamine, depression and antidepressant drugs. *Pharmacopsychiatry* 1988;21:6–8.

## FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- $\beta$ signaling

Tomomi Ito · Rumi Sawada · Yoko Fujiwara ·  
Toshie Tsuchiya

Received: 29 December 2006 / Accepted: 1 September 2007 / Published online: 18 October 2007  
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

**Abstract** Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are able to self-replicate and differentiate into a variety of cell types including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, endothelial cells, and muscle cells. It was reported that fibroblast growth factor-2 (FGF-2) increased the growth rate and multidifferentiation potentials of hMSCs. In this study, we investigated the genes involved in the promotion of osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of hMSCs in the presence of FGF-2. hMSCs were maintained in the medium with FGF-2. hMSCs were harvested for the study of osteogenic or chondrogenic differentiation potential after 15 days' culture. To investigate osteogenic differentiation, the protein levels of alkaline phosphatase (ALP) and the mRNA expression levels of osteocalcin were measured after the induction of osteogenic differentiation. Moreover, the investigation for chondrogenic differentiation was performed by measuring the mRNA expression levels of type II and type X collagens after the induction of chondrogenic differentiation. The

expression levels of ALP, type II collagen, and type X collagen of hMSCs cultured with FGF-2 were significantly higher than control. These results suggested that FGF-2 increased osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of hMSCs. Furthermore, microarray analysis was performed after 15 days' culture in the medium with FGF-2. We found that the overall insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathways were inactivated by FGF-2. These results suggested that the inactivation of IGF-I and TGF- $\beta$  signaling promotes osteogenic and chondrogenic differentiation potential of hMSCs in the presence of FGF-2.

**Keywords** Mesenchymal stem cells · Fibroblast growth factor-2 · Insulin-like growth factor-I · Transforming growth factor- $\beta$  · Osteogenic differentiation · Chondrogenic differentiation

### Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are able to self-replicate and differentiate into a variety of cell types such as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and smooth muscle cells (Caplan et al. 2001; Pittenger et al. 1999; Wakitani et al. 1995). Based on these qualities of MSCs, the regeneration of bone and cartilage has been studied (Ochi et al. 2004; Petite et al. 2000). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is

T. Ito · R. Sawada · T. Tsuchiya (✉)  
Division of Medical Devices, National Institute of Health  
Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158-8501, Japan  
e-mail: tsuchiya@nihs.go.jp

T. Ito · Y. Fujiwara  
Graduate School of Humanities and Sciences,  
Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku,  
Tokyo 112-8610, Japan

involved in angiogenesis and tissue repair. It was reported that the abilities of hMSCs to differentiate into osteoblasts and chondrocytes decreased with long-term subculture *in vitro*; however, FGF-2 increased the potential for osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiation of human MSCs (hMSCs) (Kakudo et al. 2007; Quarto et al. 2006; Solchaga et al. 2005; Tsutsumi et al. 2001). Our previous studies showed that the ability of hMSCs proliferation was decreased by long-term subculture *in vitro*, during which the expression level of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mRNA was increased (Sawada et al. 2006). Furthermore, we also showed that FGF-2 suppressed the decrease of hMSCs proliferation by down-regulation of TGF- $\beta$ 2 (Ito et al. 2007). In this study, we investigated the relation between the TGF- $\beta$  signaling and the promotion of osteogenic and chondrogenic differentiations of hMSCs induced by FGF-2.

## Materials and methods

### Cell culture

hMSCs were obtained from Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. (Walkersville, MD) and seeded in MSCGM medium (Cambrex Bio Science Walkersville) at 5,000 cells/cm<sup>2</sup> with or without FGF-2 (BD Biosciences, Bedford, MA). The first passage was regarded as the third generation because the cells were secondary cultures when they were obtained. The cells were maintained in humidified incubators at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. FGF-2 was added to the culture medium at the final concentration of 1 ng/ml, and the medium were changed every 2–3 days.

### Cell differentiation

The culture medium was replaced with a specific differentiation-inducing medium after hMSCs were cultured in the medium with or without FGF-2 for 15 days. For osteogenic differentiation, hMSCs were cultured in Differentiation Basal Medium-Osteogenic medium (Cambrex Bio Science Walkersville) at 3,100 cells/cm<sup>2</sup> and maintained for 21 days. For chondrogenic differentiation, hMSCs were cultured in Differentiation Basal Medium-Chondrogenic

medium (Cambrex Bio Science Walkersville) supplemented with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 at  $2.5 \times 10^5$  cells per 15 ml polypropylene tube and maintained for 21 days. The medium was changed every 2–3 days.

### Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from hMSCs using Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan) following the manufacturer's protocol. The first-strand cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). Using the cDNAs as templates, PCRs of GAPDH, type II collagen, and type X collagen were performed for 40 cycles under the following conditions: denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 68 °C for 10 s, and extension at 72 °C for 16 s; of osteocalcin: denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 62 °C for 15 s, and extension at 72 °C for 6 s using the LightCycler Real-time PCR System (Roche Diagnostics). The primers for GAPDH, type II collagen, and type X collagen from a LightCycler-Primer Set (Search LC GmbH, Heidelberg, Germany) were used. The primer for osteocalcin was from a LightCycler-Primer/Probes Set (Search LC GmbH).

### Protein levels of alkaline phosphatase

After the induction of osteogenic differentiation, the protein levels of alkaline phosphatase of hMSCs were determined using Osteolinks-BAP (DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan).

### DNA microarray analysis

Total RNA was isolated using Isogen following the manufacturer's protocol after hMSCs were cultured in the medium with or without FGF-2 for 15 days. One microgram of total RNA was used in each microarray experiment. cDNA and cRNA were made using Affymetrix's Two-Cycle cDNA Synthesis and IVT Labeling Kits (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). cRNAs were hybridized to an Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. After hybridization, GeneChips were washed and

stained using the GeneChip Fluidics station and scanned in a GeneChip Scanner. Gene expression data were loaded into GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), then normalized and filtered by the flags of Present or Marginal and the expression levels. Furthermore, the passed genes were performed by Ingenuity Pathway Analysis.

#### Statistical analysis

Statistical evaluation was performed with the Student's *t* test. A *p*-value of less than 0.05 was considered significant. Values are presented as means  $\pm$  SD.

### Results

#### FGF-2 increased the potentials for the osteogenic and chondrogenic differentiation of hMSCs

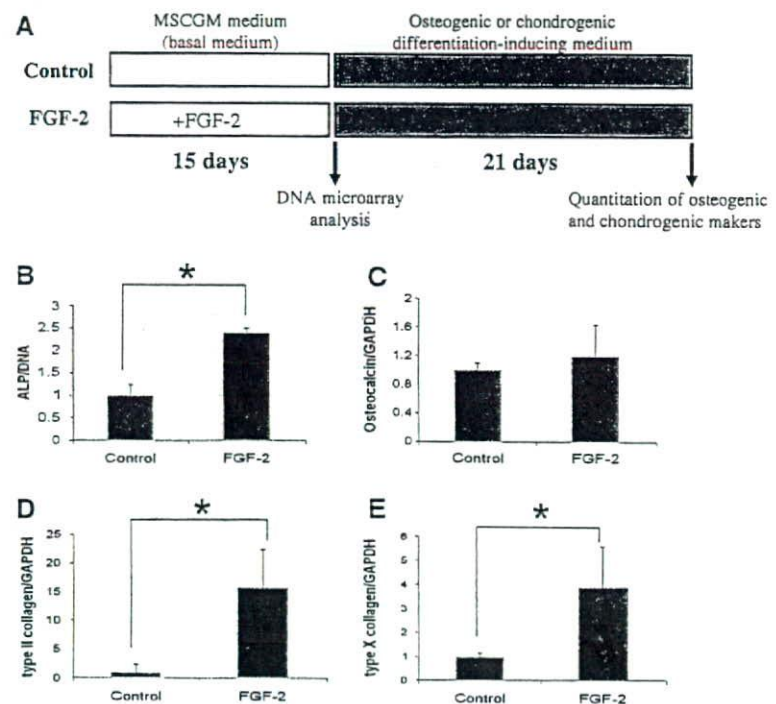
To investigate the effects of FGF-2 on osteogenic and chondrogenic differentiation, hMSCs were maintained in MSCGM medium with or without FGF-2 for 15 days, then osteogenic or chondrogenic differentiation of the hMSCs was induced individually for

21 days (Fig. 1A). Then we measured the protein expression levels of alkaline phosphatase (ALP) and the mRNA expression levels of osteocalcin to investigate the osteogenic differentiation potential. We also measured type II collagen and type X collagen to investigate the chondrogenic differentiation potential. FGF-2 increased the protein expression level of ALP (Fig. 1B). FGF-2, however, did not affect the mRNA expression levels of osteocalcin (Fig. 1C). On the other hand, FGF-2 increased the mRNA expression levels of type II collagen and type X collagen (Fig. 1D and 1E). These results suggested that FGF-2 increased the potentials for osteogenic and chondrogenic differentiation of hMSCs.

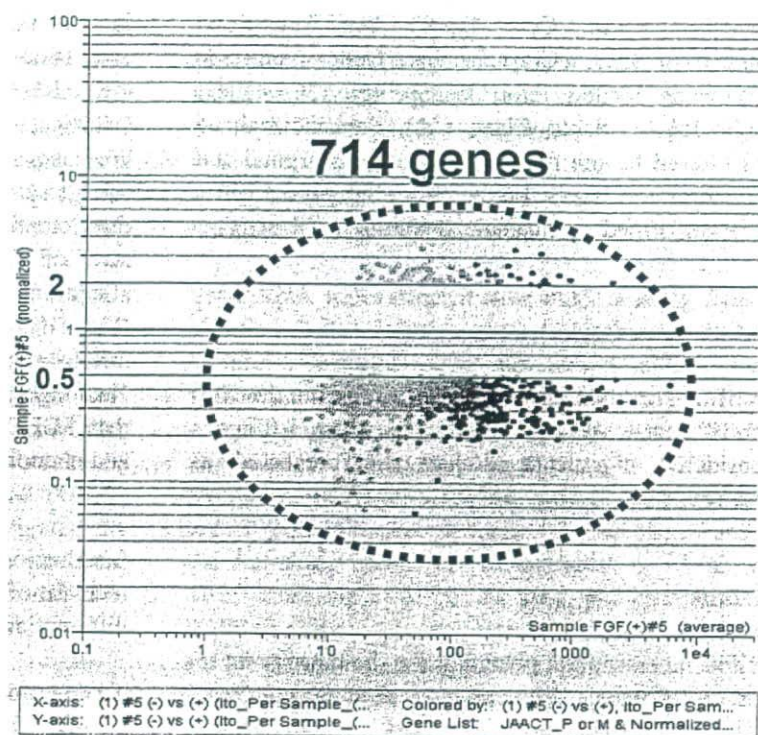
Inactivation of TGF- $\beta$  signaling contributed to the increase of osteogenic and chondrogenic differentiation potentials in the presence of FGF-2

To determine the genes that contribute to the increase of differentiation potentials of hMSCs by FGF-2, we extracted the genes of hMSCs that were up-regulated (>2 fold) or down-regulated (<1/2 fold) by FGF-2 using microarray analysis. It was performed before the induction of osteogenic and chondrogenic differentiation in hMSCs. Seven-hundred and fourteen

**Fig. 1** Experimental protocol and quantitation of osteogenic and chondrogenic markers. hMSCs were maintained in the medium with or without FGF-2 for 15 day, and osteogenic or chondrogenic differentiation of hMSCs was induced for 21 days (A). Then, the protein levels of ALP (B), the mRNA expression levels of osteocalcin (C), type II collagen (D) and type X collagen (E) were measured



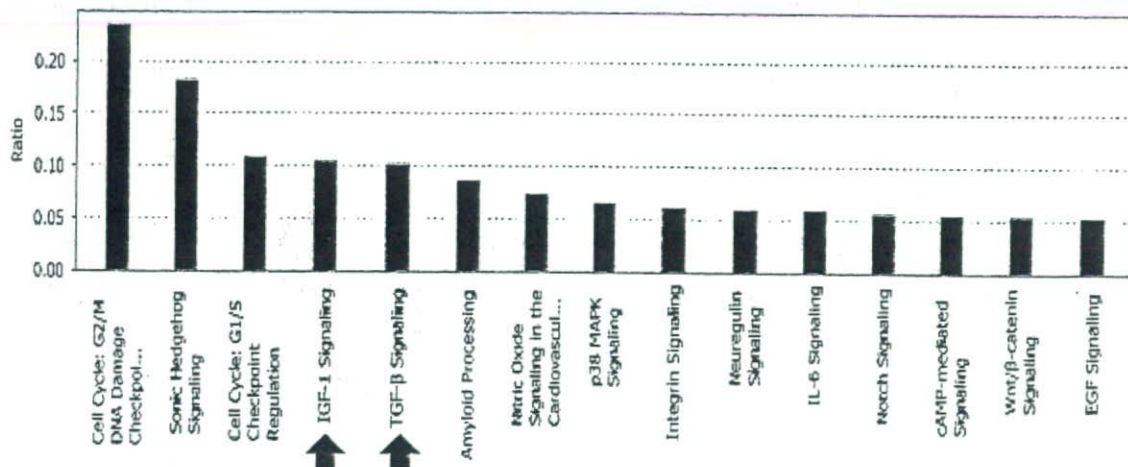
**Fig. 2** Genes up-regulated (>2 fold) and down-regulated (<1/2 fold) by FGF-2 in hMSCs. hMSCs were maintained in the medium with or without FGF-2 for 15 days. Then, total RNA was extracted from the hMSCs and microarray analysis were performed. The x-axis showed the fold-change of FGF-2 against Control. The y-axis showed the raw expression levels of hMSCs cultured in the medium with FGF-2



genes were extracted (Fig. 2), and the canonical pathways of these genes were investigated using Ingenuity Pathway Analysis. As a result, IGF-I and TGF- $\beta$  signaling genes were found to be included in the extracted genes (Fig. 3, see, red arrows).

signaling pathway (7 mapped genes out of 67) and TGF- $\beta$  signaling pathway (6 mapped genes out of 59) were found to be at upper rank. Furthermore, the overall IGF-I and TGF- $\beta$  signaling pathway was inactivated by FGF-2 (Figs. 4 and 5).

■ New Analysis Wed Sep 06 22:43:29 PDT 2006



**Fig. 3** Pathway analysis of genes up-regulated and down-regulated by FGF-2 in hMSCs. Pathway analysis of up-regulated and down-regulated genes by FGF-2 (Fig. 2) was

performed by Ingenuity Pathway Analysis. The y-axis showed the ratio of genes mapped in Fig. 2 against all of genes belongs to each canonical pathway

IGF-1 Signaling

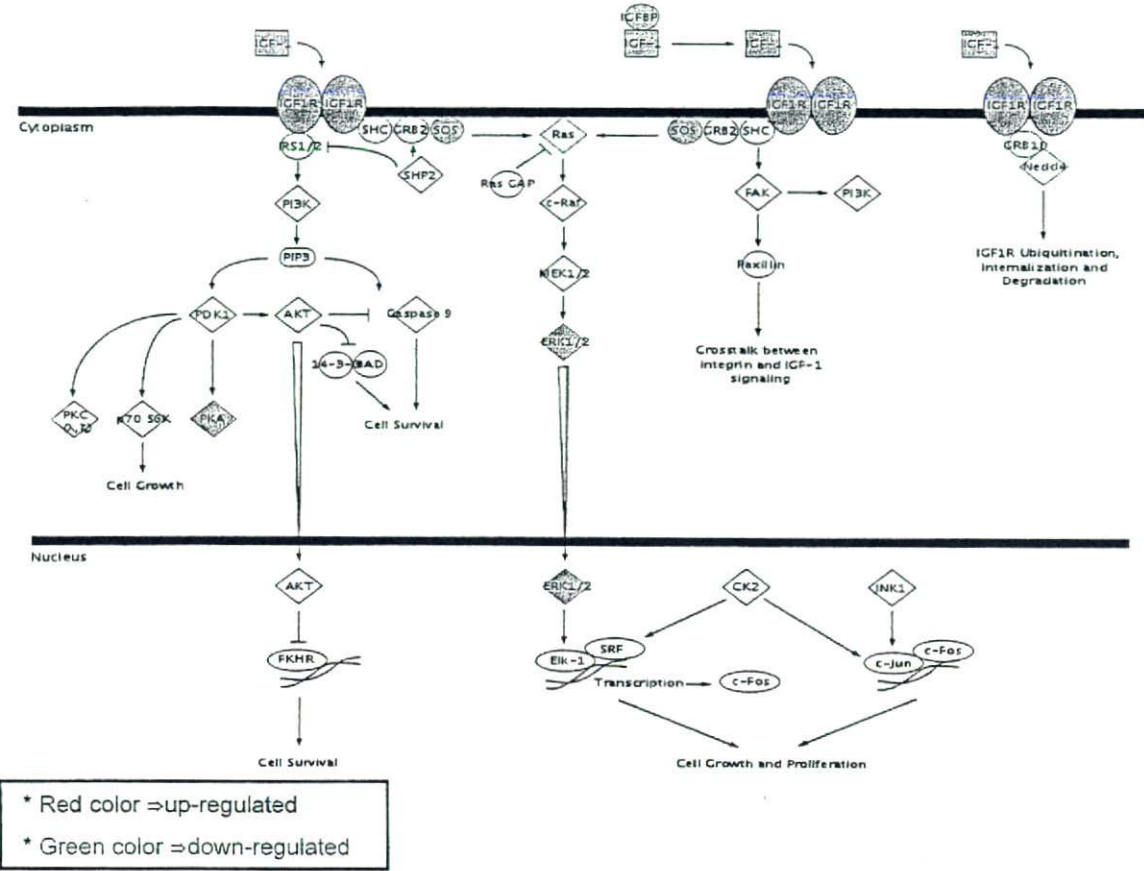


Fig. 4 Genes up-regulated and down-regulated by FGF-2 in IGF-I signaling pathway. Genes up-regulated and down-regulated by FGF-2 (Fig. 2) were mapped with the IGF-I

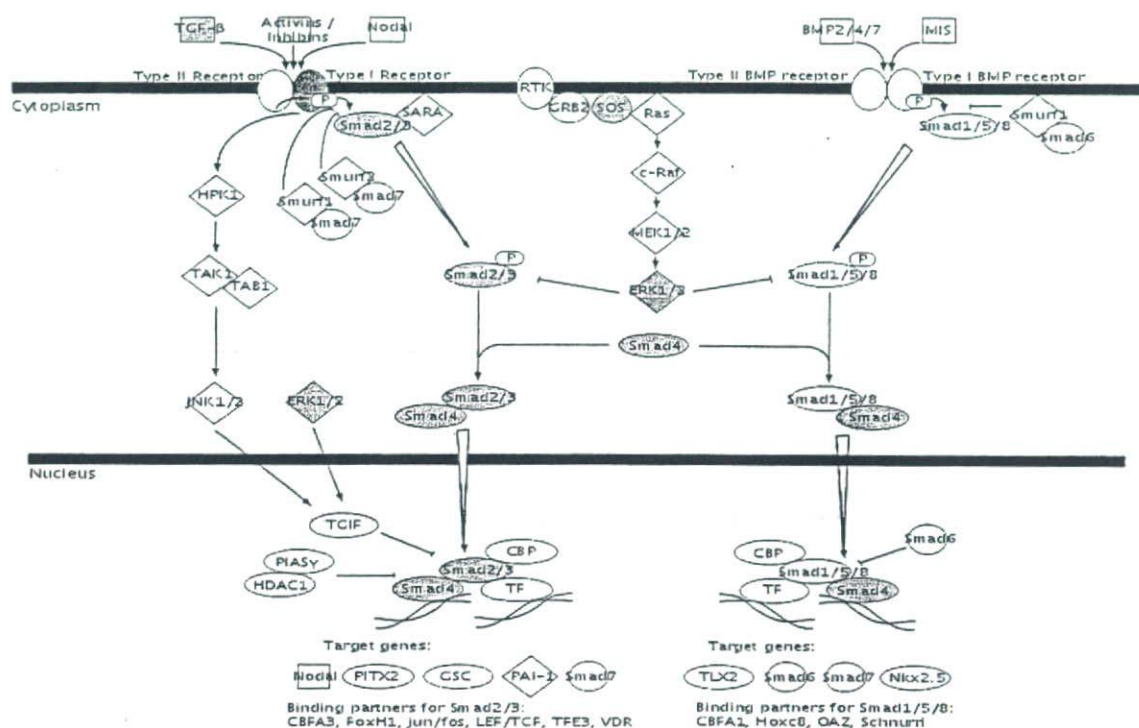
signaling pathway by Ingenuity Pathway Analysis. The red color showed up-regulated genes and green color showed down-regulated genes

Discussion

hMSCs are found in adult human bone marrow, and cells obtained from patients until late adulthood still exhibit osteogenic potency (Leskela et al. 2003). In fact, hMSCs may maintain differentiation capacity in vivo throughout life. However, after 50 days' culture of hMSCs with or without FGF-2, the protein expression levels of ALP and the mRNA expression levels of osteocalcin, type II collagen, and type X collagen were significantly lower than after 15 days' culture of hMSCs (data not shown). Those differentiation makers were up-regulated by FGF-2 after 15 days' culture of hMSCs (Fig. 1), but not after 50 days' culture of hMSCs (data not shown). These results suggested that the osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of hMSCs were

decreased by long-term subculture in vitro, as shown in Fig. 6. Furthermore, in our previous study, we have suggested that the mRNA expressions of TGF-βs increased by long-term culture (Sawada et al. 2006). The decrease of osteogenic and chondrogenic differentiation potentials by long-term culture may be involved in the increase of TGF-βs levels.

Our data in this study (Fig. 1B–E) were in agreement with the report that FGF-2 increased the potential for chondrogenic and osteogenic differentiation of hMSCs (Tsutsumi et al. 2001). Moreover, since the exposure of adipose-derived stem cells to FGF-2 before the induction of differentiation enhanced the adipogenesis (Kakudo et al. 2007), the treatment by FGF-2 before induction may increase the osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of hMSCs.

TGF- $\beta$  Signaling

\* Red color  $\Rightarrow$  up-regulated

\* Green color  $\Rightarrow$  down-regulated

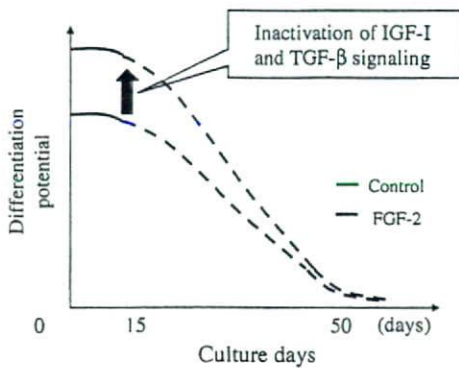
**Fig. 5** Genes up-regulated and down-regulated by FGF-2 in TGF- $\beta$  signaling pathway. Genes up-regulated and down-regulated by FGF-2 (Fig. 2) were mapped with the TGF- $\beta$

signaling pathway by Ingenuity Pathway Analysis. The red color showed up-regulated genes and green color showed down-regulated genes

In this study, we extracted 714 genes that were up-regulated or down-regulated by FGF-2 (Fig. 2), and investigated which canonical pathway they were involved. As a result, cell cycle signaling pathways were ranked first, second and third (Fig. 3). Cyclin-dependent kinase inhibitors included in those signaling pathways were down-regulated by FGF-2 (data not shown). This result suggests that cell cycle were activated by FGF-2, in agreement with our previous study (Ito et al. 2007, p. 108). In previous study, it was reported that mitogen activated protein kinase (MAPK) and Wnt modulated the differentiation potential of adult stem cells (Solchaga et al. 2005). In this study, IGF-I and TGF- $\beta$  signaling genes were included in the 714 genes (Fig. 3), and the overall

IGF-I and TGF- $\beta$  signaling pathway was inactivated (Fig. 4 and 5). Furthermore, since it was reported that TGF- $\beta$  decrease osteoprogenitor fraction in cultures of human bone marrow stromal cells (Walsh et al. 2003), inactivation of TGF- $\beta$  signaling pathway may be important for the increase of differentiation potentials of hMSCs.

In conclusion, we consider that the exposure of hMSCs to FGF-2 before the induction of differentiation enhanced osteogenic and chondrogenic differentiation potentials by inactivation of IGF-I and TGF- $\beta$  signaling. However, more studies will be needed for explanation the molecular mechanisms that inactivation of IGF-I and TGF- $\beta$  signaling by FGF-2 enhance osteogenesis and chondrogenesis of hMSCs.



**Fig. 6** Our hypothesis that FGF-2 increases the osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of hMSCs by inactivation of IGF-I and TGF- $\beta$  signaling

**Acknowledgements** This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and a Grant-in-Aid from the Japan Human Sciences Foundation.

## References

- Caplan AI, Bruder SP (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7:259–264
- Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T (2007) FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- $\beta$ 2. *Biochem Biophys Res Commun* 359:108–114
- Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K (2007) Fibroblasts growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359:239–244
- Leskelä HV, Risteli J, Niskanen S, Koivunen J, Ivaska KK, Lehenkari P (2003) Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1008–1013
- Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Yanada S, Ito Y, Agung M (2004) Articular cartilage repair using tissue engineering technique—novel approach with minimally invasive procedure. *Artif Organs* 28:28–32
- Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18:959–963
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147
- Quarto N, Longaker MT (2006) FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng* 12:1405–1418
- Sawada R, Ito T, Tsuchiya T (2006) Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during *in vitro* culture in comparison with cancer cells. *J Artif Organs* 9:179–184
- Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2005) FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 203:398–409
- Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y (2001) Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal stem cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 288:413–419
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417–1426
- Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN (2003) TGF- $\beta$ 1 limits the expression of osteoprogenitor fraction in cultures of human bone marrow stromal cells. *Cell Tissue Res* 311:187–198



## 第4章 細胞組織医療機器の品質・安全性

### — ヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現を指標とした特性解析 —

国立医薬品食品衛生研究所 澤田 留美  
国立医薬品食品衛生研究所 土屋 利江

#### 1 はじめに

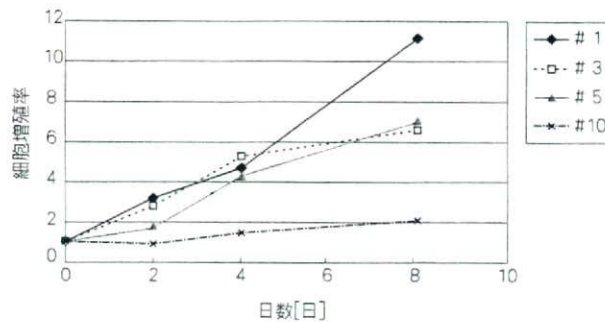
事故や病気で失った組織の修復や再建を目指す「再生医療」の実現に向けて、細胞組織医療機器の研究開発が現在盛んに行われている。昨年(2007年)秋に、京都大学の山中教授のグループから「人工多能性幹細胞(iPS細胞)」と呼ばれる新たな万能細胞がヒトの皮膚細胞から樹立されたことが報告され<sup>1)</sup>、全世界の注目の的となった。その実用化・産業化に向けて現在国を挙げてのさまざまな取り組みがなされており、iPS細胞の「再生医療」への応用も期待されている。しかし、iPS細胞の無限の可能性への期待は大きいものの、現段階では実用化へ向けていまだクリアしなければならない問題点が数多く存在することもまた事実である。一方、成体幹細胞はiPS細胞の報告がなされる以前から「再生医療」への利用が期待されている細胞である。特に間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉へ分化可能な細胞であり<sup>2)~6)</sup>、さらに神経細胞<sup>4)</sup>や肝細胞<sup>2),7)</sup>、心筋<sup>8),9)</sup>、皮膚等胚葉を越えた分化も報告されているため幅広い医療分野での応用が期待されている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞が、その採取技術および*in vitro*での培養技術も確立されている。それぞれの由来によって分化能などの細胞の性質の違いなども示されており<sup>10)</sup>、間葉系幹細胞は細胞組織医療機器の材料として最も実用化に近いものの一つであると考えられる。

幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞である<sup>11)</sup>ため、正常細胞でありながら増殖能力を持つ。幹細胞を細胞組織医療機器に利用するためには、ほとんどの場合、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。しかし、この*in vitro*培養中の自己複製能(細胞増殖能)が正常に制御されていないと、ガン化のような

好ましくない変化が起きる可能性も否定できない。実際に、2005年にはRubioら<sup>12)</sup>により脂肪細胞由来のヒト間葉系幹細胞を長期間(4～5ヵ月) *in vitro* で培養すると自然に形質転換(ガン化)する細胞が確認されたという報告がなされた。このため、幹細胞を用いた細胞組織医療機器の実用化に向けて、幹細胞の *in vitro* 培養中の性質の変化について観察し、その特性を知ることが重要であると思われる。筆者らはこれまでに、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)を用いて *in vitro* 培養期間中の変化について、特に遺伝子発現の変化に着目して細胞の特性を知る指標となり得るのかどうかいくつか検討を行ってきた。その理由としては、幹細胞におけるいくつかの遺伝子発現の変化について調べることで細胞の品質や安全性を評価できる系を最終的に確立できれば、簡便な評価法として利用可能であるため幹細胞を用いた細胞組織医療機器の開発の促進につながることを期待しているからである。本稿では、筆者らの検討結果を含む最近の知見について紹介したい。

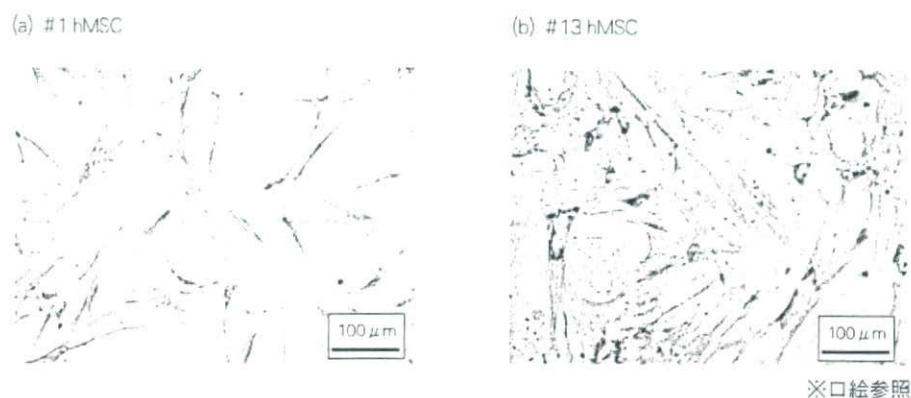
## 2 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の *in vitro* 培養中の変化について

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)を *in vitro* で継代培養を続けていくと、通常は徐々にその増殖能力が低下していく。図1に *in vitro* 培養日数の異なる hMSC の増殖曲線を比較した結果を示した。筆者らはこれまでに10種類ほどの hMSC について検討したが、それぞれの個体による増殖速度の違いは見られるものの、そのほとんどが培養期間2ヵ月程度で増殖速度は低下しはじめ、4～5ヵ月ではほとんど増殖しなくなってくるのがわかった。また、増殖速度が低下した hMSC は、Senescence associated  $\beta$ -galactosidase(SA- $\beta$ -Gal)staining によって細胞中に老化している細胞が含まれていることが確認された(図2)。このように、hMSC は通常はガン細胞のように無限増殖能を有するわけではなく、*in vitro* で培養し続けるとその増殖能力は低下し老化を伴う変化が生じることがわかった。



継代数1、3、5、10(#1、#3、#5、#10)のhMSCを用いてそれぞれ8日間培養し、増殖を比較した。

図1 hMSCの継代数の違いによる増殖の比較<sup>13)</sup>

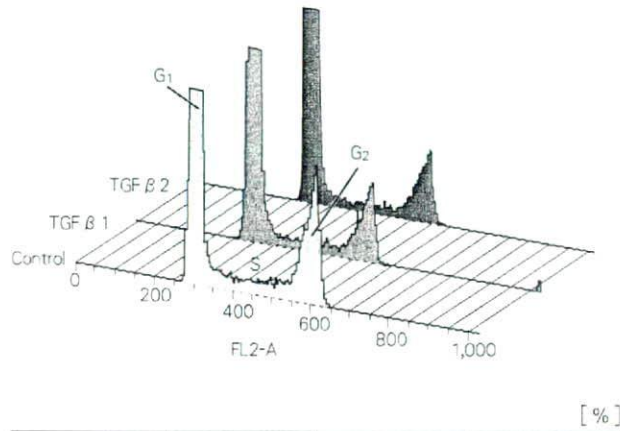


継代数 1 と 13(#1 と #13) の hMSC を比較した。

図 2 hMSC の細胞老化について (SA-β-Gal Staining)

筆者らがこのときに着目した hMSC の遺伝子発現の変化の一つは、transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) の変化である。TGF  $\beta$  1 および TGF  $\beta$  2 の遺伝子発現が hMSC の *in vitro* 培養期間の延長に伴い増加することがわかった<sup>13)</sup>。逆に TGF  $\beta$  1 または TGF  $\beta$  2 を hMSC に添加したところ、SA- $\beta$ -Gal staining によって老化細胞の出現が確認された<sup>14)</sup>。さらに、p16<sup>INK4A</sup> などの細胞周期制御因子の遺伝子発現の上昇が見られ<sup>14)</sup>、フローサイトメトリー解析により TGF  $\beta$  1 または TGF  $\beta$  2 添加によって細胞周期が停止する方向へと変化することを確認している<sup>14)</sup> (図 3)。このような変化は、hMSC の *in vitro* 培養を続けることによって起こる変化と同様であった<sup>14)</sup>。以上の変化について図 4 にまとめた。hMSC を *in vitro* での培養を続けることによって通常は細胞周期が停止する方向へ変化するが、その際に TGF  $\beta$  シグナル伝達系、細胞周期制御因子などの遺伝子発現の変化(上昇)を伴うことが判明した。またさらに、細胞の増殖能を上げるために幹細胞の培養の際に用いられることのある細胞増殖因子 fibroblast growth factor (FGF)-2 について、hMSC の *in vitro* 培養中の変化に対する影響を検討した。FGF-2 は hMSC の増殖速度を上げることは知られていたが、そのメカニズムに関する詳細は明らかにされていない部分も多い。筆者らは、hMSC の *in vitro* 培養時に FGF-2(1ng/ml)を添加することにより、細胞周期の停止を抑え老化を抑制することを見出した(図 5)。さらに、p16<sup>INK4A</sup> などの細胞周期制御因子の遺伝子発現についても、*in vitro* 培養に伴う上昇を FGF-2 によって抑制されることも確認した<sup>14)</sup>。TGF  $\beta$  については、TGF  $\beta$  1 の発現には影響を及ぼさず、TGF  $\beta$  2 の発現の上昇を抑制した(図 6)。こちらは、遺伝子だけでなくタンパク質の発現についても同様であることを確認している<sup>14)</sup>。以上のことから、FGF-2 は *in vitro* 培養時に hMSC の TGF  $\beta$  2 の発現を抑えることにより TGF  $\beta$  シグナル伝達系を介した細胞周期や細胞老化を制御している可能性を見出した<sup>14)</sup>。ちなみに、本研究の条件下では hMSC を 2 ヶ月以上培養し続けると FGF-

2による制御が認められなくなるため、FGF-2はhMSCの老化を止めるわけではなく遅らせる作用を持つことが示唆された。つまり、FGF-2(培地への添加濃度1ng/ml)によってhMSCが無限増殖能を得る訳ではないといえる。



	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
Control	75.71	16.58	12.55
TGF β 1	92.72	9.47	6.61
TGF β 2	89.96	8.89	5.13

図3 hMSCの細胞周期に及ぼすTGF βの影響<sup>14)</sup>

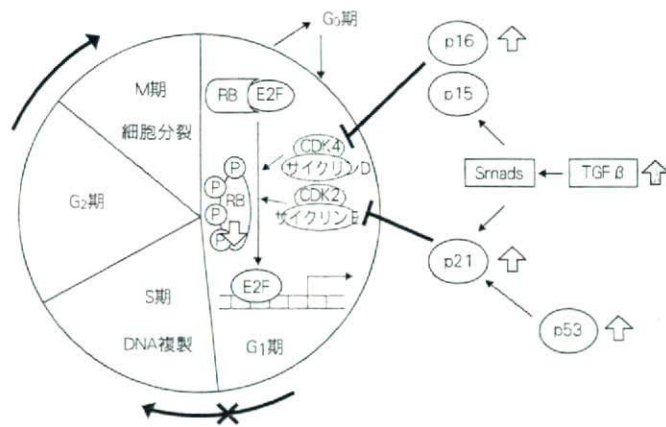
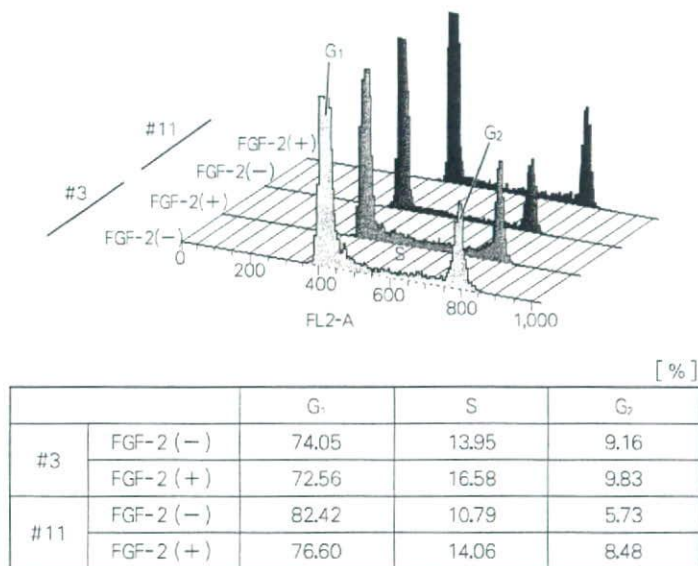
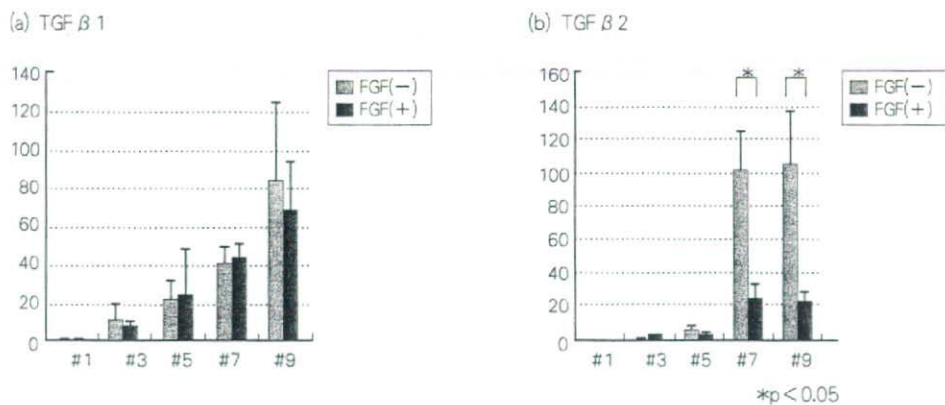


図4 TGF βまたは*in vitro*培養によるhMSCの細胞周期制御因子の遺伝子発現の変化と細胞周期への影響



hMSC の培地に FGF-2 を 1ng/ml 添加したものと無添加のものそれぞれの継代数 3 と 11 (#3 と #11) の hMSC を用いて比較した。

図 5 hMSC の細胞周期に及ぼす *in vitro* 培養期間と FGF-2 の影響



hMSC の培地に FGF-2 を 1ng/ml 添加したものと無添加のものそれぞれの継代数 1、3、5、7、9(#1、#3、#5、#7、#9) の hMSC を用いて比較した。グラフは #1 における mRNA 発現レベルを 1 として示した。

図 6 hMSC の *in vitro* 培養による TGF  $\beta$  1 (A) と TGF  $\beta$  2 (B) の遺伝子発現レベルの変化と FGF-2 の影響

hMSC の *in vitro* 培養中の遺伝子発現の変化として顕著なものは、TGF $\beta$ 1、 $\beta$ 2 および p16<sup>INK4A</sup> であった。なかでも、p16<sup>INK4A</sup> は無限増殖能を持つガン細胞ではほとんど発現が認められないため、p16<sup>INK4A</sup> の発現を確認することはガン細胞との違いを見る指標の一つとなり得るかもしれない。ただし、ガン細胞の中にはヒト子宮頸ガン由来株化細胞である HeLa S3 のように無限増殖能を持ちながらも p16<sup>INK4A</sup> が高発現している細胞も存在するため、p16<sup>INK4A</sup> 単独での発現解析によって幹細胞の異常な変化(ガン化)を判断することには限界があるだろう。また、2007年に Shibata らは p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子が hMSC の老化に大きくかかわることを報告している<sup>16)</sup>。彼らは、29 系統の hMSC を用いて、うち 25hMSCs で p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子発現が徐々に上がり増殖が有限であることを示した。残りの 4hMSCs では p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子のプロモータ領域に DNA のメチル化が起っていたことを確認している。そのうち 1 系統の細胞は他に比べて増殖期間が著しく長く、培養期間後期には染色体異常も認められている。以上のことから、hMSC の培養期間の延長に伴い、通常は p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子発現の増加と細胞老化が起り増殖能が低下していくが、p16<sup>INK4A</sup> が正常に機能していない場合はプロモータ領域のメチル化を疑った方が良いかもしれない。

### 3 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の *in vitro* 培養中における遺伝子発現の変化についての網羅的解析

hMSC における *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化についての共通性を見出しその特性を探るために、筆者らはこれまでに複数のドナー由来の hMSC について DNA アレイを用いた網羅的解析を行ったのでその一部を紹介する。4 ドナー由来の hMSC を用いて、培養期間として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、妥当な期間内(～50日)で検討した。臨床への応用を考えた際にあまり現実的ではない長期間(2ヵ月以上)培養ではなく、ある程度限られた培養期間において遺伝子発現に変化のない遺伝子を抽出することによって、細胞組織医療機器の材料として *in vitro* 培養中の hMSC の特性を知る指標の探索を試みた<sup>16)</sup>。

それぞれの hMSC から調製した total RNA を用いて、Affimetrix GeneChip<sup>®</sup> Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。そして、*in vitro* での培養期間中(50日以内)にその mRNA 発現に変化のなかった遺伝子の抽出を行うことにした。培養期間3日、20日、50日間の時間軸3点を Technical duplicate で行い、計6点全てにおいて発現しているとみなされた遺伝子の中から、培養期間3日と比較して20日、50日ともにその発現レベルが0.8～1.2倍であった遺伝子を本研究では「発現レベルに変化なし」とであるとみなした。通常、発現レベルの有意な変化とみなされるのは、「変化率2倍以上または0.5倍以下」であるため、0.5～2倍以内のものが「変化なし」とも考え得るが、本研究ではより厳しい基準として0.8～1.2倍を抽出ラインとした。

4ドナー由来のhMSC全てに共通して、3日と比較して20日、50日ともにその発現レベルが0.8~1.2倍であった遺伝子をGeneSpring(Agilent Technologies)を用いて抽出した(図7)ところ、1,553遺伝子が抽出された。さらに、Ingenuity Pathway Analysis(Ingenuity Systems社)を用いて、1,553遺伝子の中からさまざまな機能や疾病とかかわる遺伝子を抽出したところ528遺伝子あった。その機能や疾病の種類と含まれる遺伝子数を表1に示した。cancerとcell cycleにかかわるものは延べ159遺伝子含まれていた。cancerは75遺伝子、cell cycleは84遺伝子であり、より細かい機能と含まれる遺伝子数はそれぞれ表2と表3に示した。そこでまず、cancer、cell cycleのどちらにおいても、多くのカテゴリーに含まれるc-mycに着目し、さらに定量的リアルタイムPCRにてc-mycのmRNA発現レベルを測定した。図8に示すように、c-myc遺伝子はドナーによる発現レベルの差は見られるものの培養期間(50日)内においてその発現レベルに大きな変化が見られないことが確認された。このことから、hMSCの*in vitro*培養の前後において、通常はc-mycのmRNA発現レベルに有意な変化が起こりにくいと考えられるので、もしも発現レベルに大きな差が見られた場合は培養中に何か不都合な変化が起こった可能性が予測できるかもしれない。

このように、hMSCの*in vitro*培養期間中にその発現に変化のない遺伝子を探ることは、hMSCの細胞特性を知るうえで有効であると考えられる。hMSC*in vitro*培養中のc-mycの遺伝子発現の変化について調べることは一つの判断材料として利用できるかもしれない。現在も同様な方法で検討を進めており、さらにc-myc以外にもいくつかの候補遺伝子を見出してきている。今後もさらに詳細な検討を続け、細胞組織医療機器の材料としてhMSCを用いる際の品質や安全性について確認できる系の確立を目指していく。

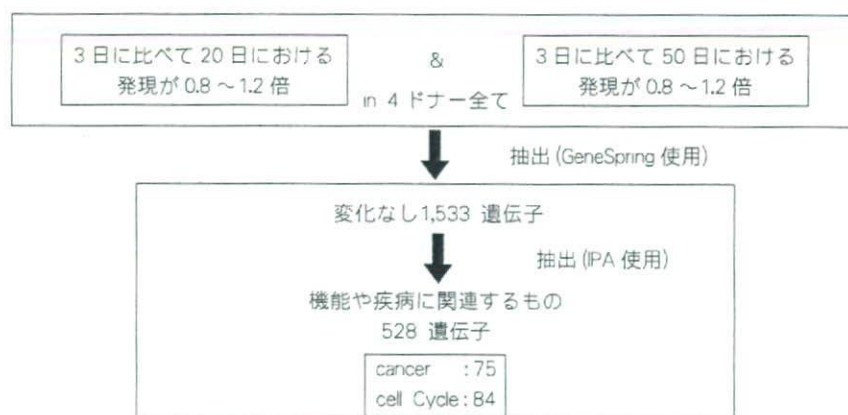


図7 hMSCの培養期間(~50日)による発現レベルに変化のない遺伝子-4ドナー間で共通-の抽出法

表1 hMSCの*in vitro*培養50日以内にmRNA発現に変化のなかった1,553遺伝子のうち機能や疾病に有意にかかわる528遺伝子について

カテゴリー	有意性	関連する遺伝子
機能や疾病		528
Protein Synthesis	6.79E-16	96
Molecular Transport	1.06E-07	64
Protein Trafficking	1.06E-07	41
Protein Degradation	1.92E-05	32
Post-Translational Modification	2.67E-05	104
Cellular Assembly and Organization	4.68E-05	99
Lipid Metabolism	1.02E-04	29
Small Molecule Biochemistry	1.02E-04	85
Gene Expression	2.13E-04	28
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4.55E-04	39
Gastrointestinal Disease	5.57E-04	7
Nervous System Development and Function	5.57E-04	11
Organismal Injury and Abnormalities	5.57E-04	3
Cell Death	5.81E-04	132
Cell Morphology	5.98E-04	35
RNA Post-Transcriptional Modification	5.98E-04	27
Cancer	6.22E-04	75
Connective Tissue Disorders	6.22E-04	48
Cellular Compromise	1.30E-03	15
Hematological Disease	2.09E-03	17
Hematological System Development and Function	2.09E-03	10
Immune and Lymphatic System Development and Function	2.09E-03	7
Immunological Disease	2.09E-03	13
Cellular Function and Maintenance	2.66E-03	46
Connective Tissue Development and Function	2.91E-03	38
Protein Folding	4.15E-03	12
Skeletal and Muscular Disorders	5.31E-03	23
Tumor Morphology	6.40E-03	18
Amino Acid Metabolism	6.77E-03	50
Cardiovascular System Development and Function	6.77E-03	21
Cell Cycle	6.77E-03	84
Cellular Development	6.77E-03	25



(続き) 表 1 hMSC の *in vitro* 培養 50 日以内に mRNA 発現に変化のなかった 1,553 遺伝子のうち機能や疾病に有意にかかわる 528 遺伝子について

カテゴリー	有意性	関連する遺伝子
Embryonic Development	6.77E-03	13
Genetic Disorder	6.77E-03	13
Tissue Development	6.77E-03	16
Viral Function	6.77E-03	11
Visual System Development and Function	6.77E-03	2
Respiratory Disease	9.21E-03	6
Metabolic Disease	9.42E-03	6
Cellular Movement	1.00E-02	41
Neurological Disease	1.00E-02	11
Reproductive System Disease	1.00E-02	38
Organ Development	1.51E-02	5
Organ Morphology	1.51E-02	18
Energy Production	1.64E-02	5
Immune Response	1.79E-02	4
Carbohydrate Metabolism	1.92E-02	2
Cardiovascular Disease	1.92E-02	9
Developmental Disorder	1.92E-02	4
Hepatic System Disease	1.92E-02	2
Reproductive System Development and Function	1.92E-02	5
Respiratory System Development and Function	1.92E-02	4
Vitamin and Mineral Metabolism	1.92E-02	2
DNA Replication, Recombination, and Repair	2.23E-02	15
Dermatological Diseases and Conditions	2.27E-02	3
Cellular Growth and Proliferation	2.55E-02	146
Renal and Urological Disease	2.99E-02	8
Cell Signaling	3.21E-02	5
Digestive System Development and Function	3.63E-02	2
Nucleic Acid Metabolism	3.63E-02	5
Tissue Morphology	3.63E-02	2
Renal and Urological System Development and Function	3.81E-02	6
RNA Damage and Repair	4.58E-02	4

表2 hMSCの *in vitro* 培養50日以内に mRNA 発現に変化のなかった遺伝子のうちガンに有意にかかわる75遺伝子について

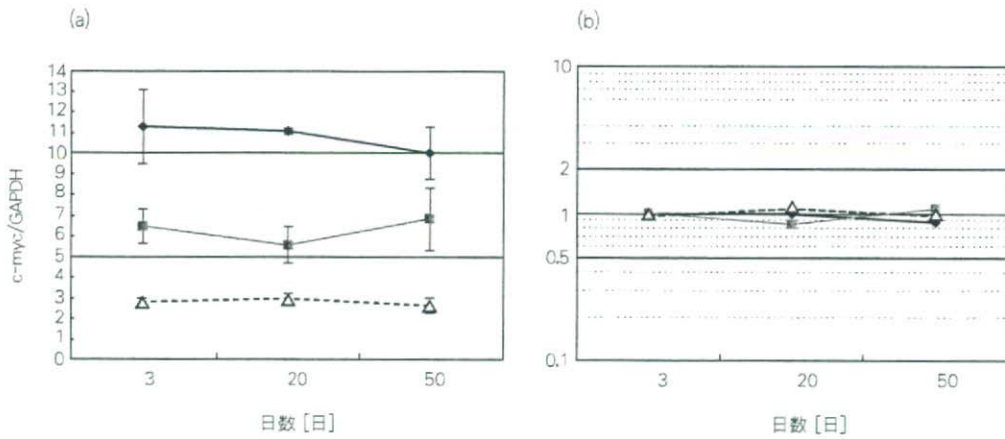
機能や疾病 (Canter ; 75 遺伝子)		関連する遺伝子	
tumorigenesis	tumorigenesis of fibroblast cell lines	8	8
size	size of leukemia cell lines	3	3
cell death	cell death of bone cancer cell lines	14	33
	cell death of breast cancer cell lines	22	
volume	volume of tumor	4	4
	volume of papilloma	2	
multiple hamartoma syndrome	multiple hamartoma syndrome	2	2
neoplasia	neoplasia of lymphoid organ	2	7
	neoplasia of organ	6	
	neoplasia of leukemia cell lines	2	
transformation	transformation of lymphoblastoid cell lines	2	4
	transformation of carcinoma cell lines	2	
vascularization	vascularization of papilloma	2	2
adhesion	adhesion of lung cancer cells	3	4
	adhesion of carcinoma cell lines	3	
	adhesion of lung cancer cells lines	3	
interphase	arrest in interphase of melanoma cell lines	3	3
cell movement	cell movement of cervical cancer cell lines	5	5
migration	migration of bone cancer cell lines	3	3
autophagy	autophagy of breast cancer lines	2	3
	autophagy of tumor cancer lines	3	
cytostasis	cytostasis of hepatoma cell lines	2	2
detachment	detachment of cervical cancer lines	2	2
G <sub>1</sub> /S phase transition	G <sub>1</sub> /S phase transition of cervical cancer cell lines	2	2
juvenile intestinal polyposis	juvenile intestinal polyposis	2	2
latency	latency of lymphoma	2	2
formation	formation of lymphoma	6	6
binding	binding of tumor cells	5	5
	binding of cancer cells	4	
bladder tumor	bladder tumor	4	4
anokis	anokis of tumor cell lines	5	5
growth	delay in growth of tumor	3	3
apoptosis	delay in apoptosis of leukemia cell lines	2	21
	apoptosis of bone cancer cell lines	10	
	apoptosis of B cell lymphoma cells	3	
	apoptosis of prostate cancer cell lines	15	
attachment	attachment of melanoma cell lines	2	2
endometrioid carcinoma	endometrioid carcinoma	2	2
G <sub>1</sub> phase	arrest in G <sub>1</sub> phase of melanoma cell lines	2	2
gliosarcoma	gliosarcoma	2	2
invasion	invasion of kidney cancer cell lines	2	2
polarization	polarization of leukemia cell lines	2	2
progression	progression of gastric carcinoma	2	2
homing	homing of breast cancer cell lines	4	4
colonic polyposis	colonic polyposis	3	3
shape change	shape change of breast cancer cell lines	3	3
cell cycle progression	cell cycle progression of leukemia cell lines	4	4

□ 遺伝子の中に MYC が含まれているもの

表3 hMSC の *in vitro* 培養 50 日以内に mRNA 発現に変化のなかった遺伝子のうち細胞周期に有意にかかわる 84 遺伝子について

機能や疾病 (Cell Cycle ; 84 遺伝子)		関連する遺伝子	
cell cycle progression	arrest in cell cycle progression of B lymphocytes	2	7
	arrest in cell cycle progression of blood platelets	2	
	cell cycle progression of leukemia cell lines	4	
duplication	duplication of cells	3	3
G <sub>1</sub> /S phase transition	G <sub>1</sub> /S phase transition of cervical cancer cell lines	2	2
remodeling	remodeling of chromatin	8	8
modification	modification of chromatin	9	9
G <sub>1</sub> phase	arrest in G <sub>1</sub> phase of melanoma cell lines	2	2
cell stage	initiation of cell stage	7	70
	cell stage	70	
length	length of telomeres	5	5

□ 遺伝子の中に MYC が含まれているもの



(a) 3 種類の hMSC を用いてそれぞれ培養期間 3, 20, 50 日における c-myc/GAPDH レベルを示した。  
 (b) 3 種類の hMSC を用いてそれぞれの培養期間 3 日における c-myc/GAPDH レベルを 1 として示した。

図8 hMSC の *in vitro* 培養期間における c-myc の mRNA 発現の変化

## 4 おわりに

以上のように、hMSC の特性を知ることを目的として hMSC の *in vitro* 培養における変化に対して①発現レベルの変化の大きい遺伝子について、②ほとんど発現に変化の見られない遺伝子についての両方向からの検討を行ってきた。その結果、p16<sup>INK4A</sup>、c-myc などが hMSC の *in vitro* 培養中の発現の変化を注目すべき遺伝子の候補として挙げられ、さらに現在も検討は続いている。またこれまでに、間葉系幹細胞と繊維芽細胞をその遺伝子発現によって識別するためのマーカー遺伝子についての報告<sup>17),18)</sup>もなされている。遺伝子発現の検討方法は比較的簡便であり再現性も良いため、hMSC を細胞組織医療機器の材料として用いる場合の安全性を評価する際にも利用できることが期待される。最終的に p16<sup>INK4A</sup>、c-myc を含む複数の遺伝子を安全性の評価に利用され得るマーカー遺伝子として提示していけることを目指して研究を進めている。

### 謝辞

本稿で記した筆者らの研究は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化」およびヒトゲノム・再生医療等研究事業「感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、ガン化等の抑制、及び培地等による有害作用の防止に関する研究」にて実施された研究の一部である。

### 参考・引用文献

- 1) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka : *Cell*, **131**, pp.1-12(2007).
- 2) Y. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz C.D. Keene, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D.A. Largaespada, C.M. Verfaillie : *Nature*, **418**, pp.41-49(2002).
- 3) N. Rosenthal : *N. Engl. J. Med.*, **349**, pp.267-274(2003).
- 4) M. Korbling, Z. Estrov : *N. Engl. J. Med.*, **349**, pp.570-582(2003).
- 5) K. Hishikawa, S. Miura, T. Marumo, H. Yoshioka, Y. Mori, T. Takato, T. Fujita : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, pp.1103-1107(2004).
- 6) E.M. Horwitz, P.L. Gordon, W.K.K. Koo, J.C. Marx, M.D. Neel, R.Y. McNall, L. Muul, T. Hofmann : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, pp.8932-8937(2002).
- 7) B.E. Petersen, W.C. Bowen, K.D. Patrene, W.N. Mars, A.K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J.S. Greenberger : *Science*, **284**, pp.1168-1170(1999).
- 8) A.A. Mangi, N. Noiseux, D. Kong, H. He, M. Rezvani, j.S. Ingwall, V.J. Dzau : *Nat. Med.*, **9**, pp.1195-1201(2003).
- 9) B.E. Strauer, M. Brehm, T. Zeus, M. Kostering, A. Hernandez, R.V. Sorg G. Kogler P. Wernet : *Circulation*, **106**, pp.1913-1918(2002).
- 10) S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter, K. Bieback : *Stem Cells*, **24**, pp.1294-1301(2006).