

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2022

課題番号：18KK0449

研究課題名（和文）単一細胞解析による組織間葉系幹細胞のin vivo特性解析

研究課題名（英文）Single-cell analysis of mesenchymal stem/stromal cells across mouse limbs.

研究代表者

馬淵 洋（Mabuchi, Yo）

順天堂大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：50424172

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、間葉系幹細胞のHeterogeneityを解明するため、Single-cell RNA sequenceによる間葉系幹細胞亜集団の解析を行った。マウス四肢組織に存在する間葉系幹細胞は、複数の集団に分類することができた。一方で、刺激によって間葉系幹細胞遺伝子パターンを獲得するクラスターの存在（クラスター10）を確認した。レポーターマウスを用いて生体でのクラスター10細胞を解析した結果、細胞群はマウスの四肢のさまざまな部分に分布しており、成長もしくは損傷などの刺激により活性化し、間葉系細胞を供給するリザーバー細胞である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞を用いた臨床応用が進んでいるが、細胞種類や性質の均一性が担保されておらず、治療効果の観点からのクオリティコントロールの設定が急務である。申請者は細胞表面抗原を指標とした幹細胞特性解析を行ってきたが、治療効果の規格値設定は表面抗原マーカーのみでは不十分である。本研究では、申請者の技術と単一細胞の遺伝子発現を統合して解析することにより、幹細胞としての根本的な性質の理解を得る。組織幹細胞の詳細な知見を把握し、本国際共同研究を通して発信することは、国際的なコミュニティの連携や密接なチームワークの創発の場となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted an analysis of subpopulations of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) using single-cell RNA sequencing to elucidate the heterogeneity of the MSC population. MSCs present in mouse limb tissues could be classified into multiple groups. Additionally, we identified a cluster (Cluster 10) that exhibited acquisition of MSC gene patterns in response to stimulation. Using reporter mice that visualize genes specifically expressed in Cluster 10, we confirmed that Cluster 10 cells are localized at the ends of the femur bone. These Cluster 10 cells were found to be distributed in various parts of the mouse limbs and suggested to function as reservoir cells that are activated by growth or injury stimuli to supply mesenchymal cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 Single-cell RNA sequence 細胞多様性 細胞間クロストーク

## 1 . 研究開始当初の背景

組織幹細胞は組織の恒常性を維持するため、複雑な生命システムに基づいて幹細胞性を維持していると考えられる (Science 2009)。間葉系幹細胞は、培養することで組織から抽出することができ、損傷モデルに移植することで組織修復および抗炎症効果などを有することが実証されている。しかし、細胞移植における有効性を発揮する細胞群が明らかではなく、治療効果の規格値設定が非常に困難である。

基課題 (国際共同研究のベースとなった課題) では、蛍光色素や抗体などの標識を用いることなく細胞特性を分析する技術の開発を目指し、新たな指標を用いた幹細胞の解析を行っている。間葉系幹細胞及び分化細胞 (血球系細胞・間葉系細胞) を分離し、誘電サイトメーターにより電気物性を測定した。その結果、間葉系幹細胞は分化細胞よりも比誘電率 (Cm) が低く、細胞種により細胞物性の違いがあることが示唆された。本国際共同研究課題では、間葉系幹細胞の heterogeneity を解析すべく、英国 University of Cambridge の Dr. Mendez-Ferrer 研究室との共同研究を進める。これまでに申請者は、間葉系幹細胞を組織から分離するための細胞表面マーカーの解析を行ってきており (Scientific Reports 2017, Stem Cell Reports 2013, Nature Protocols 2012, JEM 2009)、本国際共同研究を通し間葉系幹細胞の特定精度を飛躍的に向上させる。細胞表面抗原のみでは限界があった間葉系幹細胞亜集団の同定を単一細胞レベルでの遺伝子発現や細胞機能とリンクさせることで、細胞特性解析の解像度を高める。

## 2 . 研究の目的

本研究では、単一細胞レベルでの遺伝子発現を指標として間葉系幹細胞を分類することにより、組織恒常性に関与する細胞集団の特定を行う。また、得られる単一細胞解析の結果を個体レベルで解析するため、英国 University of Cambridge の Dr. Mendez-Ferrer 研究室との共同研究を進め、生体内での間葉系幹細胞亜集団の特性解析を行う。

## 3 . 研究の方法

### (1) 間葉系細胞亜集団の同定とクラスタリング

マウス四肢組織に含まれる間葉系細胞亜集団を解析するため、Single-cell RNA sequence による単一細胞遺伝子発現解析を行う。生後 3 日のマウス四肢からコラゲナーゼ処理により細胞を採取し、そこから抽出された単一細胞由来の RNA をもちいて RNA sequence を行ったのち、類似した遺伝子発現集団を 2 次元プロットに変換する手法 (t-SNE 解析法) により細胞を特異的に分類する (Genome Biol. 2013, 2018)。

### (2) 間葉系細胞亜集団の分離・in vivo 局在解析

実験 (1) で得られた各集団に特異的な遺伝子およびマーカーを調べ、特徴的なマーカーを同定する。マーカーを指標に細胞集団を分離し、in vitro における増殖能力・分化能力を調べる。間葉系細胞亜集団の in vivo における局在を解析するため、特異的なマーカー発現をリアルタイムに可視化できるマウス (レポーターマウス) を用いて骨髄内・筋組織内の観察を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、単一細胞レベルでの遺伝子発現を指標として間葉系幹細胞を分類することにより、組織恒常性(組織修復)に關与する細胞集団の特定を行うことを目的とした。特に、単一細胞解析の結果を個体レベルで解析するため、University of Cambridge の Dr. Mendez-Ferrer との共同研究においてレポーターマウスと Single cell RNA sequence 法を組み合わせ、in vivo における間葉系幹細胞亜集団の特性解析を進めた (Mabuchi Y, et al, *Front Cell Dev Biol.* 2021)。当初の予定では、2020年4月1日から2021年3月31日の1年間の渡英予定であったが、英国をはじめ世界のコロナ感染症の状況を踏まえて渡航期間の短縮を行った(2020年8月17日から2021年3月30日)。コロナ状況下により研究環境はかなり制限された中ではあったが、実施可能な範囲での実験や解析を実施し、研究データを得ることができた。

##### (1) マウス四肢組織に含まれる細胞集団の解析

間葉系幹細胞の特性分布を俯瞰的に解析するため、Single-cell RNA sequence 法による単一細胞遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現を指標に間葉系幹細胞のクラスターを解析したところ、複数の集団に分類することができた(図1A)。青色の細胞クラスターが四肢組織に存在する細胞集団のクラスターであり、赤色の集団は細胞を培養した後に得られた細胞集団を解析したクラスターである。興味深いことに、生体内では間葉系幹細胞の遺伝子パターンを有していないクラスター10(丸枠)は、培養によって間葉系幹細胞の細胞表面マーカーや分化能力を獲得することが示唆された(図1B)。細胞特性解析を迅速に進めるためには、各集団に特異的に発現している遺伝子の同定と、その遺伝子のレポーターマウスが必要になる。ケンブリッジ大学 Dr. Mendez-Ferrer 研究室では間葉系幹細胞を含む組織幹細胞群の追跡が可能なマウス系統を複数有しており、それらのマウスを用いた優れた in vivo トレーシング解析技術を持っている。本研究では、間葉系幹細胞に変化する集団(クラスター10)に高発現している遺伝子のレポーターマウスを用いて、細胞特性解析を進めることにした。

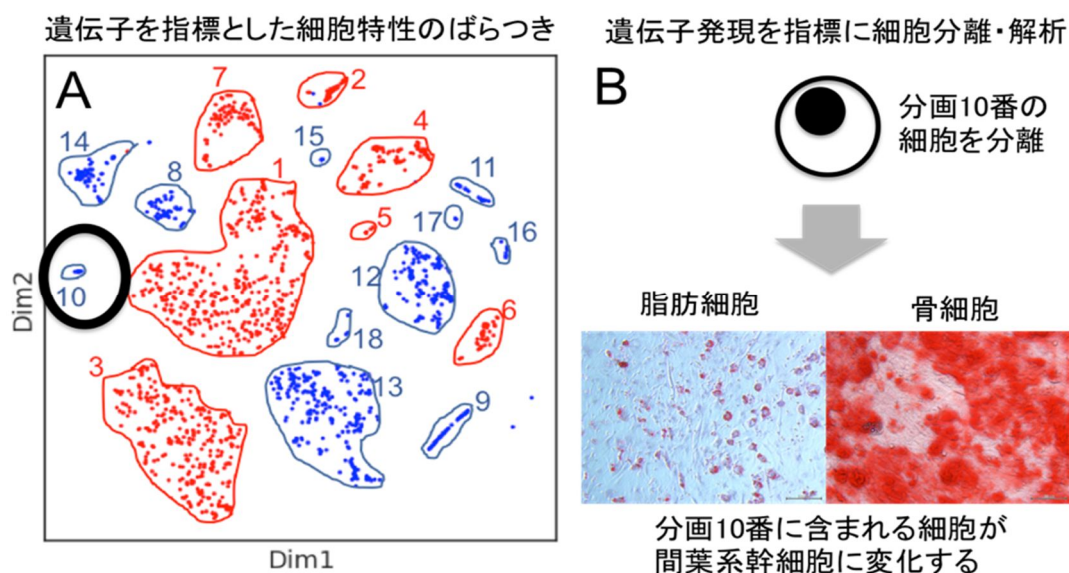


図1: 単一細胞の遺伝子発現を指標とした細胞集団の同定

(A)次世代シーケンサーにて単一細胞に発現している遺伝子発現をもとに t-SNE 解析を行った (Quartz-Seq2)。 (B)クラスター10 由来の細胞 (A の丸枠) を分離・培養したところ、間葉系幹細胞マーカーの発現や脂肪細胞や骨細胞への多分化能力を有していた。



## (2) レポーターマウスによるクラスター10 由来細胞の in vivo 解析

クラスター10 細胞で高発現している遺伝子の発現を、蛍光色素 Venus にてモニターできるマウス(クラスター10 レポーターマウス)を用いて、マウス骨髄および筋肉におけるクラスター10 細胞の局在を調べた。その結果、大腿骨において骨幹(Diaphysis)と比較し骨端(Metaphysis)に Venus 陽性細胞が局在していることが確認できた(図2: 上段)。また Venus 陽性細胞は、筋組織(Muscle)にも存在しており、それらの細胞は CD146 マーカーを発現していることが示された。CD31 マーカーを発現する血管内皮細胞とは重ならなかった(図2: 下段)。

以上の結果から、クラスター10 細胞はマウスの四肢のさまざまな部分に分布しており、成長もしくは損傷などの刺激により活性化し、間葉系細胞を供給するリザーバー細胞である可能性が示唆される。今後は、損傷モデル・老化モデルをもちいて、クラスター10 細胞のリネージトレーシングによる組織恒常性への関与を解析することが重要である。間葉系幹細胞の heterogeneity は認識されてはいたものの、その特性が不明なままであったが、本研究結果により間葉系細胞亜集団の存在を同定し、その一部の機能を示すことができた。

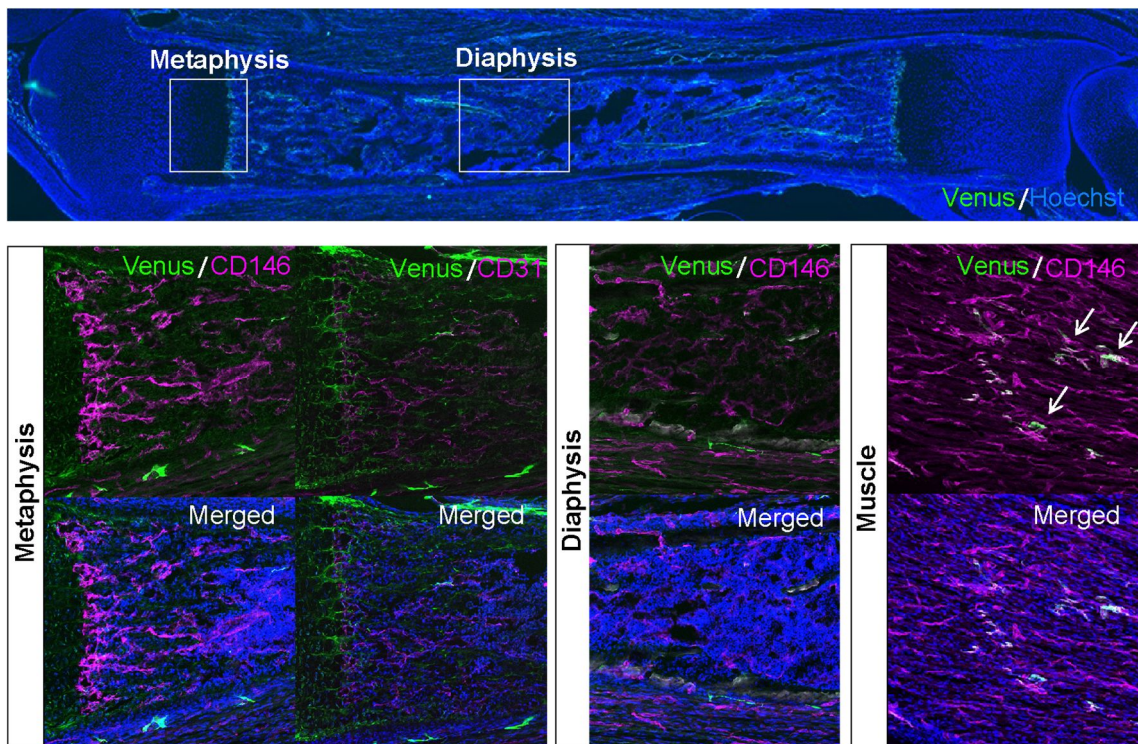


図2: 遺伝子発現を指標としたクラスター10 細胞の局在解析

(上段)骨髄大腿骨および筋肉におけるクラスター10 細胞(Venus: 緑色)の局在解析を行った。  
(下段) Venus 陽性細胞の大腿骨における骨端(Metaphysis・下段左)、骨幹(Diaphysis・下段中央)、および骨格筋組織(Muscle・下段右)における局在を示す。Venus にたいして CD146 もしくは CD31 との染色(マゼンタ)との共染色像を示す。筋組織中の Venus および CD146 を共発現している細胞を白矢印、核染色は Hoechst 染色(青色)にて表示している。

### <引用文献>

1. [Mabuchi Y](#), Okawara C, Méndez-Ferrer S, Akazawa C.

Cellular Heterogeneity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in the Bone Marrow.

*Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 6;9:689366. doi: 10.3389/fcell.2021.689366.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Otori-Morita Yumi, Niibe Kunimichi, Limraksasin Phoosuk, Nattasit Praphawi, Miao Xinchao, Yamada Masahiro, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Egusa Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Mesenchymal Stem Cell Spheroids with Enhanced Stem Cell Characteristics and Bone Regeneration Ability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 434 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stcltm/szab030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohyagi Masaki, Nagata Tetsuya, Ihara Kensuke, Yoshida-Tanaka Kie, Nishi Rieko, Miyata Haruka, Abe Aya, Mabuchi Yo, Akazawa Chihiro, Yokota Takanori	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide technology for regulating lymphocytes in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26902-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naraoka Yuna, Mabuchi Yo, Yoneyama Yosuke, Suto Eriko Grace, Hisamatsu Daisuke, Ikeda Mami, Ito Risa, Nakamura Tetsuya, Takebe Takanori, Akazawa Chihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Tissue Resident CD29-Positive Progenitor Cells in Livestock to Generate a Three-Dimensional Meat Bud	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2499 ~ 2499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10092499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mabuchi Yo, Okawara Chikako, Mendez-Ferrer Simon, Akazawa Chihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Cellular Heterogeneity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in the Bone Marrow	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 689366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.689366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamazaki Morio, Sugimoto Kotaro, Mabuchi Yo, Yamashita Rina, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kaneko Tetsuharu, Akazawa Chihiro, Hasegawa Hiroshi, Imura Tetsuya, Chiba Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Soluble JAM-C Ectodomain Serves as the Niche for Adipose-Derived Stromal/Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 278 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9030278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Seiko, Mabuchi Yo, Kohyama Jun, Shimojo Daisuke, Suzuki Sadafumi, Kawamura Yoshimi, Araki Daisuke, Suyama Takashi, Kajikawa Masunori, Akazawa Chihiro, Okano Hideyuki, Matsuzaki Yumi	4. 巻 39
2. 論文標題 FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 318 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Morio, Sugimoto Kotaro, Mabuchi Yo, Yamashita Rina, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kaneko Tetsuharu, Akazawa Chihiro, Hasegawa Hiroshi, Imura Tetsuya, Chiba Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Soluble JAM-C Ectodomain Serves as the Niche for Adipose-Derived Stromal/Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 278-278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9030278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Seiko, Mabuchi Yo, Kohyama Jun, Shimojo Daisuke, Suzuki Sadafumi, Kawamura Yoshimi, Araki Daisuke, Suyama Takashi, Kajikawa Masunori, Akazawa Chihiro, Okano Hideyuki, Matsuzaki Yumi	4. 巻 39
2. 論文標題 FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 318-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niibe Kunimichi, Ohori-Morita Yumi, Zhang Maolin, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Egusa Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 A Shaking-Culture Method for Generating Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Spheroids With Enhanced Multipotency in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 590332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2020.590332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suto Eriko G., Mabuchi Yo, Toyota Saki, Taguchi Miyu, Naraoka Yuna, Itakura Natsumi, Matsuoka Yoh, Fujii Yasuhisa, Miyasaka Naoyuki, Akazawa Chihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Advantage of fat-derived CD73 positive cells from multiple human tissues, prospective isolated mesenchymal stromal cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72012-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Yuta, Fujisaki Keiko, Hosoda Shoko, Amemiya Yusuke, Okazaki Shogo, Notsu Chihiro, Nishiyama Chiharu, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Oda Akihisa, Goitsuka Ryo	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcription factor Tlx1 marks a subset of lymphoid tissue organizer-like mesenchymal progenitor cells in the neonatal spleen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56984-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Nobuharu, Hyodo Mai, Hayashi Chikako, Mabuchi Yo, Sekimoto Kaori, Onchi Chinami, Sekiguchi Kiyotoshi, Akazawa Chihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Laminin 2, 4, and 5 Chains Positively Regulate Migration and Survival of Oligodendrocyte Precursor Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56488-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Chikako, Suzuki Nobuharu, Mabuchi Yo, Kikura Naomi, Hosoda Yukina, de Vega Susana, Akazawa Chihiro	4. 巻 523
2. 論文標題 The extracellular domain of teneurin-4 promotes cell adhesion for oligodendrocyte differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 171 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ouchi Rie, , , Mabuchi Yo et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 374 ~ 384.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2019.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Junichi, Mabuchi Yo, Hata Kenji, Yasuhara Rika, Takamatsu Koki, Kujiraoka Satoko, Yukimori Akane, Takakura Ikuko, Sumimoto Hidetoshi, Fukada Toshiyuki, Azuma Masayuki, Akiyama Haruhiko, Nishimura Riko, Shimane Toshikazu, Mishima Kenji	4. 巻 382
2. 論文標題 Sox9 regulates the luminal stem/progenitor cell properties of salivary glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111449 ~ 111449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.05.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 YO MABUCHI
2. 発表標題 FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells
3. 学会等名 12th Stem Cell Society Singapore Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 馬淵 洋、須藤 絵里子グレース、鈴木 喜晴、赤澤 智宏
2. 発表標題 間葉系幹細胞垂集団の同定と特性解析
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Mabuchi Yo	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier Inc.	5. 総ページ数 7
3. 書名 Encyclopedia of Bone Biology.	

1. 著者名 Yo Mabuchi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Reference Module in Biomedical Sciences	5. 総ページ数 7
3. 書名 Neural Crest Contributions to MSCs	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 幹細胞の分離方法ならびに培養および分化誘導方法	発明者 赤澤智宏、須藤絵里子グレース、馬淵洋、武部貴則	権利者 東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-079272	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

順天堂大学 大学院医学研究科 難病の診断と治療研究センター  
<https://akazawalab.com/>  
 東京医科歯科大学大学院医学総合研究科分子生命情報解析学分野  
<http://akazawalab.com/publication/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	メンデス・フェラー シモン  (Mendez-Ferrer Simon)	英国ケンブリッジ大学・Department of Haematology・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	University of Cambridge		