

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03616

研究課題名(和文) Muse細胞を用いた正常組織の放射線障害の治療と幹細胞の放射線抵抗性の機序解明

研究課題名(英文) Treatment of radiation damage in normal tissues using Muse cells and elucidation of the mechanism of radiation resistance of stem cells

研究代表者

細井 義夫 (Hosoi, Yoshio)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50238747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：FACSにより間葉系幹細胞(MSC)からSSEA-3陽性細胞として分離されたMuse細胞の安定性について調べた。SSEA-3陽性細胞を分離し培養を続けると、SSEA-3陽性細胞の比率は徐々に低下して行くことがわかった。また、SSEA-3陰性細胞を分離して培養を続けると、SSEA-3陽性細胞が出現し、分離前の比率と同程度になることを見いだした。また、MSCからSSEA-3陽性細胞を分離して幹細胞性を高める調整培地で36日間培養したところSSEA-3陽性率は4.56%で、コントロール培地で36日間培養した場合(SSEA-3陽性率19.45%)に比べ低い値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、臨床試験が進行しているMuse細胞を用いて、Muse細胞の多分化能を高め、正常組織の放射線障害の治療に役立てるために研究を行った。しかし、Muse細胞と間葉系幹細胞(MSC)には互換性があり、MSC中に一定の割合でMuse細胞が発現するような機構が存在する事が示唆された。また、Muse細胞を高める調整培地で培養すると、コントロール培地で培養する場合に比べ、use細胞の比率は低下する事が明らかになった。これらのことから、Muse細胞はMSCと同等かやや分化が進んだ細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The stability of Muse cells isolated as SSEA-3 positive cells from mesenchymal stem cells (MSCs) by FACS was investigated. It was found that when SSEA-3-positive cells were isolated and cultured, the proportion of SSEA-3-positive cells gradually decreased. It was also found that when SSEA-3-negative cells were isolated and cultured, SSEA-3-positive cells appeared, and the proportion of SSEA-3-positive cells was similar to that before isolation. In addition, when SSEA-3 positive cells were isolated from MSCs and cultured for 36 days in a conditioned medium that increases stemness, the SSEA-3 positive rate was 4.56%. This value was lower than the SSEA-3 positive rate of 19.45% when cultured in a control medium for 36 days.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで、放射線による臓器の障害に対する治療は原則としてステロイドのみであり、その効果は限定的である。近年、ES 細胞、iPS 細胞、Muse 細胞等の幹細胞移植が現実な手段となりつつあるが、これまでに幹細胞移植による放射線障害の治療についての研究や報告はない。幹細胞移植は、放射線障害による正常組織の細胞死を、幹細胞により置き換えるものであり、放射線障害の治療に対する全く新しい手段を提供することになる。

(2) Muse 細胞は、2010 年に東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野の出澤真理教授によって初めて発見・報告された生体内に存在する多能性幹細胞で、組織の細胞から FACS を用いて SSEA-3 陽性細胞として分離することが可能である。Muse 細胞は以下の優れた特性を持つ。

静脈投与や局所投与により治療が可能である。

投与された Muse 細胞は、細胞が障害を受けたときに与えられる警報シグナルの一つであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)を発現している障害を受けた細胞に遊走し、S1P Receptor 2 (S1PR2)を介して生着し、同じ種類の細胞に自発分化する。

自己複製能を持ち、自発的に外胚葉系、中胚葉系、内胚葉系の細胞に分化することができる。すでに脳梗塞や心筋梗塞等の治療の探索的臨床試験が開始されており、放射線障害に対する有用性が認められれば早期に探索的臨床試験に移行することが可能である。

免疫寛容をもたらす HLA-G を発現してホストの免疫系の攻撃を抑制することにより他家移植が可能で、必要である時に患者にすぐに投与が開始できる。

iPS 細胞と異なり、腫瘍性に関連する遺伝子が体細胞と同程度に低く、テロメラーゼ活性も低いため、腫瘍形成をしない。

これまでに動物実験による静脈投与では、心筋梗塞モデル、劇症肝炎モデル、肝部分切除モデル、腎不全モデル、筋変性モデル、大動脈瘤モデルで組織修復や機能回復が報告され、局所投与では、脳梗塞モデル、脳出血モデル、脊髄損傷モデル、皮膚損傷モデル、糖尿病性皮膚潰瘍モデルで組織修復や機能回復が報告されている。

Muse 細胞は、脳梗塞、脊髄損傷、急性心筋梗塞、表皮水疱症を対象として探索的臨床試験が開始され、点滴静注された Muse 細胞は障害部位に集積し、神経細胞、心筋細胞等に分化することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、臨床試験が進行している Muse 細胞を用いて、Muse 細胞を用いて、癌の放射線治療時や被ばく事故時の正常組織の放射線障害を軽減するための研究と、申請者がこれまで行ってきた低酸素・低栄養状態での放射線抵抗性の原因究明の経験・実績を生かし、低酸素・低栄養状態で成り立つ幹細胞ニッチがいかんして放射線抵抗性や幹細胞の多分化能をもたらすかを解明し、Muse 細胞の多分化能を高めて正常組織の放射線障害の治療に役立てるとともに、幹細胞の放射線抵抗性の機序を解明し、癌幹細胞や低酸素状態での癌の放射線抵抗性の治療に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) および培地 (MSCBM™ 基本培地および MSCGM™ SingleQuots™ 添加因子セット) はロンザ株式会社から購入した。Muse 細胞は hMSC から FACS を用いて SSEA-3 陽性細胞として分離した。hMSC は実験に用いる時は、DMEM に FBS(10%) と FGF2(10ng/ml) を加えた培地を用いた。

4. 研究成果

(1) Muse 細胞と MSC の関係

FACS により SSEA-3 陽性細胞として分離された Muse 細胞の安定性について調べた(図1)。passage 6(P6)の MSC における SSEA-3 陽性細胞の割合は 7.07%であった。P7 の MSC を用いて SSEA-3 陽性細胞と SSEA-3 陰性細胞を分離してロンザ培地で経代培養を続け P11 での SSEA-3 陽性の比率を調べた。P7 で SSEA-3 陰性細胞を分離した細胞における P11 での SSEA-3 陽性細胞の割合は 11.45%となっており、培養の過程で MSC が Muse 細胞に変化した事が示唆された。P7 で SSEA-3 陽性細胞を分離した細胞における P11 での SSEA-3 陽性細胞の割合は 23.61%であり、Muse 細胞が MSC に変化した事が示唆された。これらのことから、MSC と Muse 細胞は相互に変化し、MSC の一定の割合が Muse 細胞として維持されていることが示唆された。

(2) 幹細胞性を高めるための調整培地が SSEA-3 陽性率に及ぼす影響

MSC の SSEA-3 陽性率は 4.01% で、SSEA-3 細胞を分離してロンザ培地により 23 日、または 36 日培養した場合の SSEA-3 陽性率はそれぞれ 23.61% および 19.45% であった(図 2)。このことから、ロンザ培地による培養により SSEA-3 陽性率は経時的に低下することが明らかになった。MSC から SSEA-3 陽性細胞を分離して幹細胞性を高める調整培地で 36 日間培養したところ SSEA-3 陽性率は 4.56% で、ロンザ培地で 36 日間培養した場合に比べ低い値を示した。実験条件が複雑で一概に断定する事はできないが、この実験結果は Muse 細胞より MSC の幹細胞性がより高い可能性が示された。

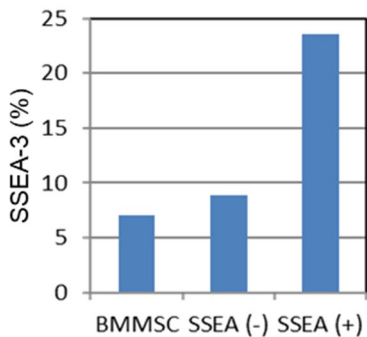


図 1 . MSC と Muse 細胞の互換性
 BMMSC : P6 細胞の SSEA-3 陽性率を示す。
 SSEA(-) : P7 で SSEA-3 陰性細胞を分離し経代培養して P11 における SSEA-3 陽性細胞の比率を示す。
 SSEA(+) : P7 で SSEA-3 陽性細胞を分離し P11 における SSEA-3 陽性細胞の比率を示す。

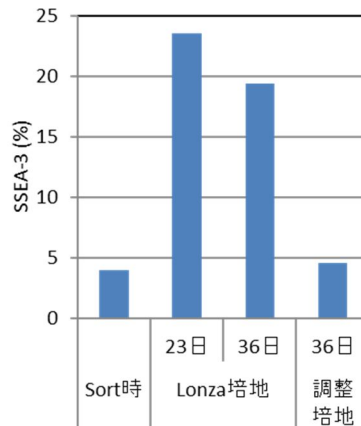


図 2 . 幹細胞性を高めるための調整培地が SSEA-3 陽性率に及ぼす影響
 MSC から SSEA-3 陽性細胞を分離し、23 日又は 36 日間ロンザ培地または調整培地で培養した後の SSEA-3 陽性細胞の比率を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Satoh H, Ochi S, Mizuno K, Saga Y, Ujita S, Toyoda M, Nishiyama Y, Tada K, Matsushita Y, Deguchi Y, Suzuki K, Tanaka Y, Ueda H, Inaba T, Hosoi Y, Morita A, Aoki S	4. 巻 67
2. 論文標題 Design, synthesis and biological evaluation of 2-pyrrolone derivatives as radioprotectors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116764.	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 Hashimoto T, Urushihara Y, Murata Y, Fujishima Y, Hosoi Y	4. 巻 90
2. 論文標題 AMPK increases expression of ATM through transcriptional factor Sp1 and induces radioresistance under severe hypoxia in glioblastoma cell lines.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 82-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.076	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 Hashimoto T, Urushihara Y, Murata Y, Fujishima Y, Hosoi Y	4. 巻 590
2. 論文標題 AMPK increases expression of ATM through transcriptional factor Sp1 and induces radioresistance under severe hypoxia in glioblastoma cell lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 82-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Urushihara Y, Hashimoto T, Fujishima Y, Hosoi Y	4. 巻 24
2. 論文標題 AMPK/FOXO3a Pathway Increases Activity and/or Expression of ATM, DNA-PKcs, Src, EGFR, PDK1, and SOD2 and Induces Radioresistance under Nutrient Starvation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241612828	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本琢磨、細井義夫
2. 発表標題 重度な低酸素状態が癌細胞の幹細胞性因子の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第59回放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本琢磨、Khaled HATABI、細井義夫
2. 発表標題 重度な低酸素状態が癌細胞の幹細胞性因子の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 漆原佑介、橋本琢磨、藤嶋洋平、細井義夫
2. 発表標題 低栄養状態のがん細胞におけるFOXO3によるDSB修復制御
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本琢磨、漆原佑介、細井義夫
2. 発表標題 低栄養状態において、AMPK/FOXO3a経路はATM、DNA-PKcs、Src、EGFR、PDK1、SOD2の活性や発言を亢進させ、放射線抵抗性を誘導する。
3. 学会等名 第60回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本琢磨、漆原祐介、細井義夫
2. 発表標題 低栄養状態において、AMPK/FOXO3a経路はATM、DNA-PKcs、Src、EGFR、PDK1、SOD2の活性や発言を亢進させ、放射線抵抗性を誘導する。
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	橋本 拓磨 (Hashimoto Takuma) (50799145)	東北大学・医学系研究科・講師 (11301)	
研究分担者	漆原 佑介 (Urushihara Yusuke) (30722269)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

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
---------	---------