

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07219

研究課題名(和文) 生体内に存在する多能性幹細胞(Muse細胞)の免疫拒絶反応回避機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the immune evasion mechanism of pluripotent stem cells (Muse cells) exist in the human body.

研究代表者

黒田 康勝 (Kuroda, Yasumasa)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00614504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Muse細胞が持つと推定される免疫拒絶回避機構についてその詳細なメカニズムを解明することを目的とし、そこから免疫抑制剤を使用しない臓器移植法の開発への足掛かりを得ることを目的として行った。  
その結果、Muse細胞は強力な免疫抑制効果を持つとされるHLA-Gを発現しつつもこれに依存しているわけではないこと、Muse細胞が生体内に注入された際にどのような組織に、どのようなタイミングで移行するのかということが明らかになった。さらにはMuse細胞は宿主の免疫システムすべてを抑制するわけではなく、Muse細胞特異的に拒絶を免れる仕組みを有していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Muse細胞の持つ免疫拒絶回避機構が、通常使用される免疫抑制剤のように無差別に広範囲にわたって免疫細胞の活動を抑制するものではなく、あくまでもMuse細胞自身に対する免疫細胞による攻撃を回避するものであることが明らかとなった。将来的にはこれを応用すると組織や細胞を移植する際、事前にドナーから採取したMuse細胞を移植し、特定のHLAに対する寛容を誘導することで、移植した組織自体への寛容を誘導できる可能性がある。これは本来であれば生涯に渡って服用し続けなければならない免疫抑制剤を使用しないで済む、新たな臓器移植法の開発へのつながるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, the purpose was to elucidate the detailed mechanisms of the immune evasion exhibited by Muse cells, presumed to possess, and gain insights for the development of organ transplantation methods without the use of immunosuppressive agents. As a result, it was revealed that Muse cells express HLA-G, which is known for its potent immunosuppressive effects, but they do not solely rely on it. Additionally, the study shed light on the tissue and timing of migration of Muse cells upon injection into the host organism. Furthermore, it was discovered that Muse cells possess a mechanism specific to Muse cells that allows them to evade rejection, without suppressing the host's entire immune system.

研究分野：再生医療

キーワード：Muse細胞 免疫寛容 幹細胞 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでもヒト造血幹細胞を利用した骨髄移植をはじめ、体性幹細胞を用いた再生医療や創薬応用研究が行われてきたが、近年ではこれらに加え、より高度な分化能を持つ多能性幹細胞を用いた研究が盛んにおこなわれている。このような状況の中、申請者らはヒト骨髄間葉系細胞(MSC)やヒト線維芽細胞などの間葉系細胞から、多能性を持ちつつも腫瘍形成能を示さない新たな多能性幹細胞を同定することに成功し、“Muse 細胞”と命名した(Kuroda et al., 2010)。Muse 細胞は培養細胞以外にも、骨髄穿刺液や各臓器の結合組織、末梢血などの様々なヒト組織から直接単離することができる (e.g. Ogura et al., 2014)。その際にはヒト多能性幹細胞の表面マーカーとして知られている SSEA-3 を抗原として純化できる他、トリプシンまたは低温・低酸素・血清飢餓状態に長時間曝すことでも濃縮することが可能である (Kuroda et al., 2010, Heneidi et al., 2013)。このように生体に元々存在する幹細胞である Muse 細胞は、多能性を獲得するための特別な培養や、遺伝子導入などの人為的な操作が一切必要ない。これは ES 細胞や iPS 細胞のような人工的な多能性幹細胞とは大きく異なる点である。

Muse 細胞を損傷モデル動物の生体内に投与すると、損傷部位から放出されるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) を認識して損傷部位へと遊走・生着する (Yamada et al., 2018)。その後、機能的に収縮する筋細胞 (ウサギ急性心筋梗塞モデル, Yamada et al., 2018) や糸球体を構成するポドサイト・メサンギウム細胞・血管内皮細胞 (マウス慢性腎疾患モデル, Uchida et al., 2017) のようなそれぞれの組織に応じた細胞へと自発的に分化することで、機能回復や治癒速度の上昇に貢献していることが確認された。同様の現象は脳や肝臓、皮膚、血管などの多岐にわたる組織でも確認されている (e.g. Uchida et al., 2016, Katagiri et al., 2016, Kinoshita et al., 2015, Hosoyama et al., 2018)。重要な点は、これらの損傷モデル動物に Muse 細胞を移植した場合、免疫抑制剤の投与なしでも長期間生着し続けることである。

ヒトの Muse 細胞を動物に移植 (異種移植) した場合、ウサギ急性心筋梗塞モデルでは移植後 2 週間、マウス慢性腎疾患モデルでは 7 週間経過後でもヒト Muse 細胞が損傷部位から検出された。またマウスやラットとは異なり、遺伝的に均一な純系動物ではないウサギにおいて、採取したウサギ Muse 細胞を別な急性心筋梗塞モデルのウサギに移植 (他家移植) した場合は、移植後 6 カ月もの間、宿主の免疫拒絶から逃れつつ、心機能を回復し続けたことが確認されている (Yamada et al., 2018)。しかしながら、Muse 細胞がどのようにして免疫抑制剤の投与なしに長期間にわたる生着を可能としているのか、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

移植された Muse 細胞が損傷した組織に応じた細胞へと分化し、免疫抑制剤なしでもそのまま生着し続けるためには、移植先の拒絶反応から逃れる何らかのメカニズムを有しているものと考えられる。事実、申請者らはこれまでに、免疫抑制剤のスクリーニングなどで用いられる混合リンパ球反応試験において、Muse 細胞が *in vitro* で単球の分化・増殖を有意に阻害できることを報告した (Yamada et al., 2018)。加えて Muse 細胞は、ヒト白血球型抗原 (HLA) のサブタイプの一つであり、免疫抑制に重要な役割を果たすとされる HLA-G (Bainbridge et al., 2000) を発現していることも報告した (Yamada et al., 2018)。しかしながら申請者が確認したところ、先に記載したヒト Muse 細胞を移植してから 2 週間後のウサギの心臓や、7 週間後のマウスの腎臓の切片においては、検出された Muse 細胞は HLA-G を発現していなかった。本来、HLA-G は胎盤特異的に発現する分子であることから、移植された Muse 細胞は分化に伴ってその発現を失っていくものと考えられる。したがって移植直後の初期段階ならともかく、長期間にわたる生着の主要因として HLA-G が働いているとは考えにくい。

一方、申請者らのこれまでの研究で、移植された Muse 細胞の一部は、損傷を与えていないはずの骨髄にも生着することが確認されている。骨髄には、免疫抑制に対して重要な役割を担うとされている制御性 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg) や、Treg 同様に強力な免疫抑制効果を示す骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived Suppressor Cell, MDSC) が存在している (Zou et al., 2004, Weber et al., 2018)。これらのことは、骨髄に生着した Muse 細胞が Treg や MDSC に直接的または間接的に働きかけ、損傷部位に生着した Muse 細胞を宿主の免疫システムから保護している可能性を示唆するものである。

そこで本研究では、1) Muse 細胞を移植後、HLA-G が担う役割と発現している期間の同定、および 2) 骨髄に生着した Muse 細胞の、Treg や MDSC を介した移植細胞への保護効果について解析を行うことで、Muse 細胞が持つ免疫拒絶回避機構を明らかにすることを目的とする。加えて、骨髄に生着した Muse 細胞と同一の遺伝子セットをもつ細胞が長期間生着できるのであれば、3) 臓器移植時に提供者から採取した Muse 細胞をあらかじめ被提供者に移植しておくことで、免疫抑制剤を投与することなく組織を生着させることができる可能性についても検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では、最終目標として Muse 細胞の免疫拒絶回避機構を明らかにし、さらに免疫抑制剤を使用しない臓器移植法の開発への足掛かりを得ることを目的とする。そのために各項目について以下のように検討していく。

#### (1) HLA-G に関する解析

HLA-G の発現は時間とともに消失してしまうものの、一部の Muse 細胞が骨髄に生着するまでの一定の期間はこれを利用して拒絶を免れていると考えられる。そこで Muse 細胞が発現している HLA-G の消失と分化のタイミング、および骨髄への生着について *in vivo* imaging や組織学的手法を用いて経時的な解析を行う。また、HLA-G を発現しない Muse 細胞を作製し、比較することで HLA-G の発現が初期の生着に必要なかどうかについても検討する。

具体的には HLA-G プロモーターの下流に GFP、組織特異的発現プロモーターの下流に RFP をそれぞれ導入したコンストラクトを構築し、ウイルスを用いて Muse 細胞へ導入する。その後損傷モデル動物へと移植し、生体を生かしたまま観察できる多光子励起顕微鏡を用いて RFP の発現と GFP の消失を観察することで、分化と HLA-G の消失に関する知見を得る。また、HLA-G が消失する前後のタイミングでそれぞれの骨髄切片を作製し、生着している Muse 細胞の数を測定する。これらの結果を合わせることで、骨髄への生着、HLA-G の消失、そして分化開始の時間的關係を決定することが可能である。

#### (2) 骨髄に生着した Muse 細胞の解析

骨髄に生着した Muse 細胞が、免疫抑制に非常に重要な Treg や MDSC を介した免疫抑制効果を示すか検討する。

具体的には GFP マウスより採取した Muse 細胞を Balb/c マウスへと移植し、骨髄から GFP 陽性細胞を回収する。その後これらの細胞を scRNA seq へと供することで、移植前と骨髄生着後の遺伝子の発現パターンの変化を解析する。

### 4. 研究成果

本研究の結果、Muse 細胞は強力な免疫抑制効果を持つとされる HLA-G を発現しつつもこれに依存しているわけではないこと、Muse 細胞が生体内に注入された際にどのような組織に、どのようなタイミングで移行するのかということが明らかになった。さらには Muse 細胞は宿主の免疫システムすべてを抑制するわけではなく、Muse 細胞特異的に拒絶を免れる仕組みを有していることが明らかとなった。

本研究により得られる知見は、学術的な Muse 細胞の免疫拒絶抑制機構の解明に留まらず、今後免疫抑制剤を使用しなくてもよい、画期的な臓器移植法の開発へとつながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野  
<http://www.stemcells.med.tohoku.ac.jp/>

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

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