

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670135

研究課題名(和文) プラナリアとヒトの生体内多能性幹細胞の共通機構の解明

研究課題名(英文) Suggested common mechanism underlying between human Muse cells and planarian neoblasts

研究代表者

出沢 真理 (DEZAWA, Mari)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50272323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアneoblastに対する抗体を用いてヒトMuse細胞に発現する分子を免疫沈降によってHsDj2が同定された。Muse細胞におけるHsDj2のsplice variantを調べたところ、9種類が存在する可能性が示唆された。その中で2つサブタイプがMuseに特異的に発現し、non-Muse-MSCには出ていない可能性が示唆された。RNAiベクターをヒトMuse細胞に導入したところ、exon4を抑制すると神経系細胞に分化しexon6を抑制すると肝細胞系に分化することが示唆された。このことからMuse細胞の多能性と分化に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified HsDj2 in human Muse cells in immunoprecipitation using specific antibody to planarian neoblast. Splice variants expressed in human Muse cells were surveyed and 9 kinds of spliced forms were identified including full length. By comparing expression pattern in Muse and non-Muse MSC, 2 out of 9 subtypes were suggested to be selectively expressed only in Muse cells. Furthermore, by introducing siRNAs, exon 4 suppression in Muse cells promoted neural differentiation, and exon 6 suppression hepatocyte-lineage differentiation, suggesting that HsDj2 is pertinent to Muse cell pluripotency as well as to differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：多能性幹細胞 線維芽細胞 間葉系幹細胞 結合組織 進化

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは胚葉の壁を越えて三胚葉の分化が可能な多能性幹細胞 Muse (Multilineage-differentiating Stress Enduring)細胞が成人ヒトの骨髄、真皮などの間葉系組織や様々な臓器の結合組織に散在性に存在することを報告した (Kuroda et al. 2010, PNAS; Wakao et al., 2011)。この細胞は生体に存在する自然の多能性幹細胞であり、腫瘍形成能を持たず、多様な臓器の損傷部位に生着・分化し、組織修復を担うことが分かっている。生物界を広く見渡すと、Muse 細胞と同様に間葉系組織に存在し、三胚葉性の分化能を有する多能性幹細胞が約5億年前に出現したプラナリアにも neoblast として存在する。申請者は「生体内多能性幹細胞」として、ヒト Muse 細胞とプラナリア neoblast との共通性に着眼した。

最近、研究協力者である京大・阿形教授のグループが休止状態の neoblast 特異的な因子を同定した (未発表)。この因子に対する抗体を用いてヒト Muse 細胞を調べたところ、驚いたことに、neoblast に見られたのと同様にヒト Muse 細胞の核が標識される (右図参照)。申請者は、このプラナリア抗体のヒト抗原を同定することによって、neoblast と Muse 細胞の共通機構に関与する遺伝子を同定できる可能性があると考えた。そこで、抗原同定のための免疫沈降実験と質量分析実験を行った結果、2種類の特徴的な産物、HsDj1、HsDj2 を見出している。またヒト内臓組織や皮膚線維芽細胞由来の Muse 細胞にこれらの産物が存在することが免疫組織化学などで確認されたことから、Muse 細胞においても HsDj1、HsDj2 はプラナリア抗体のヒト抗原因子であると考えられた。NCBI の BLAST データベース検索で、この因子はプラナリアの近縁種であるマンソン住血吸虫の他、ウニ、イソギンチャク、魚類、哺乳類からアブラムシなどの無脊椎動物まで進化的にも高度に保存されていることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

申請者の見出した Muse 細胞は生体内にある多能性幹細胞であり、3胚葉性細胞への分化能と自己複製能を有する。体中の結合組織に散在性に存在し、組織修復作用を担っている。一方、原始的なプラナリアにも結合組織に多能性幹細胞 neoblast が存在し、高い再生能を担っている。申請者は、結合組織にある、3胚葉性の細胞に分化する、などの共通点から、「5億年の進化の過程でプラナリア

neoblasto が生体内多能性幹細胞システムとしてヒト Muse 細胞として引き継がれている」のではないかという仮説のもと検証したところ、驚いたことに neoblast 特異的な抗体が、ヒト Muse 細胞を特異的に認識することを発見した。そのヒト抗原のプラナリアオルソログは、プラナリア再生に必須である。進化的に保存された再生機構は、腫瘍形成の心配が無く安全に生物が採用してきたものであり、初期発生過程の模倣ではないやり方で器官再生する方法のヒントが隠されている可能性がある。プラナリアとヒトをつなぐ生体内多能性幹細胞の共通機構を探索したい。

## 3. 研究の方法

予備実験において、プラナリアの多能性幹細胞 neoblast の休止状態 (Dormant) 特異的な抗体によって同定されたヒト Muse 細胞の HsDj1 複合体、HsDj2 新規スプライシングバリエーションの機能を解析し、生体内多能性幹細胞の共通機構の解明に取り組む。(1) HsDj2 遺伝子配列を 5', 3' RACE 法によって決定し、(2) HsDj2 スプライシングバリエーションを検出する抗体を選定、(3) HsDj1 と HsDj2 の直接的あるいは間接的な相互作用の検証、(4) レンチウイルス RNAi ベクターの構築を用いた発現阻害実験と多能性や自己複製能に対する影響、(5) Dormant 状態を検出するための系を構築することによって、Muse 細胞における機能解析に繋げ、(6) プラナリアとヒトで保存された多能性幹細胞特異的な遺伝子機能について考察する。

## 4. 研究成果

平成 25 年の実績: (1) プラナリア neoblast 特異的な抗体による免疫沈降産物を質量分析解析した結果から、250 kDa および、>250 kDa 程度の HsDj1, 2 mRNA のスプライスバリエーション、および後半の Exon を主体とする short form があることを同定した。(2) ヒト Muse 細胞で HsDj2 と neoblast 特異抗体の局在が一部重なること、さらに新たにもう一つの因子が同じ局在を示す可能性を見出した。(3) HsDj1、HsDj2 の機能同定のための RNAi ベクターを構築し、HsDj2 遺伝子の機能を調べた。それぞれのバリエーションを、また全てのバリエーションを抑制できるような RNAi ベクターを別個に構築した。

平成 26 年度の実績: (4) HsDj1、HsDj2 の RNAi ベクターの導入による機能抑制性実験: H25 年度に構築した HsDj2 の各 exon ごとの RNAi ベクターをヒト Muse 細胞に導入し、HsDj2 がヒト Muse 細胞において多能性維持に関わっているかを検証した。その結果、exon 4 を siRNA で抑制すると神経様の形態を、ま

た exon6 を抑制すると肝細胞様の形態に Muse 細胞が変化した。これらの細胞における神経マーカー、肝細胞マーカーの発現を RT-PCR と immunocytochemistry で評価したところ、exon4 の抑制型では MAP-2 等の神経マーカーが、exon 6 の抑制型では alpha-fetoprotein, albumin, 等の肝細胞マーカーが出ていたので、一つの exon を抑制しただけで、内胚葉、あるいは外胚葉系への分化が促進された可能性が考えられる。(5) HsDj2 には full length と複数の短縮型が存在する可能性が示唆された。そこで、Muse における HsDj2 の splice variant を調べたところ、exon は 1 ～7 まであり、約 9 種類の splice variant が存在する可能性が示唆された。その中でも Muse 細胞に特異的に発現していると思われる variant が 2-3 種類存在すると想定された。(6) Muse 細胞は接着状態よりも浮遊に一定時間おかれたほうが多能性因子の発現が上昇し、様々な細胞への分化能も上がることが確認された。例えば、接着状況にある Muse 細胞よりも、浮遊に 1 2 時間ほど置かれた Muse 細胞は Oct3/4, Nanog の 10 倍程度の上昇が、また Sox2 では 3 0 倍の上昇が見られた。また生殖幹細胞に関連する因子も一部は Muse 細胞で発現していることが分かった。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

(1)Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. *Cells Tissues Organs.* ;200(1):31-41. doi: 10.1159/000368188. 査読有 Epub 2015 Mar 4.

(2)Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, Shichinohe H, Houkin K, Dezawa M. Kuroda S. Therapeutic Effects of Human Multilineage-Differentiating Stress Enduring (MUSE) Cell Transplantation into Infarct Brain of Mice. *PLoS One.* 2015 Mar 6;10(3):e0116009. doi:10.1371/journal.pone.0116009. 査読有 eCollection 2015.

(3)若尾昌平, 出澤真理 「体性幹細胞と Muse 細胞の位置づけ」 臍島の再生医学 73-78, 2015. 査読無し  
<http://www.shindan.co.jp/books/index.php?menu=10&cd=213300&kbn=1>

(4)出澤真理 「生体内多能性幹細胞 : Muse

細胞」 脳神経系の再生医学 19-26, 2015. 査読無し  
<http://www.shindan.co.jp/books/index.php?menu=10&cd=213300&kbn=1>

(5)Mannoji C, Koda M, Kamiya K, Dezawa M. Hashimoto M, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived neuroregenerative cells promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 査読有 2014;74(4):479-88. PMID:25576978

(6)Wakao S, Akashi H, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues. *Spinal Surgery.*28(1):17-23 2014 査読有

(7)Okano T, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. *Anat. Rec (Hoboken).* 297(1):4-5, 2014. 査読有 doi: 10.1002/ar.22796. Epub 2013 Dec 2. No abstract available. PMID:24293331

(8)Albertine KH, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. *Anat. Rec (Hoboken).* 297(1):1-3, 2014. 査読有 doi: 10.1002/ar.22811. Epub 2013 Dec 2. No abstract available. PMID:24293066

(9)Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. *Pathology International.* 64(1):1-9, 2014. 査読有 doi: 10.1111/pin.12129. Review. PMID:24471964

(10)Y. Kuroda, M. Dezawa. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec.* 2014 Jan;297(1):98-110. 査読有 doi: 10.1002/ar.22798. Epub 2013 Dec 2. Review. PMID:24293378

(11)Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev.* 23(7):717-28, 2014. 査読有 doi: 10.1089/scd.2013.0473. Epub 2014 Jan 17. PMID:24256547

- (12)Ishikawa H, Tajiri N, Shinozuka K, Vasconcellos J, Kaneko Y, Lee HJ, Mimura O, Dezawa M, Kim SU, Borlongan CV. Vasculogenesis in Experimental Stroke After Human Cerebral Endothelial Cell Transplantation. *Stroke*. 44(12):3473-81, 2013. 査読有 doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001943. Epub 2013 Oct 15.PMID:24130140
- (13)Ishikawa H, Tajiri N, Vasconcellos J, Kaneko Y, Mimura O, Dezawa M, Borlongan CV. Ischemic Stroke Brain Sends Indirect Cell Death Signals to the Heart. *Stroke*. 44(11):3175-82, 2013. 査読有 doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001714. Epub 2013 Sep 5.PMID:24008571
- (14)Kanemaru SI, Kitani Y, Ohno S, Shigemoto T, Kojima T, Ishikawa S, Mizuta M, Hirano S, Nakamura T, Dezawa M. Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells. *Laryngoscope*. 123(11):2728-34, 2013. 査読有 doi: 10.1002/lary.24060. Epub 2013 Aug 8.PMID:23929597
- (15)Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Murata A, Okawa A, Dezawa M, Matsuse D, Tabata Y, Takahashi K, Yamazaki M. Treatment with basic fibroblast growth factor-incorporated gelatin hydrogel does not exacerbate mechanical allodynia after spinal cord contusion injury in rats. *J Spinal Cord Med*. 36(2):134-9, 2013. 査読有 doi: 10.1179/2045772312Y.0000000030.PMID:23809528
- (16)Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, and Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells. *Nature Protocols*. 8(7):1391-415, 2013. 査読有 doi: 10.1038/nprot.2013.076. Epub 2013 Jun 20.PMID:23787896
- (17)Shigemoto T, Kuroda Y, Wakao S, Dezawa M. A novel approach to collect satellite cells from adult skeletal muscles based on their stress tolerance. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2(7):488-98, 2013. 査読有 doi: 10.5966/sctm.2012-0130. Epub 2013 Jun 7.PMID:23748608
- (18)Tsuchiyama K, Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, Nojima M, Sawaya N, Yamazaki K, Aiba S, Dezawa M. Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. *J Invest. Dermatol*. 133(10):2425-35, 2013. 査読有 doi: 10.1038/jid.2013.172. Epub 2013 Apr 5.PMID:23563197
- (19)Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous engraftment of A9 dopaminergic neurons induced from mesenchymal stem cells in parkinsonian rhesus macaques. *J. Clin. Invest*. 123(1):272-84, 2013. 査読有 doi: 10.1172/JCI62516. Epub 2012 Dec 3.PMID:23202734
- (20)Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Riera JJ, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplant*. 22(9):1613-25, 2013. 査読有 doi: 10.3727/096368912X658791. Epub 2012 Oct 31.PMID:23127893
- (21)Wakao S, Kitada M, Dezawa M. The elite and stochastic model for iPS cell generation: Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are readily reprogrammable into iPS cells. *Cytometry A*. 83(1):18-26, 2013. 査読有 doi: 10.1002/cyto.a.22069. Epub 2012 Jun 12. Review.PMID:22693162
- (22)出澤真理 「ヒト生体に内在する新たな多能性幹細胞 Muse 細胞：細胞治療，予後の診断，創薬，病態解析への展開の可能性」 *人工臓器* 42(1):16-18, 2013. 査読なし
- (23)北田容章、出澤真理 「間葉系幹細胞・Muse 細胞を用いた再生医療」 *再生医療叢書* 7:163-187, 2013. 査読なし <http://www.asakura.co.jp/books/isbn/978-4-254-36077-6/>
- 〔学会発表〕(計 14 件)  
出澤真理 Discovery of Muse Cells shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, *Clinical Applications of Stem Cells*, 平成 27 年 2 月 27 日, Singapore(Singapore)
- 出澤真理 Discovery of Muse Cells shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, *日仏再生医学シンポジウム*, 平成 26 年 11 月 20 日, 在日フランス大使館(東京)
- 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイム

シフト, 第 56 回日本先天代謝異常学会, 平成 26 年 11 月 14 日, 仙台市(江陽グランドホテル)

出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第 31 回細胞療法研究会, 平成 26 年 11 月 4 日, 愛知医科大学(愛知県)

出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 未来医療開発プロジェクト(MIAST)シンポジウム, 平成 26 年 8 月 8 日, 岩手医科大学(岩手県)

出澤真理 腫瘍性の無い生体由来多能性幹細胞 Muse 細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 第 14 回日本外傷歯学会, 平成 26 年 7 月 26 日, 大阪歯科大学(大阪府)

出澤真理 再生医療研究の現状と Muse 細胞の将来展望, 特許庁 平成 26 年度先端技術研修, 平成 26 年 6 月 20 日, 東京(虎ノ門三井ビルディング)

出澤真理 生体に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞の担う機能; Regenerative homeostasis と stem cell failure の提唱, 第 20 回神戸全体会議, 平成 26 年 6 月 13 日, 神戸バイオテクノロジー研究・人材育成センター(神戸)

出澤真理 骨髄と結合組織を足場とする多能性幹細胞 Muse 細胞の担う生体内修復機能, 第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 平成 26 年 6 月 6 日, ウィンクあいち(名古屋)

出澤真理 Muse 細胞発見のもたらす間葉系幹細胞のパラダイムシフト, 第 55 回日本神経学会, 平成 26 年 5 月 24 日, 福岡国際会議場(福岡)

出澤真理 腫瘍性の無い新しい多能性幹細胞 Muse 細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, Medical Cooperation Meeting of Hepatitis (MCH), 平成 26 年 5 月 14 日, 宮城県石巻市(飛翔閣)

出澤真理 Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure. Seminar at Nelson Biological Labs in Rutgers, 平成 26 年 4 月 30 日, Rutgers, The State University of New Jersey, San Diego, USA

出澤真理 Making three dimensional human colored skin by using Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, Stem Cells and Tissue Injury Platform Session at EB 2014, 平成 26 年 4 月 28 日, San Diego Convention Center, San Diego USA

出澤真理 Discovery of Muse Cells, Novel Pluripotent Stem Cells That Reside in Human Mesenchymal Tissues: Implications for New Concepts of Regenerative Homeostasis and Stem Cell Failure, PPSSC 2014, 平成 26 年 4 月 12 日, 台北(台湾)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/medical/03/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出沢 真理(DEZAWA Mari)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50272323