

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860126

研究課題名(和文)胎児付属物由来多能性幹細胞Muse細胞の特性解析と細胞移植治療を目指した基礎研究

研究課題名(英文)Characterization of human fetal appendages-derived Muse cells as a new source of Muse cells for regenerative medicine

研究代表者

串田 良祐(Kushida, Yoshihiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10707003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胎児付属物由来のMuse細胞の特性解析を行った。臍帯組織に散在性に存在するMuse細胞はNanog、Oct3/4などの多能性幹細胞マーカーを発現し、自己複製能、自発的または分化誘導による三胚葉性の細胞への分化能を示した。また、免疫不全マウスであるSCIDマウスの精巣へ臍帯組織由来Muse細胞を移植しても腫瘍形成は認められなかった。臍帯組織由来Muse細胞はすでに報告されている成人組織由来Muse細胞と同等の性質を備えており、再生医療におけるMuse細胞の新規細胞ソースとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human umbilical cord tissue-derived Muse cells (UC-Muse cells) resided sparsely in Wharton's jelly and expressed pluripotent markers such as Nanog and Oct3/4. These cells exhibited self-renewal and triploblastic differentiation under both spontaneous and induced differentiation condition. Furthermore, these cells didn't develop into teratomas when transplanted into the testes of immunodeficient mice (SCID mice). These results suggest that UC-Muse cells exhibit the ability similar to that of adult human tissues and are useful as a new source of Muse cells for regenerative medicine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Muse細胞 多能性幹細胞 間葉系幹細胞 胎児付属物

1. 研究開始当初の背景

骨髄、皮膚、脂肪、臍帯などの間葉系組織に存在する間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪など中胚葉系への分化だけでなく、外胚葉系の神経や内胚葉系の肝臓や膵臓など胚葉を超えた細胞への分化能をもつとされる細胞で、傷害組織修復のための細胞移植治療が期待されている。既に骨髄由来の間葉系幹細胞は心筋梗塞、脊髄損傷、脳梗塞など様々な疾患において臨床研究が展開され、一定の効果が得られている。この治療効果の機序の一つとして、移植細胞が傷害部位に生着し、組織を構成する細胞に分化することにより傷害組織を修復するが、ヘテロな細胞集団である間葉系幹細胞の中で多能性を持つ細胞の実体が不明のまま、臨床応用が先行している現状があった。

申請者の研究グループはこの間葉系幹細胞で見られる多様な細胞への分化能や組織修復能を説明できる Multilineage-differentiating Stress Enduring cell (Muse 細胞)を見出した (Kuroda et al. PNAS, 2010; Wakao et al. PNAS, 2011)。Muse 細胞は自己複製能を持ち、1 細胞から 3 胚葉性の細胞に分化できる多能性幹細胞で、骨髄、皮膚、脂肪などの生体組織に存在する幹細胞であるため腫瘍性増殖を示さない。既にヒトで実施されている骨髄移植や間葉系幹細胞移植に用いられる移植細胞中に含まれている細胞であるため安全性がある程度確認されていることや、線維芽細胞と同程度の増殖能を持つため、移植細胞数を十分に確保できることから、安全性に優れた移植細胞ソースであると考えられる。さらに、他の多能性幹細胞では見られない Muse 細胞の利点として、分化誘導を必要とせずに、多能性幹細胞マーカーの Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3)を指標に採取した細胞を直接血管内や局所に移植するだけで、傷害組織へ遊走・集積し、組織に応じた細胞に自発的に分化して組織修復ができる簡便性が挙げられる。このように安全性に優れ、移植操作が簡便な Muse 細胞は臨床応用に近い細胞であると考えられている。

2. 研究の目的

成人組織由来の Muse 細胞の特徴は明らかになりつつあるが、胎児付属物由来の Muse 細胞の存在や特性については明らかにされていない。臍帯、臍帯血、胎盤などの胎児付属物は提供者側の負担がなく、通常廃棄されていることから、安全面、倫理面において問題の少ない現実的な細胞ソースであると期待される。また、細胞の採取が困難な患者や高齢者への他家移植治療への応用が期待されている。本研究では、未だ明らかにされていない胎児付属物の Muse 細胞の特性解析を通じて、再生医療における Muse 細胞の新規細胞ソースとしての胎児付属物の利用可能

性を探る。

3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯組織由来 Muse 細胞の単離と細胞表面マーカーの発現解析

ヒト臍帯組織を 5 mm 角に細切し、組織片を約 10 日間接着培養し、間葉系幹細胞を樹立した。樹立した間葉系幹細胞を継代培養した後、SSEA-3 を指標として、FACS により Muse 細胞の割合を解析した。また、この細胞を間葉系マーカーである CD105、CD90、CD44、CD73、CD166、造血系マーカーである CD34、CD45、神経堤由来幹細胞マーカーである CD271、内皮細胞前駆マーカーである von Willebrand factor (vWF)の発現をそれぞれ FACS にて解析した。臍帯組織中での Muse 細胞の局在は臍帯組織切片を用いて SSEA-3 に対する免疫染色にて確認した。従来、SSEA-3 と CD105 の二重陽性細胞を Muse 細胞として単離していたが、間葉系幹細胞はすべての細胞で CD105 などの間葉系マーカーを発現しているため、Muse 細胞の単離は SSEA-3 だけを指標とし FACS にて行った。

(2) ヒト臍帯組織由来 Muse 細胞の多能性の解析

単離した Muse 細胞は Nanog、Oct3/4、Sox2、PAR4、Klf4 などの多能性幹細胞マーカーの発現を定量 RT-PCR にて解析した。また、single cell suspension culture を 7 日間行うことにより細胞塊の形成能を確認した。この細胞塊の凍結切片を作成し、Nanog、Oct3/4、Sox2、PAR4、Tra-1-81 など多能性幹細胞マーカーの発現を免疫染色により評価した。形成した多能性細胞塊をゼラチンコートディッシュ上で接着培養し、自発的な 3 胚葉性の細胞への分化能を RT-PCR と免疫染色により確認した。これには、内胚葉系として alpha-fetoprotein、cytokeratin 7、中胚葉系として Nkx2.5、smooth muscle actin、外胚葉系として MAP-2、Neurofilament を指標に評価を行った。また、特定のサイトカインにより骨、脂肪、内皮細胞、神経、肝細胞へ分化誘導し、各種細胞マーカーの発現、分化効率を解析した。自己複製能は、Muse 細胞の多分化能を指標として、single cell suspension culture と接着培養の操作を複数回繰り返し、多分化能が維持されるかどうかを評価した。

(3) 腫瘍形成能の評価

単離した Muse 細胞 (100,000 cells) を免疫不全マウスである SCID マウスの精巢へ移植することで、腫瘍形成能を形態学的、組織学的に評価した。また、定量 RT-PCR にてテロメア逆転酵素 (Telomerase reverse transcriptase: TERT) の発現を解析した。

4. 研究成果

臍帯組織から樹立した間葉系幹細胞には約2%のSSEA-3陽性細胞が内在し、これらはWharton's jellyに多く存在していた(図1)。これは1回の分娩で得られる臍帯組織50gから約3週間で3000万細胞のMuse細胞を回収できる計算となり、Muse細胞のソースとして十分な細胞数の確保が可能であることを示している。

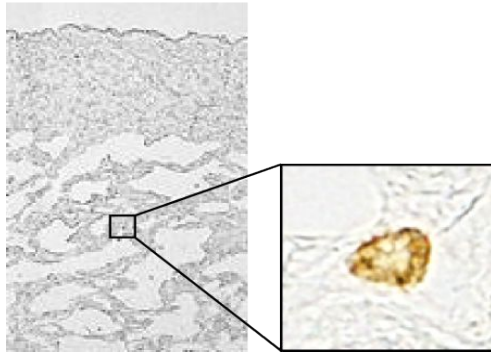


図1: ヒト臍帯組織中の Muse 細胞

臍帯組織由来 Muse 細胞は CD105、CD90 などの間葉系マーカーをすべて発現しているものの、造血系マーカー (CD34、CD45)、神経堤由来幹細胞マーカー (CD271)、内皮前駆細胞マーカー (vWF) は発現していないことが確認された。また、1細胞で浮遊培養すると、Nanog、Oct3/4、Sox2 などの多能性幹細胞マーカーを発現する多能性細胞塊を形成した (図2)。

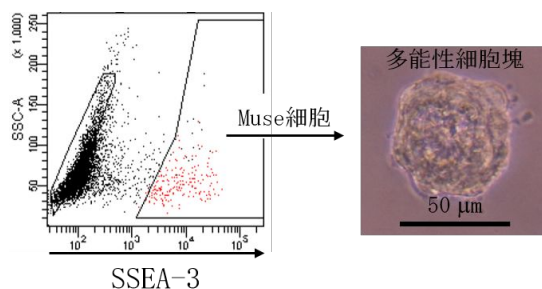


図2: ヒト臍帯組織由来 Muse 細胞の単離と多能性細胞塊の形成

この細胞塊を接着培養すると、内胚葉マーカー (Cytokeratin 7、alpha-fetoprotein)、中胚葉マーカー (smooth muscle actin、Nkx2.5)、外胚葉マーカー (Neurofilament、MAP-2) を発現する細胞が検出されたことから、自発的に三胚葉性の細胞へと分化することが確認された。この細胞塊の形成と自発的な三胚葉分化を Muse 細胞の機能の指標として、臍帯組織由来 Muse 細胞の自己複製能を検証した。多能性細胞塊の形成と接着培養を複数回繰り返しても多能性細胞塊の形成と自発的な三胚葉性の分化能を維持していた

ことから自己複製能が認められた。さらに、特定のサイトカインを用いた分化誘導により、神経幹細胞マーカー (NeuroD1、Nestin、Musashi-1)、肝細胞マーカー (alpha-fetoprotein、Albumin、Cytokeratin 19)、血管内皮細胞マーカー (CD141)、脂肪細胞マーカー (FABP-4)、骨芽細胞マーカー (Osteocalcin) を発現する細胞が検出された。このことから、分化誘導により三胚葉性の細胞へ分化することが明らかとなった。

最後に、Muse細胞を SCID マウスの精巣に移植することにより、腫瘍形成の有無を検証したが、6ヶ月を経過しても腫瘍の形成は認められなかった。また、Muse細胞の TERT の遺伝子発現は Muse 細胞以外の間葉系幹細胞と同等であったことより、腫瘍形成能はないことが示唆された。

以上より、臍帯組織由来 Muse 細胞はすでに報告されている成人組織由来 Muse 細胞と同等の性質を備えており、再生医療における Muse 細胞の新規細胞ソースとしての可能性が示唆された。

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 7件)

- (1) Saito T, Suenaga S, Fujii M, Kushida Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Touma M, Hosono M. Induction of autoimmune gastritis by neonatal thymectomy requires autoantibodies and is prevented by anti-FcγR antibodies. *Cell Immunol.* 300 (2016) 1-8. (査読有)
doi:10.1016/j.cellimm.2015.10.004
- (2) Katagiri H, Kushida Y, Nojima M, Kuroda Y, Wakao S, Ishida K, Endo F, Kume K, Takahara T, Nitta H, Tsuda H, Dezawa M, Nishizuka SS. A distinct subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells, Muse cells, directly commit to the replacement of liver components. *Am. J. Transplant.* 16 (2016) 468-483. (査読有)
doi:10.1111/ajt.13537
- (3) Uchida H, Sakata H, Fujimura M, Niizuma K, Kushida Y, Dezawa M, Tominaga T. Experimental model of small subcortical infarcts in mice with long-lasting functional disabilities. *Brain Res.* 1629 (2015) 318-328. (査読有)
doi:10.1016/j.brainres.2015.10.039
- (4) Uchida H, Morita T, Niizuma K, Kushida Y, Kuroda Y, Wakao S, Sakata H, Matsuzaka Y, Mushiake H, Tominaga T, Borlongan CV, Dezawa M.

Transplantation of unique subpopulation of fibroblasts, Muse cells, ameliorates experimental stroke possibly via robust neuronal differentiation. *Stem Cells* 34 (2015) 160-173. (査 読 有) doi:10.1002/stem.2206

- (5) Fujii M, Suzuki K, Suenaga S, Wakatsuki M, Kushida Y, Touma M, Hosono M. Dominant trait linked to chromosome 1 in DBA/2 mice for the resistance to autoimmune gastritis appears in bone marrow cells. *Exp. Anim.* 63 (2014) 155-167.(査読有) DOI: 10.1538/expanim.63.155
- (6) Kushida Y, Ishida JY, Fujii M, Touma M, Hosono M. Population doublings of murine CD4(+) memory T cells during continuous antigen stimulation in vivo. *Cell Immunol.* 292 (2014) 45-52. (査 読 有) DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.09.001
- (7) Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. *Pathol. Int.* 64 (2014) 1-9. (査読有) DOI: 10.1111/pin.12129

〔学会発表〕(計 7件)

- (1) 串田 良祐, 若尾 昌平, 明石 英雄, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一朗, 溝淵 雅巳, 飯島 一誠, 出澤 真理. 臍帯組織中に存在する多能性幹細胞 Muse 細胞の自己複製能と多分化能の検証. 第121回日本解剖学会総会. 2016. 3. 28-30. 郡山、ビックパレットふくしま
- (2) 串田 良祐, 若尾 昌平, 明石 英雄, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一朗, 溝淵 雅巳, 飯島 一誠, 出澤 真理. 臍帯組織中に存在する多能性幹細胞 Muse 細胞の自己複製能と多分化能の検証. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016. 3. 17-19. 大阪、大阪国際会議場
- (3) 串田 良祐, 若尾 昌平, 明石 英雄, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一朗, 溝淵 雅巳, 飯島 一誠, 出澤 真理. 臍帯組織中に存在する多能性幹細胞 Muse 細胞の多能性の解析. 第 42 回日本臓器保存生物医学会学術集会. 2015. 11. 13-14. 盛岡、いわて県民情報交流センター(アイーナ)(会長賞受賞)
- (4) 串田 良祐, 若尾 昌平, 明石 英雄, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一朗, 溝淵 雅巳, 飯島 一誠, 出澤 真理. 臍帯組織中に存在する多

能性幹細胞 Muse 細胞の多能性の解析. 日本解剖学会第 61 回東北・北海道連合支部学術集会. 2015. 8. 29-30. 盛岡、盛岡市観光文化交流センター プラザおでって

- (5) Kushida Y, Wakao S, Akashi H, Nishimura N, Iwatani S, Koda T, Morioka I, Mizobuchi M, Iijima K, Dezawa M. Analysis of pluripotency in Muse cells derived from human umbilical cord tissue. International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting. 2015. 6. 24-27. Stockholm, Sweden.
- (6) 串田 良祐, 若尾 昌平, 明石 英雄, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一朗, 溝淵 雅巳, 飯島 一誠, 出澤 真理. 臍帯組織由来の多能性幹細胞 Muse 細胞の探索と多能性の解析. 第 14 回日本再生医療学会. 2015. 3. 19-21. 横浜、パシフィコ横浜
- (7) 串田 良祐, 若尾 昌平, 明石 英雄, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一朗, 溝淵 雅巳, 飯島 一誠, 出澤 真理. 臍帯組織由来の多能性幹細胞 Muse 細胞の探索と多能性の解析. 日本解剖学会第 60 回東北・北海道連合支部学術集会. 2014. 9. 6-7. 福島、福島学院大学 福島駅前キャンパス

〔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

串田 良祐 (KUSHIDA, Yoshihiro)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10707003