

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15540

研究課題名(和文) 多能性幹細胞Muse細胞の遊走・分化制御機構の解明

研究課題名(英文) the molecular mechanisms controlling the migration and differentiation of Muse cells

研究代表者

串田 良祐 (Kushida, Yoshihiro)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10707003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織に存在する腫瘍性を持たない多能性幹細胞であるMuse細胞の傷害組織への遊走のMuse細胞の分子メカニズムを明らかにするために、Muse細胞の遊走を制御するmicroRNAを探索した。肝障害モデルマウスの血清を用いた遊走試験において、Muse細胞はMuse細胞以外の間葉系幹細胞(非Muse細胞)に比べ高い遊走能を示した。さらに肝障害モデルマウスの血清に曝露したMuse細胞のmicroRNAの発現をマイクロアレイにて網羅的に解析したところ、多くのMicroRNAの発現が変動することが明らかになった。これらをMuse細胞に導入し、特性解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体組織に存在する腫瘍性を持たない多能性幹細胞であるMuse細胞は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を行う。そのため、安全性と簡便性を併せ持つMuse細胞は細胞移植治療に適した細胞であると考えられている。本研究を通じてMuse細胞の組織傷害下において変動するmicroRNAが見出され、未だ明らかでないMuse細胞の遊走・分化制御機構に関わる因子の同定につながる研究の基礎を築けたと考える。

研究成果の概要(英文)：To define the molecular mechanisms controlling the migration and differentiation of Muse cells, we evaluated migration ability of Muse cells using serum of mice with CCl4-induced acute hepatic injury. Muse cells exhibited higher migration ability compared with non-Muse cells. Furthermore, MicroRNA microarray analysis revealed that microRNAs changed expression in Muse cells following exposure on hepatitis serum. Effect of differential expressed microRNAs in Muse cells analyzed by introducing these microRNAs into Muse cells. These results established the basics of molecular mechanisms controlling the migration and differentiation of Muse cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：Muse細胞 多能性幹細胞 遊走 microRNA 再生医療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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る。

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細胞から三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、臍帯、様々な臓器の結合組織や血中など生体に内在する幹細胞であるため腫瘍を形成しない。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治療に用いられる移植細胞中に含まれてい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、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。

この治療効果について、申請者はウサギ心筋梗塞モデルにおいて、骨髄由来 Muse 細胞の経静脈的投与により、Muse 細胞が傷害された心臓へ特異的に遊走し、心筋細胞や血管へ分化することで、心機能回復に寄与することを明らかにした (Yamada et al. Circ Res, 2018)。この他、脳梗塞モデル (Uchida et al. Stem Cells, 2016, Uchida et al. Stroke, 2017)、慢性腎臓病モデル (Uchida N et al, J Am Soc Nephrol, 2017)、肝障害モデル (Katagiri et al. Am J Transplant, 2016, Iseki et al. Cell Transplant, 2017)、大動脈瘤モデル (Hosoyama et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 2018)、虚血・再灌流性肺障害モデル (Yabuki et al. Cell Transplant, 2017) においても治療効果を確認している。また、Muse 細胞は間葉系幹細胞で見られる免疫調節作用も持つことから他家移植が可能であるため、ドナー由来 Muse 細胞を使用できる。このことから Muse 細胞は点滴で再生医療を施すことができるという大きなメリットがあり、現在、三菱ケミカルホールディングスグループの(株)生命科学インスティテュートが Muse 細胞製剤を用いて急性心筋梗塞、脳梗塞、表皮水泡症、脊髄損傷に対する探索的臨床試験を開始している。

この Muse 細胞の持つ組織修復能は、生体内の恒常性維持にも関わるとされている。通常、骨髄などの間葉系組織や各臓器の結合組織において休眠状態で存在する Muse 細胞は、ひとたび生体組織に損傷が起こると、血液中に動員され、損傷組織に集積し、組織修復を担うと推測される。

### 2. 研究の目的

Muse 細胞の持つ組織修復能を利用した様々な疾患に対する治療効果について報告されているものの、Muse 細胞がどのように血中に動員され、血中から傷害組織へ遊走し、組織に応じて自発的に分化するのか、その詳細なメカニズムは明らかでない。そこで本研究では Muse 細胞の遊走と組織修復に関わる分子機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

Muse 細胞は骨髄間葉系幹細胞または臍帯組織由来間葉系幹細胞から FACS にて採取し、遊走試験に使用する傷害血清は SCID マウスに四塩化炭素を腹腔内投与して作成した肝障害モデルマウスの血清を用いた。対照群として正常マウス血清を使用した。ポイデンチャンバーによる遊走試験を行い、Muse 細胞の遊走能を比較解析した。

Muse 細胞の血中動員・遊走の制御機構について理解するために、以下の研究を行った。血中から損傷部位へ遊走する際の Muse 細胞の特性を明らかにするために、Muse 細胞に肝障害モデルマウスの血清を培地に添加して浮遊培養 (血中での遊走状態を模倣)、接着培養 (組織内での遊走状態を模倣) をそれぞれ行い、曝露後 12 時間での Muse 細胞内で変動する microRNA の発現をマイクロアレイを用いて解析した。変動の見られた因子について定量 PCR を用いて、経時的な変化を明らかにした。また、変動の見られた因子を Muse 細胞にノックインまたはノックダウンし、遊走能の変化が認められるかポイデンチャンバーを用いた遊走試験を行い評価した。

### 4. 研究成果

四塩化炭素投与による肝障害モデルマウスの血清を用いたポイデンチャンバーによる遊走試験において、骨髄間葉系幹細胞由来 Muse 細胞を肝障害モデルマウスの血清に曝露すると、曝露後 24 時間までに Muse 細胞は傷害血清の方に遊走するのに対し、Muse 細胞以外の間葉系幹細胞 (non-Muse 細胞) ではほとんど遊走しないことから、Muse 細胞は non-Muse 細胞に比べ高い遊走能を示

すことが示された。生体内の Muse 細胞は傷害組織に遊走する際、血中に動員され、その後傷害組織中に遊走されることから、血中内での遊走状態および組織内での遊走状態を模倣する必要があると考え、接着状態または浮遊状態の Muse 細胞を肝障害モデルマウスの血清に曝露し、12 時間後の microRNA の発現をマイクロアレイにて網羅的に解析した。浮遊状態においては miR-6504-5p、miR-297、miR-1539 などの発現が上昇し、接着状態においては miR-544b、miR-3646、miR-3187-3p などの発現が上昇した。一方、浮遊状態においては miR-15b-3p、miR-6508-5p、miR-136-3p などの発現が低下し、接着状態においては miR-4318、miR-4797-5p、miR-410-5p などの発現が低下した。浮遊状態と接着状態では変動する microRNA が異なることを明らかにした。対照群と比較して2倍以上の変動が見られた因子を Muse 細胞にノックインまたはノックダウンし、ボイデンチャンバーを用いた遊走試験を試みたが、Muse 細胞の遊走能に大きな変化をもたらす因子は現時点で見いだせてはいない。そこで、これらの因子が変動するタイミングがそれぞれ異なること推測されたことから、2倍以上の変動の見られた因子について定量 PCR を用いて、経時的な変化を評価したところ、各因子において変動するタイミングが異なることが明らかとなった。本研究で明らかになった microRNA とその変動パターンをもとに今後遊走に関わる因子の同定を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zikuan Leng, Dongming Sun, Zihao Huang, Iman Tadmori, Ning Chiang, Nikhit Kethidi, Ahmed Sabra, Yoshihiro Kushida, Yu-Show Fu, Mari Dezawa, Xijing He, and Wise Young	4. 巻 -
2. 論文標題 Quantitative Analysis of SSEA3+ Cells from Human Umbilical Cord after Magnetic Sorting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kushida Y, Wakao S, Dezawa M.	4. 巻 1103
2. 論文標題 Muse Cells Are Endogenous Reparative Stem Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 43-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-4-431-56847-6_3	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 Wakao S, Kushida Y, Dezawa M.	4. 巻 1103
2. 論文標題 Basic Characteristics of Muse Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 13-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-4-431-56847-6_2	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 Tatsumi K, Kushida Y, Wakao S, Kuroda Y, Dezawa M	4. 巻 1103
2. 論文標題 Protocols for Isolation and Evaluation of Muse Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 69-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-4-431-56847-6_4	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 Uchida, N. Kushida, Y. Kitada, M. Wakao, S. Kumagai, N. Kuroda, Y. Kondo, Y. Hirohara, Y. Kure, S. Chazenbalk, G. Dezawa, M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Beneficial Effects of Systemically Administered Human Muse Cells in Adriamycin Nephropathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 2946-2960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2016070775	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 Yamada, Y. Wakao, S. Kushida, Y. Minatoguchi, S. Mikami, A. Higashi, K. Baba, S. Shigemoto, T. Kuroda, Y. Kanamori, H. Amin, M. Kawasaki, M. Nishigaki, K. Taoka, M. Isobe, T. Muramatsu, C. Dezawa, M. Minatoguchi, S.	4. 巻 122
2. 論文標題 S1P-S1PR2 Axis Mediates Homing of Muse Cells into Damaged Heart for Long Lasting Tissue Repair and Functional Recovery After Acute Myocardial Infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation research	6. 最初と最後の頁 1069-1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/circresaha.117.311648	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 Hosoyama, K. Wakao, S. Kushida, Y. Ogura, F. Maeda, K. Adachi, O. Kawamoto, S. Dezawa, M. Saiki, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Intravenously injected human multilineage-differentiating stress-enduring cells selectively engraft into mouse aortic aneurysms and attenuate dilatation by differentiating into multiple cell types	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of thoracic and cardiovascular surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2018.01.098	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 Abe Takatsugu, Aburakawa Daiki, Niizuma Kuniyasu, Iwabuchi Naoya, Kajitani Takumi, Wakao Shohei, Kushida Yoshihiro, Dezawa Mari, Borlongan Cesar V., Tominaga Teiji	4. 巻 51
2. 論文標題 Intravenously Transplanted Human Multilineage-Differentiating Stress-Enduring Cells Afford Brain Repair in a Mouse Lacunar Stroke Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 601 ~ 611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.119.026589	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 串田良祐
2. 発表標題 修復幹細胞としてのMuse細胞の可能性
3. 学会等名 In vivo イメージングフォーラム2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 串田 良祐, 若尾 昌平, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一郎, 飯島 一誠, 出澤 真理
2. 発表標題 臍帯組織由来Muse細胞の栄養膜細胞への分化
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 串田 良祐, 若尾 昌平, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一郎, 飯島 一誠, 出澤 真理
2. 発表標題 臍帯組織由来Muse細胞の栄養膜細胞への分化の可能性
3. 学会等名 第124回日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 串田 良祐, 若尾 昌平, 西村 範行, 岩谷 壮太, 香田 翼, 森岡 一郎, 溝淵 雅巳, 飯島 一誠, 出澤 真理
2. 発表標題 臍帯組織由来 Muse 細胞の多能性の解析 - 栄養膜細胞分化の可能性 -
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro KUSHIDA, Kazuki TATSUMI, Tatsuya SEGAWA, Mieko OHTSU, Noriyuki NISHIMURA, Masahiro MAEDA, Naoya MASUTOMI, Shohei WAKAO, Mari DEZAWA
2. 発表標題 Development of a novel antibody for pluripotent stem cell marker SSEA-3
3. 学会等名 11th Pan Pacific Symposium on Stem Cells & Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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 <a href="http://www.stemcells.med.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.stemcells.med.tohoku.ac.jp/index.html</a>
---

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