

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06062・19K21187

研究課題名(和文) 生体内に存在する多能性幹細胞(Muse細胞)の分化メカニズムの経時的解析

研究課題名(英文) Time-lapse analysis of Muse cell differentiation in vivo

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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)： Muse 細胞は多能性幹細胞マーカーSSEA-3 を指標に生体より直接単離することが可能であり、損傷モデル動物へ点滴投与するとその損傷部位へと遊走し、その部位に応じた機能的な細胞へと分化する。しかしながら移植後の自発的な分化メカニズムなどの生体内での詳細な挙動は未だ不明なままである。そこで本研究では、脳梗塞モデルマウスを生かしたまま、長時間観察し続けることが可能な多光子顕微鏡を用いて、移植後のMuse細胞が分化する様子の詳細な観察を試みた。その結果、Muse細胞は、移植してから1-2日と早い段階で分化す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

Muse 細胞は生体から単離することができ、高い分化能を維持したまま移植に用いることができる多能性幹細胞である。点滴投与すると損傷部位へと優先的に遊走し、さらにその部位に応じた機能的な細胞へと分化することから、将来性が有望視されているが、一方で移植後の自発的な分化メカニズムなどの生体内での詳細な挙動は未だ不明なままである。

本研究の結果は今後Muse細胞を用いた研究を行う際の時間的計画を立てる際の足掛かりとなるだけでなく、事前に誘導をかけているわけでもないMuse細胞が、どのようにして周囲の環境を読み取り、迅速に分化するのか、その詳細なメカニズムを解明する大きな一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Muse cells can be isolated directly from living bodies using the pluripotent stem cell marker SSEA-3 as an indicator. In addition, when administered intravenously to an animal model of the injury, they migrate to the injury site and differentiate into functional cells appropriate to the site. However, their spontaneous differentiation mechanism after transplantation is still unclear. In this study, we attempted to observe in detail the differentiation of Muse cells after transplantation by using a multi-photon microscope, which enables us to keep cerebral infarction model mice alive for a long time.

The results showed that Muse cells started to differentiate within 1-2 days after transplantation.

研究分野：再生医療

キーワード：Muse細胞 多能性幹細胞 再生医療 分化 多光子励起顕微鏡 in vivo imaging live imaging

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、機能的に収縮する心筋細胞 (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・メサングウム細胞・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)。しかしながら、これらの結果は *in vitro*、あるいは Muse 細胞を移植した各種損傷モデル動物の組織切片で確認されたものであり、生体内での自発的な分化を開始させるためのトリガーとなるメカニズムは明らかになっていなかった。将来的に、患者本人の体内に存在している Muse 細胞を採取することなく、直接損傷部位に誘導して治療するという新たな再生医療法へと発展させるためには、生体内における挙動を生きた状態で経時的に観察し、最終的にその挙動をコントロールできるようにすることが必要不可欠であるとしてその解析が求められていた。

2. 研究の目的

申請者らの報告したヒト Muse 細胞は多能性を有する一方で腫瘍形成能を持たないという、他の多能性幹細胞とは異なる非常にユニークな特徴を持っている。最近になり Muse 細胞を用いた急性心筋梗塞患者への治験も開始され、さらなる応用研究にますます期待がかかってきている。しかしその一方で、これまでの移植実験を通して得られた Muse 細胞の知見は主に組織切片を観察したものであり、これは Muse 細胞が生体内でどのように損傷部位へと遊走し、続いてその場所でどうやって周囲の環境に応じて分化を開始するのかといった疑問を解決するには不十分である。そこで本研究は近年、生体イメージングを行う上で極めて有効とされている多光子励起顕微鏡を用いることで Muse 細胞の生体内での挙動を経時的に観察することを目的とし、本研究で得られる知見を基に Muse 細胞の生体内における、より効果的な遊走法・分化誘導法の確立へと将来的に発展させていくことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で使用する多光子励起顕微鏡は、高解像度を保ったまま、より深くにある組織を観察できる非常に優れた顕微鏡ではあるものの、それでもなお、その最大到達深度は組織表面から 1 mm 程度であり、生体のすべてを無制限に観察できるわけではない。そのため損傷モデルの選定がこの研究の重要な点となる。そこで損傷モデルの選定、および観察系の樹立を試みた。その後、SSEA-3 をマーカーとしてヒト間葉系細胞から蛍光標示式細胞分取器 (FACS) を用いて採取した Muse 細胞を移植した。その際、移植した細胞をトラッキングするために常時発現プロモーター下流に mCherry を、また分化確認用に神経系特異的発現遺伝子である NeuroD1 のプロモーター下流に CFP をそれぞれレンチウイルスを用いて導入しておくことで生体内での Muse 細胞の遊走および分化を経時的に観察できるようにした。

4. 研究成果

本研究で用いるマウスの損傷モデルについて検討したところ、アクセスのしやすさ、撮影のしやすさ、適度なダメージの与えやすさといった観点から、最終的に脳梗塞モデルマウスに決定し、

以後の実験に使用した。そして、このマウスを生かしたまま、脳の状態を保ったまま多光子顕微鏡を用いて長時間観察し続けることが可能な系を開発した。このモデルに標識した Muse 細胞を局所注射し、その挙動を多光子励起顕微鏡を用いて観察することで最終的に Muse 細胞が分化し始める瞬間を撮影することに成功し、結果 Muse 細胞は、移植してから 1-2 日と早い段階で分化を開始することが明らかとなった。

本研究の結果は今後 Muse 細胞を用いた研究を行う際の時間的計画を立てる際の足掛かりとなるだけでなく、事前に誘導を受けたわけでもない Muse 細胞が、どのようにして周囲の環境を読み取り、迅速に分化するのか、その詳細なメカニズムを解明する大きな一助となるものと考えられる。

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〕

-

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