

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659667

研究課題名（和文）新たなヒト体性多能性幹細胞（Muse 細胞）を用いた心筋再生治療の開発

研究課題名（英文）Development of cardiac regenerative medicine using a novel human somatic stem cell (Muse cell)

研究代表者

寒川延子（SOUGAWA NAGAKO）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：30432579

研究成果の概要（和文）：本研究は、Muse 細胞が ES 細胞や iPS 細胞が抱える問題を克服できるような再生医療に適した細胞源となり得るかどうかを検討することを目的とする。Muse 細胞（SSEA3 陽性細胞）は培養正常ヒト皮膚線維芽細胞に含まれているが、細胞 lot 間での SSEA3 陽性率は大きく異なり、安定して SSEA3 陽性細胞を回収することは極めて困難で、十分な細胞数を得ることができなかつた。さらなる検討を行うためには、安定して SSEA3 陽性細胞を得られる細胞群の探索と、維持培養法の確立が必要である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate whether Muse cells can overcome the problems embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells have and can contribute to regenerative medicine. Although Muse cells (SSEA3 positive cells) existed in normal human dermal fibroblasts, there were great differences in SSEA3 positive rate among cell lots, so that it was extremely difficult to obtain Muse cells stably, and we could not get the sufficient number of the cells. Therefore, for further investigations, we need the search for the cells and the establishment of maintenance culture methods to obtain the SSEA3 positive cells stably.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：再生医学、幹細胞、Muse 細胞

1. 研究開始当初の背景

重症心不全に対する根本的な治療法として心臓移植があるが、常に臓器提供者は不足

している。近年、幹細胞をさまざまな細胞に分化させ、移植する再生医療が期待されている。胚性幹（ES）細胞は分化能・増殖能にお

いて他の幹細胞より優れているが、倫理的な問題および移植後の拒絶反応や、腫瘍化する点など解決すべき課題がある。その後に樹立された誘導多能性幹 (iPS) 細胞では、ES 細胞がもつ倫理的な問題や拒絶反応といった問題がなく、電気的、組織的特異性を有する心筋細胞への分化が可能であることがすでに報告されていることから、極めて魅力的な移植細胞源と考えられた。しかし、移植後の安全性の確保、腫瘍化の問題は残ったままである。このような点から、現段階では、心筋再生医療に最も適した細胞源を確定できていない。2010年に、第3の多能性幹細胞と言われる Muse (multilineage differentiating stress enduring) 細胞が報告された。この細胞は多能性幹細胞マーカーを発現し、1細胞から三胚葉性の細胞に分化する能力を有している。さらに、自己複製能をもつなど多能性幹細胞としての特性を有している。しかし、他の多能性幹細胞とは異なり、奇形腫を形成しないという特徴を持つ。さらに、損傷した皮膚や変性した大腿筋、あるいは傷害を受けた肝臓に Muse 細胞を投与すると、損傷組織に生着し、その組織特有の細胞に分化することが確認されている。これらの点から、Muse 細胞というもともと生体内に存在する細胞を利用することで、多能性を持たせるための特別な操作を必要とせず、また腫瘍化の危険性が極めて低いため、現在 iPS 細胞を利用した再生医療が抱えている問題を克服し、心疾患再生医療に対する貢献意義は非常に大きいと考えた。

2. 研究の目的

重症心不全に対する治療法の一つとして、近年急速な発展を遂げた ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医療が脚光を浴びているが、この再生医療には、倫理的な問題や移植後の安全

性の問題など、多くの課題が残っている。本研究では Muse 細胞が ES 細胞や iPS 細胞が抱える倫理的な問題や移植後の安全性の問題を克服できうるような再生医療に適した細胞源となるのかどうかを検討し、その有用性を分子レベル、細胞レベル、組織レベルで評価することにより、Muse 細胞を用いた心疾患に対する新たな治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Muse 細胞の分離

Muse 細胞の表面マーカーである SSEA3 を指標に、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト間葉系細胞、筋芽細胞 などからより効率良く Muse 細胞を得ることができる細胞源を検討し、これらの細胞から SSEA3 陽性細胞を FACS Sorting にて分離した。

(2) Muse 細胞の培養法等の検討

Muse 細胞の未分化性維持や心筋分化誘導法に適した培養基質を探索することを目的とし、細胞表面の接着分子であるインテグリンの発現を FACS および RT-PCR 法にて確認した。また、正常ヒト皮膚線維芽細胞を様々な細胞外基質上で培養し、その増殖能、分化能について検討した。

(3) 発現遺伝子、発現分子の検討

SSEA3 陽性細胞、SSEA3 陰性細胞、および iPS 細胞より mRNA を採取し、マイクロアレイ (遺伝子レベル) により遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較検討した。

4. 研究成果

(1) Muse 細胞の表面マーカーである SSEA3 を指標に、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞、培養ヒト骨髄由来間葉系細胞、ヒト筋芽細胞など

に含まれる Muse 細胞の FACS sorter による分取を試みた。その結果、成人由来培養正常ヒト皮膚線維芽細胞では lot 間で SSEA3 陽性率は異なるものの、~4%程度の SSEA3 陽性細胞を採取し得た。尚、継代とともに SSEA3 陽性率は減少し、12 継代以降はいずれの lot においても SSEA3 陽性細胞はほとんど消失した。また、新生児由来培養正常ヒト皮膚線維芽細胞を用い、SSEA3 陽性細胞の分取を試みた。しかし、成人由来培養正常ヒト皮膚線維芽細胞と比して SSEA3 陽性細胞率が高くなることはなく、成人由来培養正常ヒト皮膚線維芽細胞と比して早い継代数（7-8 継代以降）で、いずれの lot においても SSEA3 陽性細胞はほとんど消失した。一方、培養ヒト骨髄由来間葉系細胞や筋芽細胞の SSEA3 陽性細胞は極めて少なく、その採取は困難であった。

- a) 成人由来正常ヒト皮膚線維芽細胞
(lot No. 0000250896, 8 継代)
SSEA3 陽性細胞 0.5%
- b) 成人由来正常ヒト皮膚線維芽細胞
(lot No. 0000221920, 11 継代)
SSEA3 陽性細胞 1.8%
- c) 新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞
(lot No. 0000251354, 6 継代)
SSEA3 陽性細胞 1.3%
- d) 新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞
(lot No. 0000251354, 7 継代)
SSEA3 陽性細胞 0.5%
- e) ヒト筋芽細胞
(5 継代) SSEA3 陽性細胞 0.0%

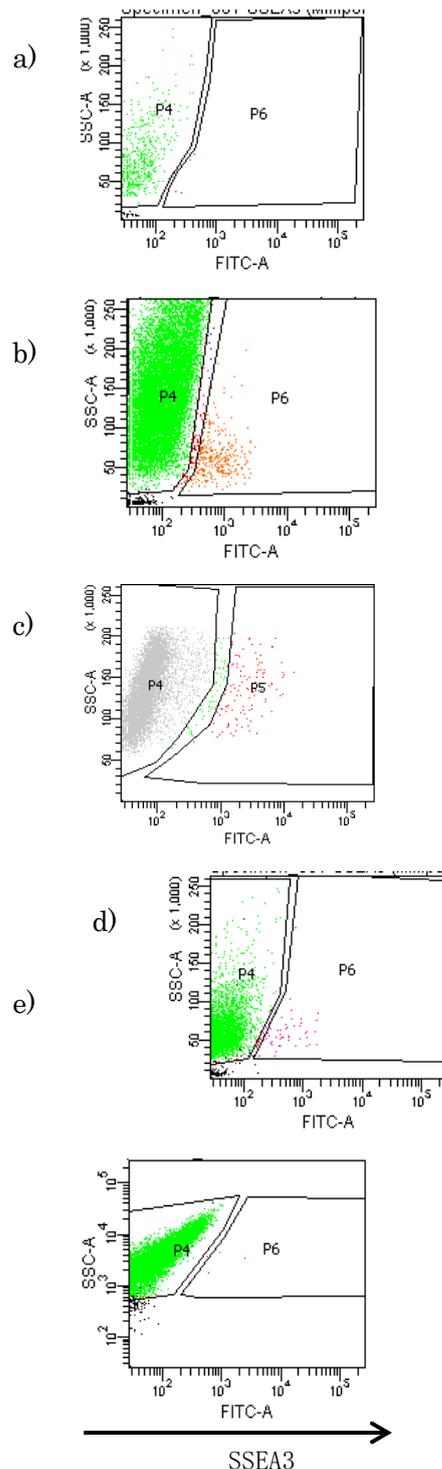


図1 SSEA3 陽性細胞率

(2) Muse 細胞の未分化性維持、心筋分化誘導に適した培養基質を探索することを目的とし、細胞表面の接着分子であるインテグリンの発現を FACS ならびに RT-PCR 法にて検討した。タンパク質レベルにおいて、SSEA3 陽性

細胞と SSEA3 陰性細胞間でインテグリン発現に有意な差は認められず、SSEA3 陽性細胞、SSEA3 陰性細胞共に $\alpha 3$ インテグリン、 $\alpha 5$ インテグリンの発現が高く、 $\alpha 6$ インテグリンの発現は低レベルであった。続いて、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン等の細胞外基質上で、正常ヒト皮膚線維芽細胞を培養し細胞の接着能と増殖能について検討を行った。その結果、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞はフィブロネクチン、ある種のラミニンに対して非常に強い接着能を示した。フィブロネクチンは $\alpha 5$ インテグリンをレセプターとし、ある種のラミニンは $\alpha 3$ インテグリンをレセプターとすることから、インテグリンの発現と接着能は一致する結果であった。増殖能については、フィブロネクチン、ある種のラミニン上で培養した正常ヒト皮膚線維芽細胞は、他の基質上で培養した細胞に比してやや高い傾向が認められたが、有意差が認められるものではなかった。

(3) 正常ヒト皮膚線維芽細胞由来 SSEA3 陽性細胞と SSEA3 陰性細胞、および iPS 細胞より mRNA を採取し、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較検討した。その結果、iPS 細胞と SSEA3 陽性細胞を比較すると、未分化性や腫瘍原性に関わる遺伝子の発現は iPS 細胞に高い傾向が認められた。一方、SSEA3 陽性細胞においては、ニューレグリン 1 (NRG1)、増殖分化因子 6 (GDF6) あるいは上皮成長因子 (EGF) 等の上皮細胞や神経細胞の増殖・分化に関わる遺伝子群の一部が高い発現傾向を示していた。SSEA3 陽性細胞と SSEA3 陰性細胞を比較しても、腫瘍原性に関わる遺伝子群の発現は、SSEA3 陽性細胞において低い傾向が認められる一方で、脳由来神経栄養因子受容体 (NTRK3)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、骨形成タンパク質 (BMP) 等、細胞の生存・増殖・分化に関わる遺伝子

群の一部は、SSEA3 陽性細胞において高い発現傾向が認められた。今回の遺伝子プロファイルの網羅的解析において、SSEA3 陽性細胞は、SSEA3 陰性細胞や iPS 細胞に比して、神経細胞の増殖・分化に関わる遺伝子群が多く発現している傾向が認められた。

(4) 成人由来、新生児由来どちらの培養正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いても、lot 間で SSEA3 陽性細胞率は大きく異なり、また、一定の継代数を越えると、ほとんど SSEA3 陽性細胞は確認できなくなった。そのため、安定して十分な数の SSEA3 陽性細胞を得ることができず、遺伝子発現プロファイルの再現性確認には至らなかった。また、分化能についても、十分な細胞数を得ることができず、検討に至らなかった。さらなる検討を進めて行く上でも、SSEA3 陽性細胞を多く含む細胞群の探索と、その細胞の維持培養法の確立が急務である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寒川 延子 (SOUGAWA NAGAKO)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：30432579

(2) 研究分担者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00243220

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70544237

西 宏之 (NISHI HIROYUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00529208

吉川 泰司 (YOSHIKAWA YASUSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40570594

井手 春樹 (IDE HARUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：90600122