

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 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：2011～2012

課題番号：23890015

研究課題名（和文） 新規の多能性幹細胞 Muse 細胞の生体内における動態解析および発生学的起源の同定

研究課題名（英文） In vivo analysis of novel type of adult human pluripotent stem cells.

研究代表者

黒田 康勝 (KURODA YASUMASA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00614504

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規のヒト多能性幹細胞 Muse 細胞の、ヒト・マウスで共通して単離に使用できる遺伝子マーカーの探索を試みた。次世代シーケンス解析やマイクロアレイによる解析を行い、それらの結果をもとに実際に FACS を用いて sorting を行った。Muse 細胞の持つ特徴の一つである浮遊培養状態でのクラスター形成能の評価を行った結果、数種類の最終候補を得ることに成功した。さらに、Muse 細胞の単離法に関する改良も行った結果、より少ないダメージで単離できる方法を確立した。

研究成果の概要（英文）： In this study, We tried to identify gene markers for isolating novel type of adult human pluripotent stem cells, Muse cells. Finally we were able to get some candidate from results of the next generation sequencing and the microarray analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：多能性幹細胞・体性幹細胞・再生医療

1. 研究開始当初の背景

近年、多分化能を持つ幹細胞を利用した再生医療に注目が集まっている。特に、マウス胚性幹(ES)細胞株の樹立(Evans MJ et al., Nature, 1981)にはじまる万能細胞を用いた再生医療の可能性は、ヒト ES 細胞株が樹立(Thomson JA et al., Science, 1998)されたことにより大きく加速した。一方再生医療分野では、ES 細胞は他者由来の細胞であるため移植

の際に拒絶反応が生じる点や、受精卵を破壊して樹立するという性質上、倫理的な批判を受ける可能性があることが議論され、特に後者は ES 細胞研究における大きな枷とされている。上記のような ES 細胞の問題を克服しうる新たな万能細胞として、人工多能性幹細胞(Induced Pluripotent Stem Cells, iPS 細胞)が創出された(Takahashi K et al., Cell, 2006)。iPS 細胞は、本人の細胞を使用

することから倫理問題もなく、また拒絶反応も生じないことから新たな医療の可能性を開いたものの、再生医療という観点から見た場合、ES細胞と同様に移植時にわずかでも未分化細胞が残存していると腫瘍形成の危険性があるという報告(e.g., Pozzobon M et al., *Pediatr Surg Int.*, 2010)があることから、臨床応用へ進めるにあたって大きな課題となっている。現在、腫瘍形成を回避する手段として、iPS作製の際にがん遺伝子を導入しない方法をはじめとする様々な研究が積極的に進められているが、現状ではこの懸念を完全に払拭するには至っていない。

このような状況の中、報告者らはヒト骨髓間葉系細胞(Marrow Stromal Cell, 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単離することに成功した。そしてこの細胞を multilineage differentiating stress enduring (Muse) cell と名付けた(Kuroda Y et al., *PNAS*, 2010)。

報告者らはMSCを通常の接着培養で培養すると、ES細胞と酷似したクラスターが自然発生的に形成されることを発見した。加えて、このクラスターはしばらく増殖すると成長が止まり、その中に外胚葉、中胚葉、内胚葉性のマーカー陽性の細胞が混在することを見出した。このことから、ヒトMSCには3胚葉への分化が可能な多能性幹細胞と考えられる細胞が内包されていることが示唆された。しかし、このクラスターの形成自体が非常に低い頻度でしか生じないことから、基となる細胞の同定は困難であったため、報告者らは幹細胞研究で通常試みられるFACSを用いた表面抗原による細胞分画法(e.g. Suzuki A et al., *Diabetes*, 2004)ではなく、ストレス耐性が高いという幹細胞としての特性に着目して単離・解析する方法を試みた。報告者らはヒトMSCおよび他の間葉系細胞であるヒト線維芽細胞に他の細胞が死滅するストレス(長時間のトリプシン処理)を与えても一部の細胞が生存し、またこの細胞はヒトES細胞から胚様体を作製する際に用いられる浮遊培養を行うことで、ヒトES細胞の胚様体と酷似したクラスターを形成することを見出した。このクラスターはES細胞やiPS細胞と同様にアルカリフォスファターゼ反応陽性であり、またOCT3/4, SOX2, Nanog, PAR4などの多能性幹細胞マーカーを発現していることも確認された。さらに、自己複製能と共にこの細胞が1

細胞から外胚葉、中胚葉、内胚葉性の細胞に分化することも確認した。また、ストレス処理の前後の集団でMSCと線維芽細胞それぞれの表面抗原の陽性率の差を調べることによりマーカーの探索を行ったところ、ヒトES細胞の表面マーカーとして知られているSSEA-3がかかる細胞のマーカーとなり得ることを確認した。また、SSEA-3陽性の細胞が1細胞単位で多能性幹細胞マーカーを発現していることも確認された。これらのことからSSEA-3を発現している細胞が培養細胞中に存在し、それが多能性幹細胞様の特性を示すことが明らかとなった。さらに、報告者らはヒト骨髓穿刺液から培養操作を加えることなく直接単核球細胞成分を単離し、SSEA-3陽性の細胞がヒト生体中に存在するか検討した。その結果、それぞれの成体組織に間葉系細胞のマーカーであるCD105陽性かつSSEA3陽性の細胞が極少量(骨髓単核球成分の0.025~0.05%)ではあるが存在することを確認し、さらにこの細胞が培養細胞から単離した細胞と同様にクラスターを形成すること、多能性幹細胞マーカーを発現していること、3胚葉性の細胞に分化することを証明した。また、ストレスは必ずしも必要ではなく、ヒトMSC、ヒト線維芽細胞群、あるいは新鮮ヒト骨髓液から直接、多能性を持つ細胞が同定されることがわかった。これらのことから、報告者らの単離した細胞はヒト生体にも自然に存在しており、ストレスに強いという特徴を持ち、1細胞から3胚葉性の細胞への分化能および自己複製能といった多能性幹細胞の特徴を有した新たな幹細胞である。このように、Muse細胞はそもそもヒトの生体に内在している多能性幹細胞であり、多能性を持たせるための遺伝子導入などを必要とせず、非常に簡便な方法で単離することが可能である。また、マウスの精巣にES細胞やiPS細胞を移植した場合、8週間後には奇形腫を形成するが、ヒトMuse細胞を移植した場合には半年が経過しても奇形腫の形成は確認されなかった。この現象はヒトMuse細胞の特性を反映していると考えられ、ヒトMuse細胞を用いることで現在ES細胞やiPS細胞が直面している腫瘍形成問題を解決できると大いに期待される。

2. 研究の目的

近年ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞を用いた再生医療に注目が集まっているが、これらの多能性幹細胞を未分化な状態で生体へ移植すると腫瘍を形

成することが報告されており、臨床応用へ進めるにあたって大きな課題となっている。これに対し報告者らはヒト生体より腫瘍形成能を示さない新たな多能性幹細胞を直接単離し、**multilineage differentiating stress enduring (Muse) cell** と命名した。ヒト Muse 細胞は ES/iPS 細胞と異なり腫瘍を形成せず、臨床応用へ進める上で大きな利点を持っているが、生体内での動態や発生の起源などは現在不明である。通常これらの解析はマウスを用いて行われるが、Muse 細胞はヒトでのみ同定されており、マウスでは同定されていない。しかし報告者らは既にマウス間葉系細胞中に Muse 細胞が存在することを示唆するデータを得ている。そこで本研究ではマウス Muse 細胞特異的発現遺伝子を同定し、該当遺伝子をマーカーとして発生学的系譜の追跡および生体組織における局在解析を行う。加えて次々世代の新たな治療を目指し、細胞特異的な走化・増殖・分化誘導因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

現在 FACS を使用し、マウス ES 細胞などで発現している細胞表面マーカーや、マウス ES 細胞などの分離培養を可能とする生理活性物質(レクチン)を用いて **sorting** を行い、これらがマウス Muse 細胞のマーカーとして使用できるかクラスターの形成率で評価している。また、これと平行してすでに SSEA-3 というマーカーが同定されているヒト Muse 細胞を用いて、マイクロアレイおよび次世代シーケンサーで遺伝子の発現解析を行っており、このデータに基づきヒト Muse 細胞のマーカーである SSEA-3 陽性および陰性の細胞との比較により得られた、Muse 細胞特異的な遺伝子を候補として選定する。候補の選定後は qPCR および NanoString nCounter gene expression system (Geiss GK et al., Nat Biotechnol, 2008)を用いて候補遺伝子の変動について定量的解析を行う。NanoString nCounter gene expression system は当研究室にすでに導入されている mRNA 発現の定量的解析を行うための解析装置であり、特徴として mRNA から cDNA への逆転写反応を行わずに解析できるという利点がある。このため、逆転写酵素の転写効率や反応の偏りによる影響に結果を左右されることなく解析を行うことが可能であり、しかも幹細胞のように大量に細胞を収集するのが容易でない場合でも利

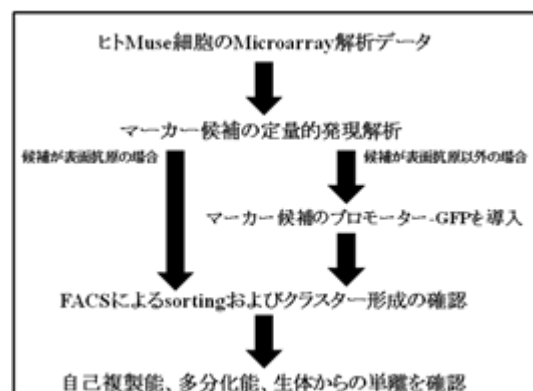
用できる解析系である。これらの定量的解析により、実際に発現が確認された遺伝子に関してそれぞれマウスでホモログが存在するかどうかを確認する。本研究で用いるマイクロアレイデータは、間葉系細胞から採取したヒト Muse 細胞より得られたものであるため、間葉系以外の細胞では発現がもともと高い場合が考えられる。そこで、ホモログが存在する遺伝子に関しては、組織別遺伝子発現データベースを用いて他の組織における発現が高いものはマーカー候補となりえないものとして除外する。その際、全てのマーカー候補が除外されるような場合には、次善策として今後の実験を間葉系細胞のマーカーである CD105 と共染色することで対応することを計画している。残ったマーカーとなり得る遺伝子に関して解析を進めていくが、表面抗原かそれ以外かで手順を変更することを以下のように計画している。

i) 表面抗原の場合

マーカー候補が表面抗原であった場合、マーカー陽性および陰性の細胞を **sorting** し、クラスターの形成率で評価する。または、FACS により Naïve と比較して長時間トリプシン処理後の集団で発現が有意に上昇しているものを選択する。

ii) 表面抗原以外の場合

マーカー候補となるタンパク質のプロモーター配列の下流に GFP を導入したプラスミドを作製し、MSC および線維芽細胞に導入する。48 時間経過した後、GFP 陽性細胞を FACS により **sorting** し、クラスター形成率で評価する。クラスター形成まで確認されたマーカーに関して、ヒト Muse 細胞を同定した際と同様に、接着-浮遊培養系による自己複製能の維持や *in vitro* および *in vivo* における多分化能の確認、さらにマウス生体からの単離を試み、最終的にマウス Muse 細胞のマーカーを決定する。



4. 研究成果

本研究は、新規のヒト多能性幹細胞 Muse 細胞の生体内における動態解析および発生学的起源の同定を目的として行った。しかしながら、現在同定されている Muse 細胞のマーカーである SSEA-3 は糖脂質であり、これをコードする遺伝子は存在しない。本研究を遂行するに当たってはトランスジェニックマウスの作製が必要となるため、遺伝子マーカーの探索を試みた。

次世代シーケンス解析やマイクロアレイの結果から絞り込んだマーカー候補について FACS を用いて実際に sorting を行い、Muse 細胞の持つ特徴の一つである浮遊培養状態でのクラスター形成能の評価を行った結果、数種類の最終候補を得ることに成功した。このうち、1 つのマーカー候補に関しては、従来のマーカーである SSEA-3 との double positive 細胞が形成するクラスターのサイズが著しく大きくなるなどの特徴を有していることを明らかにした。

また、この結果を得る過程で、クラスター形成時の浮遊培養は従来の poly-HEMA コーティングを施したプレートを用いるよりも hanging drop 法のほうが良いことや、物理的に弱いマウスの Muse 細胞を単離する際には、細胞に与えるダメージが大きくなりがちな FACS を用いるよりも、磁力を利用して分離を行う MACS のほうがダメージが少なく済み、結果としてその後の生存率などの点において優れていることなどを明らかにした。

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 10 件)

- ① 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 mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques", *J. Clin. Invest.* (2013) 123(1):272-84. (査読あり), 10.1172/JCI62516
- ② 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 cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplant.* (2012). (査読あり), 10.3727/096368912X658791
- ③ Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Ogura F, Murakami T, Dezawa M. "Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells", *PLoS One* (2012) 7(12):e48677. (査読あり), 10.1371/journal.pone.0048677
- ④ Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Dezawa M. "Isolation of adult human pluripotent stem cells from mesenchymal cell populations and their application to liver damages", *Methods Mol. Biol.* (2012) 826 89-102. (査読あり), 10.1007/978-1-61779-468-1_8
- ⑤ Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011) 108(24):9875-80. (査読あり), 10.1073/pnas.1100816108
- ⑥ Kitada M, Kuroda Y, Dezawa M. Lectins as a tool for detecting neural stem/progenitor cells in the adult mouse brain. *Anat. Rec.* (2011) 294(2):305-21. (査読あり), 10.1002/ar.21311
- ⑦ Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and umbilical cord as sources for Schwann cell differentiation: their potential in peripheral nerve repair. *The Open Tissue Engineering and Regenerative medicine Journal.* (2011) 4:54-63. (査読あり), 10.2174/1875043501104010054
- ⑧ Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Bone Marrow Mesenchymal Cells: How Do They Contribute to Tissue Repair and Are They Really Stem Cells? *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (2011) 59:369-78. (査読あり), 10.1007/s00005-011-0139-9
- ⑨ 黒田康勝、出澤真理 間葉系幹細胞における多様な分化と組織修復能を担う Muse 細胞の発見. *血液フロンティア*, (2011) 21(11):1664-1669. (査読なし)
- ⑩ 黒田康勝、出澤真理 間葉系幹細胞の特性と再生医療における展開. *再生医療* (2011) 10(1):8-11. (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 黒田康勝、繁本妙子、出澤真理、他家移植へ向けた Muse 細胞の可能性、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年03月28日～2013年03月30日、香川
- ② 黒田康勝、繁本妙子、出澤真理、他家移植へ向けた Muse 細胞の可能性、解剖学会第 58 回東北・北海道連合支部学術集会、2012年09月22日～2012年09月23日、山形
- ③ 黒田康勝、(他 9 名)、成人ヒト間葉系細胞に内在する多分化能細胞の探索、第 11 回日本再生医療学会 総会、2012年06月12日～2012年06月14日、横浜
- ④ Yasumasa Kuroda、(他 9 名)、Novel type of adult human pluripotent stem cells that exist in mesenchymal cell population、The 5th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and (他 9 名)Cancer Research、2012年04月13日～2012年04月15日、台湾 (中華人民共和国)

[その他]

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野・人体構造学分野

<http://www.stemcells.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 康勝 (KURODA YASUMASA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00614504

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：