

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790188

研究課題名(和文) マウス生体由来多能性幹細胞(Muse細胞)の発生学的解析

研究課題名(英文) Embryological analysis of mouse Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells.

研究代表者

若尾 昌平(Wakao, Shohei)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80511948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Muse細胞は多能性幹細胞マーカーであるSSEA-3陽性細胞として間葉系幹細胞から単離可能である。しかしSSEA-3は糖脂質であるため、発生学的解析が困難である。そこでMuse細胞の新たなマーカーを探索するために、様々な抗体を用いたFACS解析の結果、Cripto-1がSSEA-3に代わる新たなマーカーとなる可能性が示唆された。そこでGFPをレポーターとしたトランスジェニックマウスを作製し、組織学的解析を行った。その結果、SSEA-3とGFPの二重陽性細胞が存在することが確認された。これらの結果から、Cripto-1はマウスMuse細胞の新たなマーカーであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Muse cells can be isolated from mesenchymal stem cells by FACS as cells positive for stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3), a marker for undifferentiated human pluripotent stem cells. However, SSEA-3 is a glycolipid, it is difficult to embryological analysis. In order to search for the new marker, Muse cells were subjected to FACS analysis using various antibodies. From these results, it was suggested that Cripto-1 was a new marker in substitution for SSEA-3. Therefore, we constructed several lines of transgenic mice expressing GFP under the control of Cripto-1 promoter and subjected to histological analysis of these mice connective tissue. The GFP and SSEA-3 double positive cells were located sparsely in the connective tissue of the hypodermis and do not associated with particular structures such as blood vessels. These transgenic mice will be useful tool for future investigation of embryological analysis of Muse cells.

研究分野：幹細胞

キーワード：多能性幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

我々はヒト間葉系組織には自己複製能と三胚葉性の細胞への分化能を有する自然の多能性幹細胞の存在を明らかとし、Multilineage-differentiating stress enduring(Muse)細胞と命名して、PNAS,2010にて報告した。この Muse 細胞は (1). ヒト多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 により単離可能、(2). ストレス耐性、(3). 自己複製能を有する、(4). Oct3/4 や Sox2、Nanog といった多能性幹細胞マーカーを発現する、(5). 一細胞から三胚葉性の細胞への分化を示す、(6). 腫瘍形成は生じないという生体由来の特異な多能性幹細胞であることを明らかとした。

一方で、Muse 細胞のマーカーである SSEA-3 は糖脂質であり蛋白ではないため、その遺伝子が存在しない。また、SSEA-3 はマウス ES 細胞のマーカーではない。従って遺伝子改変動物の作製や発生学的解析が困難であるため、SSEA-3 に代わる新たなマーカーの探索が必須であった。

### 2. 研究の目的

Muse 細胞は、浮遊条件下で培養すると一細胞から ES 細胞由来の胚様体に類似した多能性幹細胞マーカーを発現する細胞塊(多能性細胞塊)を形成することが確認されている。そこでヒト骨髄間葉系細胞および皮膚由来線維芽細胞を、様々な細胞表面抗原において FACS 解析を行うことで SSEA-3 と二重陽性になる表面抗原を探索し、得られた細胞について細胞塊の形成率を検証した。その結果、SSEA-3 発現細胞の一部のみが Cripto-1 (teratocarcinoma-derived growth factor 1; Tdgf1)陽性であり、通常 SSEA-3 単独で単離した場合の細胞塊形成率が 50~60%程度であるのに対し、Cripto-1 を用いて単離した場合には多能性細胞塊の形成率が顕著に上昇することが分かった。このために Cripto-1 と SSEA-3 の二重陽性細胞は特に多能性活性が高い細胞であると考えられる。Cripto-1 はマウスやヒトなどの多能性幹細胞において共通して発現している GPI アンカー型タンパク質であり、多能性幹細胞の未分化性の維持や自己複製能(Abeyta MJ et al., Human. Mol. Genet, 2004)、初期胚の発生(Ding J et al., Nature, 1998)に参与する分子であることが知られている。このように、ヒト生体間葉系組織に存在する自然の多能性幹細胞である Muse 細胞において上記のような役割を担う遺伝子が発現していることは、非常に興味深いことである。しかしながら Cripto-1 をコードする遺伝子のプロモーターの制御によりレポーターを発現する系のトランスジェニックマウスの作製報告はなされていない。そのため、遺伝子改変動物を用いることで Muse 細胞の発生学的な起源を明らかとすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Muse 細胞において SSEA-3 と二重陽性となる表面抗原の同定と遺伝子発現等の解析: ヒト成体皮膚由来線維芽細胞や骨髄間葉系細胞を用いて、様々な表面抗原において FACS 解析を行い、SSEA-3 と二重陽性となる表面抗原を探索する。Muse 細胞は多能性を有する細胞であるため、ターゲットとなる表面抗原はヒト ES 細胞などにおいて特異的に発現している遺伝子が有力であると推測される。これらの遺伝子をリストアップし、それぞれ FACS 解析を行う。これまでの研究により、Muse 細胞は浮遊培養を行うことで一細胞から多能性細胞塊を形成することが確認されているため、今回の表面抗原の同定には FACS 解析だけでなく浮遊培養による多能性細胞塊の形成率やその大きさなども含めて検討を行う。また、これらの細胞を FACS により単離し、SSEA-3 単独で単離した細胞と、二重陽性細胞として単離した細胞の遺伝子発現パターンを解析することで、どのような違いがあるか解析する。

(2) 新たなマーカー候補である遺伝子について、トランスジェニックマウスの作製と解析: 上記の方法で得られた SSEA-3 に代わるマーカーが同定されたら、これらをコードする遺伝子のプロモーター制御によりレポーターを発現する系のトランスジェニックマウスを作製し、組織学的解析等を行うことでマウスにおける Muse 細胞の局在等の検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) Muse 細胞において SSEA-3 と二重陽性となる表面抗原の同定と遺伝子発現等の解析  
ヒト成体皮膚由来線維芽細胞や骨髄間葉系細胞を用いて、様々な表面抗原において FACS 解析を行い、SSEA-3 と二重陽性となる表面抗原を探索した。その結果、SSEA-3 陽性細胞のうち、一部の細胞にて Cripto-1 陽性であることが確認された(図.1)。

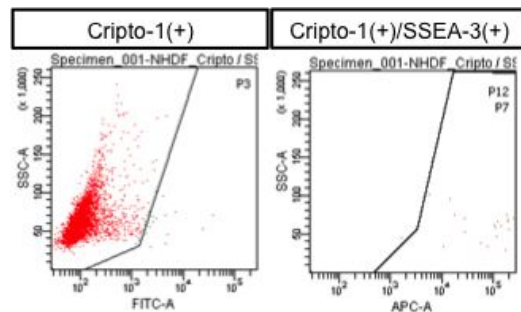


図.1 FACS解析による特異的マーカーの解析

これらの二重陽性細胞を FACS により単離し、浮遊培養による多能性細胞塊形成試験を行った。その結果、SSEA-3 のみをマーカーとして単離した場合よりも、SSEA-3 と Cripto-1 の二重陽性細胞を単離した場合の多能性細胞塊の形成率が顕著に上昇した。

胞塊の形成率が上昇し、さらにはより大きな

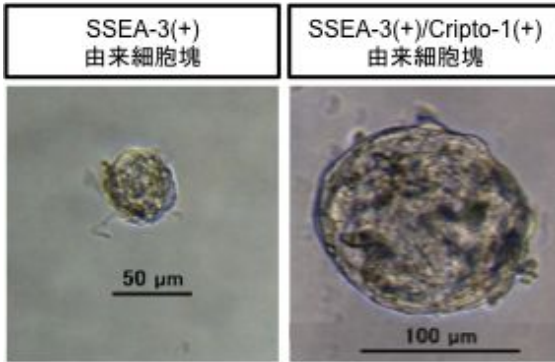
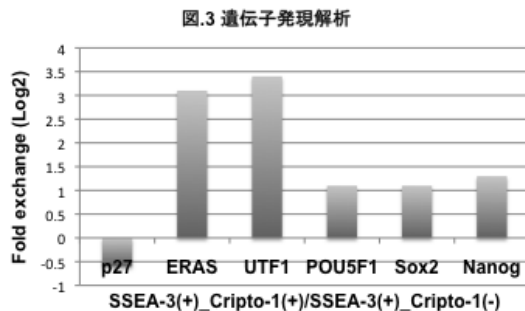


図.2 浮遊培養による多能性細胞塊の形成細胞塊を形成することが確認された(図.2)。

これらの結果から、Cripto-1 陽性細胞はより増殖活性の高い Muse 細胞のマーカーになり得る可能性が示唆された。次に、SSEA-3 と Cripto-1 二重陽性細胞と、SSEA-3 陽性で Cripto-1 陰性細胞をそれぞれ FACS により単離し、これらの細胞について Fluidigm の BioMark system を用いて single cell PCR を行うことで、多能性関連遺伝子群と細胞増殖関連遺伝子群について遺伝子解析を行った。その結果、多能性関連遺伝子群の発現はそれほど差が見られなかったことに対し、細胞増殖関連遺伝子群では SSEA-3 と Cripto-1 二重陽性細胞群において、細胞分裂を抑制する p27 の発現が低く、Eras や UTF1 といった多能性幹細胞の細胞増殖を惹起する遺伝子の発現が高いことが明らかとなり、これらの遺伝子の働きによって、より大きな多能性細胞塊が形成されていることが示唆された(図.3)。



(2) 新たなマーカー候補である遺伝子について、トランスジェニックマウスの作製と解析

上記のように、Cripto-1 が SSEA-3 に代わる新規のマーカーとなり得る可能性が示唆されたため、この遺伝子についてトランスジェニックマウスを作製することにした。Cripto-1 のプロモーター配列自体は明らかとされていないため、プロモーター領域を予測し、これらの配列と Cripto-1 遺伝子領域が十分に含まれている BAC clone の選定を行った。Cripto-1 遺伝子の ATG を利用して EGFP が発現するような EGFP-Neo カセットベクターを作製し、その前後に 500bp の homology arm を付けた。この fragment

を切り出し、BAC clone を持つ大腸菌へ遺伝子導入し、homologous recombination によってターゲット部位への挿入を行った。最後に、arabinose を加えることで flippase (Flpe) を発現させ、Neo/Km 遺伝子の欠失を行った。また、Cripto-1 のプロモーター配列は明らかとされておらず、今回作製したターゲティングベクターが細胞内で働くことを確認するために、mouse ES 細胞に導入することで EGFP の発現確認を行った(図.4)。

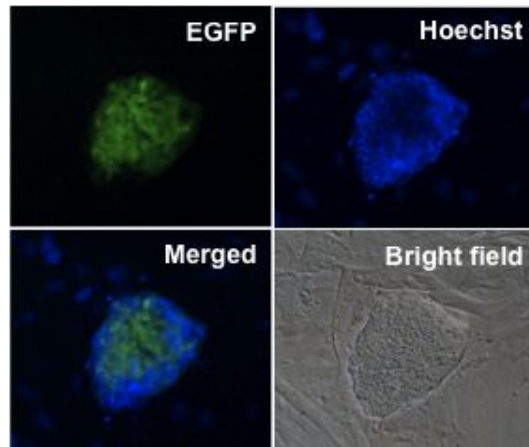


図.4 mouse ES細胞内での発現確認

mouse ES 細胞内において発現が確認されたことから、このターゲティングベクターをマウス受精卵へとインジェクションし、トランスジェニックマウスの作製を行った(図.5)。

得られた F0 マウスをジェノタイピングし、いくつかの系統のマウスが得られていることを確認した。これらのマウスから F1 マウスを作製し、ジェノタイピングにて GFP 陽性の F1 マウスのみを選別した。

次に、これらのマウスについて、Muse 細胞が局在している間葉系組織において GFP 陽性細胞が存在しているかどうか確認するために、10 週齢の雄マウスを還流固定後、皮膚の凍結切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。SSEA-3 の検出には抗 SSEA-3 抗体を、GFP の検出には抗 GFP 抗体を用い、

注入数	生存 (2 cell)	生存率 (%)	移植数	レシピエント
240	199	82.9	199	9
120	94	78.3	94	5

図.5 マウス受精卵へのインジェクション

それぞれ連続した隣り合う 2 つの凍結切片を使用した。その結果、SSEA-3 と二重陽性となる GFP 陽性細胞が間葉系組織に散在して存在していることが確認された(図.6)。これらのことから、マウスにおいては Cripto-1 が SSEA-3 に代わるマーカーとなる可能性が示唆された。

同時に、マウス compact bone に含まれる SSEA-3 陽性細胞について、多能性関連遺伝子群についての遺伝子発現解析を行った。その結果、マウス compact bone には SSEA-3 陽性細胞が存在することが FACS 解析により確認された(図.7)。また、これらの細胞は、血球系のマーカーである CD45 と TER-119 が陰性であることから、血球系の細胞ではないことが確認されている。さらに、遺伝子発現解析の結果から、SSEA-3 陰性細胞に比べて、陽性細胞の方が多能性関連遺伝子群の発現が高いことが確認された(図.7)。

以上の結果から、マウスにおいて Muse 細胞は SSEA-3 を発現しておりなおかつ Cripto-1 も発現していることから、Cripto-1 をマーカーとして使用することで、マウスを用いた Muse 細胞の発生学的解析が可能であると推測された。

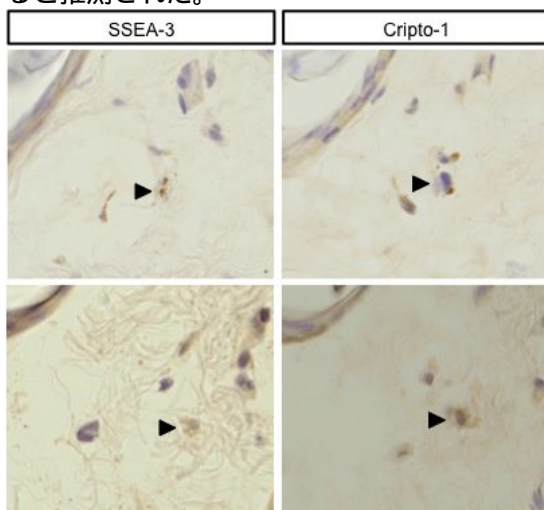


図.6 トランスジェニックマウスを用いた免疫組織学的解析

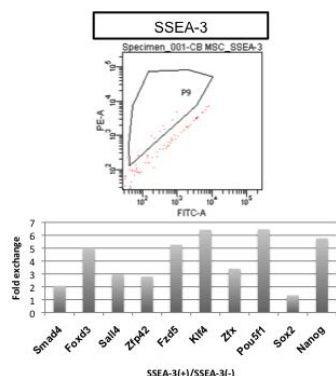


図.7 マウス compact bone 由来 SSEA-3 陽性細胞の FACS 解析と遺伝子発現解析

## 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6件)

Wakao S, Matsuse D, Dezawa M.

Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. *Cells Tissues Organs*. 査読有, 2015 Mar 4, 31-41,

PMID: 25765009

Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M.

Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissue. *Pathol Int*. 査読有, 2014, Jan; 64(1):1-9. doi:10.1111/pin.12129.

Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev*. 査読有, 2014 Apr 1; 23(7):717-28. doi:10.1089/scd.2013.0473.

Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, Dezawa M.

Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells.

*Nat Protoc*. 査読有, 2013 Jun 20; 8(7):1391-415. doi:10.1038/nprot.2013.076.

Tsuchiyama K, Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, Nojima M, Sawaya N, Yamasaki K, Aiba S, Dezawa M. Functional Melanocytes Are Readily Reprogrammable from Multilineage-Differentiating Stress-Enduring (Muse) Cells, Distinct Stem Cells in Human Fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 査読有, 2013 Oct; 133(10):2425-35. doi:10.1038/jid.2013.172.

Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Ogura F, Murakami T, Niwa A, Dezawa M. Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 査読有, (2012) 7(12):e48677

[学会発表](計3件)

若尾昌平、ヒト Muse 細胞内に存在するサブポピュレーションの特性、第 119 回日本解剖学会総会、2014 年 3 月 27 日、自治医科大

学(栃木県下野市)

若尾昌平、ヒト生体由来多能性幹細胞(Muse 細胞)内に存在するサフホピュレーションの解析、第13回日本再生医療学会総会、2014年3月5日、国立京都国際会館(京都府京都市)

若尾昌平、ヒト Muse 細胞内に存在するサブピュレーション、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月15日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計1件)

若尾昌平、出澤真理、診断と治療社、膝島の再生医療-膝 細胞の発生と再生をめぐる新展開-2015年、総ページ数 173(73~78)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

若尾 昌平 (WAKAO, Shohei)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80511948