

奨励金No.1598

骨髄由来の組織幹細胞による「新しい腸管上皮の損傷後再生メカニズム」の解析と腸再生医療への応用

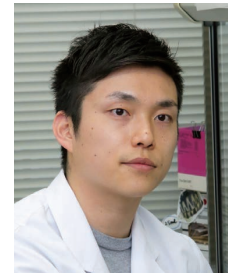
三浦 太一

量子科学技術研究開発機構 放射線医学研究所 主任研究員

Analysis of the mechanism of regeneration of intestinal epithelium after injury by bone marrow-derived tissue stem cells

Taichi Miura

National Institute of Radiological Sciences (NIRS), National Institutes for Quantum Science and Technology (QST), Senior Researcher



ヒト骨髄由来の Muse 細胞は、放射線で損傷した腸管に選択的にホーミングし、修復を促す因子を分泌して腸管の再生を促進することを明らかにした。また、S1P とその受容体 S1PR2 の相互作用が腸管へのホーミングに関与し、この過程が治療効果に不可欠であることも解明した。本研究は、ヒト骨髄由来の Muse 細胞が腸管障害に対する新たな細胞医療の有力な候補であることを示している。

Human bone marrow-derived Muse cells selectively home to sites of radiation-induced intestinal injury and promote intestinal regeneration through paracrine action. We also found that Muse cells homing to the site of intestinal injury is mediated by the interaction between S1P and S1PR2. Furthermore, we found that this homing process is essential for Muse cells to exert their therapeutic effects on radiation-induced intestinal injury. These findings suggest that human bone marrow-derived Muse cells represent a promising candidate for novel cell-based therapies targeting intestinal injury.

1. 研究内容

1.1 はじめに

骨髄移植を受けた患者の腸管には、稀にドナー由来の細胞が生着することが知られており、骨髄中に腸管へのホーミング能を有する細胞が存在する可能性が示唆されてきた。特に、骨髄由来の間葉系幹細胞（MSC）がその有力な候補とされており、国内外において腸損傷モデル動物への MSC 投与実験が数多く実施され、一定の治療効果が報告されている。しかしながら、MSC はヘテロな細胞集団であるため、腸管にホーミングし、治療効果を発揮するのはごく一部の細胞群であると考えられる。したがって、腸管へのホーミング能が高

く、かつ治療効果を有する MSC を選択的に回収できれば、それを用いた細胞投与により、腸管再生を目的とした新たな細胞医療への応用が期待される。本研究の目的は、ヒト骨髄由来 MSC の特定の細胞サブポピュレーションに着目し、腸管を標的とした革新的な細胞医療の創出を目指すことである。

1.2 結果

1.2.1 ヒト骨髄由来の Muse 細胞は放射線により障害を受けたマウス小腸に選択的にホーミングする

我々は、放射線照射により腸管障害モデルマ

ウスを作製し、ヒト骨髄由来 MSC を血管内に投与した。その結果、他の報告と同様に、MSC の一部が被ばく後のマウス小腸にホーミングすることが確認された。このように被ばく後の小腸にホーミングする MSC を「骨髄由来組織修復幹細胞 (bone marrow-derived tissue repair stem cell: BM-TRSC)」と定義し、その細胞ポピュレーションの同定を試みた。その結果、BM-TRSC は Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) 陽性の MSC である可能性が示唆された。SSEA-3 陽性 MSC は、Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) 細胞として知られており、高いホーミング能と優れた治療効果を有することから、近年注目を集めている。

我々は、ヒト骨髄由来 MSC から、抗 SSEA-3 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、ヒト骨髄由来 Muse (hBM-Muse) 細胞を回収した (図 1)。また、ネガティブコントロールとして SSEA-3 陰性 MSC も回収し以降の実験に用いた。hBM-Muse 細胞 (SSEA-3 陽性 MSC)、または SSEA-3 陰性 MSC をそれぞれ蛍光標識し、これらを被ばく後のマウス血管内に投与した。その結果、マウ

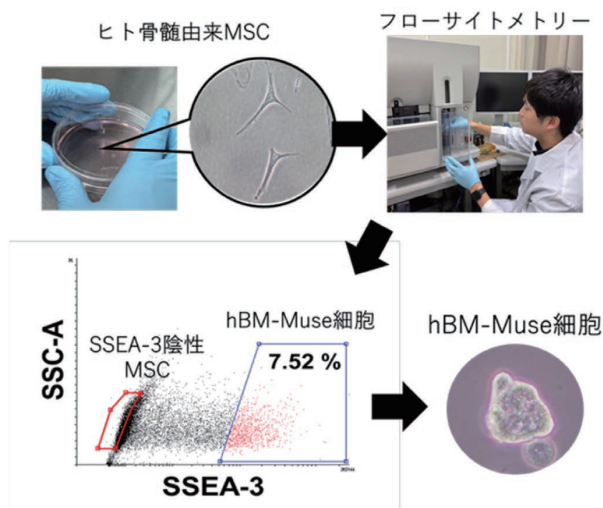


図 1. hBM-Muse 細胞のソーティング
ヒト骨髄由来 MSC よりフローサイトメトリーを用いて SSEA-3 陽性の hBM-Muse 細胞を回収した。併せて、SSEA-3 陰性 MSC も回収し、各種実験におけるネガティブコントロールとした。

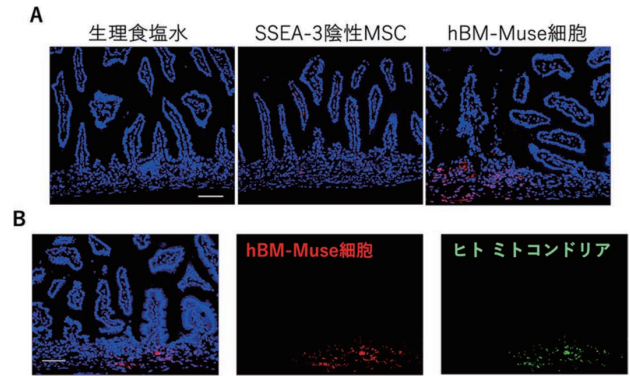


図 2. hBM-Muse 細胞のホーミング
放射線 (γ 線 10 Gy) 照射後のマウスに、生理食塩水、赤色蛍光標識-SSEA-3 陰性 MSC、赤色蛍光標識-hBM-Muse 細胞をそれぞれ血管内に投与し、48 時間後の小腸組織切片を用いた各種染色画像を示す。A：各条件において、蛍光標識された細胞の局在を検出している。B：赤色蛍光標識-hBM-Muse 細胞投与群において、検出された蛍光 (細胞) が、ヒトミトコンドリア陽性であることを示す。青色：Hoechst。スケールバー：100 μ m。

ス小腸に集積する多数の蛍光標識 hBM-Muse 細胞が確認でき、これらはヒトミトコンドリア陽性であった (図 2)。蛍光標識 SSEA-3 陰性 MSC もいくつか検出されたが、その数は hBM-Muse 細胞よりもはるかに少なかった。また、詳細な解析の結果、hBM-Muse 細胞は照射後のマウス小腸にはホーミングするが、未照射の場合はホーミングしないことも分かった。以上より、投与した hBM-Muse 細胞は腸管障害部位を認識してホーミングすることが分かった。

1.2.2 ヒト骨髄由来 Muse 細胞は放射線腸管障害に対する優れた治療効果を有している

腸管障害に対する hBM-Muse 細胞の治療効果を検討するために、マウスに放射線照射を行い、その後、hBM-Muse 細胞、SSEA-3 陰性 MSC、または生理食塩水を尾静脈内に注射した。マウス腸管上皮の再生能力は、照射後 3.5 日後に生存しているクリプトの数に依存している。照射 3.5 日後のクリプト数は、生理食塩水および SSEA-3 陰性 MSC を投与されたマウスと比較して、hBM-Muse 細胞を投与されたマウスで有意に増加した (図

3)。また、クリプトにおける増殖性の細胞（BrdU陽性細胞）や腸管幹細胞の数も、hBM-Muse細胞を投与されたマウスで有意に増加した。さらに、小腸を構成するパネート細胞、吸収上皮細胞、血管内皮細胞なども高線量被ばくにより失われるが、被ばく後のhBM-Muse細胞投与により、明らかにこれらの細胞の数が増加していることが分かった。以上より、hBM-Muse細胞は放射線腸管障害に対して優れた治療効果を有していることを明らかにした。

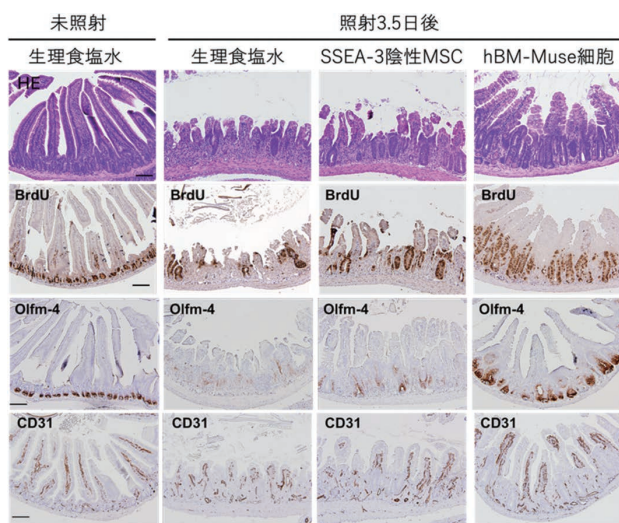


図3. hBM-Muse細胞投与の治療効果

放射線（ γ 線 10 Gy）照射後のマウスに、生理食塩水、SSEA-3 陰性 MSC、hBM-Muse 細胞をそれぞれ血管内に投与し、その後 3.5 日目の小腸組織切片を用いた各種染色画像を示す。上から、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、増殖性の細胞を検出するため、解剖前に予め投与しておいた BrdU の取り込みを検出する BrdU 染色、マウス腸管幹細胞マーカーである Olfm-4 の染色、血管内皮細胞マーカーの CD31 の染色を示す。スケールバー：100 μ m。

1.2.3 ヒト骨髄由来 Muse 細胞は S1P-S1PR2 相互作用を介して腸管障害部位にホーミングする

心筋梗塞を対象とした他の報告では、傷害部位から分泌される Sphingosine-1-phosphate (S1P) が、hBM-Muse 細胞膜上の S1P 受容体 2 (S1PR2) と相互作用することで、hBM-Muse 細胞が集積することが示されている。我々は、放射線腸管障害

においても、S1P-S1PR2 相互作用を介して hBM-Muse 細胞が集積するのか、検討した。はじめに、放射線照射後のマウス小腸における S1P の発現を質量分析により解析した（図 4A）。その結果、照射後の小腸で S1P の発現が増加し、照射後 48 時間で最大に達することが分かった。次に、S1PR2 特異的 antagonist である JTE-013 を、hBM-Muse 細胞投与時に併用することで小腸へのホーミングを抑制できるか検討した。hBM-Muse 細胞を JTE-013 と併用して照射後のマウス血管内に投与すると、hBM-Muse 細胞の小腸へのホーミングが有意に抑制された（図 4B）。これらの結果は、照射後のマウス小腸への hBM-Muse 細胞のホーミングが S1P-S1PR2 相互作用を介して行われることを示している。さらに、JTE-013 の併用により hBM-Muse 細胞のマウス小腸へのホーミングを抑制す

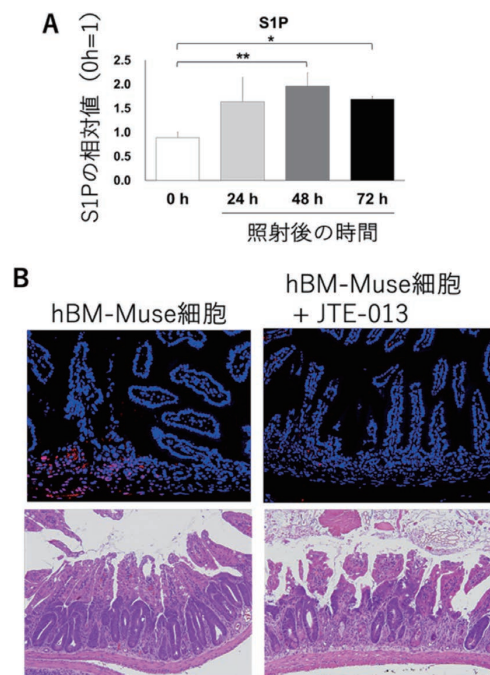


図4. S1P-S1PR2によるホーミング

A：LC-MS/MS解析により、放射線（ γ 線 10 Gy）照射後のマウス小腸における S1P の発現量を検討した。施行回数：3 回。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。B：放射線（ γ 線 10 Gy）照射後のマウスに、赤色蛍光標識-hBM-Muse 細胞、または JTE-013 を併用して、血管内に投与し、48 時間後の蛍光免疫染色画像（上）、3.5 日後の HE 染色画像（下）を示す。

ると、hBM-Muse細胞の放射線腸管障害に対する治療効果が打ち消されることが分かった。これは、hBM-Muse細胞が放射線腸管障害に対する治療効果を発揮するためには、障害部位へのホーミングが必須であるということを示している。

1.2.4 ヒト骨髄由来 Muse 細胞は腸管障害の再生促進に寄与する種々の液性因子の発現が高い

最後に、hBM-Muse細胞における小腸の恒常性維持および再生促進に関与する液性因子の発現をRNAシーケンスにより解析した。これらの液性因子の多く、例えばFGF10、TGF β 2、HGF、SHH、WNT3、IGF1などは、SSEA-3陰性MSCよりもhBM-Muse細胞で発現が高かった。加えて、hBM-Muse細胞を投与されたマウス小腸で、ヒト*Igf1*、*Hgf*、*Wnt3*などが発現していることも確認している。以上より、hBM-Muse細胞はS1P-S1PR2相互作用を介して放射線腸管障害部位にホーミングし、種々の液性因子を分泌することにより、放射線腸管障害を治療していると考えられる。しかし、この治療メカニズムについては不明な点も多く残されており、今後の詳細な解析が必要となる。

1.3 考察

今回、hBM-Muse細胞が放射線腸管障害の治療に有望であることを示した。今後、放射線腸管障害に対する再生医療においてMuse細胞は強力なツールとなり得ることが期待される。また、放射線腸管障害だけでなく、他の腸疾患の治療にも有効か検証する必要がある。

2. 発表（研究成果の発表）

【査読付き論文】

- 1) Miura T, Kado J, Takiyama H, Kawano M, Yamagiri A, Nishihara S, Yamada S, Nakayama F. Stem Cell Therapy Using Bone Marrow-Derived Muse Cells Repairs Radiation-Induced Intestinal Injury Through Their Intestine-

Homing via Sphingosine Monophosphate-Sphingosine Monophosphate Receptor 2 Interaction. *Adv Radiat Oncol.* 9, 9, 101565, 2024.

【学会発表】

- 2) 三浦 太一、加戸 淳子、瀧山 博年、川野光子、山桐 阿紗子、西原 祥子、山田 滋、上村 悟氏、藤田 真由美、中山 文明. 成体内の幹細胞を利用した放射線腸管障害に対する新しい再生治療法の開発. 日本放射線影響学会第67回大会（北九州）、2024年9月27日.
- 3) 三浦 太一、瀧山 博年、西原 祥子、山田 滋、中山 文明. 骨髄由来ヒト Muse細胞は放射線により障害を受けたマウス小腸にホーミングし再生を促進する. 第24回日本再生医療学会総会（横浜）、2025年3月21日.
- 4) 三浦 太一、加戸 淳子、瀧山 博年、川野光子、山桐 阿紗子、西原 祥子、山田 滋、上村 悟氏、藤田 真由美、中山 文明. Muse細胞の放射線腸管障害に対する治療効果の機序解明. 第47回日本分子生物学会年会（福岡）、2024年11月27日.
- 5) (招待発表) Miura T, Application of Muse Cells in the Treatment of Radiation-induced intestinal injury. Joint Workshop QST-CEA-ASNR 2025 (フランス)、2025年3月6日.

【表彰】

- 6) 三浦 太一. 優秀演題賞. 第24回日本再生医療学会総会（横浜）、2025年3月20日. <https://www.qst.go.jp/site/nirs/news250327.html>

【プレス発表】

- 7) 三浦 太一、加戸 淳子、瀧山 博年、川野光子、山桐 阿紗子、西原 祥子、山田 滋、中山 文明. 放射線腸管障害の治療に Muse細胞が有望であることを発見. <https://www.qst.go.jp/site/press/20240904.html>