

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



三浦 太一
Miura Taichi

1 はじめに

ほ乳類の腸管上皮組織は大きく分けて、吸収上皮細胞からなる「絨毛」と、その下部に位置する「クリプト」から構成される。上皮細胞は3～5日ですべて新しいものに置き換わり、この活発なターンオーバーを可能にしているのがクリプトに局在する腸管上皮幹細胞（Intestinal stem cell：ISC）である。このISCは体内の組織幹細胞の中でも異質な増殖能と多分化能を有しており、ユニークな上皮細胞供給システムを形成している。一方で、このISCは放射線感受性が非常に高いという性質を有している。腸管に放射線が照射されると、まずISCに増殖抑制や細胞死誘導が起こり、続いて機能細胞群の供給不足や粘膜炎症等が起こる。中等度の被ばくでは時間経過によりISCの数が回復することが多いが、高線量では広範囲でISCが死滅し、細胞の供給が断たれ、絨毛構造が消失し、粘膜に潰瘍や出血が起こる。放射線腸管障害は、偶発的な被ばく事故や、治療による被ばくにおいて、しばしば問題となっており、放射線腸管障害に対する有効性の高い治療法の開発が強く求められている。放射線腸管障害に対する治療法の実現に関しては、様々な研究が国内外で実施されているが、本稿では特に、放射線腸管障害に対する「再生医療」の開発について議論する。

2 放射線障害と再生医療

再生医療は大きく3つのジャンルに分けることができ、それらは「刺激」「環境整備」「補填」である。「刺激」には、液性因子、化合物、エクソソーム等を用いた再生医療が含まれる。「環境整備」には、糖鎖をはじめとした細胞外マトリクスや湿潤環境等に注目した再生医療がある。加えて、様々な足場材料を利用した治療研究もこれに含まれることが多い。これらの再生医療は、外部からの処置により、傷害部位周辺の組織再生に寄与する細胞群の増殖や遊走等の促進を目的としている。これまでに筆者らは、人工的に合成した糖鎖「高硫酸化ヒアルロン酸」が、放射線腸管障害に対する治療に有望であることを報告している¹⁾。「補填」は、外部から細胞等を投与することで、失われた細胞群を再構築することを目的とした再生医療であり、人工多能性幹細胞（iPS細胞）から分化させた細胞を移植する治療法や、間葉系幹細胞（MSC）を利用した幹細胞療法等が含まれる。放射線腸管障害では特に、骨髄や脂肪に含まれるMSCを利用した治療研究が国内外で実施されてきた。

3 Muse 細胞の特徴と再生医療への応用

今回筆者らは、成体に存在し、組織修復を担当する組織幹細胞である Multilineage-differentiating stress-enduring（Muse）細胞に着目した。Muse細胞は、骨髄、

末梢血、脂肪、臍帯等に存在する Stage-specific embryonic antigen 3 (SSEA-3) 陽性の多能性幹細胞様の細胞として 2010 年に報告された²⁾。この Muse 細胞は、MSC に属する組織幹細胞であり、市販のヒト骨髄/脂肪由来 MSC やヒト線維芽細胞にも含まれている。Muse 細胞は損傷組織に自発的に集まり、細胞増殖の促進、血管新生、抗アポトーシス等の様々な治療効果を発揮することが知られている。他の報告から、SSEA-3 陰性 MSC より SSEA-3 陽性 MSC (Muse 細胞) の方が傷害部位に集積する能力(ホーミング能)が高いことが示されている。Muse 細胞治療は、回収した Muse 細胞を血管内に投与するだけという非常にシンプルな治療であるにもかかわらず、非腫瘍性かつ遺伝子操作不要といった安全性と、培養を低コストで行える省コスト性を兼ね備えた実用的な治療法である。更に、Muse 細胞は免疫拒絶を受けにくい性質も有しており、投与の際は免疫抑制剤の併用や、ドナーマッチングが不要である。以上の理由から、Muse 細胞は再生医療の新しい治療ツールとして注目されている。ほとんどの Muse 細胞研究では、ヒト骨髄由来の Muse (hBM-Muse) 細胞が使用されており、脳卒中、急性心筋梗塞、表皮水疱症等に対する臨床試験が実施されている。以降、hBM-Muse 細胞が放射線腸管障害の治療に有効か、検討した成果を紹介する。

4 ヒト骨髄由来の 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

筆者らは市販のヒト骨髄由来 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、hBM-Muse 細胞をソーティングした(図 1)。ヒト骨髄由来 MSC に含まれる hBM-Muse 細胞の割合は 7~8% と一定であった。

放射線腸管障害に対する hBM-Muse 細胞の治療効果を検討するために、BALB/c マウスに γ 線 10 Gy の全身照射を行い、その後 2 時間以内に hBM-Muse 細胞、SSEA-3 陰性 MSC、又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、及び ISC の数に依存している。照射 3.5 日後のクリプト数は、生理食塩水及び 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

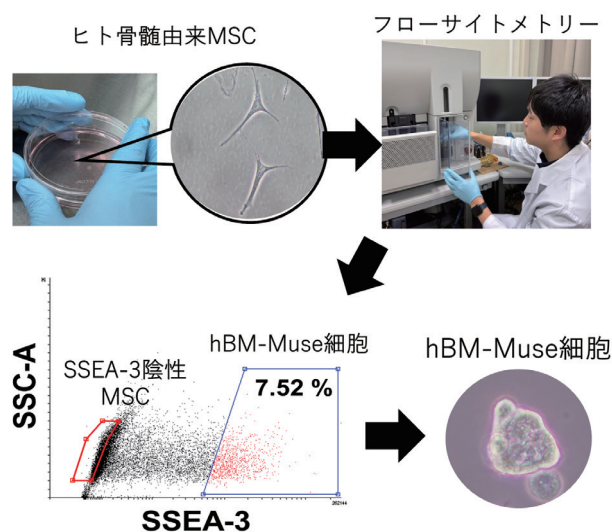


図 1 hBM-Muse 細胞のソーティング

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

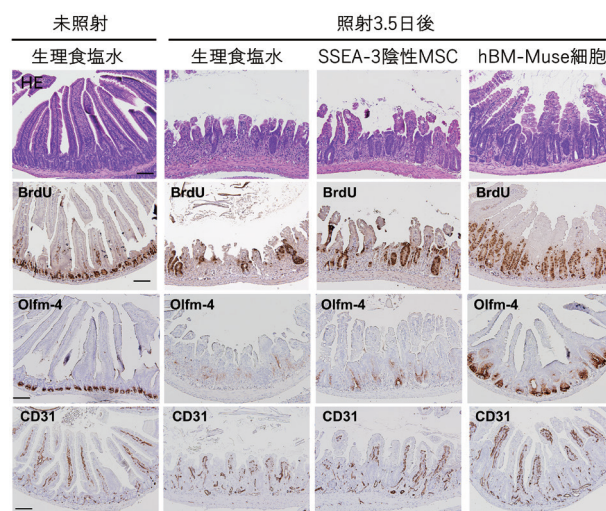


図 2 hBM-Muse 細胞投与の治療効果

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、解剖前にあらかじめ投与しておいた BrdU の取込みを検出する BrdU 染色、マウス ISC 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

れたマウスで有意に増加した(図 2)。また、クリプトにおける増殖性の細胞 (BrdU 陽性細胞) や ISC の数も、hBM-Muse 細胞を投与されたマウスで有意に増加した。更に、小腸を構成するパネート細胞、吸収上皮細胞、血管内皮細胞等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。注目すべきところは、

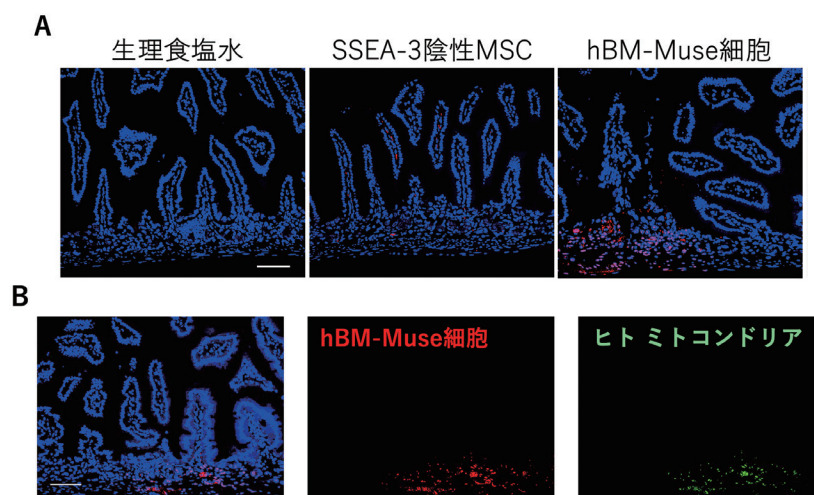


図3 hBM-Muse 細胞のホーミング

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 色素。スケールバー：100 μm

hBM-Muse 細胞投与が単純に腸管構造の再生を促進するだけでなく、血管の再生も促進するところである。この血管に対する影響については、今後詳細に解析する必要がある。この他にも、被ばく後の生存率の延長や、放射線誘導性のアポトーシス抑制等の効果もあることが分かってきた。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が明らかになった。

5 投与した Muse 細胞は放射線腸管障害部位に自発的に集まる

続いて筆者らは、被ばく後のマウス血管内に投与した hBM-Muse 細胞が、障害を受けた腸管に集まるのか、検討した。投与する前の hBM-Muse 細胞や SSEA-3 陰性 MSC を蛍光標識し、これらを照射後のマウス血管内に投与した。その結果、マウ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 3)。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 細胞は放射線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。なお、筆者らの研究において、マウス小腸にホーミングした hBM-Muse 細胞が、ISC や血管内皮細胞等の小腸構成細胞に分化するという結果は得られなかった。

6 Muse 細胞は S1P-S1PR2 相互作用を介して放射線腸管障害部位に集まってくる

前述のとおり、hBM-Muse 細胞は放射線照射後のマウス小腸に集まるが、未照射では集まらない。これらの結果から、マウス小腸において、照射により何らかの SOS シグナルが放出され、これを認識して hBM-Muse 細胞が障害部位に集積する、と考えられる。この SOS シグナルについて、同定と作用機序の解明を目指し検討を行った。

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。S1P はスフィンゴ脂質代謝産物の 1 つである。S1P が結合する受容体は S1PR1～S1PR5 の 5 種類があり、Muse 細胞では特に S1PR2 の発現が高い。筆者らは、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、γ線 10 Gy 照射後のマウス小腸における S1P の発現を液体クロマトグラフ - 質量分

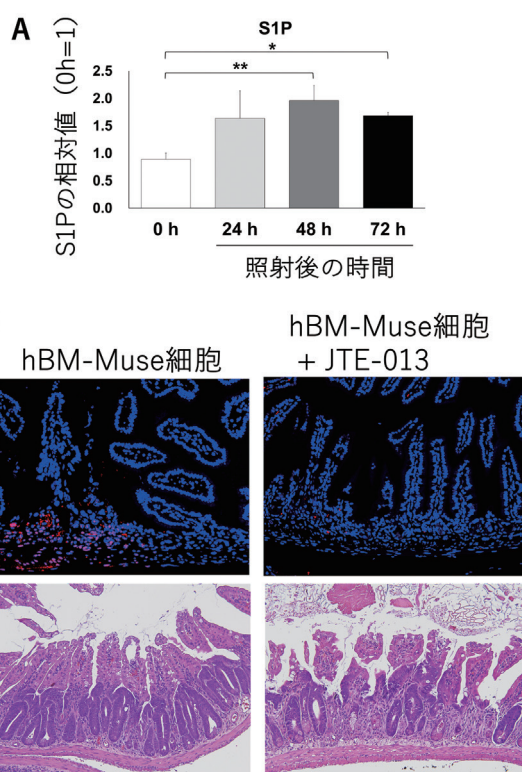


図4 S1P-S1PR2によるホーミング

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、又は 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

析計 (LC-MS/MS) により解析した (図 4A)。その結果、照射後のマウス小腸で S1P の発現が増加し、照射後 48 時間で S1P の発現が最大に達することが分かった。次に、S1PR2 特異的 antagonist (相互の薬効を相殺しあう拮抗剤) 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。更に、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。

7 Muse 細胞では放射線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、放射線障害部位に集まった hBM-Muse 細胞がどのように障害部位を治療しているのか、その治療メカニズムの一端について、最近のデータから述べる。筆者らは hBM-Muse 細胞における小腸の恒常性維持及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, TGFβ2, HGF, SHH, WNT3, IGF1 等は、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 *Igfl*, *Hgf*, *Wnt3* 等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³⁾。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。

8 まとめ

今回、筆者らは 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。同様に、フランスの研究グループからは、ヒト臍帯由来の Muse 細胞の血管内投与が放射線腸管障害の治療に有効であることが報告されている⁴⁾。したがって、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。今後の基礎研究としては、治療メカニズムや安全性、腸管以外の放射線障害治療への応用等を検討する必要がある。併せて、産学官連携による臨床応用を目指した研究の実施も重要である。

参考文献

- 1) Miura T., et al., *Adv Radiat Oncol.*, **7**, 100900 (2022)
- 2) Kuroda Y., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **107**, 8639-8643 (2010)
- 3) Miura T., et al., *Adv Radiat Oncol.*, **9**, 101565 (2024)
- 4) Dushime H., et al., *Stem Cell Res Ther.*, **14**, 201 (2023)

((国研)量子科学技術研究開発機構 放射線医学研究所)