**組織的な若手研究者海外派遣事業　報告書**

医学医療系　非常勤研究員　木村健一

研究先：　ドイツ　ボン大学　生理学第一研究室

期間：　2012年8月25日～2012年12月26日　(124日間)

研究課題：　間葉系幹細胞の機能解析および生体内におけるニッチについて

研究内容：

組織幹細胞の一種である間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells : MSCs)は, 骨, 軟骨, 脂肪へと分化する多分化能を有している. MSCsはさらに心筋, 肝臓, 神経, 血管内皮細胞など中胚葉系以外の様々な組織へと分化することが報告されている. このMSCsは1980年代半ばから1990年代にかけて骨髄中から初めて単離されたが, 脂肪, 胎盤, 羊膜, 臍帯血中など身体のほぼすべての組織に存在することが示唆されている(Meirelles S et al., J. Cell Sci., 2006, Kern S et al., Stem Cells, 2006).

近年, MSCsの多分化能を利用して虚血性疾患や心疾患の細胞治療への応用が注目されている. いくつかの報告では, 心筋梗塞動物モデルを用いた解析では, MSCsが心筋の機能を回復させることが報告されている. 梗塞部位へと移植されたMSCsはパラクライン作用によって周囲の血管新生を促進し, 局部の血流を改善させることが明らかとなった (Williams AR. Et al., Circ Res., 2011, Ranganath SH. et al., Cell Stem Cell, 2012). そのため, 心筋梗塞によって損傷した心臓組織に対する細胞治療への応用が期待され, 2011年には19症例の心臓病患者に対し骨髄由来MSCsを用いた治療が行われている.

このように, MSCsを用いた細胞治療は大きく注目を集めており, 難治性疾患に対する新たなアプローチとして期待されている. しかし, MSCsはヘテロな集団であることが知られており, 由来する組織や培養条件などによって多様性を示すことが問題となっている. また, MSCsが心筋梗塞モデルにおいて骨形成を引き起こすという報告もある (Breitbach M et al., Blood, 2007). これまで, MSCsはその接着性, 細胞の表面マーカーの発現および*in vitro*における分化能によって特徴づけられていた. それらの内在的な局在および*in vivo*での機能については, MSCsのユニークなマーカーが今だ存在しないため未解明のままである. MSCsの生体内におけるニッチを同定し, その微小環境を正しく解明することは, MSCsの性質をより理解する上で重要な役割を担っているとともに, より良い再生医療を実現させる上で欠かせないものである.

Fleischmann教授のグループは, 胚性幹細胞（ESC）や多能性幹細胞の生物学的特性やその可塑性に興味を持ち, 特に心筋梗塞から心機能を回復させるその能力に関して長年関心を抱いている. 上述のように, 生体内におけるMSCsの同定やその生物学的特性の解明, また心筋梗塞治癒への関与についての詳細な解明が困難である. 彼らはこの問題を解決するため, 遺伝的にラベルされた全く新しいマウスモデルを開発した. 彼らはMSCsと他の細胞株の遺伝子発現を網羅的に比較し, マウスMSCsに特異的なCD73, FGF-7, HoxA10の3つの遺伝子を同定した. さらに, 彼らはBACシステムを用いて, それぞれの遺伝子のプロモーター制御下でEGFPを発現するレポーターベクターを作成した.これらのMSCsに特異的なマーカー遺伝子を用いて,トランスジェニックESCおよびマウスを作製し, MSCsの発生や分化段階を追跡するシステムを構築した. 私はこの系を用いて, MSCsの機能解析および生体内におけるニッチについて研究を行った. 具体的には以下に示す研究を行った.

1. トランスジェニックマウス由来CD73陽性細胞の機能解析

私は既にヒトおよびマウス組織からMSCsを単離し, その機能を解析する手法を習得している. トランスジェニックマウスの骨髄, 脂肪およびその他の組織より初代培養MSCsの樹立を目指した. まず, GFPの発現を指標にし, MACSおよびFACSソーティングを用いたMSCsの効率的な分取法の確立を試みた. その結果, トランスジェニックマウス組織よりCD73陽性細胞を樹立することができた. 今後, これらの細胞の詳細な機能解析を行う予定である.

2. トランスジェニックESC由来MSCsの樹立

トランスジェニックマウスと同様のバックグラウンドを持つESCを用いて, MSCsへの分化誘導を行い, MSCs株の樹立を試みた. このESCを用いることで, その発生/分化の様々なステージからMSCsを分離し, MSCsへの運命決定時期の特定やそれに関わる因子, また, 周囲のニッチ形成細胞を解析することが可能である. その結果, ESCよりEGFP陽性細胞を分化誘導することができた. 今後, より誘導効率の良い条件を探るとともに, 得られたEGFP陽性細胞を分取し解析していく予定である.

3. トランスジェニックマウス骨髄内のMSCsのニッチの同定

MSCs関連の研究における重要な課題の一つに, MSCsのニッチの同定がある. なぜなら, それは個々の細胞や幹細胞の運命を決定するシグナル伝達のメカニズムを解明する手がかりとなる可能性を秘めているからである. 前述のようにFleischmann教授のグループは, BACシステムを用いてMSCsに特異的に発現している遺伝子のEGFP-labeledマウスを作製している. このマウスを用いることによりEGFP-labeled MSCsを生体内で追跡することが可能となり, さらには組織内での他の細胞との相互作用についても明らかにすることが可能である. まず, 私は先行の研究で, EGFP陽性細胞の存在が確認されている骨髄および脾臓において, 免疫組織学的手法を用いて解析したところ, 組織の一部にその局在が確認された. 今後, 周囲の細胞との関連を明らかにするとともに, 他の組織についても解析する予定である.

今回の派遣によって, 新規トランスジェニックマウスモデルを用いた研究を行うことができた. 今後, 樹立したMSCsの詳細な機能を明らかにするとともにMSCの生体内でのニッチについて明らかにする予定である.

感想：

ボン大学はドイツ西部のライン川流域に位置しており, 歴史ある建物と自然あふれるキャンパスであった. 研究室は, 大半がドイツ人でありドイツ語を使用していたが, ミーティングや研究に関するディスカッションなどは英語にて行われており, 問題は生じなかった. 日常の業務に関しては, テクニカルスタッフによるサポートが充実しており, 様々なプロトコールの管理, 試薬の調整, ラボ運営などに大きく貢献し, 時には研究プロジェクトに対する意見や提案などを行っており, その地位が確立されていた. ドイツ人気質である勤勉で真面目な性格は, 日常の研究にも現れていた. 週休2日の研究スタイルにより, 仕事と私生活のオン・オフがはっきりと分かれており, 研究生活以外の部分を楽しむ様子が見受けられた. このことは, 仕事を人生の中心として捉えがちな日本人の考え方を見直すきっかけとなるものであった. 今回の海外派遣を通じて, 研究の姿勢, 文化の違い, 自身のキャリアなど多くのことを学ぶことができた. サポートして頂いた多くの方々に感謝したい.