

九州シンクロtron光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：87-2411080I

BL番号：BL07

(様式第5号)

神経変性疾患を有するモデルマウス組織の蛍光X線イメージング Fluorescent X-ray imaging of mouse tissues with neurodegenerative diseases

権田 幸祐¹、串田 良祐¹、藤井 健太郎²、米山 明男³
Kohsuke Gonda¹, Yoshihiro Kushida¹, Kentaro Fujii², Akio Yoneyama³

¹ 東北大学大学院医学系研究科, ² 量子科学技術研究開発機構,

³ 九州シンクロtron光研究センター・ビームライングループ

¹ Tohoku University Graduate School of Medicine

² National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology (QST)

³ Beamline Group, SAGA Light Source

- ※ 1 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開〔論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表〕が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※ 2 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※ 3 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より1人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

アルツハイマー病はアミロイドβとタウタンパク質の凝集体が生じることで神経細胞死を引き起こし、その結果として認知機能障害がみられる難治性の疾患である。

本研究では生体内に内在する非腫瘍性の多能性幹細胞である Multi-lineage differentiating stress enduring (Muse) 細胞によるアルツハイマー病の治療効果のメカニズムを検証するために、蛍光X線顕微鏡を用いてアルツハイマー病モデルマウス脳組織におけるアミロイドβの蓄積に関与すると考えられる鉄などの軽元素の分布を解析した。

その結果、バッファ投与群では、アミロイドβの蓄積している領域において鉄、銅の蓄積が認められたものの、Muse細胞治療群では特定の領域に鉄、銅は蓄積していないことが見出された。

(English)

Alzheimer's disease is an intractable disease characterized by the accumulation of amyloid-β and tau protein aggregates, leading to neuronal death and cognitive impairment.

In this study, to elucidate the mechanism underlying the therapeutic effects of Multi-lineage differentiating stress enduring (Muse) cells, a type of non-tumorigenic pluripotent stem cell endogenous to the body, on Alzheimer's disease, we analyzed the distribution of light elements such as iron, which are thought to be involved in amyloid-β accumulation, in the brain of Alzheimer's disease model mice using fluorescent X-ray microscopy.

As a result, while iron and copper accumulation was observed in the regions where amyloid-β accumulated in the buffer-administered group, no accumulation of iron and copper was found in specific regions in the Muse cell-treated group.

2. 背景と目的

アルツハイマー病は認知症の原因疾患の一つで、脳内のアミロイドβの蓄積が神経細胞死を引き起こし、発症するとされている。脳内に蓄積したアミロイドβには鉄、銅、亜鉛などの金属と一緒に蓄積することが報告されており、アルツハイマー病との関連が注目されている^{1,2}。現時点では根治できる治療法はなく、根本的治療法の開発が望まれている。

Multilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞は自己複製能を持ち、非腫瘍性の多能性幹細胞

で、骨髄、臍帯、様々な臓器の結合組織や血中など生体に内在する³⁻⁶。他の多能性幹細胞では見られない Muse 細胞の利点として、多能性を獲得するための遺伝子導入や分化誘導を必要とせずに、多能性幹細胞マーカーを指標に採取した細胞を直接血管内や局所に投与するだけで、Muse 細胞は傷害組織へ遊走・集積し、組織に応じた適切な細胞へと分化することで組織修復を行うことが挙げられる⁷⁻⁹。

我々はこれまで富山大学医学部脳神経外科とアルツハイマー病に対する治療を目指した共同研究を行ってきた。アルツハイマー病モデルマウスに対し、バッファーのみを投与または Muse 細胞で治療したところ、7 か月後にバッファー投与群ではアミロイド β の蓄積が顕著である一方、Muse 細胞治療群ではアミロイド β の蓄積が劇的に軽減し、認知機能の改善が認められた（投稿準備中）。

本研究ではバッファー投与群または Muse 細胞治療群のアルツハイマー病モデルマウスの脳組織を用い、アミロイド β の蓄積に関与すると考えられる鉄、銅、亜鉛などの元素イメージングを行い、Muse 細胞による治療効果のメカニズムの検証を目的とした。

3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

サンプルは共同研究者である富山大学医学部脳神経外科の黒田敏教授、白石啓太朗先生、山本修輔 先生からご提供いただいた Muse 細胞治療群またはバッファー投与群のアルツハイマー病モデルマウスの脳組織を用いた。組織は4%パラホルムアルデヒドで固定し、スクロース置換後にOCTコンパウンドに包埋することで凍結ブロックを作成した。その後、20 μm 厚の凍結切片を窒化シリコン膜上に貼り付けて、導電性の両面テープを用いて金属の台座に取り付け、BL07の走査型蛍光X線顕微鏡にて測定した。走査型蛍光X線顕微鏡での測定領域を設定するために、あらかじめ6 μm の隣接切片をアミロイド β に対する抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて画像取得することで、アミロイド β の蓄積領域を特定した。

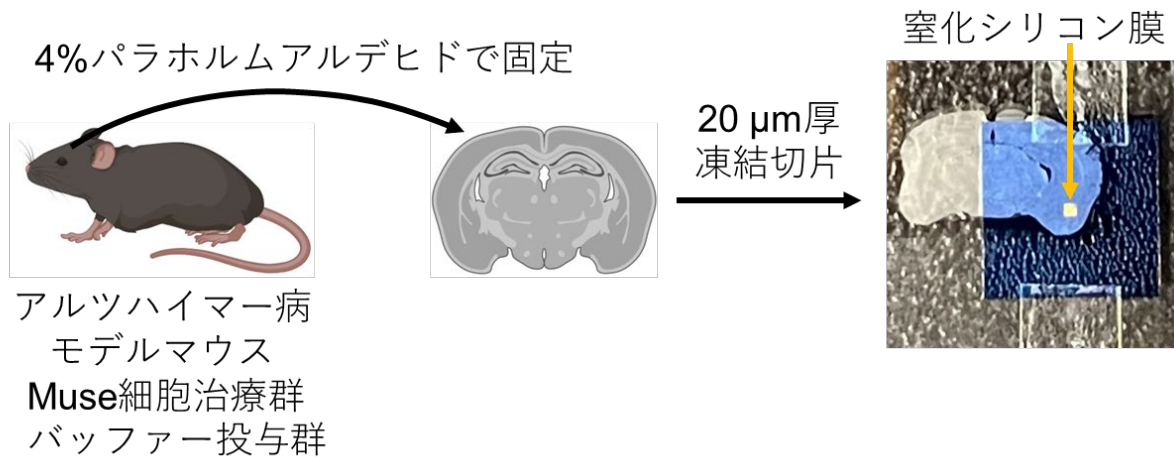


図1. サンプル調整方法

4. 実験結果と考察

本研究では走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いてバッファー投与群または Muse 細胞治療群のアルツハイマー病モデルマウスの脳組織の元素イメージングを行い、Muse 細胞による治療効果のメカニズムの検証を目指した。観察に使用したサンプルは元素の流出を避けるために窒化シリコン膜上に貼りつけた凍結切片をそのまま観察した。あらかじめ隣接切片をアミロイド β に対する抗体を用いて免疫染色することで、アミロイド β の集積領域を特定し、その領域において測定を行った。

アミロイド β が蓄積している領域においてスペクトル解析を行ったところ、バッファー投与群、Muse 細胞治療群いずれの群においても鉄や銅などの特異的なピークが検出された（図 2）。さらに、バッファー投与群では、アミロイド β の蓄積している領域において鉄、銅の蓄積が認められたものの、Muse 細胞治療群では特定の領域に鉄、銅は蓄積していないことが見出せた。一方、亜鉛の存在も想定していたが、明確なピークを検出できずイメージングを行うことはできなかった。亜鉛の含有量が鉄や銅に比べて少ない可能性もあるが、亜鉛領域でのバックグラウンドが高いことで亜鉛のシグナルが検出できなかったものと推測される。これは固定方法や包埋剤などサンプル調整法や測定条件を検討する必要がある、今後の課題である。

バッファー投与群

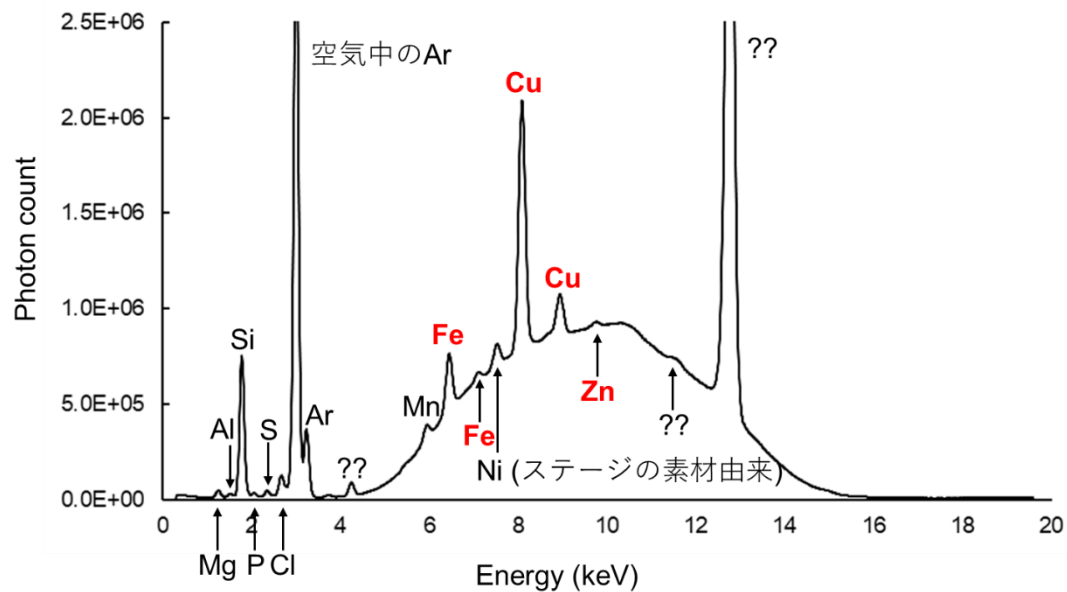


図 2. バッファー投与群におけるスペクトル解析

5. 今後の課題

今回、BL07 の走査型蛍光 X 線顕微鏡での測定において、鉄や銅などの元素イメージングができた。しかし、存在が想定される亜鉛については明確な元素イメージングができなかったことより、サンプル調整や測定条件について検討の余地がある。現状、サンプルを観察するためには真空中で乾燥した状態で観察する必要があるが、これは生体に存在している状態とは大きく乖離している。生体組織中での状態を反映した状態で観察するためにも、液体中での観察や他のサンプル調整方法の検討が必要であり、今後の課題であると考えられる。

6. 参考文献

1. James SA, Churches QI, de Jonge MD, Birchall IE, Streltsov V, McColl G, Adlard PA, Hare DJ. Iron, Copper, and Zinc Concentration in A β Plaques in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Correlates with Metal Levels in the Surrounding Neuropil. *ACS Chem Neurosci*. 2017 Mar 15;8(3):629-637. doi: 10.1021/acscchemneuro.6b00362.
2. Everett J, Collingwood JF, Tjendana-Tjhin V, Brooks J, Lermyte F, Plascencia-Villa G, Hands-Portman I, Dobson J, Perry G, Telling ND. Nanoscale synchrotron X-ray speciation of iron and calcium compounds in amyloid plaque cores from Alzheimer's disease subjects. *Nanoscale*. 2018 Jul 5;10(25):11782-11796. doi: 10.1039/c7nr06794a.
3. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 11;107(19):8639-43. doi: 10.1073/pnas.0911647107.
4. 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 Jun 14;108(24):9875-80. doi: 10.1073/pnas.1100816108.
5. Kushida Y, Oguma Y, Abe K, Deguchi T, Barbera FG, Nishimura N, Fujioka K, Iwatani S, Dezawa M. Human post-implantation blastocyst-like characteristics of Muse cells isolated from human umbilical cord. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Jul 11;81(1):297. doi: 10.1007/s00018-024-05339-4.
6. Sato T, Wakao S, Kushida Y, Tatsumi K, Kitada M, Abe T, Niizuma K, Tominaga T, Kushimoto S, Dezawa M. A Novel Type of Stem Cells Double-Positive for SSEA-3 and CD45 in Human Peripheral Blood. *Cell Transplant*. 2020 Jan-Dec;29:963689720923574. doi: 10.1177/0963689720923574.
7. Yamada Y, Wakao S, Kushida Y, Minatoguchi S, Mikami A, Higashi K, Baba S, Shigemoto T, Kuroda Y, Kanamori H, Amin M, Kawasaki M, Nishigaki K, Taoka M, Isobe T, Muramatsu C, Dezawa M, Minatoguchi S. S1P-S1PR2 Axis Mediates Homing of Muse Cells Into Damaged Heart for Long-Lasting Tissue Repair and Functional Recovery After Acute Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2018 Apr 13;122(8):1069-1083. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311648.
8. Kushida Y, Wakao S, Dezawa M. Muse Cells Are Endogenous Reparative Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*.

2018;1103:43-68. doi: 10.1007/978-4-431-56847-6_3.

9. Wakao S, Oguma Y, Kushida Y, Kuroda Y, Tatsumi K, Dezawa M. Phagocytosing differentiated cell-fragments is a novel mechanism for controlling somatic stem cell differentiation within a short time frame. Cell Mol Life Sci. 2022 Oct 6;79(11):542. doi: 10.1007/s00018-022-04555-0.

7. 論文発表・特許（注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果）
なし

8. キーワード（注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3）
アルツハイマー病、アミロイド β 、Muse 細胞

9. 研究成果公開について（注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文（査読付）発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後2年以内です。例えば2018年度実施課題であれば、2020年度末（2021年3月31日）となります。）
長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文（査読付）発表の報告 （報告時期：2027年3月）