

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05680

研究課題名(和文)多能性幹細胞(Muse細胞)による脳深部白質梗塞に対する白質再建

研究課題名(英文)Reconstruction of Neuronal Circuitry by Muse cell transplantation in lacunar stroke

研究代表者

坂田 洋之(Sakata, Hiroyuki)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80722305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞中の一分画であるMuse細胞は、高い神経分化能を持つ一方で腫瘍化の危険性は低く、優れた移植ソースと期待される。マウスを用いた本研究では、Muse細胞を移植することにより、脳梗塞によって破壊された神経回路が再建され、脳梗塞後の後遺障害が回復することが証明された。また、Muse細胞移植後に腫瘍形成等の合併症は見られず、長期的な安全性についても確認された。本研究結果が将来的に臨床応用されれば、脳梗塞患者の生活の質の向上及び寝たきりの患者数減少につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, subpopulation of bone marrow-mesenchymal stem cells, are endogenous nontumorigenic stem cells with pluripotency. We transplanted Muse cells into the perilesion brain at 2 weeks after lacunar infarction in immunodeficient mice. Transplantation at the delayed subacute phase showed muse cells differentiated into neural cells, facilitated neural reconstruction, improved functions, and displayed solid safety outcomes over prolonged graft maturation period, indicating their therapeutic potential for lacunar stroke.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経再生 脳梗塞 Muse細胞 白質再建

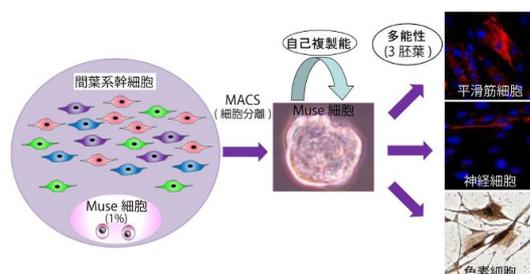
1. 研究開始当初の背景

**脳梗塞治療の現状:** 超急性期の再開通療法が脳梗塞に対する唯一の治療法であるが、治療の恩恵を受ける患者は僅かである(5%程度)。特に、穿通枝領域の障害である脳深部白質梗塞(大脳皮質と脊髄を繋ぐ線維連絡が断裂)は重篤な後遺障害の原因であり、新規治療法の開発が期待される。

**既存の幹細胞移植治療:** iPS 細胞や間葉系幹細胞は優れた移植用ソースとして期待される。しかし、iPS 細胞は高い神経再生能力を有する一方、腫瘍化等の安全面の問題解決が待たれ、脳梗塞に対する臨床応用には更なる検討が必要な段階である。自家骨髄由来間葉系幹細胞は既に我が国でも臨床試験が行われており、安全性の実績を有する。優れた bystander effect (神経栄養作用や血管新生作用など)を示すが、本来幹細胞移植治療に期待される神経再生能力は低く(Dezawa M (研究協力者), et al, J Clin Invest, 2004)、顕著な有効性は示されていない。安全性の高い間葉系幹細胞をベースとしつつも、分画等を活用することにより治療効果を示すことが喫緊の課題と考えられる。

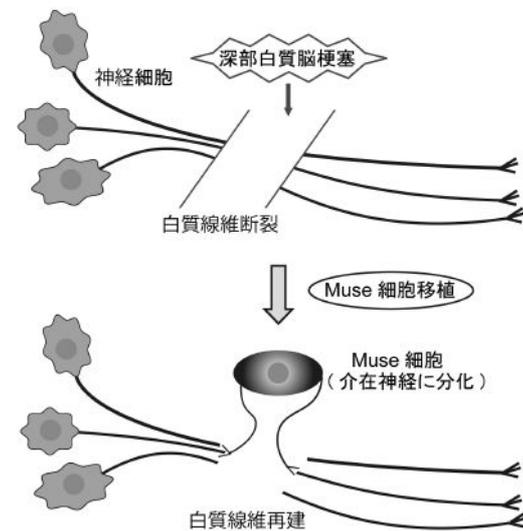
	神経分化能	腫瘍化リスク	倫理的問題
Muse 細胞	高い	低い	少ない
iPS 細胞	高い	高い	少ない
間葉系幹細胞	低い	低い	少ない
神経幹細胞	高い	やや高い	あり

**新規多能性幹細胞の開発:** 出澤(研究協力者)らは、間葉系幹細胞の一分画(1%)に3胚葉性の分化能を有する Muse 細胞を発見した(Dezawa M (研究協力者), et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2010)。間葉系幹細胞に対して SSEA-3 を表面抗原としたセルソーティング(MACS 法(magnetic-activated cell sorting)等)を行うことで、Muse 細胞は簡便に分離できる。Muse 細胞は、ヒト生体から直接得られるため腫瘍化の危険性が低いという利点を持つ。また、既に施行されている骨髄移植や間葉系幹細胞移植の一部の細胞に相当するため、安全性の実績を有し、倫理的なハードルも極めて低い。心筋梗塞等の前臨床試験では Muse 細胞移植による治療効果が既に確認されており、中枢神経疾患への応用が期待される。



**着想に至った経緯:** Muse 細胞が安全性と高い神経分化能を期待できる点、造腫瘍性を持つ iPS 細胞等と異なり品質管理及びコスト面で大きな困難が予想される分化誘導を必要

としない点、骨髄穿刺後 2-3 週間程度で移植に必要な Muse 細胞数を確保出来るため神経再生に適した移植時期(脳梗塞亜急性期)に自家移植が可能なる点から、Muse 細胞は他の既存の幹細胞と比較して優れた移植用ソースとなり得る。脳深部白質梗塞では軸索で構成される単純構造の白質が障害されるため、複雑構造の大脳皮質とは異なり、神経再生により飛躍的な治療効果が期待される。これらの一連の知見から、脳梗塞亜急性期に移植した Muse 細胞が介在神経に分化・着生し、脳深部白質梗塞により断裂した白質線維連絡をリレー方式で再建することが可能ではないかと着想するに至った。



2. 研究の目的

本研究の目的は、脳深部白質梗塞に対する Muse 細胞移植治療の有効性、安全性及び作用メカニズムについて検討し、非臨床レベルで「脳深部白質梗塞に対する Muse 細胞移植による白質再建」という概念実証を確立することである。

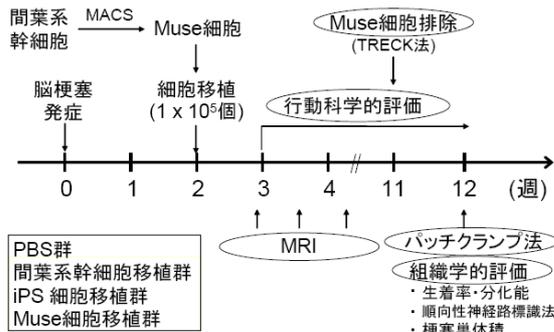
3. 研究の方法

本研究では、亜急性期脳深部白質梗塞に対する Muse 細胞移植治療の有効性及び安全性について明らかにするため、マウス・霊長類を用いた動物実験による検討を行う。脳梗塞モデル作成や Muse 細胞培養等の本研究計画遂行に必要な基盤となる技術・設備・環境は既に整っている。

(1) **Muse 細胞の脳梗塞に対する有効性試験:** 脳深部白質梗塞モデル(SCID マウス)を作成し、脳梗塞発症 2 週間後に定位的な Muse 細胞移植を行う(梗塞巣周囲)。行動科学的/組織学的手法を用いて、Muse 細胞移植治療の有効性を検討する。さらに、神経路標識法/TRECK 法/パッチクランプ法を用いて、Muse 細胞による治療効果の作用メカニズムに迫る。

(2) **間葉系幹細胞/ iPS 細胞との比較試験**: 脳深部白質梗塞モデルに対して、梗塞発症 2 週間後に間葉系幹細胞/ iPS 細胞移植を行い、移植細胞の生着率、神経系細胞への分化能について Muse 細胞と比較検討する。更に、行動科学的評価により Muse 細胞移植と比較した有効性の評価を行う。

(3) **Muse 細胞の安全性試験**: マウスを用いて、組織学的に安全性を検討する。



	項目	平成 27 年	平成 28 年	平成 29 年
有効性試験 (マウス)	行動科学的検討	→	→	→
	組織学的検討		→	→
	作用メカニズム解明		→	→
他の幹細胞との比較 (マウス)	行動科学的検討	→	→	→
	組織学的検討		→	→
安全性試験	組織学的検討 (マウス)		→	→
	組織学的検討 (霊長類)		→	→

#### 4. 研究成果

まず、ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた Muse 細胞移植の予備実験を行い、移植 3 か月後に Muse 細胞が間葉系幹細胞より有意に脳に生着することや、Muse 細胞が高率に神経系細胞に分化することを証明した (Stem Cells., 2016)。さらに、Endothelin-1 と N(G)-nitro-1-arginine methyl ester の混合液を SCID マウスの内包に定位的投与し、脳深部白質梗塞モデルを確立した (Brain Res., 2015)。この脳深部白質梗塞モデルを用いて、脳梗塞発症 2 週間後に定位的な Muse 細胞/ 間葉系幹細胞移植 (脳梗塞周囲) を行い、corner test/ cylinder test を用いた行動学的評価を行った。その結果、脳梗塞発症 12 週後の段階で、PBS 群/ 間葉系幹細胞移植群と比較して Muse 細胞移植群で有意な行動学的改善が確認された (図 1)。一方で、梗塞巣の体積に関しては明らかな縮小効果を認めなかった。これらの所見から、Muse 細胞は、脳保護効果ではなく、脳深部白質梗塞により断裂した白質線維連絡の再建により、機能回復を促した可能性が示唆された。

次に Muse 細胞の作用メカニズムを検討した。移植した Muse 細胞は主に神経細胞に分化し、脳梗塞周囲に生着していることが確認された (図 2)。さらに、順行性神経路標識法を用いたところ、脳梗塞によって断裂した神経連絡が、Muse 細胞移植群では有意に回復

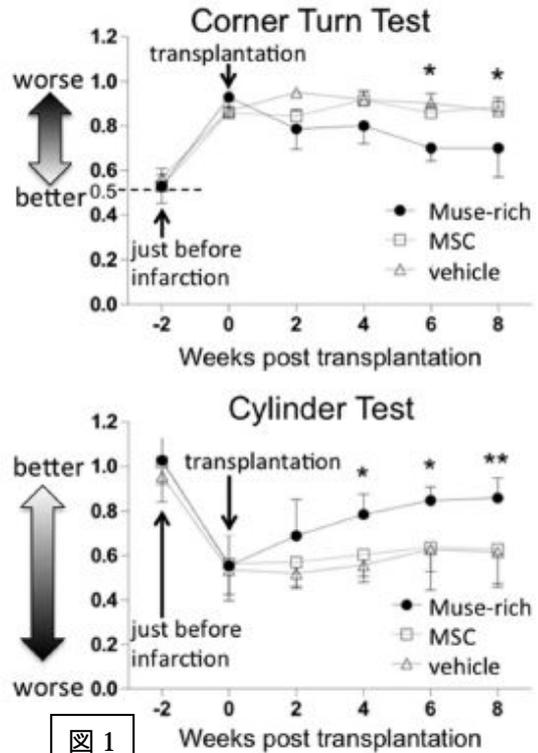


図 1

していることが分かった。移植した Muse 細胞を選択的移植細胞排除法により除去すると、Muse 細胞の移植効果は完全に消失した (図 3)。以上の結果から、Muse 細胞は断裂した深部白質を再建することにより治療効果をもたらすことが解明された。

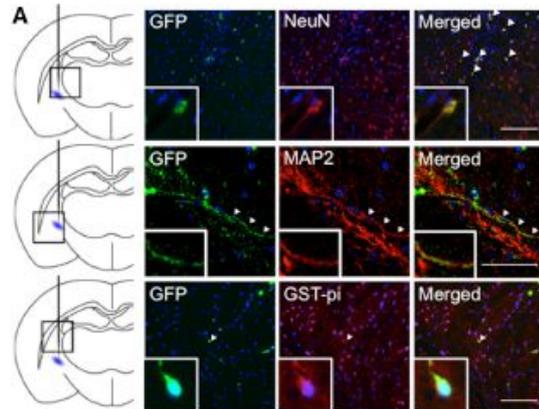


図 2

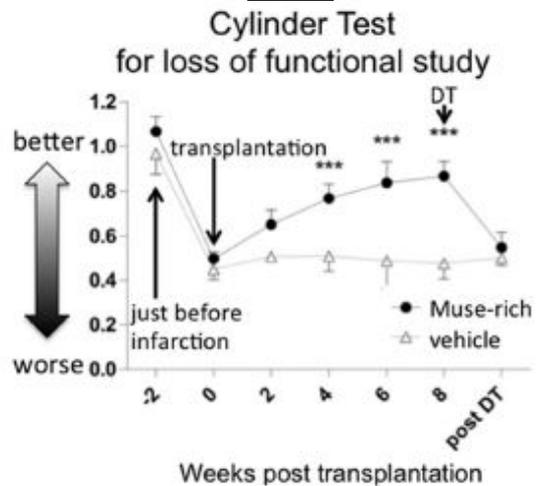


図 3

最後に、将来的な Muse 細胞移植の臨床応用を見据えて、Muse 細胞の安全性試験を行った。Muse 細胞を移植して 1 年が経過したマウス脳切片に対して、組織学的検討を行った。Muse 細胞は脳実質内に生着していたが、その多くは神経細胞に分化しており、分裂能を失っていた。H&E 染色上腫瘍を形成した個体を認めず、腫瘍死した個体はなかった。以上の結果から、Muse 細胞移植の長期的な安全性について一定の検証を行うことができた。

#### 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 3 件)

Uchida H, Morita T, Niizuma K, Kushida Y, Kuroda Y, Wakao S, Sakata H, Matsuzaka Y, Mushiake H, Tominaga T, Borlongan CV, Dezawa M. Transplantation of unique subpopulation of fibroblasts, Muse cells, ameliorates experimental stroke possibly via robust neuronal differentiation. *Stem Cells.*、査読有、34 巻、2016、160-173 (doi: 10.1002/stem.2206)

Uchida H, Sakata H, Fujimura M, Niizuma K, Kushida Y, Dezawa M, Tominaga T. Experimental model of small subcortical infarcts in mice with long-lasting functional disabilities. *Brain Res.*、査読有、1629 巻、2015、318-328 (doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.039)

Uchida H, Niizuma K, Kushida Y, Wakao S, Tominaga T, Borlongan CV, Dezawa M. Human Muse cells reconstruct neuronal circuitry in subacute lacunar stroke model. *Stroke.*、査読有、48 巻、2017、428-435 (doi: 10.1161/STROKEAHA.116.014950)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.nsg.med.tohoku.ac.jp/medical/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 洋之 (SAKATA, Hiroyuki)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 80722305

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

富永 悌二 (TOMINAGA, Teiji)

出澤 真理 (DEZAWA, Mari)

Pak H. Chan

渡辺 みか (WATANABE, Mika)

藤村 幹 (FUJIMURA, Miki)

中川 敦寛 (NAKAGAWA, Atsuhiko)

新妻 邦泰 (NIIZUMA, Kuniyasu)