

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08723

研究課題名(和文) 大動脈解離におけるMuse細胞を用いた新たな治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategy in mouse acute aortic dissection induced by intravenously administrated human-Muse cells

研究代表者

安達 理 (Adachi, Osamu)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30375092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性大動脈解離Stanford B型は遠隔期に径が拡大し手術を要することが少なくない。また、Muse細胞は障害組織に選択的に遊走・集積し、周囲組織に分化する性質を持つ。本研究では解離モデルマウスに経静脈的にMuse細胞を投与した際の、解離血管保護効果を評価することを目的とされた。細胞投与後8週間後で生存率ではMuse細胞5万投与群が間葉系幹細胞(MSC)5万投与群よりも有意に優れており、解離血管径拡大抑制効果もMuse細胞5万投与群はMSC75万投与群よりも有意に優れていた。In vivoや病理組織評価によりMuse細胞は特異的に解離血管に集積していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性大動脈解離Stanford B型は合併症がない場合は手術ではなく保存的加療を行うことが第一に選択されるが、解離血管の脆弱性のため遠隔期に径が拡大、破裂することが少なくない。その場合、結局破裂予防のための手術が必要となるため、この遠隔期の解離血管径拡大を予防することができれば、手術を回避することが可能であるため、患者の負担減少や医療資源の節約のためにも社会的意義は大きいと考えられる。Muse細胞による治療は経静脈的に可能であり、身体的侵襲も少なく、急性期に介入可能であるため、迅速な治療介入が可能であるという利点もある。

研究成果の概要(英文)：Stanford type B-acute aortic dissection (AAD) often expands over time and requires prosthetic vascular graft surgery. Muse cells home selectively to damaged-tissue and replace damaged/lost cells by in vivo-differentiation into tissue-constituent cells. We evaluated the therapeutic effects of intravenous injection of human-Muse cells without immunosuppression in a mouse AAD model. Survival rate was significantly improved in the Muse (50,000 cells) group compared with the vehicle and mesenchymal stem cell (human-MSC) (50,000 cells) groups at 8 wk due to avoidance of ruptures of the dissected aorta ($P < .05$). The diameter dilation ratio was smaller in the Muse group compared with the MSC (750,000 human-MSCs containing the same number of Muse cells; $P < .01$) and elastin knockdown-Muse (50,000 cells; $P < .001$) groups. In vivo-dynamics and histologic analysis demonstrated homing of Muse cells to AAD-tissue and differentiation into aortic-tissue components with elastic fiber production.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：急性大動脈解離 Stanford B Muse細胞 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大動脈解離は、解離範囲により2つの型に分類される。上行大動脈に解離のあるStanford A型は極めて予後不良な疾患で、内膜に亀裂(エントリー)のある部位の大動脈置換術が緊急で施行される。上行大動脈に解離のないStanford B型では内科治療と外科治療の成績が同等であり、安静と降圧による保存的治療が選択されることが一般的である。しかし、大動脈解離は急性期に治療が奏功した場合であっても、解離血管壁がその脆弱性から継時的に拡大傾向を示すことがあり、破裂のリスクが高まる。破裂予防のための拡大した血管の人工血管置換手術は侵襲が大きく、手術リスクが高い。

近年の研究で、大動脈解離血管壁では炎症性物質を介して解離の進展と拡大、破裂を引き起こしているという報告がある¹。しかし、炎症による障害を抑制しても、一度障害された血管壁が修復されるわけではない。そのため、我々は「解離血管壁の炎症の抑制」に加え、「障害された解離血管壁の修復」が大動脈解離の本質的な予後の改善策であるという仮説に基づき、再生治療の可能性を模索した。これまでに、血管の再生治療としては間葉系幹細胞により大動脈瘤径の拡大を抑制するという報告がある²。しかし、大動脈解離という高度な炎症環境下では幹細胞の生着率低下が予想される。そこで、炎症環境下で障害細胞への遊走と組織修復能を期待できる幹細胞としてMuse細胞に着目した。

Muse細胞は、ヒト間葉系組織に存在する多能性幹細胞として2010年に東北大学細胞組織学教室で発見された[3]。Muse細胞は単一の細胞から三胚葉すべての細胞に分化する能力と自己複製能を持つが、腫瘍性を持たない細胞である。さらに、静脈投与のみで炎症反応を認識し、損傷した組織へ移行・生着し、抗炎症作用を示すとともに、自発的に組織特異的な細胞へと分化して組織修復を行う特徴がある。また、Muse細胞では、一部のストレス耐性関連因子の発現がみられ、ストレス環境下でも高い細胞生存率を維持することが期待できる。このようなストレス耐性、障害組織への遊走能、抗炎症作用、組織修復能という特徴を持つMuse細胞を用いることで大動脈解離の予後を簡便な静脈点滴投与で改善できないかと考えた。

[参考文献]

1. Tomohiro Kurihara, et al: Neutrophil-Derived Matrix Metalloproteinase 9 Triggers Acute Aortic Dissection. Circulation. 2012; 126: 3070-3080.
2. Schneider f, et al: Bone marrow mesenchymal stem cells stabilize already-formed aortic aneurysms more efficiently than vascular smooth muscle cells in a rat model. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2013; 45: 666-672

2. 研究の目的

本研究では、Stanford B型急性大動脈解離モデルマウスに対して、免疫抑制なしにヒト骨髓由来間葉系幹細胞から収集したMuse細胞を経静脈的に投与し、解離血管径の拡大抑制効果とその奏功機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト Muse 細胞の分離

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(BM-MSCs)を使用し、先行文献³に従ってMuse細胞(SSEA-3(+))細胞とnon-Muse細胞(SSEA-3(-))細胞を分離した。MSCsはMACS(autoMACS Pro Separator, Miltenyi Biotec Inc)を用いてanti-FITC(+)細胞とanti-FITC(-)細胞に分離され、anti-FITC(+)細胞の区画をMuse細胞投与群に使用した。細胞区画の解析にはFACS(BD FACS Aria II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)を使用し、ヒトBM-MSCsは $5.0 \pm 0.9\%$ のSSEA-3(+)-Muse細胞を含んでおり、MACSによりanti-FITC(+)細胞区画をソーティングしたMuse細胞群ではSSEA-3(+)-Muse細胞は $76.5 \pm 6.0\%$ 含まれていた。

Stanford B型急性大動脈解離モデルマウスの作成

本研究における動物実験は、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の審査、承認のもとに実施された (No. 2018 医動-157)。

Stanford B型 AAD モデルマウスは先行文献^{4,5}を参考に一部方法を変更して作成した。4週齢のオス野生型マウス (C57BL/6NCrSlc, Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Japan) を使用した。マウスは一般的なエサと α -aminopropionitrile fumarate salt (BAPN) (A3134, MilliporeSigma, St. Louis, MO; 1 g/kg/day) を添加した飲料水で4週間飼育し、その後ヒト angiotensin (Ang ; 4001-v, Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) を充填した浸透圧ミニポンプ (Alzet 2001D, DURECT Corporation, Cupertino, CA) を皮下に埋め込み、Ang をマウスの体重 (kg) をもとに $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の流量で24時間持続投与することでStanford B型 AAD を形成する。

造影CTの撮像

CT撮像は、動物実験用CT装置 (Latheta LCT-200, Hitachi, LTD, Tokyo, Japan) を用いた。造影剤として Iomeprol (Iomeron, Eisai Co. Ltd, Tokyo, Japan) をマウスの体重 (g) をもとに $0.4 \text{ ml}/\text{g}/\text{h}$ の流量で経静脈的に持続投与した。

Stanford B型 AAD の診断と解離血管径の測定

Stanford B型 AAD の診断は、造影CTでの短軸像にて上行大動脈に解離が認められず、複数枚の画像で大動脈が2腔となっていることが確認できることを条件とした。解離血管径は造影CTでの左鎖骨下動脈分岐部以遠から横隔膜レベルまでの解離大動脈短軸像での最大短径を比較した。径の計測には Osirix software (MD ver.5.8.2, Pixmeo SARL, Switzerland) を使用した。

経静脈的細胞投与

各種細胞治療群の割り付けは Ang 投与後24時間時点で生存していたモデルマウスを無作為に4群; (1) Muse 細胞群 $50,000$ 個/ 0.2 ml 生理食塩水投与群 (Muse 群), (2) MSCs $50,000$ 個/ 0.2 ml 生理食塩水投与群 (MSC-50K 群), (3) MSCs $750,000$ 個/ 0.2 ml 生理食塩水投与群 (MSC-750K 群), (4) 0.2 ml 生理食塩水投与群 (vehicle 群) に振り分け、造影CTにてStanford B型 AAD の診断を行った後すみやかに経静脈的に各種細胞を投与した時点で割り付け完了とした。

蛍光免疫染色による病理組織学的評価の際には先行文献の通り³ レンチウイルスを用いて GFP (green fluorescent protein) で標識した MSCs と Muse 細胞を用いた。

モデルマウスの生存率

モデルマウスの生存期間は細胞投与後8週間時点で犠牲死させるまで測定した。細胞投与後2週間以内の短期間で犠牲死させる予定であったモデルマウスは生存率からは除外した。

生体内での Muse 細胞の局在評価

レンチウイルスを用いて MSCs に Venus-Akaluc を導入した⁶。解離発症から24時間以内にモデルマウスを無作為に3群に振り分け、(1) Akaluc-Muse 細胞 $50,000$ 個/ 0.2 ml 生理食塩水 (Akaluc-Muse 群), (2) Akaluc-MSCs $750,000$ 個/ 0.2 ml 生理食塩水 (Akaluc-MSCs-750K 群), (3) 0.2 ml 生理食塩水 (vehicle 群) の各種細胞を経静脈的に投与した。各群 $n=3$ のモデルマウスを使用した。Muse 細胞と MSCs の生体内での局在は IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて、細胞投与後1週間、4週間、8週間の時点で評価した。

病理組織学的評価

蛍光免疫染色では Muse 細胞を標識してある GFP で、血管平滑筋をマーカーである SMA (α -smooth muscle actin) で、血管内皮細胞をマーカーである CD31 で染色した。GFP(+) 細胞のうち SMA(+) 細胞または CD31(+) 細胞の比率と、短軸での解離血管単位面積あたりの GFP(+) / SMA(+) または GFP(+) / CD31(+) 2重陽性細胞数を大動脈1サンプルあたり5切片の平均で評価した。細胞投与後4週間、8週間の時点でそれぞれ各群 $n=3$ のモデルマウスを使用した。

弾性繊維を評価するため、Elastica-Masson 染色を行い、解離血管短軸像での新生内膜と中膜の面積のうち弾性繊維の占める割合を計測した。定量化には Image J software (ver.1.52, National Institutes of Health, Bethesda, MD, <https://imagej.net/Citing>) を使用した。大動脈1サンプルあたり5切片の平均で評価した。細胞投与後8週間の時点で各群 $n=6$ のモデルマウスを使用した。

解離血管への炎症性細胞の浸潤を評価するため、白血球共通抗原である CD45 の免疫染色を行った。解離血管単位面積あたりの陽性細胞数は大動脈1サンプルあたり5切片の平均で評価した。細胞投与後1日の時点で各群 $n=3$ のモデルマウスを使用した。

Muse 細胞の elastin 遺伝子ノックダウン

Muse 細胞の elastin 合成能を評価するために Muse 細胞の elastin 遺伝子をノックダウンした。Elastin shRNA レンチウイルス粒子 (sc-43360-V, Santa Cruz Biotechnology) を multiplicity of infection 4 で MSCs に導入し, Elastin KD (Knock down)-MSCs を作成した。

Elastin 遺伝子の発現量はソーティングした各種細胞を over night 培養した後に Digital Droplet PCR (ddPCR) にて定量化した。QuantaSoft (Ver.1.7, BIO-RAD Laboratories) を用いて定量化された。

他の細胞投与群と同様に解離発症から 24 時間以内にモデルマウスを無作為に Elastin KD-Muse 細胞 50,000 個/0.2 ml 生理食塩水投与群 (Elastin KD-Muse 群) に割り当て, 経静脈的に細胞を投与した。この群には細胞投与後 8 週間まで生存した個体が n=10 となるまでモデルマウスを使用した。

S1P 測定

大動脈解離による組織障害度を評価するため, 各種 S1P を測定した。解離発症から 24 時間以内にモデルマウスを無作為に Sham 群, Vehicle 群, Muse 群, non-Muse 群 (MSCs からソーティングした 712,000 個の SSEA-3(-) non-Muse 細胞を投与した群。712,000 個は MSC-750K 群で投与された MSCs 750,000 個中に含まれる non-Muse 細胞と同数となるよう設定した) の 4 群に割り当て, 各種細胞投与 1 日後に末梢血と解離大動脈組織が収集された。各群 n=3 のモデルマウスを使用した。

In vitro における解離大動脈と non-Muse 細胞の共培養

Non-Muse 細胞が S1P を低下させる作用を検討するため, 解離大動脈と non-Muse 細胞の共培養実験を行った。解離発症 1 日後採取した解離大動脈組織を non-Muse 細胞を 24 時間共培養したのち, 解離大動脈組織をホモジネートし, 上清の S1P レベルを上述と同様に測定した。コントロールとして, 大動脈組織のみ同様の培地で 24 時間培養後にホモジネートした上清の S1P レベルも測定した。各群 n=3 のモデルマウスを使用した。

統計学的解析

各種データは JMP Pro 15 software (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いて統計処理を行った。連続変数は平均値 ± 標準偏差で表している。統計解析はまずデータが正規分布に従うか否かを Shapiro-Wilk 検定で評価し, その結果による適切な検定方法を選択した。正規分布に従う場合は Tukey-Kramer 検定を, 正規分布に従わない場合は Steel-Dwass 検定で解析を行った。また, 2 群間の比較は Student's t 検定で解析を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

[参考文献]

3. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 8639-8643. 2010/04/28. DOI: 10.1073/pnas.0911647107.
4. Kurihara T, Shimizu-Hirota R, Shimoda M, et al. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection. *Circulation* 2012; 126: 3070-3080. 2012/11/09. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.097097.
5. Anzai A, Shimoda M, Endo J, et al. Adventitial CXCL1/G-CSF expression in response to acute aortic dissection triggers local neutrophil recruitment and activation leading to aortic rupture. *Circ Res* 2015; 116: 612-623. 2015/01/08. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304918.
6. Iwano S, Sugiyama M, Hama H, et al. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science* 2018; 359: 935-939. 2018/02/24. DOI: 10.1126/science.aag1067.

4. 研究成果

経静脈的 Muse 細胞投与による死亡率低下効果, 解離血管径拡大抑制効果

生存期間はマウスを細胞投与後8週間に犠牲死するまで観察し, カプランマイヤー法により評

価した。ログランク検定とWilcoxon検定では4群間に統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$)。死亡に対するオッズ比ではMuse群はVehicle群と比較して 0.19 (95% CI: 0.047 - 0.791, $p < 0.05$)、MSC-50K群と比較して 0.15 (95% CI: 0.026 - 0.821, $p < 0.05$) と統計学的有意差をもって小さかった。

解離血管径は細胞投与後4週間時点では解離発症時と比較して、Muse群では 1.05 ± 0.02 倍であり、解離を発症していないSham群 1.00 ± 0.03 倍より統計学的有意に大きく ($p < 0.01$)、Vehicle群 1.23 ± 0.10 倍 ($p < 0.01$)、MSC-750K群 1.15 ± 0.10 倍 ($p < 0.05$) より統計学的有意に小さかった。細胞投与後8週間時点ではMuse群では 1.09 ± 0.02 倍であり、Sham群 1.02 ± 0.03 倍より統計学的有意に大きく ($p < 0.01$)、Vehicle群 1.36 ± 0.07 倍 ($p < 0.01$)、MSC-750K群 1.23 ± 0.11 倍 ($p < 0.01$) より統計学的有意に小さく、MSC-750K群はVehicle群と比較して統計学的有意に小さかった ($p < 0.05$)。

経静脈的に投与された Muse 細胞の生体内での分布

Akaluc-Muse 群では大動脈で主に遠位弓部から腹部大動脈上部までの解離部位に細胞投与後 1, 4, 8 週間後の時点で Akaluc のシグナルが認められた。Akaluc-MSC-750K 群でも同様シグナルが認められたが、強さは Muse 群と比較してかなり小さかった。

Akaluc 光度の合計値 (p/s) を各臓器で比較すると、大動脈では細胞投与後 1 週間の時点では Muse 群 1562 ± 86 は MSC-750K 群 489 ± 108 の 3.19 倍の光度であり、統計学的有意差を認めた ($p < .001$)。細胞投与後 4 週間の時点では Muse 群 1853 ± 448 は MSC-750K 群 481 ± 146 と 3.85 倍の差があり ($p < 0.01$)、8 週間後の時点では Muse 群 2058 ± 625 は MSC-750K 群 559 ± 112 と 3.68 倍の差を認めた ($p < 0.05$)。

モデルマウスの解離大動脈組織学的評価

解離血管壁中膜で GFP(+) 細胞のうち α -SMA を発現している割合は細胞投与後 4 週間の時点で Muse 群では $42.3 \pm 8.8\%$ であり、MSC-750K 群の $22.8 \pm 4.0\%$ と比較して 1.86 倍であり、統計学的有意に高率であり ($p < 0.05$)、細胞投与後 8 週間の時点では Muse 群は $46.3 \pm 8.5\%$ であり、MSC-750K 群の $22.2 \pm 3.7\%$ と比較して 2.09 倍と統計学的有意に高率であった ($p < 0.05$)。解離血管壁内膜で GFP(+) 細胞のうち CD31 を発現している割合は細胞投与後 4 週間の時点で Muse 群では $6.2 \pm 2.2\%$ であり、MSC-750K 群 $5.9 \pm 3.2\%$ と比較して統計学的有意差は認められなかったが ($p = 0.88$)、細胞投与後 8 週間の時点では Muse 群は $9.0 \pm 0.3\%$ であり、MSC-750K 群の $4.0 \pm 1.8\%$ と比較して 2.25 倍と統計学的有意に高率であった ($p < 0.05$)。

解離血管新生内膜と中膜での弾性繊維の面積の割合は Muse 群で $33.6 \pm 1.4\%$ であり、Sham 群 $43.5 \pm 1.2\%$ よりも有意に低く、Vehicle 群 $21.5 \pm 2.0\%$ 、MSC-750K 群 $27.8 \pm 1.4\%$ よりも有意に高かった (全て $p < 0.05$)。また、MSC-750K 群は Vehicle 群と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。

Elastin KD-Muse 細胞の Elastin の発現量は ddPCR での測定で Muse 細胞と比較して 55.2% 減少していた。Elastin KD-Muse 群の解離発症後 24 時間以内の径を基準とした細胞投与後 4 週間の径の拡大率は 1.15 ± 0.10 倍であり、Muse 群の 1.05 ± 0.05 倍と比較して統計学的有意に大きく ($p < 0.001$)、MSC-750K 群の 1.15 ± 0.10 倍と比較して統計学的有意差を認めなかった ($p = 0.61$)。細胞投与後 8 週間時点では Elastin KD-Muse 群は 1.22 ± 0.04 倍であり、Muse 群 1.09 ± 0.04 倍と比較して統計学的有意に大きく ($p < 0.001$)、MSC-750K 群の 1.23 ± 0.11 倍と比較して統計学的有意差を認めなかった ($p = 0.61$)。

Elastica-Masson 染色での解離血管新生内膜と中膜での弾性繊維の面積の割合は Elastin KD-Muse 群では $29.4 \pm 1.8\%$ であり、Muse 群の $33.6 \pm 1.4\%$ よりも統計学的有意に低く ($p < 0.05$)、MSC-750K 群の $27.8 \pm 1.4\%$ と比較して統計学的有意差を認めなかった ($p = 0.28$)。

Muse 細胞の障害組織への遊走に対する non-Muse 細胞の効果

各種細胞投与 1 日後の血漿での S1P 濃度は Vehicle 群で最も高く 448.7 ± 89.4 ng/ml であり、Sham 群の 275.8 ± 56.3 ng/ml と比較して統計学的有意に高かった ($p < 0.05$)。Non-Muse 細胞と共培養した解離血管組織の S1P は 2.21 ± 0.66 ng/mg protein であり、単独で培養した解離血管組織 (Vehicle) の 5.65 ± 1.61 ng/mg protein と比較して統計学的有意に低かった ($p < 0.05$)。解離血管単位面積当たりの CD45(+) 細胞数は Muse 群で 117.1 ± 28.5 個/mm²、MSC-750K 群で 123.0 ± 56.6 個/mm² であり、Vehicle 群の 294.3 ± 57.7 個/mm² と比較して統計学的有意に低かった (ともに $p < 0.05$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 動脈解離の治療薬	発明者 齋木 佳克、高橋 誠、出澤 真理、東 秀光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許2020-216721	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋木 佳克 (Saiki Yoshikatsu) (50372298)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	秋山 正年 (Akiyama Masatoshi) (80526450)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------