

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09448

研究課題名(和文) Muse細胞を用いた脊髄損傷に対する新しい細胞移植治療法の開発

研究課題名(英文) Muse cell transplantation for Spinal cord injury

研究代表者

遠藤 俊毅 (Toshiki, Endo)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00535370

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)：本研究では、ラット脊髄損傷モデルにMuse細胞を経静脈投与し、Muse細胞が損傷脊髄内に到達し神経細胞に分化、さらに脊髄損傷後の神経機能回復につながるかどうかを評価した。その結果、ヒトMuse細胞製を尾静脈より経静脈的に脊髄損傷後2週間時点で移植することにより、脊髄損傷後のラットの後肢運動機能を有意に改善させることが示された。また、機能喪失試験を行うとCL2020群で20週目まで改善したまま持続していた運動機能が再度増悪した。これによりMuse細胞の運動機能改善への関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで行われてきた脊髄損傷に対する細胞移植実験は、脊髄を露出して髄内に細胞を直接投与することが主であった。しかし、本研究により、Muse細胞の経静脈投与による治療効果が得られ、脊髄損傷に対する安全かつ非侵襲的かつ画期的な細胞移植治療法としての確立につながる可能性が示唆された。脊髄損傷におけるMuse細胞の損傷部までの遊走機構、神経機能回復機序については更なる詳細な検証が必要と考えられるが、本研究により「CL2020」の亜急性期移植が、脊髄損傷患者の機能改善のために有効な治療法になりうる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the spinal cord injury model, Muse cells can reach to the injured spinal cord after intravenous administration. Muse cells differentiated into neuronal and neural cells and facilitated nerve fibers preservation and possibly regeneration. We confirmed therapeutic potential of Muse cells for severe subacute spinal cord injury.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：Muse細胞 脊髄損傷

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は、外傷により脊髄に強い外力が加わることによって傷害が引き起こされる。本邦の2018年の研究調査では外傷性脊髄損傷発生率は、年間100万人あたり49人であった。脊髄損傷患者の平均年齢は70歳で、原因としては転倒が一番多く、次いで交通外傷が多かった。脊髄損傷の症状としては、運動機能障害、感覚障害、膀胱直腸障害が特徴的の症状であり、それらの症状は永続的な後遺症となり患者の日常生活動作ADL (Activities of Daily Living) が著しく低下する。特に、現在の高齢化社会においては、高齢者脊髄損傷患者が増加し医療経済的負担も増えると。また、若年者脊髄損傷患者においても重度の後遺症により自身の生活の質QOL (Quality of Life) が低下し、また後遺症による社会復帰が困難となるため、社会的損失も重大な問題である。

近年では、幹細胞を中心とした脊髄損傷の再生治療効果が期待されており、臨床治験が世界的に進められている。本研究では、Multilineage-differentiating stress enduring cell (以下 Muse 細胞) 製品「CL2020」を用いた脊髄損傷に対する細胞移植治療の効果を検討した。

Multilineage-differentiating stress enduring cell (以下 Muse 細胞) は、東北大学で発見された生体内に存在する多能性幹細胞である。Muse 細胞は、骨髄、脂肪および皮膚組織などの間葉系組織に存在している。そのため、Muse 細胞は骨髄から末梢血に動員され、体内のあらゆる結合組織に分布し、様々な組織に分化する新たな多能性幹細胞である。Muse 細胞は、糖鎖である stage specific embryonic antigen (SSEA) -3 が表面抗原として発現しており、SSEA-3 陽性細胞を間葉系組織や間葉系の細胞培養から分離回収することが可能である。Muse 細胞は、浮遊培養下で自己複製能を持ち、ES 細胞の胚葉体と類似したクラスターを形成し、多能性幹細胞のマーカーである Oct3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4)、Sox2 (sex determining region Y-box 2)、Nanog (homeobox protein NANOG) 等を発現している。クラスターの接着培養から外胚葉系、中胚葉系、内胚葉系の三胚葉系の細胞にも分化するという多能性を有する。さらに、Muse 細胞は腫瘍形成の可能性が低い間葉系幹細胞中に存在しており、Muse 細胞も腫瘍形成の可能性が低いという特徴を有する。また、Muse 細胞は損傷組織への局所投与のみならず経静脈的に投与しても治療効果を示すとされている。その機序として、経静脈的に投与された Muse 細胞はスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) -S1P 受容体 2 システムを介して体内の損傷部位を自動で認識、遊走し、損傷組織に生着し必要な細胞へ分化することで組織を修復するとされている。スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) -S1P 受容体 2 システムとは、生体内の細胞が損傷を受けると、細胞膜の構成要素として存在するスフィンゴシンが細胞質に存在する酵素と反応することによってスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) が生成され、それが急性期の炎症やダメージのシグナルとなる。Muse 細胞は S1P 受容体 2 を有しているため、損傷組織より生成された S1P を認識することで損傷組織へ遊走する<sup>4,21,38</sup>。つまり、Muse 細胞は自己複製能と、三胚葉いずれの細胞へも分化する能力を有し、損傷した組織に応じて細胞分化し修復する。これら特徴により、これまで急性心筋梗塞、肝障害、慢性腎疾患などの動物実験モデルで Muse 細胞移植の治療効果が実証されている。中枢神経系においては、脳梗塞モデル動物に対する Muse 細胞移植治療研究がこれまでなされており、脳梗塞巣周辺において Muse 細胞の神経細胞に分化を確認し、さらに神経機能回復をもたらしたことが報告されている。また、脳卒中モデルにおいて、経静脈的に Muse 細胞から神経軸索が伸長し、対側の上位頸髄まで皮質脊髄路が再構築されたことが確認されている。これらの研究結果から、Muse 細胞が脳神経疾患に対しても移植細胞として適格性を有すると示された。

当研究室の先行研究において、脊髄損傷ラットに対する Muse 細胞製品

「CL2020」の脊髄損傷後1日目という急性期の移植による治療効果を検証した。行動評価による神経機能回復を確認し、組織学的評価により神経機能回復機序を検討した。また、先述の通り、脊髄損傷後急性期は損傷組織への炎症細胞浸潤による炎症反応が強く、移植細胞が傷害されるため細胞移植には不利であるとされている。そのため、脊髄損傷に対する幹細胞治療の一般的な至適時期は、損傷組織での炎症反応が減弱する亜急性期とされている。これまで Muse 細胞の脊髄損傷亜急性期の移植の治療効果については未検証であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、先行研究結果に基づき、脊髄損傷ラットに対してヒト Muse 細胞製品「CL2020」を経静脈的に亜急性期移植することによっても神経機能回復の効果が得られるか、また神経機能回復が得られた場合の回復機序について検証することを目的とした。また、急性期移植と亜急性期移植の神経機能回復の程度の差があるか検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

本研究で使用した動物は東北大学のガイドラインに従って扱われ、動物実験プロトコールは東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認のもとに実施された。動物種は、体重 200 - 230 g

の成体 Sprague-Dawley ラット（日本エスエルシー株式会社、静岡、日本）の雌を使用した。雌のラットを用いた理由は、脊髄損傷後に排尿障害をきたすため排尿介助を行いやすくするためである。1 ゲージ毎に2匹から3匹のラットを収容し、手術前後で自由に飲水と摂食可能な環境とし、24 時間の温度に維持した。

#### （2）脊髄損傷モデルの作成

ラットに30%の酸素と70%の亜酸化窒素中に2.0%のイソフルランで吸入麻酔をかけた。手術中は、フィードバック調節式加温パッド（BWT-100、バイオリサーチセンター株式会社、名古屋、日本）を用いて直腸温を $37.0 \pm 0.5$  に維持した。脊髄損傷モデルは、胸椎棘突起が触知しやすい第9胸椎レベルで、圧挫損傷を作成するのが一般的である。吸入麻酔をかけたラットを腹臥位にして、第9胸椎棘突起を触知して確認した。第9胸椎棘突起上の皮膚を剃毛し、感染症を予防するために消毒と洗浄を行った。背側正中切開を行い、第9胸椎弓を脊髄損傷しないよう切除し脊髄背側面を広範に露出した。次に、Infinite Horizon (IH) -impactor (Precision System and Instrumentation, LLC., Lexington, KY, USA) を使用し、IH-impactor テーブルに脊髄が平行になるようにラットを固定し、200 kilodynes の圧力、dwell time を0秒に設定した状態で脊髄に圧挫傷を加えた。損傷後は筋肉と皮膚を閉創した。脊髄損傷により排尿障害を呈し死亡する危険性があるため、損傷後1週間まで毎日2回、その後は毎日1回、徒手的に腹部圧迫し排尿を促した。

#### （3）Muse 細胞製品「CL2020」の経静脈的投与

Muse 細胞製品「CL2020」(株式会社生命科学インスティテュート、東京、日本) 投与群 (CL2020 群、 $n = 8$ ) と Dulbecco's Phosphate Buffered saline (D-PBS、フナコシ株式会社、東京、日本) 投与群 (対照群、 $n = 12$ ) の2群を作成した。脊髄損傷後2週目に、CL2020 群はラット尾静脈より CL2020 含有の Muse 細胞 300,000 細胞/匹を経静脈的に投与した。対象群は、同様の手技にて尾静脈より D-PBS を投与した。両群とも全ラットに免疫抑制剤プログラフ (アステラス製薬株式会社、東京、日本) 0.5 mg/kg を1日おきに損傷後20週目まで皮下投与した。

#### （4）行動評価

脊髄損傷で障害されるうる機能は、運動機能、感覚機能、膀胱直腸機能があるが、本研究では先行研究に即して機能障害と機能回復の程度が評価しやすい運動機能障害に対する移植治療効果を評価した。

運動機能は、後肢運動機能の評価として一般的に用いられる B.B.B (Basso, Beattie, Bresnahan) 運動評価尺度<sup>3</sup>を用いて評価した。両群の全ラット ( $n = 20$ ) について、脊髄損傷作成前、損傷後1日目、7日目、その後20週目までの毎週毎に B.B.B 運動評価尺度を評価した。全ラットで行動評価を動画撮影し、盲目的にスコアリングを行った。

#### （5）Diphtheria toxin の投与による運動機能喪失試験

Diphtheria toxin は、齧歯類の細胞と比較して、ヒト由来の細胞に対して100,000倍の感度があるとされている<sup>7</sup>。したがって、ヒト由来の細胞移植を受けた齧歯類モデルに Diphtheria toxin を投与すると、齧歯類モデル内のヒト由来の移植細胞が優位に傷害される。したがって、細胞移植後に機能が回復している検体で、Diphtheria toxin 投与後にその回復した機能が喪失した場合、移植したヒト由来の移植細胞が機能回復に寄与している可能性があると考えられる。過去に報告されたラクナ梗塞モデルに対する Muse 細胞移植の研究において、Muse 細胞移植後に有意に改善していた運動機能が Diphtheria toxin 投与後に再増悪し、移植した Muse 細胞が神経機能回復に寄与したとされた。

本研究では、脊髄損傷後20週後に *Corynebacterium diphtheriae* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) の Diphtheria toxin を用いて、各群無作為に選択したラット (CL2020 群  $n = 3$ 、対照群  $n = 3$ ) に対して運動機能喪失の評価を行なった。既存の研究に則り、脊髄損傷後20週+1日目、2日目に24時間間隔で Diphtheria toxin (50  $\mu$ g/kg) を計2回腹腔内投与した。脊髄損傷後20週+7日目にそれぞれ後肢運動機能を B.B.B 運動評価尺度で評価した。

#### （6）組織学的評価、組織標本の作成

脊髄損傷後20週まで行動評価を行った後、先述した Diphtheria toxin 投与による機能喪失試験を施行しなかった全ラット (CL2020 群  $n = 5$ 、対照群  $n = 9$ ) を sacrifice し、それぞれ脊髄の軸位断の凍結切片を作成し組織学的評価を行なった。両群の全ラットにイソフルランを過量に吸引させて麻酔をかけた。麻酔をかけたラットに経心臓的に、生理食塩水を還流し十分に脱血し、続いて0.1 ml/L の2%パラホルムアルデヒドを還流して組織を固定した。その後、損傷部位を含む脊髄を取り出した。脊髄損傷部を中心に10 mm の長さで切り出し、包埋材 (Thermo Scientific™ Shandon™ M-1 Embedding Matrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で包埋し液体窒素で凍結した。凍結脊髄はクライオスタットを使用して軸位断で切片を5  $\mu$ m の薄さで切断した。スライド上の脊髄切片は損傷中心部を0点として、吻側と尾側方向に1.0 mm、1.5 mm、2.0 mm、3.0 mm、4.0 mm、5.0 mm の間隔のセグメントとして切片を作成した。

#### ( 7 ) 脊髄損傷部における空洞体積の計測

Hematoxylin-Eosin 染色で組織形態学的評価を行った (CL2020 群 n = 5、対照群 n = 5)。脊髄損傷後、慢性期より損傷脊髄組織内で空洞が形成される。Hematoxylin-Eosin 染色を行うと、温存されている脊髄組織のみが染色され、脊髄中心部に形成された空洞は非染色部となる。Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して、各セグメントの切片毎に空洞の面積を計測した。その面積から空洞の体積を算出した。

#### ( 8 ) 脊髄前角部における 5-HT fiber 陽性数の計測

脊髄損傷遠位部の切片における脊髄前角部の 5-HT (5-Hydroxytryptamine = serotonin) fiber 陽性数を計測した (CL2020 群 n = 5、対照群 n = 5)。5-HT fiber の蛍光染色では、脊髄前角部を走行する下降性脊髄路の神経軸索が陽性となる。両群の脊髄損傷遠位部の脊髄前角部において、5-HT fiber を定量的に評価することで脊髄損傷後に温存されている神経軸索数を比較した。抗 5-HT 抗体 (ab66047, Abcam, Cambridge, UK) を蛍光免疫染色した。軸位断脊髄切片で、損傷部中心から 3 mm 遠位部のセグメントで、脊髄前角部において抗 5-HT 抗体で染色された陽性 fiber を Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて計測した。単位面積 1mm<sup>2</sup> 当たりの陽性数に換算した。

#### ( 9 ) 損傷脊髄組織内での Muse 細胞の同定、神経細胞への分化の評価

蛍光免疫染色を用いて、経静脈的に投与した「CL2020」含有の Muse 細胞が脊髄損傷組織に存在していることを同定し、さらに損傷部辺縁の脊髄内で神経細胞へ分化しているか評価した (CL2020 群 n = 5)。Muse 細胞は、ヒト由来多能性幹細胞であり、細胞質内のミトコンドリアが hMit (human Mitochondria) (1:50; ab3298, Abcam, Cambridge, England) 抗体で陽性となる。hMit と核を示す DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、そして神経細胞を示す MAP2 (Microtubule Associated Protein 2) 抗体 (1:500; ab5392, Abcam)、星状膠細胞を示す GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 抗体 (1:500; 130330, Invitrogen)、希突起膠細胞を示す GST pi (Glutathione S-transferase pi) 抗体 (1:200; MBL312, Medical & Biological Laboratories) の各々で三重染色を行った。DAPI 抗体は、核内の二本鎖 DNA に結合することで蛍光を呈す。MAP2 は、細胞質、細部骨格に存在し、脱重合に対して微小管を安定させており、神経細胞のマーカーとなる。GFAP は、中間径フィラメントタンパク質であり、中枢神経系では星状膠細胞、上衣細胞、末梢神経系ではシュワン細胞などに発現する。GST pi は、疎水性・親電子性化合物と還元型グルタチオンとの抱合を触媒する酵素で、中枢神経では希突起膠細胞のマーカーとなる。二次抗体は、Alexa 488 anti-mouse、Alexa 488 anti-rabbit、Alexa 568 anti-chicken、Alexa 488 anti-Rat (Prolong diamond antifade mountant with DAPI: P36962, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) でインキュベートし、封入剤 (DAPI を含む Prolong diamond 退色防止封入剤: P36962, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で封入した。切片はレーザー共焦点顕微鏡 (FV3000、OLYMPUS 東京、日本) を用いて鏡検した。脊髄損傷部周辺の組織切片において三重染色で陽性を呈する細胞を同定し、細胞数をカウントし比率を算出した。また脊髄切片内での細胞の分布も評価した。

#### ( 10 ) 統計学的評価

行動評価における B.B.B 運動評価尺度は、CL2020 群と対照群との間の B.B.B 運動評価尺度を多重測定分散分析 (ANOVA) と Bonferroni post hoc テストで統計学的解析を行った。グラフは、平均 ± 標準偏差で示した。各群のジフテリア毒素投与前後の B.B.B スコアは paired T 検定で解析した。

脊髄損傷部空洞体積、5-HT fiber 陽性数の CL2020 群と対照群間の比較は、多重測定分散分析 (ANOVA) で比較した。グラフは、平均値 ± 標準偏差で示した。

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) CL2020 静脈投与による後肢運動機能の改善

脊髄損傷後 2 週目に CL2020 を経静脈的に投与した。CL2020 群のラットは対照群と比較して、損傷後 6 週目より B.B.B スコアが有意に改善した。さらにその改善効果は損傷後 20 週目まで持続した。脊髄損傷後 20 週目の B.B.B スコアの平均値 ± 標準偏差は、CL2020 群で 10.9 ± 0.96 で、対照群は 7.4 ± 3.1 であった。

#### ( 2 ) Diphtheria toxin 投与後の後肢運動機能の喪失

Diphtheria toxin を投与することによる機能喪失試験を施行した。CL2020 群 (n = 3) において、Diphtheria toxin 投与後 5 日目に B.B.B スコアの再増悪を呈した。20 週目のスコアと比較して、有意なスコア低下であった (p < 0.01)。一方、対照群においては、Diphtheria toxin 投与前後での B.B.B スコアの有意な変化は呈さなかった。

#### ( 3 ) 脊髄損傷部における空洞体積の計測

CL2020 群において、対照群と比較して脊髄損傷により形成された空洞の体積は有意に小さかつ

た ( $p < 0.05$ )。空洞体積の平均値  $\pm$  標準偏差は、CL2020 群で  $3.1 \pm 0.69 \text{ mm}^3$ 、対照群で  $4.1 \pm 0.64 \text{ mm}^3$  であった。

(4) 脊髄前角部における 5-HT fiber 陽性数の計測

脊髄損傷部遠位側で 5-HT fiber 陽性数を計測したところ、CL2020 群において対照群と比較して 5-HT 陽性の軸索数は有意に多かった ( $p < 0.01$ )。5-HT 陽性の軸索数の平均  $\pm$  標準偏差は、CL2020 群で  $201.0 \pm 30.4 / \text{mm}^2$ 、対照群で  $130.9 \pm 11.2 / \text{mm}^2$  であった。

(5) 損傷脊髄組織内での Muse 細胞の同定、神経細胞への分化の評価

CL2020 群の脊髄損傷部周辺組織において蛍光免疫染色を行ったところ、「CL2020」含有 Muse 細胞である hMit 陽性細胞を同定した。さらに、それらの細胞のうち、MAP2、GFAP、GST pi も陽性となる細胞を確認した。細胞の分布としては、hMit、MAP2 とともに陽性となる細胞は主に脊髄灰白質に多く分布し、hMit と GFAP、GST pi がともに陽性となる細胞は脊髄白質に多く分布する傾向にあった。また、それぞれの hit 陽性のうち MAP2、GFAP、GST pi が陽性となる細胞数をそれぞれカウントし比率を算出したところ、MAP2 陽性細胞  $>$  hMit - GFAP 陽性細胞  $>$  GST pi 陽性細胞の順に多かった。損傷近位部において、MAP2 陽性細胞  $54.0 \pm 3.5\%$ 、GFAP 陽性細胞  $24.0 \pm 2.5\%$ 、GST pi 陽性細胞  $22.0 \pm 1.9\%$  であった。損傷中心部において、MAP2 陽性細胞  $48.4 \pm 2.8\%$ 、GFAP 陽性細胞  $26.6 \pm 6.0\%$ 、GST pi 陽性細胞  $25.0 \pm 5.0\%$  であった。損傷遠位部において、MAP2 陽性細胞  $52.3 \pm 4.6\%$ 、GFAP 陽性細胞  $25.6 \pm 1.7\%$ 、GST pi 陽性細胞  $22.1 \pm 3.1\%$  であった。いずれも平均値  $\pm$  標準偏差で表記した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kajitani T, Endo T, Iwabuchi N, Inoue T, Takahashi Y, Abe T, Niizuma K, Tominaga T.	4. 巻 Jan 1
2. 論文標題 Association of intravenous administration of human Muse cells with deficit amelioration in a rat model of spinal cord injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurosurg Spine.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2020.7.SPINE20293.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 遠藤俊毅
2. 発表標題 Muse細胞を用いた脊髄損傷治療
3. 学会等名 日本脳神経外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤俊毅
2. 発表標題 Intravenous administration of human Muse cells ameliorates deficits in a rat model of spinal cord injury
3. 学会等名 59th ISCoS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤俊毅
2. 発表標題 Muse細胞を用いた脊髄損傷治療
3. 学会等名 脊髄障害医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	新妻 邦泰  (Niizuma Kuniyasu)  (10643330)	東北大学・医工学研究科・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
---------	---------