

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19924

研究課題名（和文）特発性大腿骨頭壊死症に対するMuse細胞を用いた革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative Muse cell-based therapies for idiopathic osteonecrosis of the femoral head

研究代表者

山田 宏（Yamada, Hiroshi）

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70275361

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：特発性大腿骨頭壊死の動物モデル（ラット）に対するMuse細胞の治療効果を検討した。モデルにステロイドの投与を行った後、大腿骨頭を採取し病理組織学的に骨頭壊死発生の有無を評価した。使用したラット30匹中11匹12骨頭で骨梁構造内に壊死を示唆する病理学的所見を認めた。作成した動物モデルに30万Muse細胞を経血行性に投与した。壊死の進行が抑制されていた例も認めたが、30万非Muse細胞を投与した群と有意差は認めなかった。今回の実験系では、使用動物の問題により、安定したモデルの供給が困難であったため、十分な個体数による比較検討ができず、Muse細胞の治療効果を客観的に証明することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回採用した動物モデルは、多くが大腿骨頭の骨化障害や骨化遅延を伴っており、骨梁構造が十分に確認できなかったため、骨頭壊死の有無を判定することは困難であった。このため、品種、生産業者の変更を行ったが、改善されなかった。しかしながら、Muse細胞がステロイド誘発性大腿骨頭壊死に対し、抗炎症作用、抗線維化作用により壊死の進行を抑制するとともに壊死部の再生に寄与している可能性は大いにあると考えている。今後、動物モデルの変更又は骨化障害・骨化遅延を生じない品種を検索し、本実験系を継続していく予定である。

研究成果の概要（英文）：The therapeutic effect of Muse cells on an animal model (rat) of idiopathic osteonecrosis of the femoral head was investigated. After the model was created, a large dose of steroids was administered. Two weeks after administration, the femoral head was harvested and histopathologically assessed for the development of osteonecrosis. Pathological findings suggestive of necrosis within the diaphyseal structures were observed in 12 heads of 11 out of 30 rats used. The animal model created was injected with 300,000 Muse cells intravenously. In some cases, the progression of necrosis of the femoral head was suppressed, but this was not significantly different from the group that received 300,000 non-Muse cells. In the present experimental system, it was difficult to supply a stable model due to problems with the animals used, so comparative studies with a sufficient number of animals were not possible, and the therapeutic effect of Muse cells could not be objectively proven.

研究分野：整形外科学

キーワード：特発性大腿骨頭壊死 Muse細胞 動物モデル ステロイド 治療効果

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腿骨頭壊死は、他の疾患へのステロイド治療などによる大腿骨頭の阻血が原因であり、大腿骨頭圧潰から変形性股関節症に至り、疼痛歩行障害から日常生活動作が著しく阻害される厚生労働省指定の難病である。青壮年期に好発し、ひとたび発症すると保存療法で対処することが出来ず、人工関節に置換しても10年で再手術となるため、医療経済や社会経済的な損失が大きい。もし壊死骨発生の早期で大腿骨頭の圧潰を予防し、壊死骨を再生できる安全で有効な治療法が開発されれば、難病克服へ向けた画期的な成果となりうる。

Muse細胞は、多能性の生体内修復幹細胞で腫瘍性が無い(Kuroda et al, PNAS 2010)。多能性幹細胞マーカーSSEA-3で様々なソースから採取可能である。骨髄から末梢血に定期的に動員され、あらゆる臓器の結合組織に分配され、恒常性維持に関わると考えられている。胎盤に類似する免疫調整能を持つため、血縁の提供、HLA適合や長期の免疫抑制剤を必要とせず、ドナー細胞の点滴のみで、多様な臓器を修復し機能を取り戻すことができる(Yamada et al., Cir Res 2018)。三菱ケミカルホールディングスのグループ会社 生命科学インスティテュートが Muse細胞製剤を作成し、医薬品医療機器総合機構(PMDA)の承認を得て2018年より心筋梗塞、脳梗塞、表皮水泡症、脊髄損傷、新生児脳性麻痺での治験が実施されている。2020年には脳梗塞の二重盲検治験での安全性・有効性が公表され<https://www.isii.co.jp/pdf/20200423-2.pdf>、心筋梗塞での治験成果も論文発表されている(Noda et al., Cir J, 2020)。他の幹細胞には見られない Muse細胞の特徴は；1)【投与に際して外科的手術が不要】傷害を受けた組織は警報シグナルとして sphingosine-1-phosphate(S1P)を合成する。S1P receptor2を発現する Muse細胞は血液中を巡る過程で傷害部位を認識し、集積・ホーミングする。2)【遺伝子導入や分化誘導操作が不要】ホーミング後多能性である Muse細胞は、自発的に「場の倫理」に応じて組織を構成する複数の細胞に同時に分化する。3)【ドナー細胞が直接利用可能】Muse細胞は胎盤の持つ免疫調整機構を有しており、ドナー細胞は免疫拒絶を免れ、半年以上組織内で機能細胞として生存可能である(図2)(Cir Res, 2918; Stroke 2019; JASN 2017; Cell Transpl, 2017)。4)現在実施されている治験は全て、血縁提供、HLA適合や長期の免疫抑制剤投与を必要とせず、ドナー細胞の直接の点滴投与で行われている。点滴で傷害部位に集積し、傷害を受けた組織を健全な組織に作り替えることができるのが最大の利点であり、これらの簡便性から一般の診療所や病院における普及が可能である。

現在、Muse細胞は株)生命科学インスティテュートにより医薬品製造品質管理基準(GMP)および再生医療等製品に関わる規制要件(GCTP)を満たす細胞処理手順が確立されている。PMDAの承認を得て、2018年から急性心筋梗塞、脳梗塞、表皮水泡症、脊髄損傷、新生児脳性麻痺での探索的臨床試験の治験が実施されており、申請者は脊髄損傷の実施機関である。Muse細胞は他の難治性疾患への可能性も持っていると思われるが、現時点で運動器疾患への Muse細胞の臨床応用は未だなされておらず、妥当性を示す動物実験の研究結果が期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究は Muse細胞の可能性に賭けて、難病指定となっている特発性大腿骨頭壊死症に対する根本治療法の可能性を、世界で初めて示そうとするものであり、ラット骨壊死実験動物モデルに、ヒト Muse細胞を免疫抑制剤無しに投与し、壊死骨再生の有効性と安全性を検証し、臨床応用への道筋をつけることである。

### 3. 研究の方法

- 1) ラット大腿骨頭壊死の作成：Lipopolysaccharide(2mg/kg)を経静脈的投与後、methylprednisolone(20 mg/kg)を3日間連続して筋注する。
- 2) ヒト Muse細胞の採取：MSCから数パーセント含まれるSSEA-3陽性細胞として Muse細胞をMACSで採取する(Uchita et al, 2017, Stroke)。

- 3) ヒトMuse細胞の骨分化能、軟骨分化能の検討：骨や軟骨への分化能はサイトカイン等の刺激を用いて確認する。
- 4) Muse細胞投与とdose dependency：MRIで大腿骨頭において壊死領域の発現を認めたものだけを投与実験に用いる。群はvehicle（等量の生食水）、ヒトMuse細胞、ヒトMSCの3群を設定し、dose dependencyを調べるために、ヒトMuse細胞とMSCにおいては、投与細胞数を5万、10万、15万で設定する。投与は尾静脈で行う。各群はn=6～10とする。投与はMRI検査直後とする。
- 5) 投与細胞の体内動態：投与するMuse細胞、MSC にあらかじめAkalucを遺伝子導入しておく。投与3日後と4週後において、IVISを用いてそれぞれの細胞の体内動態をIVISによって撮影する。その際、全身像を撮影した後、各臓器を取り出して個別に撮影する。
- 6) 壊死領域の縮小評価：投与4週で行う。大腿骨頭壊死領域の評価は、高精度のMRIを必要とするため、大阪大学の11.7テスラの機種を使用する。
- 7) 大腿骨頭への血管新生の3次元解析：投与4週後で血管からFITC dextranを注入し、安楽死の後大腿骨頭の脱灰、透明化処理を行う。Light sheet microscopy(東北大)にて大腿骨頭への血管の分布、血管新生を3次元的に解析する。
- 8) 組織学的検討：大腿骨切片を作成し、HE染色等により概要を把握する。抗ヒト核抗体、抗ヒトミトコンドリア抗体などを用いて静脈投与されたMuse細胞、MSCの壊死骨への生着を確認する。さらに生着した細胞の分化を免疫組織学的検討によって調べる。骨はRunx2、Osteopontin、Osteocarcin等で、軟骨細胞はtype II collagen等を用いる。
- 9) ヒト分化マーカー検出：digital PCRを用いて検証する。ラット大腿骨頭からtotal RNAを抽出、cDNAに変換し検証する。マーカーとしてRunx、Collagen type2、type 10、Aggrecan、Sox4、Sox5、Sox9等を用いる。

#### 4．研究成果

Muse細胞の単離を行なうために、Lonza社より骨髄由来間葉系幹細胞を購入し、low glucose DMEM、Human FGF2、fetal bovine serumを用いて培養した。培養した骨髄由来間葉系幹細胞を、Muse細胞の膜表面に特異的に存在する糖蛋白のSSEA-3で標識した。標識した間葉系幹細胞を、フローサイトメトリーを用いて、Muse細胞を分離した。

10週齢のWistar系雄性ラットを用いて、ステロイド性大腿骨頭壊死動物モデルの作成を行った。まず、炎症状態を引き起こすため、Toll-like receptor 4のリガンドであるLipopolysaccharide (LPS) 2.0mg/kgを投与した。次いで、Methylprednisolone (MPSL) 20mg/kgの投与を行った。MPSL投与から2週後に大腿骨頭を採取し、病理組織学的に大腿骨頭壊死発生の有無を評価した。使用したラット30匹中11匹12骨頭で骨梁構造内にempty lacunaeやpyknotic nucleiといった大腿骨頭壊死を示唆する病理学的所見を認めた。残りのラット19匹は大腿骨頭の骨化障害や骨化遅延を伴っており、骨梁構造が十分に確認できないため、骨頭壊死の有無を判定することは困難であった。骨化障害・遅延は大腿骨頭壊死を認めた11匹でもみられた。使用動物の骨化障害・骨化遅延により安定した動物モデルの供給が困難であったため、品種、生産業者の変更を行ったが、改善されなかった。作成した動物モデルに30万Muse細胞を経血行性に投与したところ、大腿骨頭壊死の進行が抑制されていた例も認めしたが、30万非Muse細胞を投与した群と有意差は認めなかった。

今回の実験系では、使用動物の問題により、安定したモデルの供給が困難であったため、十分な個体数の確保下におけるMuse細胞投与群と対照群の比較検討ができず、その治療効果を客観

的に証明することはできなかった。しかしながら、Muse 細胞がステロイド誘発性大腿骨頭壊死に対し、抗炎症作用、抗線維化作用により大腿骨頭壊死の進行を抑制するとともに、既に壊死に陥った局所の再生に寄与している可能性は十分にあり得ると我々は考えている。今後、動物モデルの変更又は骨化障害・骨化遅延を生じない品種を検索し、本実験系を継続していく予定である。

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

〔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	原田 悌志  (Harada Teiji)  (20838320)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員   (24701)	
研究分担者	南方 邦彦  (Minakata Kunihiko)  (50838307)	和歌山県立医科大学・医学部・准客員研究員   (24701)	

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