

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20774

研究課題名(和文)急性脳症モデル動物に対するMuse細胞の治療効果

研究課題名(英文)Effects of Muse cell on a mouse model with Acute encephalopathy

研究代表者

川口 達也(Kawaguchi, Tatsuya)

鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：30881594

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文):本研究は急性脳症モデルマウスに対するMultilineage-differentiating stress-enduring (Muse)細胞の治療効果を検討する研究である。急性脳症モデルマウスにMuse細胞とnon-Muse細胞、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)のそれぞれを投与し、生存率、体重変化率、RT-PCRによるサイトカイン(IL-6, IL-10, TNF)の定量を行い効果判定した。Muse投与群、non-Muse投与群とPBS投与群において生存率と抗炎症性サイトカインの定量で有意差を得た。Muse細胞が急性脳症の生存率改善とサイトカインの制御に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性脳症は主に小児において発症し、種々の感染症を契機に高熱に伴う痙攣重積、意識障害が生じ、高い死亡率を示す疾患である。更に精神運動発達障害や難治性てんかんなどの重い後遺症を残すが、根治的な治療法は確立されておらず、医学的・社会的に大きな課題である。本研究ではMuse細胞が急性脳症の死亡率の改善や抗炎症性サイトカインの増加に効果があることが示唆された。Muse細胞が急性脳症の新しい根治療法となれば、急性脳症による死亡率、重篤な後遺症を軽減できる可能性がある。

研究成果の概要(英文):This study was designed to investigate the effects of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells on a mouse model of acute encephalopathy (AE). Muse cells, non-Muse cells, and phosphate-buffered saline (PBS) were administered to mice models of acute encephalopathy, and the efficacy was evaluated by quantifying survival rate, body weight change, and cytokines (IL-6, IL-10, TNF) by RT-PCR. The results suggest that Muse cells are useful for improving survival and regulating cytokines in acute encephalopathy. Muse cells were suggested to be effective in improving survival and regulating cytokines in acute encephalopathy.

研究分野：急性脳症

キーワード：acute encephalopathy Muse cell cytokine-stome

### 1. 研究開始当初の背景

急性脳症(Acute Encephalopathy:AE)は主に乳幼児期の小児を中心に、インフルエンザウイルスなど種々の感染症に併発する(400-700人/年)。急性期では発熱、痙攣重積、意識障害や高い死亡率を示し、精神障害やてんかんなどの後遺症を残すが、ヒトのAEの剖検脳は極めて少ないため病態解明が進んでいない。中でも急性壊死性脳症や出血性ショック脳症症候群など、血中サイトカインの異常上昇を主とした病態のAEは、特に予後が悪い。

研究代表者の所属教室では、AEモデルマウスの開発に成功した。このAEモデルマウスは、生後8日マウスに対してLipopolysaccharide(LPS)腹腔内投与と温熱処理(Hyperthermia:HT)の組み合わせ(LPS+HT処置)により、高い死亡率、BBB破綻による血管原性浮腫、アストロサイトやミクログリアの活性化、ニューロンやアストロサイトの壊死、局所的虚血など、急性壊死性脳症や出血性ショック脳症症候群に類似した神経病理学的所見を示す。

近年、脳虚血を含む様々な傷害に対して、組織修復能を持つMuse細胞の移植が、高い治療効果をもたらす事が証明されている。また研究代表者の共同研究者は、血管原性脳浮腫とニューロン変性を呈する腸管出血性大腸菌関連脳症モデル動物に対して、Muse細胞を静脈注射移植すると、高い治療効果を示す事を証明した。以上のことから、AEモデルマウスに対してもMuse細胞移植による治療・症状改善効果が期待できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、AEモデルマウスに対するMuse細胞移植による治療効果を検討することを第一の目的とする。更に、移植されたMuse細胞の体内動態(損傷部位への集積、分化等)を解析し、AEの発症機序とMuse細胞による治療機序を解明することを目的とする。研究代表者の所属教室で開発されたAEモデルマウスにより、症例の少ないヒトでは得難い、詳細なデータが得られる点が最大の利点である。本研究が目指す多能性幹細胞移植は全く新しい治療戦略となり、本研究の推進により患者とその家族の精神的負担と、医療・福祉にかかる膨大な費用の軽減に直結することは明白であり、極めて意義深い研究であると言える。

### 3. 研究の方法

本研究では、出生8日のNOD/SCIDマウス(免疫不全マウス)を用いた。既に確立されたAEモデルマウスはICRマウスを用いていたので、マウスの系統による反応の相違を考慮して条件設定(LPS投与量等の最適化)を行い、AE-SCIDマウスを作成した。AE-SCIDマウスに対して、LPS+HT処理し、Muse細胞(10,000個/個体)を後眼窩静脈洞に注射して(Muse群)、以下の解析を行った。なお、対照群としてAE群(AE2時間後に生理食塩水50μL投与)とnon-Muse群(AE群にMuse細胞以外の間葉細胞を投与)を用いて比較した。

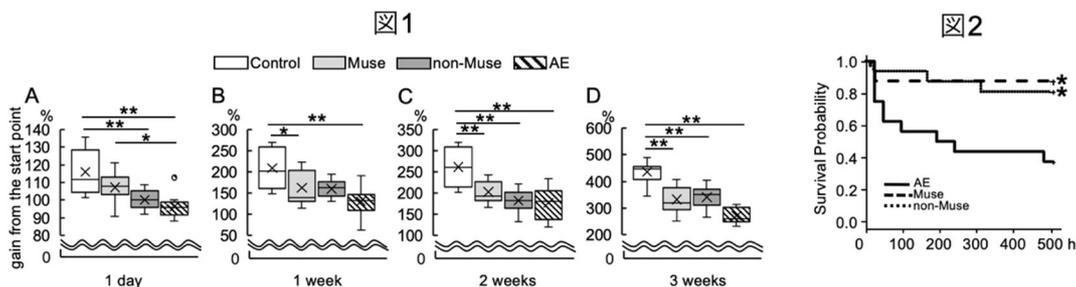
効果判定として生存率、体重変化率を各群で比較した。BBB破壊の解析はフルオレセインナトリウムを腹腔内投与し、45分後に摘出した脳の蛍光強度を測定した。組織学的解析は、ウサギ抗Iba1抗体およびマウス抗STEM121抗体を用いて免疫染色を行った。炎症性サイトカインプロファイルの解析は各マウスの脳からRNAを抽出し、炎症性サイトカイン(IL-6、IL-10、TNF)のmRNAをqRT-PCRによって測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 体重増加および生存に対するMuse細胞の効果

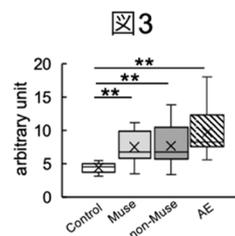
各実験群の体重変化率をAE誘導処理後3週間まで測定した。AE誘導1日後の体重増加は、non-Muse群、AE群ともに対照群より有意に減少した。一方Muse群の体重増加は対照群と有意差はなかったが、AE群の体重増加より有意に多かった(図1A)。

AE誘導1週間後の体重増加は、Muse群とAE群ともに対照群より有意に少なかった(図1B)。また、全群の体重増加率は、対照群よりも有意に低かった(図1C、1D)。生存期間を通じて、体重増加はMuse群とnon-Muse群で有意差はなかった。



次に、AE 誘導処理後 3 週間(504 時間)の生存率を測定した(図 2)。3 週間の生存率は Muse 群および非 Muse 群の生存率は AE 群よりも有意に高かったが、Muse 群と non-Muse 群の間に有意差は認められなかった(図 2)。

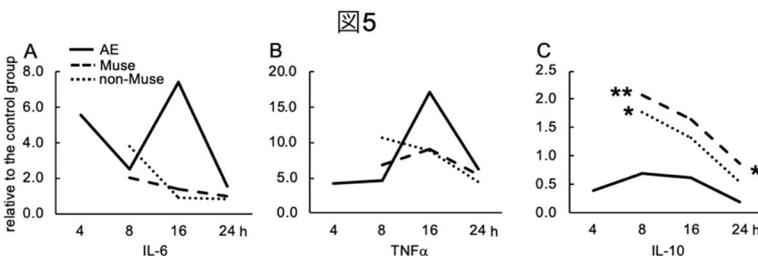
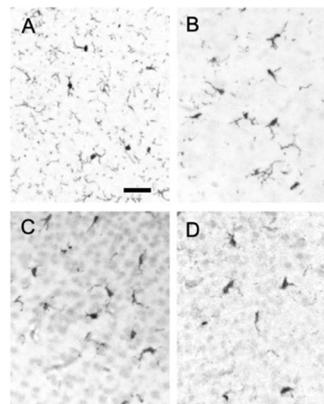
(2) BBB 障害およびミクログリア活性化に対する Muse 細胞の効果  
 脳 1g あたりのフルオロセインナトリウムの蛍光強度の中央値は、対照群、Muse 群、non-Muse 群、AE 群でそれぞれ 4.51、6.78、6.80、8.25 であった。蛍光強度は、Muse 群、non-Muse 群、AE 群で対照群より有意に高かったが、Muse 群、non-Muse 群、AE 群間で有意差はなかった(図 3)。



(3) グリア細胞の活性化

NOD/SCID マウスの Iba1 免疫陽性ミクログリアの活性化は、ICR マウスのそれよりもはるかに低かった。さらに、AE 誘導処理後 24 時間の時点で、ミクログリアは対照群よりも AE 群の方が、細胞体がわずかに大きかった(図 4A、4B)。特に、Muse 群と非 Muse 群のミクログリアはわずかに活性化していた(図 4C、4D)。

図 4



(4) 脳内炎症性サイトカインの mRNA 発現に対する Muse 細胞の影響

AE 投与 4、8、16、24 時間後にサイトカイン (IL-6、TNF、IL-10) の mRNA 発現量を qRT-PCR で評価した(図 5)。AE 誘導処理後 16 時間で、IL-6 と TNF の mRNA 発現量は AE 群でピークに達し、その後低下した。これらの炎症性サイトカインの平均 mRNA 発現量は、AE 誘導処理後 16 時間の時点で、Muse 群と non-Muse 群で AE 群より低かったが実験群間に有意差は認められなかった(図 5A、5B)。一方、Muse 群および non-Muse 群の IL-10 の mRNA 発現量は、AE 誘導処理後 8 時間で AE 群より有意に高かった(図 5C)。その後、IL-10 の発現量は低下したが、Muse 群では他の実験群よりも有意に高かった(図 5C)。

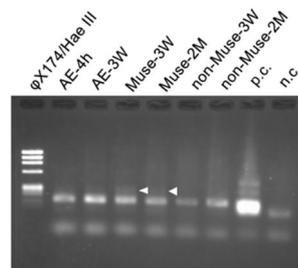
(5) 脳内における Muse/non-Muse 細胞の存在

抗 STEM121 モノクローナル抗体は、マウスに移植されたヒト細胞の細胞質タンパク質を検出するのに広く使われている。抗 STEM121 抗体によるスクリーニングを、Muse 群と non-Muse 群の切片について、AE 誘導処理 24 時間後と 2 カ月後に行ったが、STEM121 免疫陽性細胞は検出されなかった。そこで、より感度が高い検出法として、ヒト特異的 Alu 配列を標的とした PCR を行った。AE 誘導処理後 24 時間では、Alu 配列のアンプリコンは検出されなかった。一方、Muse 群ではごく微弱な band が検出されたが、non-Muse 群では AE 誘導処理後 3 週および 2 カ月では検出されなかった(図 6)。

図 6

(6) 本研究では、AE 誘発プロトコルを NOD/SCID マウスに適用し、Muse 細胞投与による急性期 AE の治療効果を検討した。

本研究の AE 誘導プロトコルが免疫不全マウスにも適用可能であることを確認した。また NOD/SCID マウスにおいても AE モデルマウスでサイトカインが活性化し、ミクログリアの形態学的活性化を確認できた。しかしながら、ICR マウスと比べ活性化が軽度であり、アストロサイトの活性化や clasmatodendrosis は確認できなかった。これは NOD/SCID マウスにおいては、免疫応答が生じにくいことが要因だと考えられる。Muse 群では AE 誘導処理 1 日後に体重増加が有意に改善した。AE 誘発投与 8 時間後の脳では、Muse 群、non-Muse 群ともに一過性の IL-10 発現が上昇したが Muse 群でのみ、IL-10 の高い発現が 24 時間維持された。そのため Muse 群では、AE 誘導処理後 1 日目から IL-10 の高発現が維持され、体重増加の改善につながったものと推察された。



本研究では Muse 細胞投与群で BBB の破壊の改善する効果と神経細胞死の有意な改善は見られなかった。原因として Muse 細胞の投与量と投与のタイミングという 2 つの要因があったと考えられる。Muse 細胞の投与は、脳梗塞、脊髄損傷、急性心筋梗塞など、単一臓器の疾患や傷害に対して有望な治療法であることが示されている。しかし、AE 患者では脳、肝臓、腎臓など複数の臓

器が障害されるため、AE 条件下では、投与された Muse 細胞は複数の臓器に遊走されと考えられ、脳に遊走した Muse 細胞数が少なかった可能性がある。したがって、より多くの Muse 細胞を投与することで、急性期の NOD/SCID-AE モデルの転帰が改善した可能性がある。

また本研究では、急性期と考えられる HT 処理後 2~4 時間に Muse 細胞を投与した。これまでの報告では、脳病変後 1-7 日の亜急性期に Muse 細胞を投与することで、病態の緩和に成功したことが示されている。さらに、大腸菌関連脳症のマウスモデルにおいて、大腸菌感染後 24 時間ではなく 48 時間に Muse 細胞を投与すると、障害された脳への Muse 細胞の遊走が増加することが示されている。したがって、Muse 細胞は生存率、サイトカインの制御を調整するための急性期投与と障害された組織の修復を目的とした亜急性期の二段階に投与することが、AE 管理に有効である可能性がある。

本研究ではヒト Muse 細胞移植が可能な NOD/SCID マウスを用いた AE マウスモデルを確立した。また、AE 急性期における Muse 細胞投与は、サイトカインを制御し生存率と体重増加の改善に寄与することが判明した。このことは、Muse 細胞が今後の小児 AE の根治的療法になる可能性を示している。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------