

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462097

研究課題名(和文) 大動脈瘤形成における分子機序解明とMuse細胞を用いた新たな治療戦略

研究課題名(英文) Efficacy and mechanism of Multilineage-differentiating Stress Enduring Cell transplantation in experimental abdominal aortic aneurysm

研究代表者

高橋 悟朗 (TAKAHASHI, GORO)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50526449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自発分化能を有するMuse細胞を用いて、マウス大動脈瘤モデルにおけるその治療効果を検討した。Muse細胞は市販ヒト骨髄間葉系幹細胞からフローサイトメトリーによりSSEA-3陽性細胞として単離し、経尾静脈的に計60,000細胞を投与した。瘤径拡大率はMuse群で有意に低値を示した。蛍光免疫染色ではMuse群においてGFP/CD31及びGFP/SMAの二重陽性細胞を認めた。EM染色ではMuse群において有意に弾性線維が保たれていた。Muse細胞は組織構成細胞である血管内皮細胞及び平滑筋細胞に自発分化し効率的な組織修復効果に寄与することで、有意な大動脈瘤治療効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cell therapies for aortic aneurysms (AAs) have advantages of non-invasiveness compared to surgical therapies. However previously reported cell therapies had only limited therapeutic effect. With the aim of evaluation the efficacy of multi-lineage differentiating stress enduring cells (Muse cells), which are a kind of pluripotent stem cells with unique features, abdominal aortic aneurysms were induced in mice models and assessed the AAs diameter after cell transplantation. Muse cells were collected from human bone marrow mesenchymal stem cells by FACS sorting with SSEA-3 staining. The mean diameters of AAs in Muse group were significantly smaller than other groups. The immunofluorescent assessment demonstrated that some smooth muscle cells and endothelial cells were derived from injected Muse cells. These data suggest that Muse cells can fix AAs by regenerating the damaged cell components of aortic wall.

研究分野：心臓血管外科分野

キーワード：大血管外科学 大動脈瘤 Muse細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は細胞外基質 (ECM; extra cellular matrix) の破壊や血管平滑筋細胞 (VSMC; vascular smooth muscle cell), 血管内皮細胞 (EC; endothelial cell) の脱落・減少の結果, 血管壁の構造的強度が失われることにより生じる。これまでに報告された間葉系幹細胞 (MSC; mesenchymal stem cell) や平滑筋前駆細胞を用いた細胞治療では, 抗炎症作用を主とした trophic 効果による大動脈瘤拡大予防効果が示されているが, VSMC や EC, ひいては ECM の再生が得られた報告はなく, 治療効果も限定的である。一方, Muse (Multilineage-differentiating stress enduring) 細胞は成人ヒト間葉系組織に存在する, 非腫瘍形成性の多能性幹細胞で, 3 胚葉性細胞への自発分化能を有し, 障害臓器ではその組織特異的な細胞への分化により修復効果を発揮する。

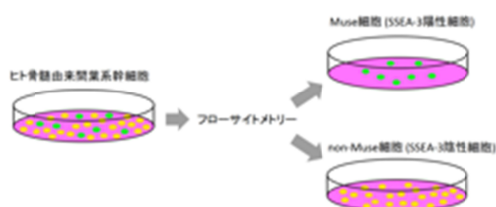
2. 研究の目的

本研究では, この高い自発分化能と組織修復能を有する Muse 細胞を用いて, マウス大動脈瘤モデルにおける拡大抑制効果を検討し, その奏功機序を解明することを目的とした。

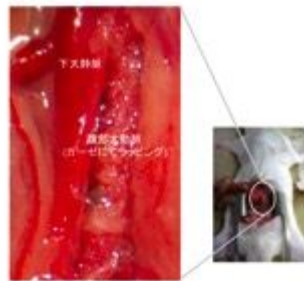
3. 研究の方法

8 週齢オス severe combined immunodeficient (SCID) マウスにおいて塩化カルシウム (0.5mol/L) 及びブタエラストラーゼ (0.5u/μL) を腹部大動脈周囲に塗布し大動脈瘤を作成した。Muse 細胞は, ヒト骨髓間葉系幹細胞にレンチウイルスを用いて Green Fluorescent Protein (GFP) を導入した後, フローサイトメトリーにより GFP 及び多能性幹細胞マーカーである Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) の二重陽性細胞を sorting し単離した。また Muse 細胞以外の MSC を non-Muse 細胞として単離した。大動脈瘤作成術後 3 日目, 10 日目, 17 日目に経尾静脈的に 20,000 細胞/回, 計 60,000 細胞を投与し, Muse 群, non-Muse 群, MSC 群, Vehicle 群 (PBS 投与) で比較検討した。術後 3 週間及び 8 週間でマウスを犠牲死させ, 腹部大動脈を摘出し評価した。また, 投与された Muse 細胞の遊走様式を明らかにする目的で, 細胞投与 3 日後及び 5 日後の大動脈瘤モデルマウスを犠牲死させ multiphoton レーザ顕微鏡を用いて観察した。

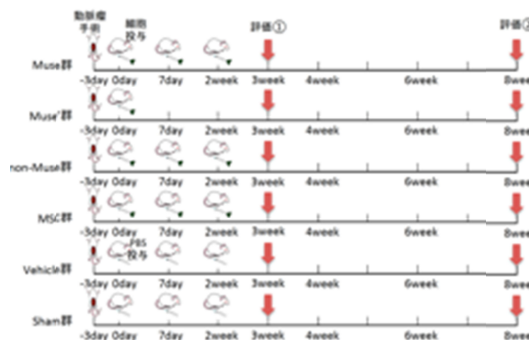
Muse細胞の分離



マウス大動脈瘤モデルの作成



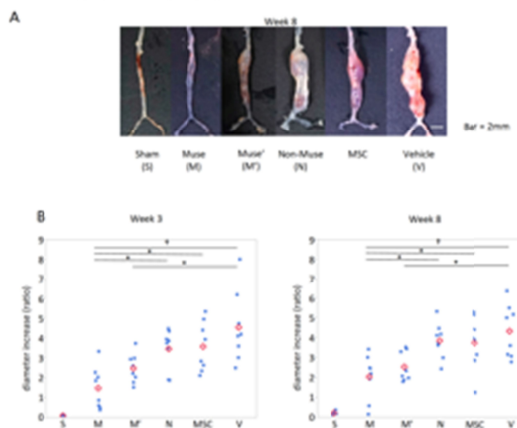
マウス大動脈瘤モデル細胞投与プロトコール



4. 研究成果

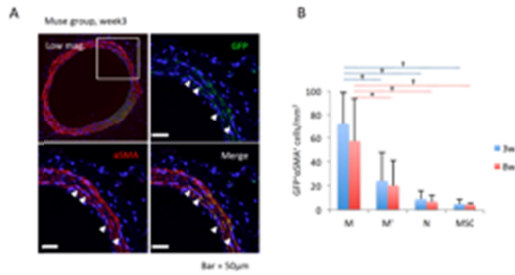
細胞移植実験において, 大動脈瘤径拡大率は 3 週・8 週ともに Muse 群で有意に低値を示した (術後 3 週 Muse 群  $1.5 \pm 1.0$  倍, non-Muse 群  $3.4 \pm 1.0$  倍, MSC 群  $3.6 \pm 1.2$  倍, Vehicle 群  $4.5 \pm 1.7$  倍; 術後 8 週 Muse 群  $1.9 \pm 1.1$  倍, non-Muse 群  $3.8 \pm 0.8$  倍, MSC 群  $3.7 \pm 0.7$  倍, Vehicle 群  $4.3 \pm 1.3$  倍)。

マウス大動脈瘤モデル移植実験

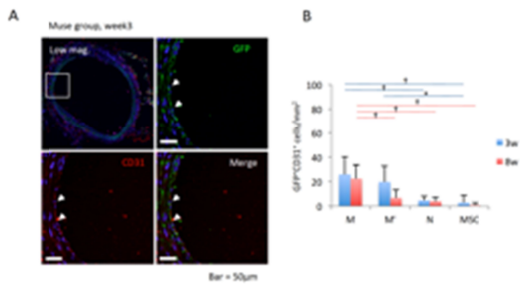


蛍光免疫染色では Muse 群において大動脈瘤壁内に GFP/ $\alpha$ SMA (SMC マーカー) 及び GFP/CD31 (EC マーカー) の二重陽性細胞を認めた一方, non-Muse 群や MSC 群では 2 重陽性細胞はどちらも僅かであった。Elastica-Masson 染色では, 術後 3 週の大動脈瘤組織において, 弾性線維は Muse 群で有意に保たれていた (弾性線維面積/大動脈断面積 Muse 群  $13.7 \pm 4.4\%$ , non-Muse 群  $6.4 \pm 1.5\%$ , MSC 群  $4.8 \pm 4.2\%$ , Vehicle 群  $5.2 \pm 2.1\%$ )。

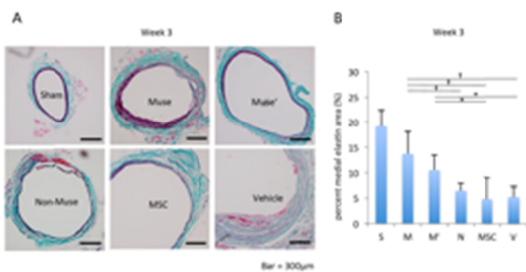
マウス大動脈瘤標本蛍光免疫染色 (αSMA・GFP)



マウス大動脈瘤標本蛍光免疫染色 (CD31・GFP)

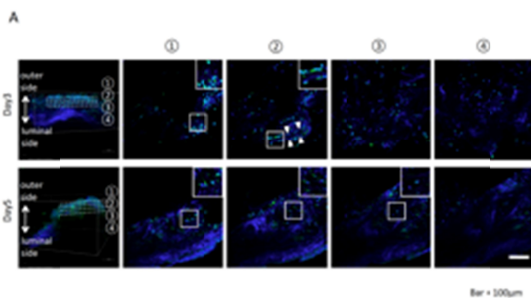


Elastica-Masson染色による弾性線維評価



Multiphoton レーザー顕微鏡による移植3日後及び5日後の大動脈瘤観察では、投与された Muse 細胞はその外膜側から大動脈瘤壁内へ侵入し、また一部は外膜内の管腔構造周囲に集積していることから、特に vasa vasorum をその経路としている可能性が示唆された。

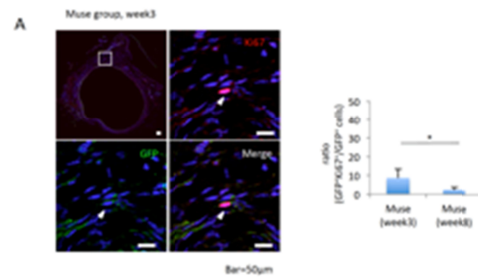
Muse細胞の大動脈瘤組織内遊走様式の検討



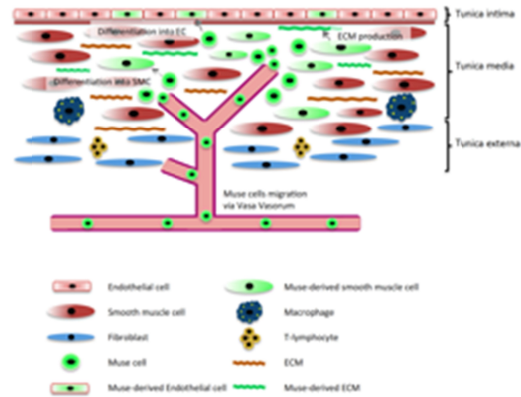
移植実験における組織評価では腫瘍形成は確認されず、Ki67 による免疫蛍光染色からは、投与後 8 週の時点で Muse 細胞は殆ど分裂能を喪失していることが示唆された。細胞移植 8 週後の体内分布評価では、Muse 細胞は肺と脾臓でわずかに検出されるものの、その他の臓器では検出されず、一方で腹部大動脈では多くが残存、生着している

ことが確認された。

投与後Muse細胞の分裂能及び生体内分布



マウス大動脈瘤モデルにおいて、Muse 細胞は静脈内投与によって自発的に大動脈瘤組織内へと遊走し、血管壁構成細胞である VSMC 及び EC に分化することで、弾性線維を中心とした ECM を再生・補充し、non-Muse 細胞や MSC と比べてより効率的な組織修復効果が示された。加えて、腫瘍形成性がなく、非標的臓器への遊走・生着も極めて少ないことなど、安全性の面からも Muse 細胞は大動脈瘤における細胞治療の有望な細胞源であることが示唆された。



## 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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

鷹谷 紘樹, 細山 勝寛, 齋木 佳克, 出澤 真理  
Muse 細胞静脈内投与は血管構成細胞再生によりマウス大動脈瘤拡大を抑制する. 第 16 回 日本再生医療学会(2017 年 3 月 8 日, 仙台, 仙台国際センター)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 悟朗 (Goro Takahashi)  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：50526449

### (2) 研究分担者

川本 俊輔 (Shunsuke Kawamoto)  
東北大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：20400244

安達 理 (Osamu Adachi)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：30375092

齋木 佳克 (Yoshikatsu Saiki)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50372298

齋藤 正寛 (Masahiro Saito)  
東北大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：40215562

### (3) 研究協力者

細山 勝寛 (Katsuhiko Hosoyama)  
東北大学・医学系研究科・大学院生