

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860844

研究課題名(和文) Muse細胞を用いた周産期脳障害の新規治療開発

研究課題名(英文) The development of new treatments for perinatal brain damage using Muse cells

研究代表者

鈴木 俊彦 (TOSHIHIKO, SUZUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60711083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：周産期低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルラットに対し、Muse細胞、Muse細胞を除外した間葉系幹細胞(non Muse細胞)または生食を投与し、各種臓器における生着確認と行動実験による治療評価を行った。Muse細胞投与群でのみ、投与4週後に受傷脳への生着を確認した。さらにMuse投与群ではnon Muse投与群や生食群と比較して、生後5か月の時点でも運動障害、学習障害、行動異常などについて改善効果を認めた。以上の結果から、Muse細胞は受傷脳に生着し、脳機能障害改善効果をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to reveal the therapeutic effects of Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells to hypoxic ischemic encephalopathy (HIE). To HIE model rats, Muse cells (Muse group), mesenchymal stem cells excluding Muse cells (non-Muse group) and saline (vehicle group) were administered intravenously. Then the confirmation of cell engraftment in various organs and behavioral experiments were performed. Muse cells were detected in injured brains even 4 weeks after intravenous administration, but non-Muse cells were not detected. Moreover compared with non-Muse group and vehicle group, Muse group were improved movement and learning impairments and behavior abnormalities even at five months old. It was suggested that Muse cells may be engrafted in the injured brain and have an effect of improving cerebral dysfunction.

研究分野：小児科

キーワード：再生医療 Muse細胞 新生児低酸素性虚血性脳症

1. 研究開始当初の背景

周産期低酸素性虚血性脳症 (hypoxic-ischemic encephalopathy; HIE) に対する有効な治療法は、現在のところ脳低温療法のみであり、しかも最重症例に対しては効果が期待できない。そのため、HIE に対する新規治療法の開発は周産期医療における急務の課題であり、その解決策の1つとして幹細胞治療が注目されている。Multilineage-differentiating stress enduring cells (Muse 細胞) は、間葉系幹細胞の数%を構成する、高い多能性を持つ細胞である。間葉系幹細胞の中で唯一、組織に生着し直接的に分化転換・組織修復に寄与できるとされ、既存の液性因子を中心とした細胞療法とは異なる治療アプローチが可能である。また、ヒト生体から直接得られる多能性幹細胞であり、腫瘍化の危険性が非常に低い。そのため受傷組織に生着し組織修復が見込める Muse 細胞を幹細胞治療の細胞源として用いることは、HIE に対する効果的な治療法となる可能性がある。

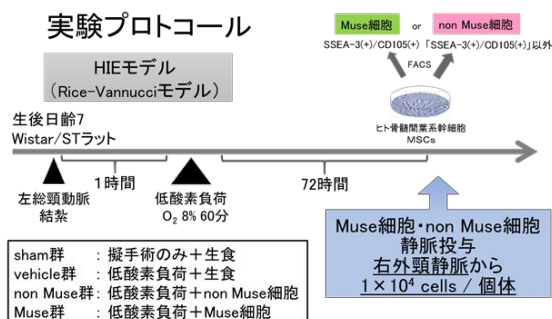
2. 研究の目的

本研究の目的は、Muse 細胞を周産期 HIE モデルラットに投与し組織学的、行動学的評価を行うことで、Muse 細胞の治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

(実験モデル動物作成と実験方法)

7日齢の Wistar 新生仔ラットにイソフルラン麻酔下で左総頸動脈を結紮し、1時間後から低酸素(約8%)曝露をインキュベーター内で60分間行った。低酸素曝露終了3日後(約72時間後)に、イソフルラン麻酔下でHIEモデルラットに対し、Muse細胞、Muse細胞以外の間葉系幹細胞(non Muse細胞) 1×10^4 個、または生食を、0.3mL/分の速度で右外頸静脈から投与した。各 HIE ラットを Muse 群、non Muse 群、vehicle 群の3群に分類し、偽手術のみ施行したラットを sham 群として、4群について各種検討を行った。



- ① 行動実験学的評価 : 生後1か月(亜急性期)、生後5か月(慢性期)
- ② 投与細胞の体内分布確認 : 投与後2週間、投与後4週間
- ③ 投与細胞の生着・分化確認 : 投与後2週間、投与後4週間、投与後6か月

なお、Muse 細胞は、GFP 遺伝子を導入したヒト骨髄由来間葉系幹細胞のうち、FACS で SSEA-3 と CD105 が共に陽性であった細胞とし、non Muse 細胞は Muse 細胞を分離した後の残りの細胞とした。

また、群の割付前に、2次元画像レーザー血流計または頭部 MRI により脳血流減少や梗塞巣の範囲を確認し、群間で重症度に差が出ないように割付をした。

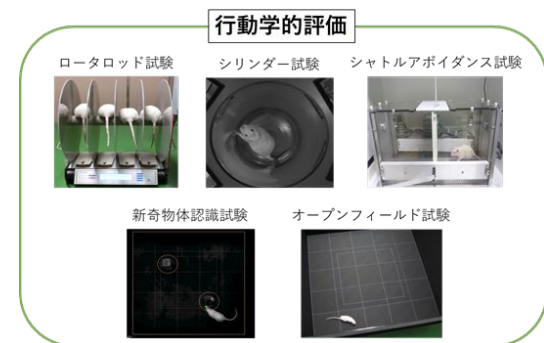
(Muse 細胞・non Muse 細胞の生着・分化、体内動態確認)

投与細胞の脳への生着・分化確認は、免疫組織学的染色によって行った。まず細胞投与10日後に脳切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織学的染色を行った。さらに細胞投与2週間後、4週間後、6か月後の時点で脳切片を作製し、GFP と神経分化に特異的なマーカー (NeuN または MAP-2) との二重染色を行い、投与細胞の生着・分化を確認した。

次に、各臓器における Muse 細胞、non Muse 細胞の体内分布確認を行った。まず細胞投与2週間後と4週間後に各種臓器(患側脳・健側脳・肝臓・脾臓・肺)を採取した。その後ヒトゲノムに特異的な Alu 配列の定量的PCRを行い、各臓器におけるヒト細胞を検出することで、投与後の体内分布を確認した。

(行動学的評価)

生後1か月(亜急性期)と5か月(慢性期)の時点で各種行動実験を施行し、治療効果の確認を行った。なお行動実験は、運動障害についてはロータロッド試験とシリンドー試験、学習障害についてはシャトルアボイダンス試験と新奇物体認識試験、行動異常(多動性)についてはオープンフィールド試験を行った。



・ロータロッド試験

実験前日に、装置に馴化させるため4rpmで5分間走行させた。試験当日は、5分間で4rpmから40rpmに加速するように回転させ、動物が落下するまでの時間(秒)を記録した(最長5分)。この操作を2回繰り返す(1回目と2回目の間は3時間以上空ける)2回の平均値を算出した。

なお、装置に乗せた際や、走行中に装置から飛び出す等、適切に評価できないと判断され

た個体は、試験データから外した。

・シリンダー試験

直径 20 cm、高さ 45 cm の円筒型シリンダーに動物を入れ、立ち上がって壁に前肢をつく際の肢（左、右又は両方）を記録した。記録は、円筒型シリンダーの背方に鏡を設置し、上方及び側方からのビデオ撮影によって行った。測定は 1 日 1 回 3 日間連続で行い、接触した前肢が左か、右か、両方をカウントして、（左前肢-右前肢）/（左前肢+右前肢+両前肢）を算出し、前肢使用非対称性を評価した。記録時間は 1 試行あたり 5 分間とした。ただし、5 分間で前肢の接触する回数が 10 回未満の場合は、さらに 5 分間記録し 10 回接触した時点のデータを集計に用いた。なお、合計 10 分間でも 10 回に満たない場合は、当該動物のデータは集計から除外した。

・シャトルアボイダンス試験

動物を 2 室に区切られたシャトルアボイダンス実験装置（Med Associate Inc. 製 MED-APA-DIM / MED-PC versionIV）に入れ、条件刺激（US、光とブザー音、最長 5 秒間）を与え、引き続き無条件刺激（UCS、電撃、最長 5 秒間）を与えた。US 中に別室に移動した場合は UCS 回避と判定し、別室に移動できず UCS を受けた場合は UCS 回避不能と判定した。これを 20 回繰り返し、UCS を回避できた割合を算出した。測定は連続 4 日間行った。

・新奇物体認識試験

獲得試行の前日に、動物を物体が入っていない観察箱〔100 cm (W) × 100 cm (D) × 45 cm (H)〕で 5 分間自由行動させた。獲得試行では、観察箱に同一の物体を 2 個置き、5 分間探索させた。獲得試行の 24 時間後にテスト試行を実施した。獲得試行で用いた同じ物体 1 つ（既知物体）と、獲得試行では用いなかった物体（新奇物体）を観察箱に置き、獲得試行と同様 5 分間探索させた。テスト試行における既知物体と新奇物体の各物体探索時間を記録し、探索指向指数{（新奇物体-既知物体）/（新奇物体+既知物体）}を算出した。

・オープンフィールド試験

観察箱〔100 cm (W) × 100 cm (D) × 45 cm (H)〕の中央に動物を置き、10 分間自由行動させ行動を記録した。行動は ANY-maze Video Tracking System を用いて解析した。移動距離、静止時間及び中央の区画（50 cm × 50 cm 四方）に滞在した時間を計測した。

4. 研究成果

(1) 生着・分化、体内動態確認

生後 20 日目に作製した脳切片において、抗 GFP 抗体陽性の細胞を認めた。この結果から、移植された Muse 細胞が、傷害を受けた脳組織に移行したことが確認された。

さらに、細胞投与 2 週間後、4 週間後、6 か月後に作製した脳切片において、いずれにおいても傷害側脳組織内に GFP と NeuN または MAP-2 の二重陽性細胞を認めた。この結果から、移植された Muse 細胞が傷害側脳内に生着し、さらに神経細胞に分化していることが確認された。

また Alu 配列の定量的 PCR による評価では、投与 2 週後の時点で、Muse 細胞を患側脳と肺において認め、non Muse 細胞は肺でのみ検出した。さらに投与 4 週後の時点では、Muse 細胞のみを患側脳で認め、non Muse 細胞はいずれの臓器でも検出されなかった。この結果から、Muse 細胞は障害を受けた脳組織に特異的に移行するが、non Muse 細胞は移行しないことが確認された。

(2) 行動学的評価

・ロータロッド試験

生後 1 か月、生後 5 か月での行動評価では、いずれにおいても Muse 群、non Muse 群、vehicle 群の 3 群間で有意差を認めなかった。

・シリンダー試験

生後 1 か月での行動評価では、vehicle 群と比較して Muse 群で前肢使用非対称性に改善を認め（ $p < 0.05$ ）、さらに生後 5 か月での行動評価では、non Muse 群、vehicle 群と比較して Muse 群で有意な改善効果を示した（ $p < 0.01$ ）。以上の結果から、Muse 細胞投与による運動障害の改善が示唆された。

・シャトルアボイダンス試験

生後 1 か月での行動評価では、Muse 群、non Muse 群、vehicle 群の 3 群間で明らかな差を認めなかった。しかし、生後 5 か月での行動評価では、3 日目、4 日目の回避率において、vehicle 群と比較して Muse 群で有意に改善効果を示した（ $p < 0.05$ ）。以上の結果から、Muse 細胞投与による長期における学習障害改善効果が示唆された。

・新奇物体認識試験

生後 1 か月の行動評価では、Muse 群は vehicle 群と比較して、探索指向性に改善を認めた（ $p < 0.01$ ）が、non Muse 群では Muse 群ほど著明な改善効果は認めなかった。この傾向は生後 5 か月の行動評価でも同様であった。以上の結果から、Muse 細胞は non Muse 細胞と比較して、HIE における学習障害を長期にわたって改善させる可能性が示唆された。

・オープンフィールド試験

生後 1 か月の行動評価では、Muse 群、non Muse 群、vehicle 群の 3 群間で明らかな差を認めなかったが、生後 5 か月の行動評価では non Muse 群、vehicle 群と比較して Muse 群で有意な改善効果を示した（ $p < 0.01$ ）。以上の結果から、Muse 細胞投与による長期におけ

る行動異常(多動性)改善効果が示唆された。

これらの結果から、HIE モデルラットに対し Muse 細胞を静脈内投与することで、Muse 細胞が長期間にわたって患側脳に生着し、運動障害、学習障害、行動異常など様々な脳機能障害の改善効果をもたらすことが示された。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

鈴木俊彦、佐藤義朗、上田一仁、片岡英里奈、北瀬悠磨、杉山裕一郎、立花貴史、見松はるか、松沢要、伊藤美春、齋藤明子、村松友佳子、早川昌弘. 新生児低酸素性虚血性脳症に対する Multilineage-differentiating stress enduring cells を用いた幹細胞療法. 第52回日本周産期・新生児医学会学術集会、2016年7月18日、富山県民会館(富山県富山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：多能性幹細胞による周産期脳障害の改善及び治療

発明者：佐藤義朗、鈴木俊彦、清水忍、水野正明、早川昌弘、出澤真理

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2016-098186

出願年月日：2016年5月16日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊彦 (TOSHIHIKO SUZUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60711083