

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20H03560  
研究課題名（和文）認知症に対するMuse細胞による革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Muse cell therapy for dementia

## 研究代表者

新妻 邦泰 (Niizuma, Kuniyasu)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：10643330

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本邦では高齢化と共に認知症患者が急増し、患者および家族の生活の質の低下や医療・介護費用などの点が社会的課題である。しかしながら、認知症に対する根本治療は未だ存在しない。Muse細胞は生体に存在する自然の多能性幹細胞であり、安全性と組織修復性を両立していると考えられる細胞であり、これを用いて認知症を治療できる可能性を着想した。ラットに両側頸動脈閉塞を負荷する血管性認知症モデルを用い、Muse細胞製品による治療効果を検証した。細胞治療群において海馬周辺への細胞生着と神経損傷軽減、認知機能の改善などが確認された。Muse細胞治療が社会的波及効果を有する、有望な認知症治療法となる可能性が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は過去に脳梗塞や脊髄損傷においてMuse細胞の治療効果を報告してきたが、今回、進行性の疾患である認知症に対する治療効果が示された。メカニズムとしては血管新生やアポトーシス抑制効果などが関与することが示唆されたが、更なる検証が必要である。Muse細胞治療により失われた認知機能を回復させることが出来れば、要介護者の減少、患者及び家族の生活の質の向上、医療費削減等、様々な領域に対する波及効果が得られると考えられ、社会的な意義は極めて大きいものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The number of dementia patients is rapidly increasing, and a decline in the quality of life of patients and their families, as well as the cost of medical care and nursing care, are social issues. However, there is still no fundamental treatment for dementia. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are non-tumorigenic endogenous pluripotent-like stem cells that are mobilized from the bone marrow to the peripheral blood and distribute to the connective tissue of organs. The purpose of this study was to utilize Muse cells for the treatment of vascular dementia. After inducing vascular dementia by bilateral common carotid artery occlusion, the clinical-grade human-Muse cell-based product was intravenously administered. In the cell therapy group, an improvement in cognitive impairment, which was attributed to the suppression of hippocampal and white matter damage. Muse cell therapy could be a promising treatment for dementia with a social ripple effect.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Muse細胞 幹細胞 認知症

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦では、高齢化と共に認知症患者が急増しており、2020年には300万人を超えるといわれている。要介護の大きな原因、かつ患者および家族の生活の質を下げ、医療費・介護費用も多大であり、大きな社会問題になっている。認知症には様々な分類が存在するが、2大要因はアルツハイマー病と脳血管性認知症である。以前は、両者は全く別の疾患と考えられてきたが、最近の研究では、両者には共通する病態が多く、関連性がある疾患と認識されるに至った (Neurology, 2009)。共通する背景病態は脳アミロイドの沈着である。アルツハイマー病ではアミロイドβタンパク生成の増強によりアミロイドβタンパクが沈着することが広く知られている。一方血管性認知症の場合は、アミロイドβタンパクの排出不全によりアミロイドの沈着を認める。脳アミロイドはリンパ系と細動脈が協調して排出されることが報告されているが (Acta Neuropathol, 2009)、脳血管障害により脳循環不全が生じると、このアミロイド排出機構が障害され、結果としてアミロイドβタンパクが蓄積するのである。アミロイドβタンパクの蓄積は、海馬および大脳白質に障害をもたらす、認知機能障害が生じてくる。げっ歯類の両側頸動脈を閉塞あるいは高度狭窄させることにより脳慢性低灌流を誘導すると、脳アミロイドの沈着に引き続き認知機能障害が生じ、近年はアルツハイマー病や血管性認知症のモデルとして用いられている。我々も最近安定した新規血管認知症モデルを開発し、発表した (Mansour A, Niizuma (研究代表者) K, Rashad S (研究分担者), Tominaga T (研究分担者), et al., J Neurosurg, 2018)。

研究レベルでは、脳血流を改善させ、アミロイドの排出を促進することにより、白質障害が一部改善し、認知症の病態にも一部可逆性の部分が存在することが示唆され、治療法としての確立が期待されているが、一般的に、ひとたび完成した認知症に対しては、有効な治療手段がなく、基本的には薬剤により進行をできる限り遅らせることしかできない。現状、有効な治療法がないため、近年は、認知症に対する新たなアプローチとして幹細胞治療が注目され始めている。

(2) Muse (multilineage-differentiating stress-enduring) 細胞は、骨髄から末梢血に動員され、あらゆる臓器の結合組織に分布し、様々な組織に分化する 新たな多能性幹細胞である (Proc Natl Acad Sci USA, 2010; Nat Protoc, 2013)。糖鎖である SSEA (stage specific embryonic antigen) -3 を表面抗原として、容易に分離回収可能である (Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 2011; Nat Protoc, 2013)。Muse 細胞は本来腫瘍形成の可能性が低い間葉系幹細胞中に存在しているため、当然 Muse 細胞自体も腫瘍形成の可能性が低い細胞であることが示唆されている (Proc Natl Acad Sci USA, 2011)。



図1 Muse細胞について

目的とする細胞への事前の分化誘導を必要とせず、局所で必要となる細胞種や血管に分化し、投与するだけで再生治療が可能になる点が注目し値する。細胞の準備自体にも遺伝子導入などが必要ないことと合わせて、高い安全性と多能性を有し、かつ細胞治療を身近なところまで近づける細胞ソースと考えられる (図1)。

(3) 本研究組織では、これまで主に脳梗塞に対する幹細胞治療の有用性につき、神経幹細胞を用いて報告してきた (Sakata H (研究分担者), Niizuma K (研究代表者), et al., J Neurosci, 2012; Sakata H (研究分担者), Niizuma K (研究代表者), et al., Stroke, 2012; Sakata H (研究分担者), Niizuma K (研究代表者), et al., Brain, 2012)。その後、Muse細胞を用いた細胞移植治療の研究に移行し、脳梗塞に対する Muse 細胞移植の治療効果を明らかにした (Uchida H, Niizuma K (研究代表者), Sakata H (研究分担者), et al., Stem Cells, 2016; Uchida H, Niizuma K (研

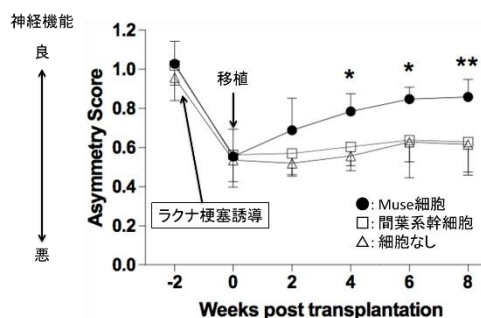


図2 脳梗塞に対する Muse 細胞の治療効果

究代表者), Tominaga T (研究分担者), et al., Stroke, 2017 (図 2)。

間葉系幹細胞の治療効果の主体は神経栄養因子などの液生因子によるものだが、Muse 細胞はそれにとどまらず、実際に組織を再生、置換することが判明した。従って、Muse 細胞により既存の細胞治療とは一線を画する、いわば個体に備わる組織修復能の大幅な enhanceとも表現可能な治療効果が期待できる。この脳梗塞に対する Muse 細胞移植に関しては、AMED の橋渡し研究加速ネットワークプログラムの支援を受けて臨床応用に向けて研究開発を進め、最終的には治験への導出に成功し、研究代表者を治験責任医師として、亜急性期脳梗塞に対する Muse 細胞含有製剤を用いた細胞治療の治験が進行中である。

(4) 前述のように認知症に対する治療としては、①根本的な治療手段がないこと、②ただし、一部可逆性を持つ白質障害に対しては、アミロイドの排出を促進することにより、認知機能回復の可能性もあること、がポイントとなる。Muse 細胞は、①組織修復能力が高く、脳梗塞ですら麻痺や知覚障害の回復といった機能回復をもたらすため、根本的な神経機能回復から認知症を改善させる可能性がある。また、②血管新生能があり、細血管障害を回復しうることから、アミロイド排出の促進により認知機能を改善させる可能性も考えられる。認知症を効率的に治療可能な特性を備えており、医学が進歩した今もなお未解決の課題となっている認知症の有力な治療になりうると着想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、認知症に対する Muse 細胞移植治療の有効性、安全性、及び作用メカニズムについて検討し、非臨床レベルで概念実証 (POC) を確立することである。

## 3. 研究の方法

図 3 に方法の概略を示す。認知症モデルとしては、両側総頸動脈閉塞(CCH)によるラット慢性脳虚血モデルを用いた。

### (1) Muse 細胞の認知症に対する有効性および治療メカニズム解析

認知症が完成すると考えられる、頸動脈閉塞後 6 週の段階で Muse 細胞製品 CL2020 を静注し(細胞数  $3 \times 10^5$  個)、以下を検証した。認知機能評価 (Barnes maze)、細胞生着評価、組織形態評価/白質評価 (Klüver-Barrera 染色)、Muse 細胞の分化評価 (NeuN など各種マーカー)、海馬におけるアポトーシス検出 (TUNEL, caspase3)、アミロイド  $\beta$  検出、血管新生評価 (CD31, 34) 等を用いた。

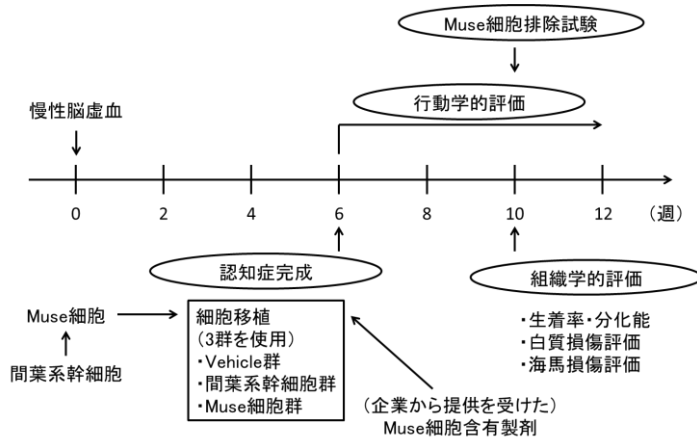


図 3 Muse 細胞移植工程

### (2) Muse 細胞の安全性試験:

認移植された Muse 細胞の異所性生着 (ヒト特異的配列 PCR) や長期観察後の造腫瘍能 (H&E 染色) を評価し、その安全性を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) CL2020 による認知機能の改善

CCH モデル作成 6 週間後に CL2020 を経静脈的に投与し、投与後 3 週から BCM を 4 日間 (1 日目馴致期、2-4 日目訓練期) 行い、認知機能の評価した。3 日間の訓練期において、逃避潜時は両者間で有意差を認めなかった (図 4 左)。探索戦略では訓練期 2 日目で CL2020 群が vehicle 群と比較して direct または serial の選択が多かった (図 4 右)。このことは、CL2020 群が効率的に逃避

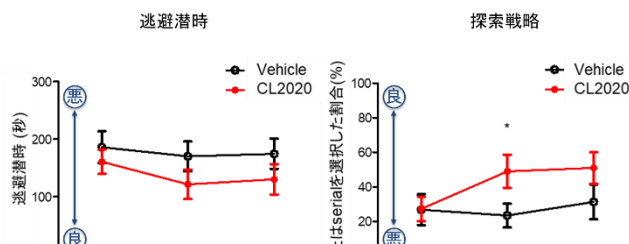


図 4 CL2020 による認知機能の改善

箱に到達する方法をより早く学習したということであり、CL2020 群において認知機能が改善した可能性がある。

### (2) CL2020 による海馬神経変性と白質損傷の改善

CCHモデル作成6週間後にCL2020を経静脈的に投与し、投与後4週の時点で脳切片を作製した。髄鞘染色を行い海馬の神経変性と白質の損傷の程度を検討した。海馬の各領域 (CA1, CA2-3, CA4) において、CL2020 群は vehicle 群と比較し形態学的に変性した神経細胞が少なく、神経病理スコアが有意に低かった (CA1, 60% vs. vehicle,  $p < 0.05$ ; CA2-3, 60% vs. vehicle,  $p < 0.05$ ; CA4, 67% vs. vehicle,  $p < 0.01$ ) (図5)。一方、海馬の歯状回 (DG) では、CL2020 群は vehicle 群と比較して形態学的変化は少なく、神経病理スコアも有意差はなかった (図5)。海馬におけるCA1、CA2-3、CA4、DG

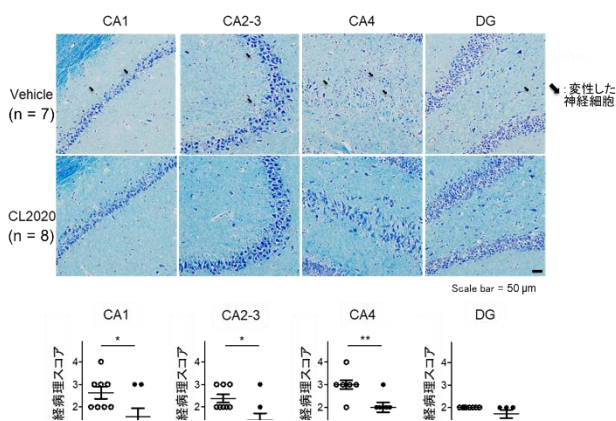


図5 CL2020 による海馬変性の改善

vehicle 群と比較し、神経病理スコアが有意に低かった (63% vs. vehicle,  $p < 0.05$ ; 図5)。また、脳梁において髄鞘の染色強度を比較すると、CL2020 群は vehicle 群と比較し、髄鞘の染色強度が有意に高く (222% vs. vehicle,  $p < 0.05$ )、白質の粗鬆化が抑制されたことが示唆された。

### (3) CL2020 の脳内での分布

CCHモデル作成6週間後にCL2020を経静脈的に投与し、投与後4週の時点で脳切片を作製した。ヒトミトコンドリアマーカーであるhMitを免疫染色しCL2020の生着を検討した。hMit陽性細胞が海馬周辺で検出されたが、生着細胞数20 LPFあたり0-2個であり、多くは認めなかった。

### (4) CL2020 による海馬における血管新生の促進

CCHモデル作成6週間後にCL2020を経静脈的に投与し、投与後4週の時点で脳切片を作製した。新生血管マーカーであるCD34を免疫染色しCL2020による血管新生の程度を検討した。海馬のCA1、CA2-3、CA4、DGにおいて、CL2020 群は vehicle 群と比較して有意にCD34を多く発現していた (CA1, 162% vs. vehicle,  $p < 0.01$ ; CA2-3, 154% vs. vehicle,  $p < 0.01$ ; CA4, 67% vs. vehicle,  $p < 0.05$ ; 162% vs. vehicle,  $p < 0.01$ )。海馬の各部位におけるCD34の発現も、CL2020 群は vehicle 群と比較し有意に多かった (140% vs. vehicle,  $p < 0.01$ ) (図6)。

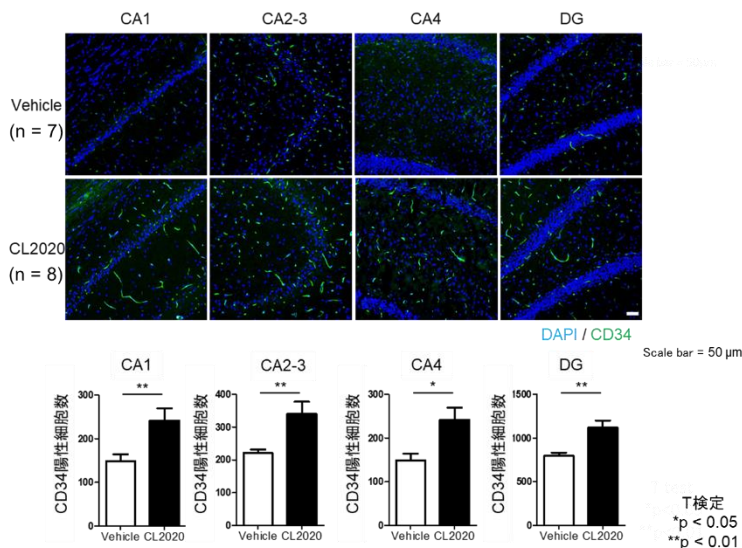


図6 CL2020 による海馬血管新生の促進

(5) CL2020 による海馬におけるアポトーシス細胞の減少

CCH モデル作成 6 週間後に CL2020 を経静脈的に投与し、投与後 4 週の時点で脳切片を作製した。TUNEL 染色を施行し CL2020 による抗アポトーシス作用を検討した。また、神経マーカーである NeuN も染色した。海馬の DG において、CL2020 群は vehicle 群と比較して TUNEL 陽性細胞が有意に多かったが、海馬の CA1、CA2-3、CA4 においては統計学的な有意差は示せなかった (CA1, 37% vs. vehicle; CA2-3, 50% vs. vehicle; CA4, 60% vs. vehicle; DG, 34% vs. vehicle,  $p < 0.05$ ) (図 7)。TUNEL 陽性細胞の多くは NeuN を発現していた。

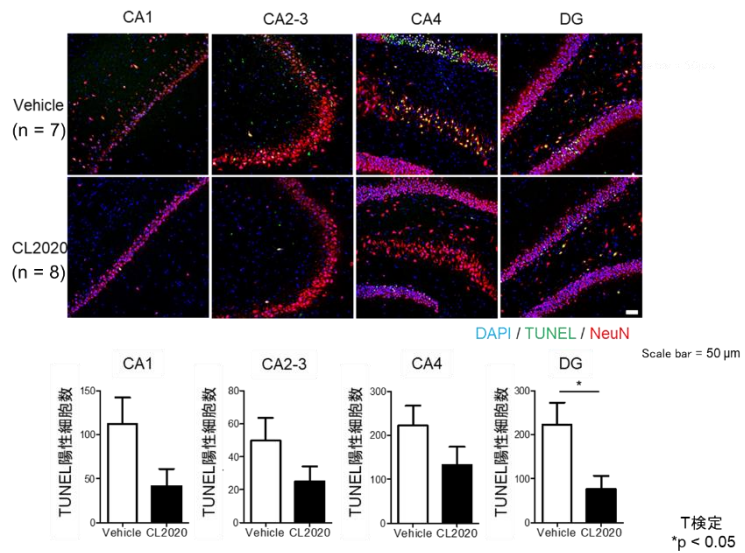


図 7 CL2020 による海馬アポトーシスの抑制

(6) CL2020 による海馬におけるアポトーシス関連蛋白質の変化

CCH モデル作成 6 週間後に CL2020 を経静脈的に投与し、投与後 4 週の時点で海馬を摘出した。海馬の全細胞の蛋白質を抽出し、アポトーシス促進蛋白質である Bid, Bim, 抗アポトーシス蛋白質である Bcl-2 と Bcl-xL の発現をウエスタンブロットで検討した。CL2020 群は vehicle 群と比較して、アポトーシス促進蛋白質である Bid と Bim の発現が有意に低下していた (Bid, 54% vs. vehicle,  $p < 0.05$ ; Bim 59% vs. vehicle,  $p < 0.05$ )。また、抗アポトーシス蛋白質である Bcl-2 と Bcl-xL の発現は有意に上昇していた (Bcl-2, 267% vs. vehicle,  $p < 0.001$ ; Bcl-xL, 349% vs. vehicle,  $p < 0.05$ ) (図 8)。

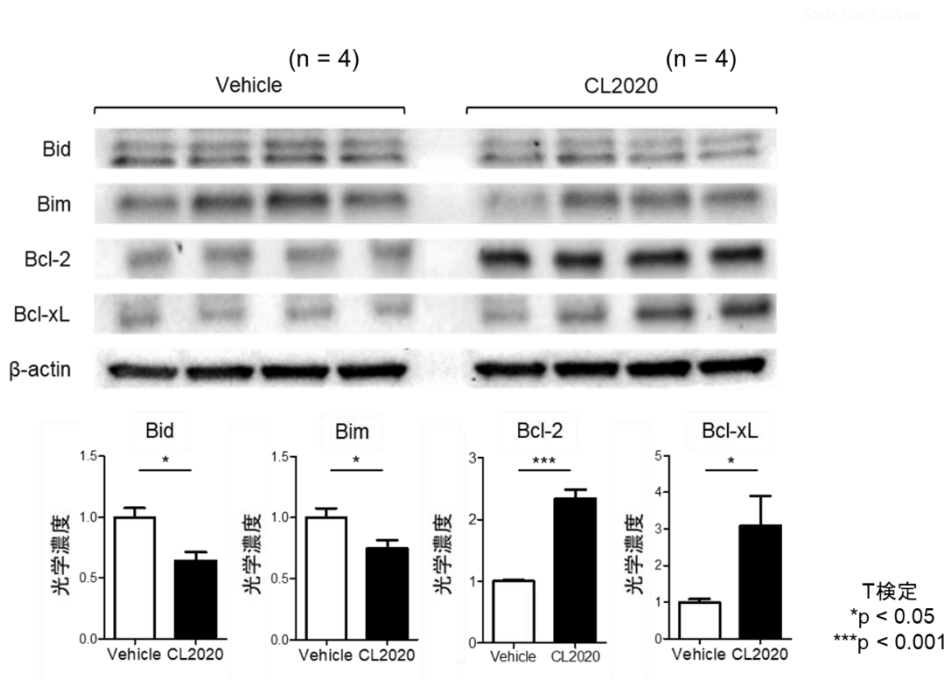


図 8 CL2020 による海馬アポトーシスの抑制

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

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 脳血管性認知症の治療または予防剤	発明者 新妻邦泰、富永悌二	権利者 国立大学法人東北大学、生命科学インスティ
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-539261	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 AGENT FOR TREATING OR PREVENTING CEREBROVASCULAR DEMENTIA	発明者 新妻邦泰、富永悌二	権利者 国立大学法人東北大学、生命科学インスティ
産業財産権の種類、番号 特許、WO-A1-2021/029346	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	富永 悌二  (Tominaga Teiji)  (00217548)	東北大学・大学病院・教授    (11301)	
研究分担者	Rashad Sherif  (Rashad Sherif)  (00824088)	東北大学・医工学研究科・准教授    (11301)	
研究分担者	坂田 洋之  (Hiroyuki Sakata)  (80722305)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師    (11301)	
研究分担者	伊藤 明  (Akira Ito)  (90867863)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師    (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
---------	---------