

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08960

研究課題名(和文) Muse細胞を用いたてんかん原性治療手法の確立

研究課題名(英文) Muse cell therapy for the cure of epileptogenesis

研究代表者

大沢 伸一郎 (Osawa, Shin-ichiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00813693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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する特徴ゆえに、細胞治療の有力なソースである。てんかんに対する細胞治療の報告は少なく、今回我々は脳内急性けいれんモデルにおける脳損傷に対しMuse細胞治療の可能性を検証した。Optogeneticsを用いた脳内光けいれんモデルで急性けいれんを誘発、けいれん誘発2日後にMuse細胞投与を行うと、3週間後の脳組織内にヒト由来の抗原を持つ細胞が確認され、Muse細胞が組織学的生着することが確認された。今後行動実験や生化学的評価により、てんかん原性改善効果の証明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Muse細胞は生体に存在する自然の多能性幹細胞であり、安全性の高い細胞治療の有力なソースである。てんかんは慢性疾患であり、細胞治療の報告は少ない。今回我々は脳内急性けいれんモデルにおける脳損傷に対しMuse細胞投与し、3週間後の脳組織内に同細胞が組織学的生着することが確認された。安全性が確立されている同細胞は今後行動実験や生化学的評価の追加により、てんかん原性改善効果の証明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Muse cells are naturally pluripotent stem cells that exist in living organisms, and are a promising source of cell therapy because of their characteristics of both safety and tissue repair. There are few reports of cell therapy for epilepsy, and this time we examined the possibility of Muse cell therapy for brain damage in acute seizure model. Photostimulation using optogenetics induces acute seizure in rodent hippocampus and then Muse cells are administered 2 days after the seizure. 3 weeks later we confirmed cells with human-derived antigens: Muse cells. In the future, behavioral experiments and biochemical evaluations are expected to prove the effect of improving epileptogenicity.

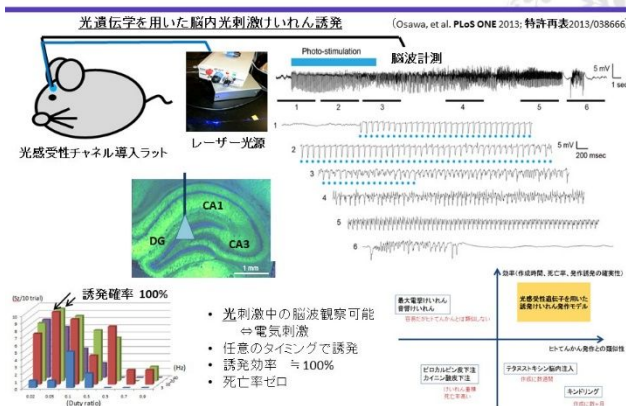
研究分野：てんかん外科

キーワード：てんかん Muse細胞 細胞治療 オプトジェネティクス 海馬 けいれん 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

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する特徴ゆえに、細胞治療の有力なソースとして注目されている。これまで我々は脳梗塞、脊髄損傷などの脳神経疾患モデルにおいて Muse 細胞が生着、分化し神経回路を再建することを示してきた<sup>1,2)</sup>。てんかんは良性疾患であり慢性に経過するため、一般的に遺伝子操作を必要とする治療のハードルは高く、再生医療の試みは未だ報告が少ない。しかし Muse 細胞は生成に遺伝子導入を必要とせず、その安全性はてんかん治療に対して有利と考えられる。一報で我々はてんかん治療法研究に最適なモデルを探索し、Optogenetics を用いた in vivo けいれんモデルを開発した(図1)<sup>3)</sup>。電気刺激を行う従来モデルに比べ、本モデルは脳内へ留置した光ファイバーにより、光刺激によってけいれん発作を誘発する。そのため電気的アーチファクトが全く存在せず、信号ノイズ比の極めて高い電気生理学的データを得ることができる。さらに発作誘発の再現性と死亡率の低さで大きな優位性があり、てんかん病態解明や治療法開発に有用と考えられる<sup>4)</sup>。Muse 細胞による局所修復・機能再建能力のてんかん原性改善効果を証明できれば、現状治療困難な薬剤抵抗性てんかんの新規治療法の道を拓くと期待される。

図1 脳内光誘発けいれん動物モデル



### 2. 研究の目的

脳内光誘発けいれんモデルによる脳損傷の定量的観察と、それを用いて Muse 細胞治療を行った際に組織損傷およびてんかん原性にどのような変化が起こりうるのか、さらに脳機能の改善が起こりうるかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

動物実験は東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の審査及び承認のもとに実施された。Long Evans をバックグラウンドとし、Thy1.2 プロモーター制御下で ChR2 と蛍光タンパク質 Venus との融合タンパク質である ChR2V を発現する Thy1.2 ChR2V-TG ラットのオスおよびメス (200-300g) を使用した。

#### (1) 光脳内けいれんモデルにおける組織学的検討

光脳内けいれん誘発モデルについて、Muse 細胞が生着可能か検討する。Thy1.2-ChR2-Venus トランスジェニックラットを用いた光脳内けいれん誘発(急性けいれん、光刺激: 背側海馬へ光ファイバー留置し、波長 420nm, 15mW, duty ratio 0.05, 10 Hz, 10 sec、5 分間隔で 20 回誘発)を行い、誘発 14 日後の脳組織評価を行い、背側海馬内 subdivision (歯状回、CA1、CA3) における細胞脱落程度を NeuN による神経細胞数変化の評価で行った(けいれん群、コントロール群それぞれ n=8)。

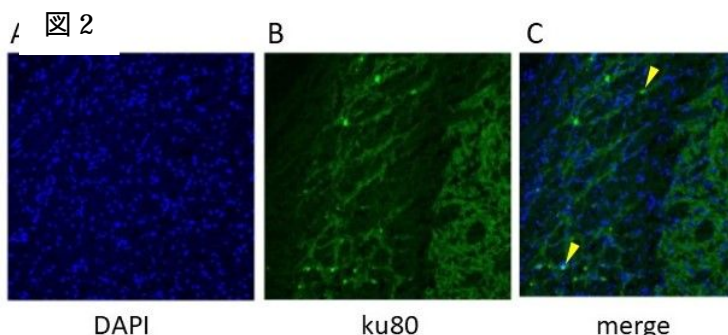
#### (2) けいれんモデルへの静脈内 Muse 細胞投与と生着確認

明らかな組織損傷が起こる 2 日目に Muse 細胞投与 (3.0x10<sup>6</sup> cells/body, tail vein より静注) を行い、投与 21 日後に組織学的評価を行った。ヒト由来 Muse 細胞は SSEA-3 をマーカーとして単離し、ヒト細胞核マーカーである ku80 をマーカーとして組織内での同定を行った(各群 n=3)。なおいずれの実験系も、コントロールは光刺激の光量エネルギー (W) を同量として発作誘発しない duty ratio 0.05, 1 Hz, 10 Hz, 10 sec で行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 光脳内けいれんモデルにおける組織学的検討

光脳内けいれん誘発後の組織学的評価では、海馬内歯状回の NeuN 陽性細胞による神経細胞カウントはけいれん群: コントロール群 = 201.0 ± 18.0 cells : 243.0 ± 15.0 cells (p = 0.011) と有意差があり、他の subdivision では CA1 でけいれん群: コントロール群 = 136.5 ± 8.5 cells : 141.0 ± 9.0



cells ( $p=0.344$ )、CA3 で  $170.5 \pm 10.5$  cells :  $175.0 \pm 7.0$  cells ( $p=0.301$ )と有意差はなかった。

(2) けいれんモデルへの静脈内 Muse 細胞投与と生着確認

けいれんを起こした後の Muse 細胞投与では、3 例中 2 例で ku80 陽性細胞の生着を認めた(図 2)。

コントロール群では ku80 陽性細胞の生着は認められなかった。

これはてんかんに対する細胞治療の分野において、遺伝子導入を必要としないヒト由来幹細胞による治療方法が確認されたことを意味する。本細胞は良性疾患であるが故の倫理的ハードルを乗り越えやすいと考えられる<sup>1,2)</sup>。一方、本実験では細胞分化の種類や程度、生化学的な移植細胞の機能、症状への効果は未だ確認できていない。今後行動実験、生化学的評価により、今後細胞治療の可能性が拡がることが期待される。また Muse 細胞は組織内損傷部位へ遊走する性質を持っているため、今後損傷の時期に合わせ細胞生着部位を詳細に検討することで、新たな治療ターゲット及び至適な投与タイミングを検討したい。

#### 参考文献

1. Uchida H, Niizuma K, Kushida Y, Wakao S, Tominaga T, Borlongan CV et al. Human Muse Cells Reconstruct Neuronal Circuitry in Subacute Lacunar Stroke Model. *Stroke* 2017;48(2):428-435.
2. Uchida H, Morita T, Niizuma K, Kushida Y, Kuroda Y, Wakao S et al. Transplantation of Unique Subpopulation of Fibroblasts, Muse Cells, Ameliorates Experimental Stroke Possibly via Robust Neuronal Differentiation. *Stem Cells* 2016; 34(1) : 160-73.
3. Osawa S, Iwasaki M, Hosaka R, Matsuzaka Y, Tomita H, Ishizuka T et al. Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network dynamics. *PLoS One* 2013; 8(4):e60928.
4. Osawa S, Tominaga T. Optogenetics in Epilepsy research. *Optogenetics (Advances in Experimental Medicine and Biology)*. (39) (2020 in press)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大沢伸一郎 新妻邦泰 富永悌二	4. 巻 46
2. 論文標題 Muse細胞を用いたてんかん原性治療手法の確立	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 56-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大沢伸一郎 富永悌二	4. 巻 30
2. 論文標題 Optogeneticsとてんかん	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epilepsy	6. 最初と最後の頁 未発行
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大沢伸一郎 遠藤英徳 川村強 富永悌二	4. 巻 46
2. 論文標題 脳内出血急性期の血腫吸収過程に対する桂枝茯苓丸の効果および安全性：CT画像を用いた検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 763 - 770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1436203810.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大沢伸一郎	4. 巻 34
2. 論文標題 くも膜下出血の合併症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ブレインナーシング	6. 最初と最後の頁 31 - 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 梅垣翔 大沢伸一郎 木村健介 奥島敏美 川村強 富永悌二	4. 巻 46
2. 論文標題 症候性静脈洞還流障害をきたした肥厚性硬膜炎の一例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 147 - 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436203691.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大沢伸一郎 富永悌二	4. 巻 76
2. 論文標題 成人てんかんの外科治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 987-993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大沢伸一郎 岩崎真樹 高山裕太郎 神一敬 中里信和 富永悌二	4. 巻 27
2. 論文標題 過運動発作を呈した前頭葉てんかんに対する外科治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脳神経外科ジャーナル	6. 最初と最後の頁 764-772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Osawa S, Tominaga T	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 657
3. 書名 Optogenetics Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond	

〔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	中川 敦寛 (Nakagawa Atsuhiro)  (10447162)	東北大学・大学病院・特任教授  (11301)	
研究分担者	新妻 邦泰 (Niizuma Kuniyasu)  (10643330)	東北大学・医工学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	西嶌 泰生 (Nishijima Yasuo)  (90816307)	東北大学・大学病院・助教  (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