

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293305

研究課題名(和文) 新しい多能性幹細胞(Muse細胞)を用いた脳梗塞の再生治療の戦略的研究

研究課題名(英文) Basic and Clinical Aspects of MUSE Cells in Stroke Care

研究代表者

黒田 敏 (KURODA, Satoshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：10301904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間質細胞とnon-Muse細胞を移植した各群の運動機能の回復は移植後21日目に明らかとなったが、その後安定期に達した。Muse細胞を移植したグループでは、機能的な回復は移植28日後には観察されなかったが、35日後に明らかとなった。組織学的評価では、唯一Muse細胞は梗塞脳に生着し、神経細胞に分化した。本研究では、Muse細胞が虚血性脳卒中患者における末梢血中に骨髄から動員されるという仮説を証明することを目的とした。虚血性脳卒中患者29人について定量的解析をした結果、Muse細胞の数は発症後24時間以内に増加し、喫煙とアルコール摂取量がMuse細胞の増加に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Motor function recovery in BMSC and non-Muse groups became apparent at 21 days after transplantation, but reached the plateau thereafter. In Muse group, functional recovery was not observed for up to 28 days post-transplantation, but became apparent at 35 days post-transplantation. On immunohistochemistry, only Muse cells were integrated into peri-infarct cortex and differentiate into neurons, while negligible number of BMSCs and non-Muse cells remained in the peri-infarct area at 42 days post-transplantation.

This study was aimed to prove the hypothesis that Muse cells are mobilized from bone marrow into peripheral blood in patients with ischemic stroke. This study included 29 patients with ischemic stroke. The number of Muse cells robustly increased within 24 hours after the onset, compared with the controls. Multivariate analysis revealed that smoking and alcohol intake significantly affect the increase in circulating Muse cells.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経再生 脳梗塞 Muse細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中はわが国の主要疾病の一つであり、なかでも最も高頻度の脳梗塞は、その後遺症のために多くの国民の日常生活に重大な支障を及ぼすとともに国民医療費の増加に拍車をかけている。一方、幹細胞を利用した再生医療は、脳梗塞による後遺症を改善させる新たな治療法として期待されている。なかでも、骨髄間質細胞は、患者自身の骨髄から採取・培養が可能で、ES細胞やiPS細胞などに比べると生命倫理や免疫反応、腫瘍形成などの問題がない点も臨床応用を考える上で有利である。

申請者らは骨髄や皮膚の細胞の中にさまざまな細胞に分化する能力を有する多能性幹細胞を発見し、「Muse (ミューズ) 細胞」と命名した。この細胞は遺伝子操作などのプロセスを経ることなく神経細胞への分化が可能で、従来の細胞よりもさらに安全かつ効率的な再生医療を実現できる可能性が高いと考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、新たに発見された多能性幹細胞「Muse 細胞」を用いた脳梗塞に対する再生医療の前臨床試験および臨床試験を主眼とし、人体に備わった自己修復機能に「Muse 細胞」がどのような役割を果たしているかを明らかにすることで、将来的には、自己修復機能を強化するための創薬や、「Muse 細胞」を用いた細胞治療の開発に発展させることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス脳梗塞モデルの作成

全身麻酔下にヌードマウスの右側頭部に小開頭を作成し、右中大脳動脈を露出した。右中大脳動脈の本幹を電気凝固、切断することで脳梗塞を作成した。経時的に rotarod を用いて運動機能の変化を、八方向迷路システムを用いて高次脳機能の変化を定量的に解析した。TTC 染色や HE 染色を用いて脳梗塞の分布や容積を定量的に解析した。

### (2) マウス脳梗塞モデルに対する「Muse 細胞」の移植

ボランティアの骨髄液から遠心分離にて単核球分画を採取したのち、フローサイトメトリーを用いて SSEA-1 陽性細胞、すなわち「Muse 細胞」を単離、培養した。上記の脳梗塞モデルを作成した 1 週間後に、培養した「Muse 細胞」を定位的にヌードマウス脳梗塞モデルの同側線条体に移植した。経時的に運動機能、高次脳機能を定量的に測定して、「Muse 細胞」の脳梗塞に対する治療効果を検証した。約 1 ヶ月後に二重蛍光免疫染色を実施して「Muse 細胞」の生着や神経系細胞への分化などを詳細に検討した。同様に、「Muse 細胞」を含む全骨髄間質細胞や、骨髄間質細胞から「Muse 細胞」を取り除いた「non-Muse 細胞」を上記の手法を用いてヌードマウス脳

梗塞モデルに移植した。各群における運動機能、高次脳機能を経時的に定量解析し、6 週間後に組織学的評価を実施した。

(3) ヒト骨髄における「Muse 細胞」の分布  
剖検から得られた骨髄の標本をサンプルとして、「Muse 細胞」に特異的な細胞表面マーカーである SSEA-1 に対するモノクローナル抗体を用いて蛍光免疫染色を実施し、各年齢層における骨髄中「Muse 細胞」の分布や数を明らかとした。

(4) 健常人の末梢血中「Muse 細胞」の定量解析

20~60 歳代の健常ボランティアから末梢血 10 mL をサンプリングし、遠心分離により末梢血中の単核球分画を採取した。フローサイトメトリーを用いて SSEA-1 陽性細胞、すなわち「Muse 細胞」を単離してその数を定量測定し、健常状態ではヒト骨髄から末梢血中にどのくらいの「Muse 細胞」が常に動員されているのか、また年齢による差異の有無について検証した。

(5) 健常人の末梢血中「Muse 細胞」の生物学的特性

健常ボランティアの末梢血から得られた「Muse 細胞」に fibroblast growth factor (FGF)-2, retinoic acid (RA), DMSO を添加することで、神経系細胞や血管内皮細胞へ分化させることができるかどうかを試みた。この実験を通して「Muse 細胞」の体内における分化能を in vitro において検証した。

(6) 脳梗塞急性期における「Muse 細胞」の動態解析

脳梗塞 (ラクナ梗塞、アテローム血栓性脳梗塞、心原性脳塞栓) を発症した患者から発症 1、3、7、30 日後に経時的に末梢血 10 mL をサンプリングし、(4) と同様に遠心分離およびフローサイトメトリーを用いて、末梢血中の「Muse 細胞」数を定量的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト骨髄から単離した「Muse 細胞」を、ヌードマウス脳梗塞モデルの脳に移植した。「Muse 細胞」を含む骨髄間質細胞や「non-Muse 細胞」を同様にヌードマウス脳梗塞モデルに移植した。各群におけるヌードマウスの運動機能、高次脳機能を経時的に定量解析した結果、「Muse 細胞」のみが梗塞脳に生着、神経細胞に分化するとともに運動機能や高次脳機能の改善を促進していることが判明した。

(2) 各年齢群の健常ボランティアからサンプリングした末梢血から「Muse 細胞」の数を測定した結果、年齢による差異は認められなかった。

(3) 剖検から得られた骨髄の標本を用いて骨髄中における Muse 細胞の分布などについて組織学的評価を実施し、その結果年齢とともに Muse 細胞が減少すること、生前に化学療法を実施された例では Muse 細胞が極めて少ないことが判明した。

(4) 脳梗塞を発症した急性期患者 29 例から発症直後、1 週間後、1 ヶ月後にサンプリングした末梢血から「Muse 細胞」数を定量的に解析した結果、発症から 1~4 週間後にかけて末梢血中の Muse 細胞数は増加すること、その増加を喫煙が抑制し、飲酒では促進されることが明らかとなった。

#### 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 21 件)

Hori E, Hayakawa Y, Hayashi T, Hori S, Okamoto S, Shibata T, Kubo M, Horie Y, Sasahara M, Kuroda S: Mobilization of pluripotent multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells in ischemic stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis, 査読有, (*in press*), doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.12.033

Kuroda S: Current opinion of bone marrow stromal cell transplantation for ischemic stroke. Neurol Med Chir (Tokyo), 査読有, 2016 March 15 [Epub ahead of print], doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0349

Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, Shichinohe H, Houkin K, Dezawa M, Kuroda S: Therapeutic effects of human multilineage-differentiating stress enduring (MUSE) cell transplantation into infarct brain of mice. PLoS One, 査読有, 10:e0116009, 2015, doi:10.1371/journal.pone.0116009

Shichinohe H, Ishihara T, Takahashi K, Tanaka Y, Miyamoto M, Yamauchi T, Saito H, Takemoto H, Houkin K, Kuroda S: Bone marrow stromal cells rescue ischemic brain by trophic effects and phenotypic change toward neural cells. Neurorehab Neural Repair, 査読有, 29:80-89, 2015, doi: 10.1177/1545968314525856.

Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuroda S: Application of cell sheet technology to bone marrow stromal cell transplantation for rat infarct brain. J Tissue Engineer Regen Med, 査読有, 2014 Jun 12 [Epub ahead of print], doi: 10.1002/term.1920.

Yamauchi T, Saito H, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuroda S: Platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor serve safe and accelerated expansion of human bone marrow stromal cells for stroke therapy. Transl Stroke Res, 査読有, 5:701-710, 2014, doi: 10.1007/s12975-014-0360-z.

Shichinohe H, Yamauchi T, Saito H, Houkin K, Kuroda S: Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of

motor function after lacunar stroke in rats. Acta Neurobiol Exp, 査読有, 73:354-363, 2013, <http://www.ane.pl/archive.php?vol=73&no=3&id=7325>

Kuroda S, Houkin K: Translational challenge for bone marrow stroma cell therapy after stroke. Front Neurol Neurosci, 査読有, 32:62-68, 2013, doi: 10.1159/000346414.

Kuroda S: Bone marrow stromal cell transplantation for ischemic stroke - Its poly-functional feature. Acta Neurobiol Exp, 査読有, 73:57-65, 2013, <http://www.ane.pl/archive.php?vol=73&no=1&id=7304>

Miyamoto M, Kuroda S, Zhao S, Magota K, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N: Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarct in rats - A serial [18]F-FDG PET study. J Nucl Med, 査読有, 54:145-150, 2013, doi: 10.2967/jnumed.112.109017.

[学会発表](計 12 件)

Kuroda S: Management of incidental imaging findings, 83rd American Association of Neurological Surgeons Annual Scientific Meeting, 2015.5.2-6, Washington(USA)

Kuroda S: Diagnosis and treatment of moyamoya syndrome, 4th International Moyamoya Meeting, 2015.7.2-4, Berlin(Germany)

堀恵美子、早川由美子、林 智秀、堀 聡、岡本宗司、柴田 孝、久保道也、堀江幸男、黒田康勝、出澤真理、黒田 敏: 急性期脳梗塞患者における末梢血中多能性幹細胞 (MUSE 細胞) の動態解析、日本脳神経外科学会第 73 回学術総会、2014.10.9-11、グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

黒田 敏: 脳梗塞をターゲットとした自己骨髄間質細胞の定位移植治療、第 26 回日本脳循環代謝学会総会、2014.11.21-22、岡山コンベンションセンター (岡山)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: Mobilization of pluripotent multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells in ischemic stroke  
発明者: Kuroda S.

権利者: 同上

種類: 特許

番号: -

出願年月日: 2016 年 1 月 15 日

国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 敏 (KURODA, Satoshi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授  
研究者番号：10301904

### (2) 研究分担者

桑山 直也 (KUWAYAMA, Naoya)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
准教授  
研究者番号：30178157

早川 由美子 (HAYAKAWA, Yumiko)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教務補佐員  
研究者番号：30238092

出沢 真理 (DEZAWA, Mari)  
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号：30178157

柏崎 大奈 (KASHIWAZAKI, Daina)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教  
研究者番号：50374484

秋岡 直樹 (AKIOKA, Naoki)  
富山大学・大学病院・助教  
研究者番号：70422631