

平成 29 年 5 月 15 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：26462150

研究課題名(和文) もやもや病における多能性幹細胞MUSE細胞を用いた血管新生療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the stem cell transplantation therapy by MUSE for moyamoya disease

研究代表者

藤村 幹 (Miki, Fujimura)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00361098

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)：もやもや病に対する間接血行再建術における多能性幹細胞MUSE細胞を用いた血管新生促進の概念実証を目的に検討を行った。げっ歯類に対して慢性脳虚血誘導を行いもやもや病に類似した病態を作成した。そして間接血行再建術を施し、側頭筋から虚血脳に向かう血管新生と血管新生因子発現を確認した。さらに疾患感受性遺伝子RNF213変異マウスを用いたもやもや病の病態解明を行った。慢性脳虚血と間接血行再建術モデルを用いて血管新生が再現性をもって誘導可能となった。MUSE細胞については培養ヒト間葉系幹細胞に対して、SSEA-3/CD105抗体を用いたMACSによる分離を行い効率良いMUSE細胞の分離方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to establish stem cell transplantation therapy using pluripotent MUSE cells for the patients with moyamoya disease. Mice and rats were subjected to chronic cerebral ischemia and then underwent indirect pial synangiosis, in a consistent situation of indirect bypass for moyamoya disease. Two-staged carotid artery occlusion reproducibly provided chronic hypoperfusion and the development of pial synangiosis by our methods. To obtain more similar condition to moyamoya disease, we alternatively generated genetically-engineered mice of RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease. Spontaneous development of moyamoya disease was not evident in these mice, while RNF213-deficient mice demonstrated decreased ratio of regulatory T cells after immunologic adjuvant administration. Regarding MUSE cell preparation, using MUSE cells were successfully sorted by anti- SSEA-3/CD105 antibodies from cultured mesenchymal stromal cells.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：moyamoya disease

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は両側内頸動脈終末部と周囲の動脈が進行性に狭窄・閉塞し、付近に異常血管網の発達を認める原因不明の疾患である。治療法としては浅側頭動脈・中大脳動脈吻合術(直接血行再建術)や側頭筋/硬膜からの血管新生を期待した pial synangiosis (間接血行再建術)が確立されているが、予後不良群である重症脳梗塞発症小児例や重症型出血例に対しては現行の術式では外科的治療介入そのものも困難なのが実情である。間接血行再建術からの血管新生を確実に誘導する手法の開発によりもやもや病の治療成績の飛躍的な向上が期待できる。

中枢神経疾患に対する新規治療法として幹細胞移植治療が注目され、パーキンソン病、脳梗塞を始め様々の中枢神経疾患において臨床応用がなされ、実験的脳虚血においては幹細胞移植による血管新生療法の有効性が報告されている。Muse 細胞は間葉系幹細胞内に存在する多能性幹細胞の一集団であり、連携研究者である Dezawa M らが世界に先駆けて発見した (Dezawa M et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2010)。MUSE 細胞は、iPS 細胞のように人工的な遺伝子導入を行う必要がなく、腫瘍化の危険性が低いという利点を持つ。さらに、MUSE 細胞は、神経系細胞や血管内皮細胞への分化能を有するのみならず、移植した臓器の血管新生を促進することが明らかになってきている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、もやもや病に対する Muse 細胞を導入した間接血行再建術の有効性及び安全性について組織学的、分子生物学的に動物実験で検証し、非臨床レベルで「もやもや病における Muse 細胞の血管新生促進」の概念実証を確立することである。

3. 研究の方法

もやもや病に類似した両側内頸動脈領域の慢性脳虚血モデルの確立を目指し、マウス/ラットに対する片側総頸動脈閉塞と二期的対側内頸動脈閉塞を施行し脳血流、慢性期脳組織切片の検証を行った。本モデルに間接血行再建術を追加施行し、脳表に接着させた側頭筋から虚血脳に向かう血管新生の有無を検証した。さらに免疫組織染色、Western blot 法による側頭筋ならびに虚血脳における血管新生因子の誘導の有無を検証した。もやもや病に、より近い病態下での実験系確率を目的に行う目的で疾患感受性遺伝子 RNF213 欠損マウス (RNF213 KO) ならびに RNF213 ノックインマウス (RNF213 KI) を作成した。MUSE 細胞については培養したヒト間葉系幹細胞に対して、SSEA-3/CD105 抗体を用いた MACS による分離を試みた。

4. 研究成果

マウス/ラットに対する片側総頸動脈閉塞と二期的対側内頸動脈閉塞による慢性脳虚血モデルを確立し、間接血行再建術による側頭筋から虚血脳に向かう血管新生を確認した。免疫組織染色、Western blot 法では側頭筋ならびに虚血脳における血管新生因子の誘導を認めた。RNF213 KO, RNF213 KI においては 64 週齢まで高感度 MRA にて頭蓋内血管に変化を認めず異常血管網などもやもや病に特徴的な所見を認めなかったが、免疫負荷を行った RNF213 KO で制御型 T 細胞の誘導抑制が明らかとなり免疫寛容の破綻が示唆された。以上より慢性脳虚血と間接血行再建術モデルを用いて血管新生が再現性をもって誘導可能であり、血管新生因子の誘導を伴うことが確認された。MUSE 細胞については培養したヒト間葉系幹細胞に対して、SSEA-3/CD105 抗体を用いた MACS による分離を行い効率良い MUSE 細胞の分離方法を確立した。現在は MUSE 細胞を用いたもやもや病を模擬した動物モデルにおける血管新

生促進の検証を推進している。

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 19 件)

- (1) Tashiro R, Fujimura M, Niizuma K, Endo H, Sakata H, Sato-Maeda M, Tominaga T. De novo development of moyamoya disease in an adult female with a genetic variant of the RNF-213 gene: case report. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.** 2017;26:e8-e11. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.035. 【査読あり】
- (2) Kanoke A, Fujimura M, Niizuma K, Fujimura T, Kakizaki A, Ito A, Sakata H, Sato-Maeda M, Kure S, Tominaga T. Temporal profile of magnetic resonance angiography and decreased ratio of regulatory T cells after immunological adjuvant administration to mice lacking RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease. **Brain Res.** 2016; 1642:1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2016.03.009. 【査読あり】
- (3) Rashad S, Fujimura M, Niizuma K, Endo H, Tominaga T. Long-term follow-up of pediatric Moyamoya disease treated by combined direct-indirect revascularization surgery: Single institute experience with surgical and perioperative management. **Neurosurg. Rev.** 2016;39: 615-623. doi: 10.1007/s10143-016-0734-7. 【査読あり】
- (4) Sato-Maeda M, Fujimura M, Kanoke A, Morita-Fujimura Y, Niizuma K, Tominaga T. Transient middle cerebral artery occlusion in mice induces neuronal expression of RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease. **Brain Res.** 2016;1630:50-55. doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.055. 【査読あり】
- (5) Bang OY, Fujimura M, Kim SK. The pathophysiology of moyamoya disease: an update. **J. Stroke** 2016;18:12-20. doi: 10.5853/jos.2015.01760. 【査読あり】
- (6) Abe T, Fujimura M, Mugikura S, Endo H, Tominaga T. Brain stem infarction due to basilar artery dissection in a patient with moyamoya disease four years after successful bilateral revascularization surgeries. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.** 2016;25:e76-82. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.024. 【査読あり】
- (7) Uchida H, Sakata H, Fujimura M, Niizuma K, Kushida Y, Dezawa M, Tominaga T. Experimental model of small subcortical infarcts in mice with long-lasting functional disabilities. **Brain Res.** 2015;1629:318-328. doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.039. 【査読あり】
- (8) Fujimura M, Tominaga T. Current status of revascularization surgery for moyamoya disease: Special consideration for its ‘internal carotid-external carotid (IC-EC) conversion’ as the physiological reorganization system. **Tohoku J. Exp. Med.** 2015;236:45-53. doi: 10.1620/tjem.236.45. 【査読あり】
- (9) Kanoke A, Fujimura M, Niizuma K, Ito A, Sakata H, Sato-Maeda M, Morita-Fujimura Y, Kure S, and Tominaga T. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-tesla magnetic resonance angiography and histological analysis in mice with the R4859K mutation of RNF213, the susceptibility gene for moyamoya disease. **Brain Res.** 2015;1624: 497-505. doi: 10.1016/j.brainres.2015.07.039. 【査読あり】
- (10) Fujimura M, Tominaga T. Diagnosis of moyamoya disease: International standard and regional differences. **Neurol. Med. Chir.**

- (Tokyo) 2015;55:189-193. 【査読あり】
- (11) Fujimura M, Tominaga T. Significance of cerebral blood flow analysis in the acute stage after revascularization surgery for moyamoya disease. **Neurol. Med. Chir. (Tokyo)** 2015;55: 775-781. 【査読あり】
- (12) Sakata H, Fujimura M, Mugikura S, Sato K, Tominaga T. Local vasogenic edema without cerebral hyperperfusion after direct revascularization surgery for moyamoya disease. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.** 2015;24:e179-84. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.03.050. 【査読あり】
- (13) Ito A, Fujimura M, Niizuma K, Kanoke A, Sakata H, Morita-Fujimura Y, Kikuchi A, Kure S, Tominaga T. Enhanced post-ischemic angiogenesis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. **Brain Res.** 2015;1594: 310-320. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.014. 【査読あり】
- (14) Fujimura M, Niizuma K, Endo H, Sato K, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T. Quantitative analysis of early postoperative cerebral blood flow contributes to the prediction and diagnosis of cerebral hyperperfusion syndrome after revascularization surgery for moyamoya disease. **Neurol. Res.** 2015;37: 131-138. doi: 10.1179/1743132814Y.0000000432. 【査読あり】
- (15) Fujimura M, Sonobe S, Nishijima Y, Niizuma K, Sakata H, Kure S, Tominaga T. Genetics and biomarkers of moyamoya disease: Significance of RNF213 as a susceptibility gene. **J. Stroke** 2014;16:65-72. doi: 10.5853/jos.2014.16.2.65. 【査読あり】
- (16) Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Nishijima Y, Ito A, Shimizu H, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Tominaga T. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-tesla magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. **Brain Res.** 2014;1552: 64-71. doi:10.1016/j.brainres.2014.01.011. 【査読あり】
- (17) Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Fujimura T, Furudate S, Nishijima Y, Kure S, Tominaga T. Increased vascular MMP-9 in mice lacking RNF213; moyamoya disease susceptibility gene. **Neuroreport** 2014;25: 1442-1446. doi:10.1097/WNR.000000000000289. 【査読あり】
- (18) Fujimura M, Kimura N, Ezura M, Niizuma K, Uenohara H, Tominaga T. Development of de novo arteriovenous malformation after bilateral revascularization surgery in a child with moyamoya disease -Case report-. **J. Neurosurg. Pediatr.** 2014;13: 647-649. doi: 10.3171/2014.3.PEDS13610. 【査読あり】
- (19) Akamatsu Y, Fujimura M, Uenohara H, Shimizu H, Tominaga T. Development of moyamoya disease in pregnancy and puerperium -Case report- **Neurol. Med. Chir. (Tokyo)** 2014;54:824-826. 【査読あり】
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- (1) Fujimura M, Tominaga T. Management of intracranial aneurysms; Microsurgical clipping as a standard procedure and application of EC-IC bypass for complex aneurysms. 2017 年 3 月 21-24 日 (Cairo, Egypt) 【シンポジウム・指定演者】
- (2) Fujimura M, Tominaga T. Efficacy of direct/indirect combined revascularization surgery for Moyamoya disease: surgical indication, microsurgical techniques, and perioperative care. 2017 年 3 月 21-24 日 (Cairo, Egypt) 【シンポジウム・指定演者】

- (3) Fujimura M, Tominaga T. Moyamoya disease, Update: Surgical treatment. Pierre Lasjaunias Neurovascular Educational Team Course. (PLANET). 2016 年 10 月 22-26 日 (Akasaka Park Bld., Tokyo) 【シンポジウム・指定演者】
- (4) Fujimura M, Tominaga T. Complication avoidance in revascularization surgery for moyamoya disease: significance of intraoperative decision making. The 13th Japanese and Korean Joint Conference on Surgery for Cerebral Stroke. 2016 年 9 月 22-24 日 (Busan, Korea) 【シンポジウム・指定演者】
- (5) Fujimura M, Tominaga T. Current status of revascularization surgery for moyamoya disease; Special consideration for 'IC-EC conversion' as its physiological reorganization system. The 11st Asian Congress of Neurological Surgeons. 2016 年 3 月 10-12 日 (Surabaya, Indonesia) 【シンポジウム・指定演者】
- (6) Fujimura M, Tominaga T. Efficacy of direct/indirect combined revascularization surgery for moyamoya disease: significance of CBF analysis in the acute stage. The 12th International Conference on Cerebrovascular Surgery. 2016 年 2 月 26-28 日 (Mumbai, India) 【口演】
- (7) Fujimura M. Microsurgery for aneurysms. 1st Walter E. Dandy Neurosurgical Society Quadrennial Meeting. 2015 年 11 月 20-22 日 (Dubai, UAE) 【モーニングセミナー】
- (8) Fujimura M, Niizuma K, Kure S, Tominaga T. Genetics of moyamoya disease: Recent study using genetic engineered mice of RNF213; A moyamoya disease susceptibility gene. The 7th Japan - Korea Joint Stroke Conference 2015 年 10 月 22-24 日 (Busan, Korea) 【シンポジウム・指定演者】
- (9) Fujimura M, Niizuma K, Endo H, Sakata H, Tominaga T. Prophylactic blood pressure lowering with intravenous minocycline administration as secure and effective postoperative management after revascularization surgery for moyamoya disease. 15th Interim Meeting of the World Federation of Neurological Societies. 2015 年 9 月 8-12 日 (Rome, Italy) 【口演】
- (10) Fujimura M, Tominaga T. Diagnosis of moyamoya disease : International standard and regional difference. The 2nd Asian Neurosurgical Conference on Moyamoya Disease. 2015 年 3 月 26 日 (Rihga Royal Hotel, Hiroshima) 【シンポジウム・指定演者】
- (11) Fujimura M, Tominaga T. Current status of revascularization surgery for adult Moyamoya disease in Japan. The 8th Catholic International Neurosurgery Update. 2015 年 2 月 28 日 (Seoul, Korea) 【特別講演】
- (12) Fujimura M, Niizuma K, Endo H, Sakata H, Tominaga T. Outcome of revascularization surgery for elderly patients with moyamoya disease over the age of 60 years: Single institute experience. 4th International Moyamoya Meeting. 2015 年 7 月 2-4 日 (Berlin, Germany) 【口演】
- (13) Fujimura M, Tominaga T. Significance of scientific approach and academic productivity in neurosurgical practice. The 11th International Conference on Cerebrovascular Surgery. 2014 年 12 月 10-15 日 (Jakarta, Indonesia) 【シンポジウム・指定演者】
- (14) Fujimura M, Tominaga T. Role of EC-IC bypass in cerebrovascular surgery: special consideration for moyamoya disease.

The 11th International Conference on
Cerebrovascular Surgery. 2014 年 12 月
10-15 日 (Jakarta, Indonesia) 【シンポジウ
ム・指定演者】

〔図書〕(計 3 件)

- (1) 藤村幹. *もやもや病*. 脳神経外科学. 太
田富雄 (総編集). 金芳堂. 2016 年.
1061-1077 ページ.
- (2) Fujimura M. *Moyamoya disease*. Intracranial
Atherosclerosis: Pathophysiology, diagnosis
and treatment. Kim JS (ed.) Karger 2016.
pp204-220.
- (3) Fujimura M. Moyamoya disease explored
through RNF213. Koizumi A (ed.) Springer
2017. pp79-90.

〔産業財産権〕

なし

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 幹 (FUJIMURA, Miki)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00361098

(2) 研究分担者

富永 悌二 (TOMINAGA, Teiji)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00217548

新妻 邦泰 (NIIZUMA, Kuniyasu)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10643330

坂田 洋之 (SAKATA, Hiroyuki)

東北大学・医工学研究科・助教

研究者番号：80722305