

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860273

研究課題名(和文)機能強化型間葉系間質細胞を用いた細胞移植治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文)Cell therapeutic approach using gene-transduced mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy

研究代表者

笠原 優子 (YUKO, KASAHARA)

日本医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90391911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系間質細胞(Multipotent mesenchymal stromal cells: MSCs)は「免疫制御能」と「多分化能」を有し、細胞性医薬品としての応用が注目されている。本課題では、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)に対するMSCs移植治療の可能性を検討した。まず、抗炎症性サイトカインIL-10を欠損することで慢性炎症を伴うDMDマウスを樹立し、炎症反応によって助長される筋組織傷害および機能障害を明らかにした。また、モデル動物を用いてMSCsの全身投与方法を確立し、安全性と有効性を確認した。今後さらに治療効果を明確にすることで、MSCsの応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive muscle-wasting disease that causes respiratory and cardiac failure. Inflammation is involved in the pathogenesis of muscular dystrophy and therefore immunosuppressants can be utilized to improve muscle function. For cell therapeutic approach, multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are promising because of their immunosuppressive properties and ability to differentiate into myogenic-lineage. In this study, we demonstrated that the correlations of inflammation with the severity of DMD by the results of dystrophic mice, which exhibited more severe inflammation and cardiorespiratory dysfunction by genetic ablation of IL-10. We established safe and effective cell transplantation of MSCs into DMD dogs and also indicated the effects of IL-10 on the MSCs engraftment in the skeletal muscle. The strategy would be promising for the anti-inflammatory therapy of DMD, although further study is required for the mechanism of interaction.

研究分野：細胞生物学、生化学、分子生物学

キーワード：間葉系幹細胞 筋ジストロフィー

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系間質細胞 (Multipotent mesenchymal stromal cells : MSCs)は安全性が高く、生体内において炎症や組織障害のある部位へ集積し免疫抑制能を示すこと、不特定多数の患者に投与が可能であることから、世界で初めて移植時の副作用であるステロイド抵抗性移植片対宿主病に対する細胞性医薬品として、本邦においても販売承認が得られている。デュシェンヌ (Duchenne) 型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン完全欠損により、慢性炎症を伴う進行性の筋機能障害を認め、呼吸不全や心筋症に至る重篤な遺伝性疾患である。ステロイドによる抗炎症療法が実施されているが、治療効果には個人差があり、長期服用による副作用が懸念される。

1) これまでに、DMD の病態進行における機能障害と炎症との相互作用は十分には解明されていない。モデル動物として広く用いられている *mdx* マウスは、活発な筋線維の壊死・再生や加齢に伴う横隔膜や心筋の線維化が認められるものの、ヒトの様な重篤な経過を示さない。ユートロフィン/ジストロフィン欠損 (*utro*<sup>-/-</sup>/*mdx*) マウスも治療研究に用いられているが、慢性炎症が病態進行に及ぼす影響や機能障害を経時的に明らかにするためには、炎症反応を伴った、よりヒトの病態に近いモデルを用いた解析が望まれる。

2) 骨髄由来 MSCs は、その免疫制御能を応用した移植片対宿主病の炎症制御療法において有効性及び安全性が確立されている一方、骨、血管、筋肉等の間葉系組織や中枢神経系の再構築への応用も期待されている。しかし、移植後の生存・生着は不安定である。研究代表者らはこれまでに、筋分化誘導操作を行った MSCs を用いて、DMD 犬への移植条件の確立に成功している (Kasahara *et al.*, 2012)。しかし、治療効果を得るためには炎症の鎮静化が必要だと考えた。抗炎症性サイトカイン IL-10 は Th2 型 CD4<sup>+</sup>T 細胞から産生され、マクロファージによる IL-6 やケモカインの産生を抑制し抗炎症性活性を示す。そこで、移植効率改善のため、IL-10 の作用に注目した。

## 2. 研究の目的

1) IL-10 欠損により慢性炎症を伴うことが予想される DMD モデルマウス (*IL-10*<sup>-/-</sup>/*mdx*) 系統を樹立して、炎症反応によって助長される筋組織傷害および機能障害を明確にすることを目的とした。

2) 抗炎症作用を示す MSCs を作製し、DMD モデルマウスおよび犬を用いた MSCs および IL-10 発現 MSCs の移植効率の改善効果や安全な投与方法を検討し、炎症制御療法の可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) IL-10 を欠損して慢性炎症を伴った

DMD モデルマウス (*IL-10*<sup>-/-</sup>/*mdx*) を作出し、心筋および横隔膜骨格筋における炎症性細胞浸潤やサイトカイン・ケモカイン発現変動、筋線維の壊死や線維化・脂肪化による組織傷害、機能評価としてプレチスモグラフィによる呼吸機能、超音波画像診断による心機能評価を行った。

2) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて IL-10 の長期発現が可能な MSCs を作製し、移植条件の検討を行った。マウスへの投与を行い、*in vivo* イメージングや病理組織学的解析を行った。さらに、DMD 犬 (ビーグル犬) への投与実験を実施し、行動解析による安全性評価や移植効率を評価した。

## 4. 研究成果

1) *IL-10*<sup>-/-</sup>/*mdx* は *mdx* と比べて筋組織中の炎症性 M1 マクロファージの浸潤が増強し、IL-6 など炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が増加していた。横隔膜は病理学的解析において *mdx* と同等の強い線維化を認めたが、心筋においては、より進行した線維化や拡張型心筋症の病理所見を認めた。さらに呼吸循環機能解析において、*IL-10*<sup>-/-</sup>/*mdx* は安静時の換気量や左室内径短縮率 (%FS) が低下していた。IL-10 を欠損することで、*mdx* マウスの筋組織障害や呼吸循環機能障害が重症化したことから、炎症が DMD の病態を重篤化する重要な要因であることが示唆された。

2) 組換え IL-10 や IL-10 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと同時にマウス下腿に MSCs を局所投与し、生体イメージングを行って移植細胞の生存・生着を解析したところ、MSCs 単独で投与した場合と比べて IL-10 発現 MSCs は生存細胞が多数認められた。さらに、AAV ベクターにより IL-10 を強制発現させた MSCs を投与した結果、移植組織における生存・生着効率が著しく増加し、生存期間は約 70 日まで延長した。この際、MSCs の集積組織においてのみ IL-10 濃度が増加し、血中濃度の変化は軽微であった。また、ビーグル犬前脛骨筋への投与においても同様に、炎症部位へ 8~12 週間の長期生着を確認でき、筋分化誘導操作を行わない場合においても、MSCs による新たな筋線維の形成が認められた。MSCs の全身投与においては、行動異常など目立った副作用は認められなかった。

以上より、IL-10 を欠損することで、*mdx* マウスは呼吸機能および心機能が重症化したことから、炎症が DMD の病態を重篤化する重要な要素であることが示唆された。IL-10 発現 MSCs による生存・生着効率の改善に伴い、組織中での分化効率も向上することが明らかとなった。MSCs の全身投与による安全性が検証され、今後さらに、IL-10 発現 MSCs の作用機序を詳細に検証することにより、様々な炎症性疾患に対する機能強化型 MSCs を用いた炎

症制御療法の実用化が期待された。

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 4 件)

1. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Akiyo Nishiyama, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Hum. Mol. Gen.* 23(15): 3990-4000, 2014 査読あり
2. Yuko Nitahara-Kasahara, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. : Cell therapeutic approaches using multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. *Inflammation and Regeneration*. Vol. 34, No.4, p198-205. 2014 査読あり
3. Yuko Nitahara-Kasahara. Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Inflammatory predisposition predicts disease phenotypes in muscular dystrophy. *Inflammation and Regeneration*. Vol. 36, No.14, 2016 査読あり
4. Janek Hyzewicz, Jun Tanihata, Mutsuki Kuraoka, Yuko Nitahara-Kasahara, Teiva Beylier, Urs T Ruegg, Axel Vater, Shin'ichi Takeda. Low intensity training and the C5a complement antagonist NOX-D21 rescue the mdx phenotype through modulation of inflammation. *American Journal of Pathology*, In printing, 2017 査読あり

[学会発表](計 21 件)

1. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Nana Tsumita, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Exacerbation in the IL-10 deficient dystrophic mice and an anti-inflammatory strategy with mesenchymal stromal cells. The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics (Poster presentation), Kyoto, April 6, 2016 (April 3-7)
2. Hiromi Hayashita-Kinoh, Yuko Nitahara-Kasahara, Hironori Okada, Kiwamu Imagawa, Katsuhiko Tachibana, Shin'ichi Takeda, MD, PhD and Takashi Okada. Improved transduction of canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9-microdystrophin by MSCs pretreatment. The 13<sup>th</sup> International

Congress of Human Genetics (Poster presentation), Kyoto, April 6, 2016

3. Hiromi Hayashita-Kinoh, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Kiwamu Imagawa, Katsuhiko Tachibana, Shin'ichi Takeda, Takashi Okada. Improved transduction of canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9-microdystrophin by introducing immune tolerance. 19<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (Poster presentation), Washington DC, May 4-7, 2016
4. Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Chiaki Masuda, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Yoko Endo-Takahashi, Koichi Kato, Yoichi Negishi, Shin'ichi Takeda, Takashi Okada, Transient Ultrasound-Mediated Microbubble-Assisted Modulation of Blood-Brain Interface in Adult Common Marmoset to Improve rAAV-Mediated Brain Transduction. 19<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (Poster presentation), Washington DC, May 4-7, 2016
5. Yuko Nitahara-Kasahara, Mutsuki Kuraoka, Hiromi Hayashita-Kinoh, Aki Takahashi, Chiaki Masuda, Kiwamu Imagawa, Katsuhiko Tachibana, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Cell therapeutic approach using dental pulp stromal cells for Duchenne muscular dystrophy. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene & Cell Therapy (Oral presentation), Tokyo, July 28, 2016 (July 28-30)
6. Hiromi Hayashita-Kinoh, Yuko Nitahara-Kasahara, Mutsuki Kuraoka, Hironori Okada, Chiaki Masuda, Kiwamu Imagawa, Katsuhiko Tachibana, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada. Systemic administration of rAAV9-microdystrophin with MSCs pre-treatment improves transgene expression and expression and phenotype in CXMD<sub>J</sub>. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene & Cell Therapy (Oral presentation), Tokyo, July 28, 2016
7. Ryo Ikeue, Aki Takahashi, Takashi Muramatsu, Yuko Kasahara, Atsushi Watanabe, Takashi Shimada, Takashi Okada, Toru Sato. Assessment of the alveolar bone and tooth in lethal hypophosphatasia mice treated by rAAV8-TNALP-D10. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene & Cell Therapy (Oral presentation), Tokyo, July 29, 2016
8. Aki Nakamura-Takahashi, Ryo

Ikeue, Yuko Nitahara-Kasahara, Atsushi Watanabe, Yukihiro Hirai, Masataka Kasahara, Takashi Okada. Therapeutic effects of scAAV8-mediated high dose expression of bone targeted alkaline phosphatase on the lethal hypophosphatasia mice. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene & Cell Therapy (Oral presentation), Tokyo, July 29, 2016

9. Chikako Nito, Kota Sowa, Masataka Nakajima, Masayuki Ueda, Yasuhiro Nishiyama, Satoshi Suda, Aki Nakamura, Kiwamu Imagawa, Katsuhiko Tachibana, Yuko Kasahara, Takashi Okada, Kazumi Kimura. Intravenous administration of dental pulp stem cells in a rat stroke model. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japan Society of Gene & Cell Therapy (Poster presentation), Tokyo, July 29, 2016

10. 武田 伸一、倉岡 睦季、笠原 優子、立森 久照、木村 円、青木 吉嗣、加藤 直広、加速度・角速度センサを用いたイヌ筋ジストロフィーモデルの運動機能評価および筋傷害との関連解析、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」平成 28 年度 研究班会議（口頭発表）東京、2016.12.8

11. 岡田 尚巳、喜納 裕美、笠原 優子、倉岡 睦季、岡田 浩典、今川 究、平戸 徹、武田 伸一、DMD に対する遺伝子細胞治療の基盤技術開発 - AAV ベクターを用いた DMD 遺伝子治療と免疫寛容誘導 - 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」平成 28 年度 研究班会議（口頭発表）東京、2016.12.8

12. 岨 康太、仁藤 智香子、中島 壯崇、須田 智、坂本 悠記、西山 康裕、上田 雅之、高橋 有希、笠原 優子、今川 究、平戸 徹、岡田 尚巳、木村 和美、ラット局所脳虚血モデルにおける HGF 強発現歯髄幹細胞移植の治療効果 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会（口頭発表）徳島、2016.11.11-12

13. 笠原 優子、倉岡 睦季、喜納 裕美、島津 苑子、増田 千明、高橋 有希、今川 究、平戸 徹、武田 伸一、岡田 尚巳 歯髄幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する細胞治療、第 16 回日本再生医療学会総会（口頭発表）仙台 2017.3.8

14. 岨康太、仁藤智香子、中島壯崇、須田智、上田雅之、笠原優子、今川究、平戸徹、岡田尚巳、木村和美 ラット局所脳虚血モデルにおける HGF 強発現歯髄幹細胞移植の神経保護効果 第 42 回日本脳卒中学会学術集会（発表予定）大阪 2017.3.16-19

15. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Kuraoka M, Chiyo T, Okada H, Tsumita N, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T. Mesenchymal Stromal Cells Can Ameliorate the Progressive Phenotype of Dog With Duchenne Muscular Dystrophy. 18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy, New Orleans, Louisiana, May 14, 2015

16. Kasahara Y, Kinoh H, Kuraoka M, Chiyo T, Okada H, Tsumita N, Imagawa K, Tachibana K, Takeda S, Okada T. Mesenchymal stromal cells ameliorate progressive phenotype of Duchenne muscular dystrophy in dog. 22th Annual Meeting of Japan Society of Gene & Cell Therapy, Osaka, July 24, 2015

17. 笠原 優子、喜納 裕美、積田 奈々、武田 伸一、岡田 尚巳. 炎症素因による筋ジストロフィー組織障害の重症化. 第 36 回日本炎症・再生医学会、2015 年 7 月 21 日

18. 笠原 優子、喜納 裕美、積田 奈々、武田 伸一、岡田 尚巳. IL-10 欠損 mdx マウスによって示された炎症素因による筋ジストロフィー組織. 第 1 回日本筋学会. 2015 年 8 月 8 日

19. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Hironori Okada, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda. Skeletal muscle engraftment of mesenchymal stromal cells is augmented by IL-10. ASGCT 17th Annual Meeting May 21-24, 2014 DC, USA

20. 笠原優子、喜納裕美、千代智子、岡田浩典、武田伸一、岡田尚巳：IL-10 強制発現による機能強化型 MSCs の作製と生存解析。第 35 回日本炎症・再生医学会、7.2, 2014 沖縄

21. Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Nana Tsumita, Tomoko Chiyo, Hironori Okada, Shin'ichi Takeda and Takashi Okada Engraftment of mesenchymal stromal cells is effectively associated by IL-10 in skeletal muscle. JSGT 20th Annual meeting. Aug 8th, 2014, Tokyo

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：歯髄由来多能性幹細胞を含有する筋ジストロフィー治療剤

発明者：岡田 尚巳、笠原 優子、今川 究  
権利者：日本医科大学、国立精神・神経医療研究センター、JCR ファーマ株式会社

種類：特許  
番号：PCT/JP2015/082045  
出願年月日：2014年11月14日  
国内外の別：国外

名称：移植用幹細胞及びその製造方法  
発明者：岡田 尚巳、笠原 優子、武田 伸  
—

権利者：国立精神・神経医療研究センター、  
JCR ファーマ株式会社  
種類：特許  
番号：PCT/JP2014/063448  
出願年月日：2014年5月21日  
国内外の別：国外

取得状況（計 件）

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

笠原 優子 (KASAHARA, Yuko)  
日本医科大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90391911

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )