

博士論文

マウスラクナ梗塞に対する
無血清培養下ヒト骨髄由来多能性幹細胞（Muse 細胞）
移植による神経回路網の再建

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

神経・感覚器病態学講座神経外科学分野

内田浩喜

略語一覽

APC: allophycocyanin

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA: deoxyribonucleic acid

ET-1: endothelin-1

ES 細胞: embryonic stem cells

FACS: fluorescence activated cell sorting

FITC: fluorescein isothiocyanate

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GFP: green fluorescent protein

GST-pi: glutathione S-transferase pi

L-NAME: N(G)-nitro-L-arginine methyl ester

MACS: magnetic activated cell sorting

MAP2: microtubule associated protein 2

MSCs: mesenchymal stem cells

Muse 細胞: multilineage-differentiating stress-enduring cells

PBS: phosphate-buffered saline

PLP: periodate lysine paraformaldehyde

Q-PCR: quantitative polymerase chain reaction

SCID: severe combined immunodeficiency

SD: standard deviation

SSEA-3: stage-specific embryonic antigen-3

tPA: tissue plasminogen activator

【1】要約

背景：ラクナ梗塞は単純構造である白質に限定された小梗塞で，脳梗塞のおよそ 25%を占める．一般的に生命予後良好であるが，障害が錐体路に及ぶと機能予後不良である．大きさが小さく，神経線維自体である神経細胞と，髄鞘を形成する乏突起膠細胞を主体とした単純構造の障害であるため，細胞置換を目的とした幹細胞治療の良い適応と考えられる．現在行われている幹細胞治療は，安全性や簡便性から MSCs を用いている者が多い．しかしながら，治療効果は限定的であり，そのメカニズムも幹細胞から分泌される神経保護効果が主体であり，失われた神経細胞自体を再生させることは難しい．

Muse 細胞は MSCs 中に一定の割合で存在する多能性細胞である．多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 を表面抗原としたセルソーティングで分離できる．高い生着率と分化能を有する一方で腫瘍化の危険性も低く，細胞置換を目的とした幹細胞治療において有用であると考えられる．今回我々は，マウスラクナ梗塞に対してヒト Muse 細胞を局所投与し，その治療効果を検討した．将来の臨床応用を考慮し，安全性試験では動物由来の素材を極力排除した形で無血清培地で Muse 細胞を培養し，移植時期も慢性期とした．

方法: SCID マウスに対して ET-1 と L-NAME の 2 種類の血管収縮剤をマウスの内包後脚に局所投与し、ラクナ梗塞を誘導した。ラクナ梗塞 2 週後に、ヒト Muse 細胞を梗塞巣の近傍に移植した。移植後 8 週にわたり Corner Turn スコアと Asymmetry スコアで神経機能を評価し、神経機能改善の有無を評価した。8 週間後に脳および脊髄の切片を作製し、Muse 細胞の生着及び神経系細胞への分化を組織学的に評価した。また、順行性トレーサーである Dextran を投与し神経トレーシングを行うことで、Muse 細胞による神経回路網再建を評価した。Muse 細胞を移植した一部のモデルに対しては、ヒト細胞を選択的に死滅させるジフテリア毒素を投与することで、改善した神経機能がどのように変化するか検討した。また、慢性期の安全性を検討する目的で、移植後 6 ヶ月の段階で、Muse 細胞の全身分布及び腫瘍形成の有無を組織学的及び Q-PCR で評価した。

結果: 移植した Muse 細胞はラクナ梗塞周辺に生着しており、生着率は約 28% であった。生着した細胞の半数以上が神経へ分化しており、一部は突起細胞への分化もみられ、髄鞘を形成している可能性が示唆された。移植した Muse 細胞は、軸索を少なくとも上位頸髄まで伸展させていることが神経トレーシングにより確認され、宿主の錐体路を再建していることが示唆された。Muse 細胞

移植により神経機能は移植後 4 週より改善がみられた。またジフテリア毒素投与により生着したヒト Muse 細胞を選択的に死滅させると、改善した神経機能が再度悪化した。これにより、神経機能改善は Muse 細胞によってもたらされていることが示唆された。移植後長期間経過をみたが、Muse 細胞は脳内のみで確認され、他臓器も含めて腫瘍形成は確認されず、Muse 細胞の安全性が示された。

結論：マウスラクナ梗塞の慢性期に無血清培地で培養した Muse 細胞移植療法を行うことにより、細胞置換による機序で神経機能改善がもたらされた。高い分化能及び安全性を有する Muse 細胞は、倫理面でのハードルも低く、今後の脳梗塞に対する細胞移植療法の有用な材料と成り得ると考えられた。

【2】研究背景

ラクナ梗塞は脳梗塞のおよそ 25%を占める¹。穿通枝領域の小さい脳梗塞である。一般的に生命予後は良好であるが、錐体路に障害が及ぶ場合には麻痺が長期に渡り残存することがあり、機能予後は必ずしも良好ではない^{2,3}。脳梗塞後の機能改善に関しては、急性期であれば tissue plasminogen activator (tPA)

が有用である⁴。しかし、脳梗塞発症 4.5 時間という短い治療可能期間を過ぎると、リハビリテーション以外に有効な治療法は無く、効果は限定的である。

近年、障害された神経細胞自体を再生させるような新たな治療法が望まれ、幹細胞治療が注目されている。安全性が高く、細胞も入手しやすいことから、間葉系幹細胞 (MSCs: mesenchymal stem cells) を用いた脳梗塞患者への幹細胞治療が近年行われているが、その治療メカニズムは移植細胞の分泌する神経保護因子による保護効果が主体である⁵。虚血による種々の細胞性サイトカインが分泌される急性期では、この神経保護による治療効果を期待できるが、効果は一時的である。そこで移植細胞の生着や喪失した細胞への分化による細胞置換を期待した、本来の意味での再生治療が期待されるが⁶、未だ十分な細胞置換を達成した報告はない。この観点からみると、脳梗塞の中でもラクナ梗塞の障害は白質に限定されており、障害部位の構造も神経線維と髄鞘を形成する乏突起膠細胞が主な構成で比較的単純であるため、細胞置換を目的とした再生治療の良い適応と考えられる。

Muse (multilineage-differentiating stress-enduring) 細胞は、骨髄や脂肪組織などの間葉系組織に存在し、様々な組織に分化する新たな多能性幹細胞であ

る^{7,8}。トリプシンによるストレス処理、または糖鎖である 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⁷⁻⁹。Muse 細胞は浮遊培養下で自己複製能を持ち、ES (embryonic stem)細胞の胚様体と類似したクラスターを形成し、それらは Oct3/4, Sox2, Nanog などの多能性幹細胞マーカーを発現している⁷。また、それらのクラスターを接着培養すると、分化誘導することなく外胚葉系、中胚葉系、内胚葉系のいずれの細胞にも分化する多能性を有する⁷。さらに、Muse 細胞は本来腫瘍形成の可能性が低い MSCs 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る⁹。このように高い安全性と多能性を有する Muse 細胞は、他の幹細胞と比して優れた移植細胞と考えられ、近年様々な有効性を示唆する実験結果も報告されている。肝臓や筋組織の障害モデルに静脈内投与された Muse 細胞は、障害部位に遊走し生着、分化することで機能し、改善をもたらすことが報告されている⁶。また神経分野においても中大脳動脈閉塞モデルに局所投与された Muse 細胞は生着、分化することにより、神経回路網を再建し、運動および感覚機能を改善することも報告されている¹⁰。

【3】 研究目的

本研究の目的は、将来の臨床応用を企図し、マウスラクナ梗塞に対して無血清培養したヒト Muse 細胞移植を行い、治療効果、そのメカニズムと安全性について検討することである。臨床での脳梗塞に対する幹細胞治療は、発症後慢性期に投与されていることが多いため¹¹、本研究では Muse 細胞移植をラクナ梗塞作製後 2 週間という慢性期に行うことで、神経保護よりも細胞置換による治療効果を主眼とした。また、Muse 細胞移植の安全性についても検討した。

【4】 研究方法

1) ラクナ梗塞モデル

本研究における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。8 から 10 週齢、雄の SCID (severe combined immunodeficiency) マウスを用いた。1.5%のイソフルランで麻酔し、定位的固定装置(SR-5M, NARISHIGE, Japan)にマウスを固定し、術中は直腸温で 37.5°C に維持した。過去の文献を参考に¹²、2 種類の血管収縮剤を脳内の局所投与することでラクナ梗塞を作製した。血管収縮剤は Entothelin-1 (ET-1)を 1.5

μg と N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を $2.7 \mu\text{g}$ を $3 \mu\text{l}$ の phosphate-buffered saline (PBS)に溶解し用いた。投与部位は内包後脚とし、Bregma を基準として以下の座標に投与した。①前方・後方 -2.0 mm , ②右側 $+2.0 \text{ mm}$, ③背側・腹側 -4.0 mm 。7 分間かけて持続投与した後, 5 分間針を静置後に抜去した。

2) Muse 細胞の分離

過去の文献を参考に⁷, Muse 細胞は継代数が 6 回から 8 回までの骨髄由来 MSCs (PT-2501, Lonza Inc)を用い, FACS aria II (Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA)にて分離した。一次抗体としてラット抗 SSEA-3 抗体 (1:100, MAB4303, Millipore)を, 二次抗体として fluorescein isothiocynate (FITC)標識抗ラット IgM 抗体 (1:100, 112-095-075, Jackson ImmunoResearch)を用いた。一部の細胞は過去の文献を参考に¹³, green fluorescent protein (GFP)を導入しており, その際 Muse 細胞を分離するには二次抗体として allophycocyanin (APC) 標識抗ラット IgM 抗体 (1:100, 112-136-075, Jackson ImmunoResearch)を用いた。

行動評価と安全性評価の実験には無血清培地 (A1033201, life technologies) で培養した骨髄由来 MSCs (StemPro BM Mesenchymal Stem Cells, A15652, Gibco, life technologies, CA, USA) から分離した Muse 細胞を用いた。無血清培地においては、通常培養下と比較して継代による細胞への障害が強くなるため、継代数は 4 回から 6 回までの骨髄由来 MSCs を使用し Muse 細胞を分離した。その際には FACS 以外に autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec, Germany) も用いて Muse 細胞を分離した。MACS による分離の際には、一次抗体及び二次抗体は FACS の時と同様の抗体を用い、三次抗体に microbeads 標識抗 FITC 抗体 (1:10, 130-048-075, Miltenyi Biotec, Germany) を用いた。MACS により分離された細胞集団 (positive fraction) に Muse 細胞が 70% 以上含まれているものを Muse-rich と定義し、移植細胞として用いた。

3) 無血清培養した Muse 細胞のクラスター形成と三胚葉分化

過去の文献を参考に⁷⁾、無血清培養した Muse 細胞のクラスター形成を行った。無血清培地で浮遊培養を 1 週間行い、クラスター形成の有無を確認した。播種時に単一細胞であった数を基準とし、クラスター形成率を算出した。形成され

たクラスターを 2 週間接着培養後、蛍光免疫細胞化学を行い三胚葉分化能を検討した。一次抗体は外胚葉系のマーカーとして抗 neurofilament 抗体 (1:200; AB1987, Millipore), 内胚葉系のマーカーとして抗 cytokeratin 7 (1:100; MAB3226, Millipore), 中胚葉系のマーカーとして抗 smooth muscle actin (1:200; MS-113-P0, Thermo-Fisher Scientific)を用いた。対応する 2 次抗体を用い反応させた後、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich)を用いた核染色を行い、Nikon C2si 共焦点顕微鏡 (Nikon Instruments)で観察した。

4) 細胞移植

ラタナ梗塞作製 2 週間後に細胞移植を行った。FACS で分離した GFP-Muse 細胞もしくは MACS で分離した Muse-rich 細胞を投与した群 (Muse-rich)と、MSCs を投与した群 (MSC)を作製した。細胞投与は梗塞巣周辺である以下の部位に局所投与した。①前方-後方 -2.0 mm, ②右側 +2.0 mm, ③背側-腹側 -3.0 mm. 移植細胞数は 1×10^5 細胞を 3 μ l の PBS に懸濁し投与した。対照として懸濁したものと同量の PBS を投与した群 (vehicle)も作製した。行動評価と Muse 細胞の安全性評価の実験では MACS で回収した Muse-rich 細胞を投与し

た．それ以外の検討では，FACS で分離した GFP-Muse 細胞を移植した．

5) 組織学的検討

移植後 8 週の時点で periodate lysine paraformaldehyde (PLP) 溶液 (0.01 M NaIO₄, 0.075 M lysine, 2% paraformaldehyde, pH6.2) でマウスを灌流固定し，脳および脊髄を摘出して凍結切片を作製した．Hematoxylin & Eosin (H & E) 染色および髄鞘染色を行い，移植細胞の生着及び分化の評価に関しては蛍光免疫組織化学を行った．一次抗体は以下の抗体を用いた．抗 GFP 抗体 (1:1000; ab6673, Abcam)，抗 NeuN 抗体 (1:200; MAB377, Millipore)，抗 microtubule associated ptorein (MAP) 2 抗体 (1:1000; M1406, Sigma)，抗 glutathione S-transferase (GST) -pi 抗体 (1:500; 312, MBL)，抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (1:500; IR524, DAKO)，抗 Ki-67 抗体 (1:100; ab15580, Abcam)，抗 synaptophysin 抗体 (1:1000, MAB5258, Millipore) and 抗 vesicular glutamate transporter (VGluT) 抗体 (1:200; 821301, BioLegend)．対応する 2 次抗体を用いて反応させ，DAPI を用いた核染色を行い、Nikon C2si 共焦点顕微鏡 (Nikon Instruments) で観察した。

6) 神経トレーシング

移植後 8 週の時点で、過去の文献を参考に順行性トレーサーである Alexa Fluor 594 標識 Dextran conjugated (D-22913, Invitrogen, USA)を用い神経トレーシングを行った¹⁴。宿主の錐体路を標識するために運動皮質に相当する以下の座標 3 ヶ所にトレーサーを投与した。I ①前方-後方 0 mm, ②右側 +1.0 mm, ③背側-腹側 -0.5 mm, II ①前方-後方 +0.5 mm, ②右側 +1.5 mm, ③背側-腹側 -0.5 mm, III ①前方-後方 +1.0 mm, ②右側 +1.5 mm, ③背側-腹側 -0.5 mm. 移植後生着した Muse 細胞を標識するために移植部位周辺相当する以下の座標にトレーサーを投与した。①前方-後方 -2.0 mm, ②右側 +2.0 mm, ③背側-腹側 -3.0 mm. トレーサー投与後 1 週間で脳及び脊髄を摘出し、同様に切片を作製した。DAPI を用いた核染色を行い、Nikon C2si 共焦点顕微鏡 (Nikon Instruments)で観察した。

7) 神経機能評価

神経機能の評価には過去の文献を参考に corner turn test と cylinder test を

用いた^{15,16}。神経機能評価はそれぞれの群を移植前と移植後 2 週, 4 週, 6 週および 8 週で評価した。一部の Muse-rich 群と vehicle 群に関してはジフテリア毒素 (diphtheria toxin :DT)を用いた機能喪失試験を行った。マウス細胞に比べてヒト細胞はジフテリア毒素の感受性が 1×10^5 倍といわれており¹⁷, 選択的にヒト細胞を死滅させることが可能である¹⁸。移植後 8 週の時点でジフテリア毒素を 24 時間ごと 2 回腹腔内投与し (50 μ g/kg), 翌週に再度神経機能の評価した。機能喪失試験の評価には cylinder test を用いた。

8) Q-PCR でのヒト特異的 Alu 配列の検出

ラクナ梗塞モデルに Muse 細胞を移植した後 6 ヶ月の時点で, 過去の文献を参考に¹⁹, 脳, 肺, 腎臓, 肝臓及び脾臓から DNA を抽出した。また障害モデルでない SCID マウスに Muse 細胞を移植後 10 ヶ月の時点で同様の臓器から DNA を抽出し, quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) を行った。Q-PCR は Biosystems 7500 (life technologies, USA) を用いた。50°C で 2 分, 95°C で 10 分反応させた後に, 95°C で 15 秒, 58°C で 30 秒, 72°C で 30 秒反応させるサイクルを 50 回行った。ヒト特異的 Alu 配列のプライマー及び TaqMan

プローブは過去の文献を参考に新たに作製したものを用いた¹⁹.

9) 統計学的解析

得られた数値は平均±standard deviation (SD)で表示した. 統計学的解析には GraphPad Prism 5 (MDF, Japan)を用いた. 行動評価の解析は一元配置反復測定分散分析にて検定後, bonfferoni による後検定を行った. p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした.

【5】研究結果

1) 移植モデルの検証

ET-1 と L-NAME 投与によりラクナ梗塞作製後 8 週の時点で, 脳切片の髄鞘染色を施行した. 髄鞘染色では血管収縮剤投与部位に, 脱髄が確認された (図 1A). ラクナ梗塞モデルに対して, 順行性トレーサーである dextran を運動皮質に投与して行った神経トレーシングでは, 障害モデルではない通常の SCID マウスでは, 上位頸髄 (C1-2) レベルにおいて dextran は検出されるが, ラクナ梗塞モデルでは dextran の検出は少なく (図 1B), 軸索の断裂が示唆された.

2) Muse 細胞分離と多能性確認

無血清培地で培養した MSCs において, SSEA-3 陽性細胞は $4.8 \pm 0.2\%$ であった (図 2A). FACS で回収したこれらの細胞を 1 週間浮遊培養すると, $37.6 \pm 6.1\%$ の細胞がクラスターを形成した (図 2B). それらのクラスターをゲラチン上で 2 週間接着培養すると, neurofilament ($2.6 \pm 1.1\%$), cytokeratin 7 ($2.1 \pm 1.5\%$), smooth muscle actin ($16.8 \pm 2.4\%$) 陽性の細胞への自発的分化を認めた (図 2C).

神経機能改善および安全性を評価する際には, MACS で回収した Muse 細胞を用いた. MACS 前の SSEA-3 陽性率は $3.2 \pm 0.8\%$ であり, MACS 後の positive fraction には SSEA-3 陽性細胞が $71.3 \pm 0.7\%$, negative fraction には SSEA-3 陽性細胞が $0.6 \pm 0.1\%$ 含まれていた (図 2D). positive fraction に Muse 細胞が 70% 以上含まれているものを Muse-rich 細胞と定義し, 移植に用いた.

3) Muse 細胞の生着および脳内での分布

ラクナ梗塞作製 2 週間後に, FACS で分離した GFP-Muse 細胞を移植し, 移

植後 8 週の時点で脳切片を作製した。Muse 細胞は Bregma より吻側および-4 mm 以降の場所では認めなかった。Bregma より-1 mm の場所では一切片中に 21 ± 2.2 細胞，-2 mm では 82.3 ± 13.7 細胞，-3 mm では 23.3 ± 5.2 細胞であった (図 3A)。移植細胞が一番多く認められた Bregma から-2 mm の切片で，Muse 細胞は障害部位付近に多く認められた (図 3B)。生着細胞数を簡易的に積分計算すると，約 2.8×10^4 細胞となり，投与された Muse 細胞に対する生着率は約 28%と試算された。

4) Muse 細胞の神経系への分化

ラクナ梗塞作製 2 週間後に，FACS で分離した GFP-Muse 細胞を移植し，移植後 8 週の時点で脳切片を作製した。Bregma から-2mm の脳切片を詳細に検討した。対側脳半球にはほとんど GFP-Muse 細胞はほとんど見られなかった。障害側では投与した部位から約 400 μm の範囲に多くの細胞が分布していた。GFP-Muse の中で NeuN (神経マーカー)，MAP2 (神経マーカー)，GST-pi (乏突起膠細胞マーカー)を発現する移植細胞を認めた (図 4A)。生着した移植細胞に対する，それらの発現割合は NeuN: $62.2 \pm 2.4\%$ ，MAP2: $30.6 \pm 3.1\%$ ，GST-pi:

12.1 ± 1.1%であった (図 4B). 観察した範囲では GFAP (星状膠細胞マーカー), Iba-1 (ミクログリアマーカー), Ki-67 陽性細胞は認めなかった.

5) Muse 細胞による錐体路再建

ラクナ梗塞作製 2 週間後に, FACS で分離した GFP-Muse 細胞を移植し, 移植後 8 週の時点で神経トレーシングを行った後, 脳及び脊髄の切片を作製した. 大脳皮質運動野に注入した順行性トレーサーである dextran は, 宿主の錐体路を標識する. 障害部位付近では移植した Muse 細胞と標識された錐体路は近接して位置しており, 宿主の錐体路は synaptophysin (シナプス前マーカー) 陽性であった (図 5A). 移植部位周辺に注入したトレーサーは, Muse 細胞に取り込まれ, 同側腹側の錐体路を通過した後, 延髄で交叉して, 上位頸髄レベルでは移植側と反対側の脊髄後索にて信号を確認できた (図 5B). 上位頸髄 (C1-2) 前角にて VGluT (グルタミン酸作動性神経マーカー) 陽性の Muse 細胞が確認された (図 5C).

6) Muse 細胞移植による神経機能改善と機能喪失試験

ラクナ梗塞作製 2 週間後に MACS で分離した無血清培養下 Muse-rich 細胞 (Muse-rich 群) と無血清培養した骨髄由来 MSCs (MSC 群) を移植した。コントロールとして PBS を投与した (vehicle 群)。細胞移植後 8 週間、神経機能評価を行った。Corner turn test では移植後 6 週から、Cylinder test では移植後 4 週から、MSC 群と vehicle 群と比較して Muse-rich 群では有意に神経機能が改善した ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$; 図 6A, B)。また、Muse-rich 群と vehicle 群に対してジフテリア毒素を用いて機能喪失試験を行った結果、Muse-rich 群のみジフテリア毒素投与後に神経機能が悪化した ($***p < 0.001$; 図 6C)。

7) Muse 細胞移植の安全性

ラクナ梗塞作製 2 週間後に MACS で回収した無血清培養下 Muse-rich 細胞を移植し、6 ヶ月後に全身臓器（脳、肺、腎臓、肝臓及び脾臓）から DNA を抽出し、各臓器における Muse 細胞の有無を Q-PCR で検証した。Muse 細胞の検出にはヒト特異的 Alu 配列に対するプライマーを用いた。陽性コントロールとしてラクナ梗塞モデルに Muse-rich 細胞移植後 2 ヶ月の脳を用いた。移植後 6 ヶ月の時点では、脳内に局所投与された Muse 細胞は、脳だけで検出され、そ

の他の臓器では検出されなかった (図 7A). それらの臓器の切片を作製し H&E 染色をしたが, 腫瘍形成は確認されなかった (図 7B). また, 障害モデルでない通常の SCID マウスに MACS で回収した無血清培養下 Muse-rich 細胞を移植し, 10 ヶ月後に全身臓器 (脳, 肺, 腎臓, 肝臓及び脾臓) から DNA を抽出し, 各臓器における Muse 細胞の有無を Q-PCR で検証した結果, 脳を含めた全臓器で Muse 細胞は検出されなかった (図 7A).

【6】 考察

今回我々は, ラクナ梗塞後 2 週という慢性期に無血清培地で培養した Muse 細胞を移植した. これは, ラクナ梗塞が単純構造である白質に局限し, 細胞置換を期待しやすいと考えられること. また実際の臨床試験においては, MSCs を投与する場合は数週間培養を必要とし¹¹, 梗塞発症急性期での幹細胞治療は現実的に困難であること. MSCs の慢性期治療では分化能の低さなどから治療効果に懸念があるが, 分化能の高い Muse 細胞であれば, 慢性期投与でも治療効果が得られる可能性があることなどからである. また, 本研究では Muse 細胞を脳内へ局所投与しているが, この局所投与という手技に関しても実臨床で

は確立された手技であり、安全に行うことが可能である。Muse 細胞は高い生着性と神経系への分化能により機能改善をもたらすことが示された。慢性期移植であっても、Muse 細胞は細胞置換により障害された神経回路網を修復し、また安全性も示された。

本来、幹細胞治療は細胞置換の概念で捉えられており、最初は新たな神経補給を目的とした神経幹細胞移植による臨床試験が試みられてきた。しかしながら、十分な神経回復効果を示すことはできず²⁰⁻²³、また胎児から採取した神経幹細胞は腫瘍方向性があることも報告された^{24,25}。そして近年は、移植細胞による成長因子分泌、抗炎症作用、免疫調整作用によってもたらされる神経保護効果が作用していると考えられるようになった²⁶。MSCs 移植による臨床試験も数々行われたが、治療効果の証明には至っておらず、安全性が示されたのみである²⁷⁻³⁰。

Muse 細胞はすでに臨床試験で使用されている MSCs に数%存在し、SSEA-3 陽性である⁷。MSCs は安全性も示されていることもあり、腫瘍化の危険性が低い⁷⁻⁹。遺伝子導入も必要とせず、MSCs を培養し、抗 SSEA-3 抗体によって細胞を回収するというステップのみで簡便に細胞が用意でき、また複数

の MSCs cell line を用いても分離された Muse 細胞に相違がみられないことも確認されている⁷。Muse 細胞は、自己増殖能力があり、浮遊培養ではクラスターを形成する。またそのクラスターを接着培養すると、分化誘導することなく三胚葉すべての系統に自然分化する⁷。分化の方向性は生着した組織の微小環境によって決まり、障害脳切片と共培養すると早期より神経系に分化することも示されている¹⁰。このような分化の能力を持ち合わせた細胞は、本来の細胞置換を念頭においた治療を考慮する上では、有用と考えられる。

ET-1 と L-NAME の局所投与により、内包後脚にラクナ梗塞を作製し、2 週間後に麻痺が確認されたモデルに、FACS または MACS で回収した Muse 細胞を障害部位周辺に局所投与した。細胞治療 8 週間後の脳においては、NeuN や MAP2 陽性の Muse 細胞が確認されており、神経細胞に分化していることが示された。また GST-pi 陽性の Muse 細胞も認め、乏突起膠細胞にも分化し髄鞘形成している可能性も示唆された。Muse 細胞は神経に分化する割合がもっとも多く、次いで乏突起膠細胞分化も約 10%みられた。星状膠細胞やミクログリアへの分化はみられなかった。また今回、移植した Muse 細胞の生着率は 28%であり、過去の MSCs や神経幹細胞の生着率と比較すると顕著に高い値である。こ

れらは、Muse 細胞の高い正着能によるとも考えられるが、それに加え Muse 細胞自体ストレス耐性があるため、移植後の虚血環境に適応できることも要因のひとつと考えられる。

また本研究では神経トレーシングをすることで、Muse 細胞による治療機序を検討した。移植した Muse 細胞は神経に分化、少なくとも上位頸髄（C1-2）までは軸索を伸展させていることが、神経トレーシングにより示された。またこれらの移植した Muse 細胞は、下流ではグルタミン酸作動性神経として、上位頸髄前角でシナプス形成している可能性が組織学的に示唆された。神経機能評価では、vehicle 群や MSC 群と比較して、Muse-rich 群で移植後 6 週の時点で有意に神経機能改善を認めた。過去には中大脳動脈閉塞モデルに対する Muse 細胞移植により、移植後 12 週で神経機能改善がみられたという報告があるが¹⁰、これと比較すると移植後早期に治療効果がみられている。中大脳動脈閉塞モデルと今回のラクナ梗塞モデルは梗塞サイズに大きな差があり、神経機能改善までの期間の差は、梗塞サイズに依存している可能性も考えられた。また、この治療効果は移植した細胞をジフテリア毒素で選択的に死滅させることで打ち消された。これらより、投与した Muse 細胞は神経に分化し、宿主の錐体路を再

建することで、神経機能改善をもたらしていることが示された。これらの神経機能改善は、無血清培養した MSCs から MACS によって回収された Muse-rich 細胞投与によってもたらされた結果である。無血清培養した Muse 細胞も、通常の血清を用いて培養した Muse 細胞と同様の多能性を持つことが示された。MACS はすでに臨床にも使用されており³¹、さらに無血清培養した細胞を用いているため、今回の結果は今後の臨床応用が十分に可能であると考えられる。

今回、MSCs 移植での神経機能改善はみられなかった。MSCs 移植による治療効果の主体は、これまで神経保護効果によるものだと考えられているため⁵、細胞置換が主体となる慢性期治療である本実験系での低い治療効果は納得できるものである。慢性期における神経保護効果を目的とした治療は効果が少ないことが裏付けされたと言えよう。Muse 細胞移植のように、慢性期でも細胞置換による治療効果が得られるような細胞ソースであれば、臨床でも幹細胞治療の適応を広げられる可能性がある。また細胞置換という治療機序であれば、梗塞発症から 2 週間よりさらに慢性期での移植であっても、治療効果がみられる可能性があり、より幹細胞治療の適応が広がると考えられる。

MSCs での臨床試験は安全性の面で問題になることはないと言われているが

27-29, Muse 細胞でも今回の実験で安全性が示された。組織学的に腫瘍化も確認されず、細胞増殖のマーカーである Ki67 陽性の移植細胞も確認されなかった。障害マウスに対する Muse 細胞移植 6 ヶ月後の脳では移植細胞の存在が Q-PCR により確認されたが、他臓器では確認されなかった。しかしながら、移植後 2 ヶ月後の脳と比較すると、検出されるヒト DNA 量は減少している。これは、単純に長期経過において生着数が減少している可能性や、またドナーのヒト由来神経細胞がマウス由来の神経細胞に置き換わっている可能性など考えられる。仮に、長期経過において生着数が減少しているとすれば、機能維持の面では実臨床において追加移植の必要性も考慮しなくてはならないと思われる。また、障害モデルではない正常のマウスに Muse 移植後 10 ヶ月では、脳を含めすべての臓器で移植細胞は確認されなかった。これは、障害と伴わない健常個体では Muse 細胞は生着しないという事実を示唆している。Muse 細胞が障害部位に作用する機序は、障害部位から分泌される物質により Muse 細胞が遊走すると考えられているが、現時点で明確な結論はでない。

今回ラクナ梗塞モデルにおいて慢性期で Muse 細胞による幹細胞治療を行い、有意な神経機能改善がみられた。これらは、Muse 細胞が生着・神経分化し、宿

主の障害された神経回路網を再建することに起因することが示された。また Muse 細胞移植の安全性も示された。慢性期での細胞置換を念頭においた細胞移植療法が可能であり、今後臨床応用においても十分有用であると考えられる。

【7】 結論

マウスラクナ梗塞に対する無血清培地培養 Muse 細胞移植は、高い生着性と神経系への分化により機能改善をもたらすことが示された。慢性期移植であっても、Muse 細胞は細胞置換により障害された神経回路網を修復する機序が解明され、また安全性も示された。また、Muse 細胞は倫理的なハードルが低く、高い有効性と安全性を有しており、今後の細胞移植療法の臨床応用に向けて有力であると考えられた。

謝辞

今回の研究ならびに博士論文作製に際し、多大なるご指導とご協力を頂いた出澤真理教授、富永悌二教授、若尾昌平先生、串田良祐先生、明石英雄先生、藤村幹先生、新妻邦泰先生、坂田洋之先生、森田隆弘先生、佐々木徹先生に深く

感謝を申し上げます。

【参考文献】

1. Sudlow CL, Warlow CP. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration. *Stroke*. 1997;28:491–499.
2. Jackson C, Sudlow C. Comparing risks of death and recurrent vascular events between lacunar and non-lacunar infarction. *Brain*. 2005;128:2507–2517.
3. Norrving B. Long-term prognosis after lacunar infarction. *Lancet Neurol*. 2003;2:238–245.
4. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N. Engl. J. Med*. 1995;333:1581–1587.
5. Bliss TM, Andres RH, Steinberg GK. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiol. Dis*. 2010;37:275–283.
6. Abe K, Yamashita T, Takizawa S, Kuroda S, Kinouchi H, Kawahara N. Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2012;32:1317–1331.
7. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 2010;107:8639–8643. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2889306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

8. Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nat. Protoc.* [Internet]. 2013;8:1391–415. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23787896>
9. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108:9875–9880.
10. Uchida H, Morita T, Niizuma K, Kushida Y, Kuroda Y, Wakao S, Sakata H, Matsuzaka Y, Mushiake H, Tominaga T, Borlongan C, Dezawa M. Transplantation of unique subpopulation of fibroblasts, Muse cells, ameliorates experimental stroke possibly via robust neuronal differentiation. *Stem Cells.* in press.
11. Dulamea AO. The potential use of mesenchymal stem cells in stroke therapy--From bench to bedside. *J. Neurol. Sci.* 2015;352:1–11.
12. Horie N, Maag A-L, Hamilton S a, Shichinohe H, Bliss TM, Steinberg GK. Mouse model of focal cerebral ischemia using endothelin-1. *J. Neurosci. Methods.* 2008;173:286–290.
13. Hayase M, Kitada M, Wakao S, Itokazu Y, Nozaki K, Hashimoto N, Takagi Y, Dezawa M. Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2009;29:1409–1420.
14. Hellenbrand DJ, Kaeppler KE, Hwang E, Ehlers ME, Toigo RD, Giesler JD, Vassar-Olsen ER, Hanna A. Basic techniques for long distance axon tracing in the spinal cord. *Microsc. Res. Tech.* 2013;76:1240–1249.

15. Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, Jiang Q, Arniago P, Li Q, Lu M, Chopp M. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Methods.* 2002;117:207–214.
16. Li X, Blizzard KK, Zeng Z, DeVries AC, Hurn PD, McCullough LD. Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. *Exp. Neurol.* 2004;187:94–104.
17. Pappenheimer AMJ, Harper AA, Moynihan M, Brockes JP. Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J. Infect. Dis.* 1982;145:94–102.
18. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:14069–14074.
19. Nicklas JA, Buel E. Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *J. Forensic Sci.* 2003;48:936–944.
20. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology.* 2000;55:565–569.
21. Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, Gebel J, Decesare S, Jovin T, Zafonte R, Lebowitz J, Flickinger JC, Tong D, Marks MP, Jamieson C, Luu D, Bell-Stephens T, Teraoka J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg.* 2005;103:38–45.

22. Savitz SI, Dinsmore J, Wu J, Henderson G V, Stieg P, Caplan LR. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc. Dis.* 2005;20:101–107.
23. Rabinovich SS, Seledtsov VI, Banul N V, Poveshchenko O V, Senyukov V V, Astrakov S V, Samarin DM, Taraban VY. Cell therapy of brain stroke. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005;139:126–128.
24. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A, Constantini S, Rechavi G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* 2009;6:e1000029.
25. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97:12846–12851.
26. Bersano A, Ballabio E, Lanfranconi S, Boncoraglio GB, Corti S, Locatelli F, Baron P, Bresolin N, Parati E, Candelise L. Clinical studies in stem cells transplantation for stroke: a review. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2010;8:29–34.
27. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* 2005;57:874–882.
28. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells.* 2010;28:1099–1106.

29. Battistella V, de Freitas GR, da Fonseca LMB, Mercante D, Gutfilen B, Goldenberg RCS, Dias JV, Kasai-Brunswick TH, Wajnberg E, Rosado-de-Castro PH, Alves-Leon S V, Mendez-Otero R, Andre C. Safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with nonacute ischemic stroke. *Regen. Med.* 2011;6:45–52.
30. Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, Waxman SG, Kocsis JD. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain.* 2011;134:1790–1807.
31. Forcillo J, Stevens L-M, Mansour S, Prieto I, Salem R, Baron C, Roy D-C, Larose E, Masckauchan D, Noiseux N. Implantation of CD133+ stem cells in patients undergoing coronary bypass surgery: IMPACT-CABG pilot trial. *Can. J. Cardiol.* 2013;29:441–447.

【図説明】

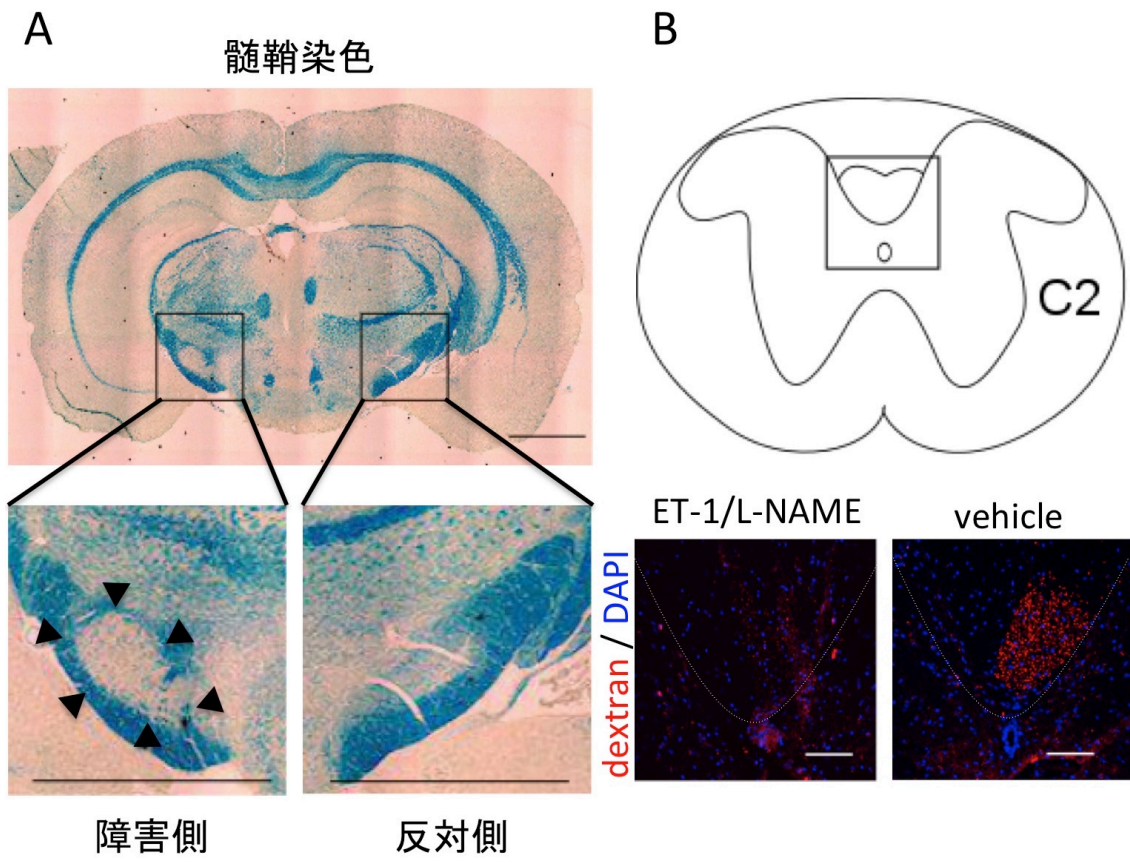


図 1. ラクナ梗塞モデル作製の確認

2 種類の血管収縮剤を内包後脚に投与することでラクナ梗塞を作製した。ラクナ梗塞作製後 8 週の髄鞘染色で、薬剤投与部位に脱髄（矢頭）を確認した（A）。また運動皮質に投与したトレーサー（dextran; 赤）を上位頸髄（C2）で評価することで、軸索の断裂を確認した（B）。A のスケールバーは 1,000 μm を示し、B のスケールバーは 100 μm を示す。

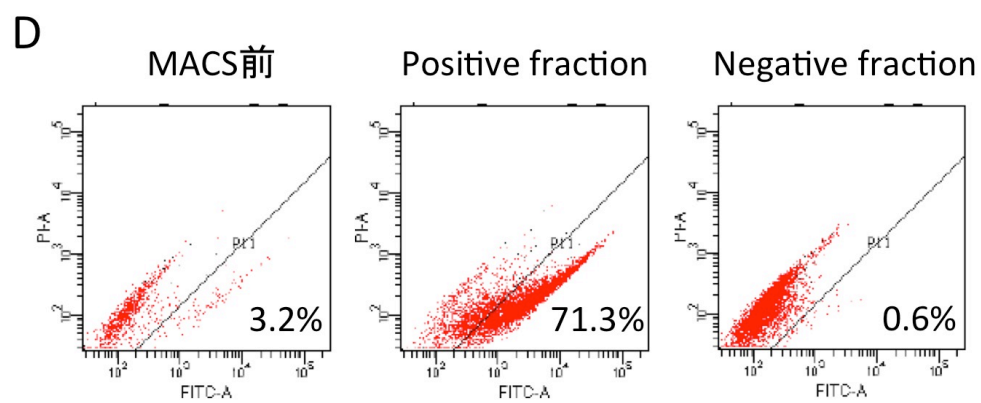
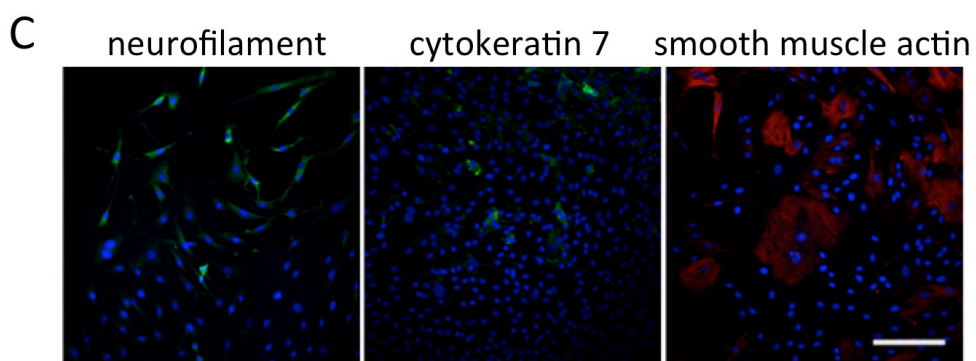
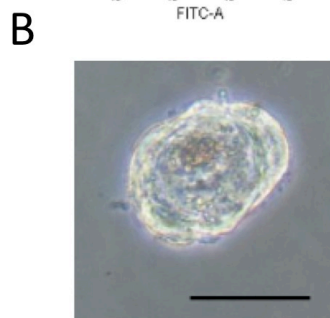
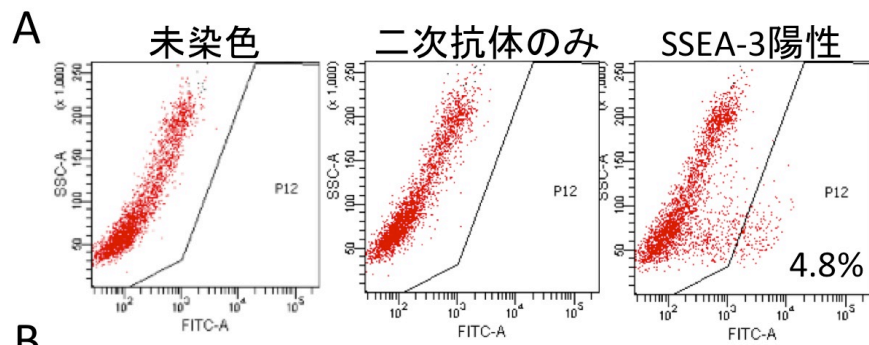


図 2. 無血清培養した Muse 細胞の分離と三胚葉分化の検証

無血清培養した骨髓由来 MSCs より SSEA-3 陽性細胞を FACS で分離した. SSEA-3 陽性細胞は $4.8 \pm 0.2\%$ であった (A). 回収した Muse 細胞を浮遊培養しクラスター作製した (B). 作製したクラスターをゲラチン上で接着培養し, 三胚葉性の細胞マーカー (外胚葉: neurofilament (緑), 内胚葉: cytokeratin 7 (緑), 中胚葉: smooth muscle actin (赤)) で蛍光免疫細胞染色を行った (C). 無血清培養した骨髓由来 MSCs より MACS にて Muse 細胞を分離した. MACS 前の SSEA-3 陽性率は $3.2 \pm 0.8\%$, positive fraction には $71.3 \pm 0.7\%$, negative fraction には $0.6 \pm 0.1\%$ であった ($n = 3$) (D). B のスケールバーは $50 \mu\text{m}$ を示し, C のスケールバーは $100 \mu\text{m}$ を示す.

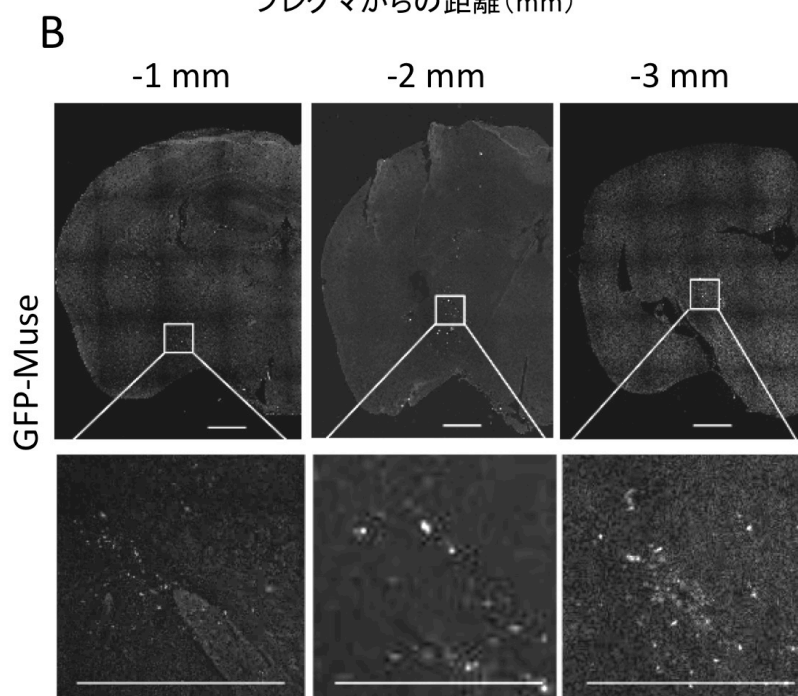
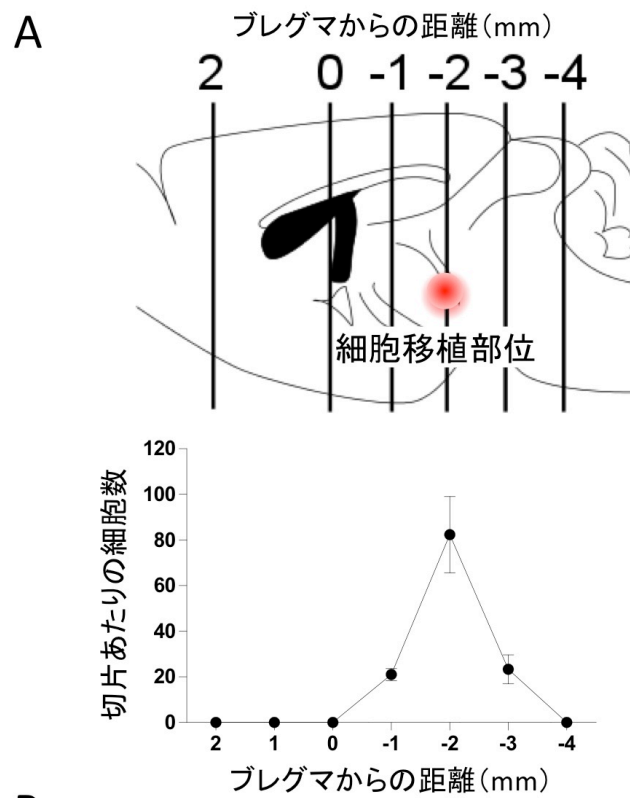


図 3. ラクナ梗塞モデルにおける移植 Muse 細胞の分布

移植後生着した GFP-Muse 細胞を, Bregma を基準にそれぞれのレベルで脳切片を作製し, 一切片あたりの GFP-Muse 細胞をカウントした ($n = 3$) (A).

Bregma を基準に-1 mm から-3 mm までの脳切片では, 多くの Muse 細胞(白)は梗塞巣周囲に生着していた. スケールバーは 1,000 μm を示す.

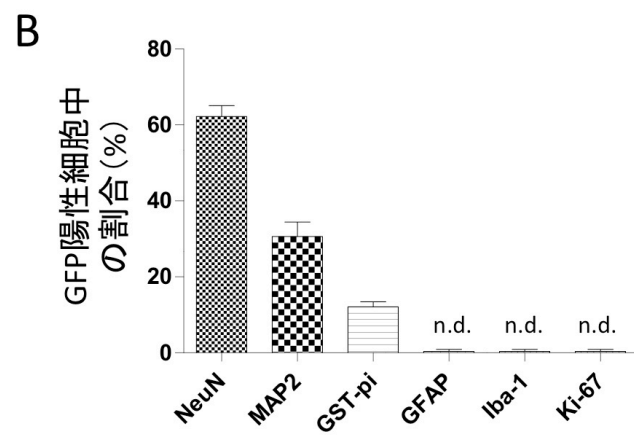
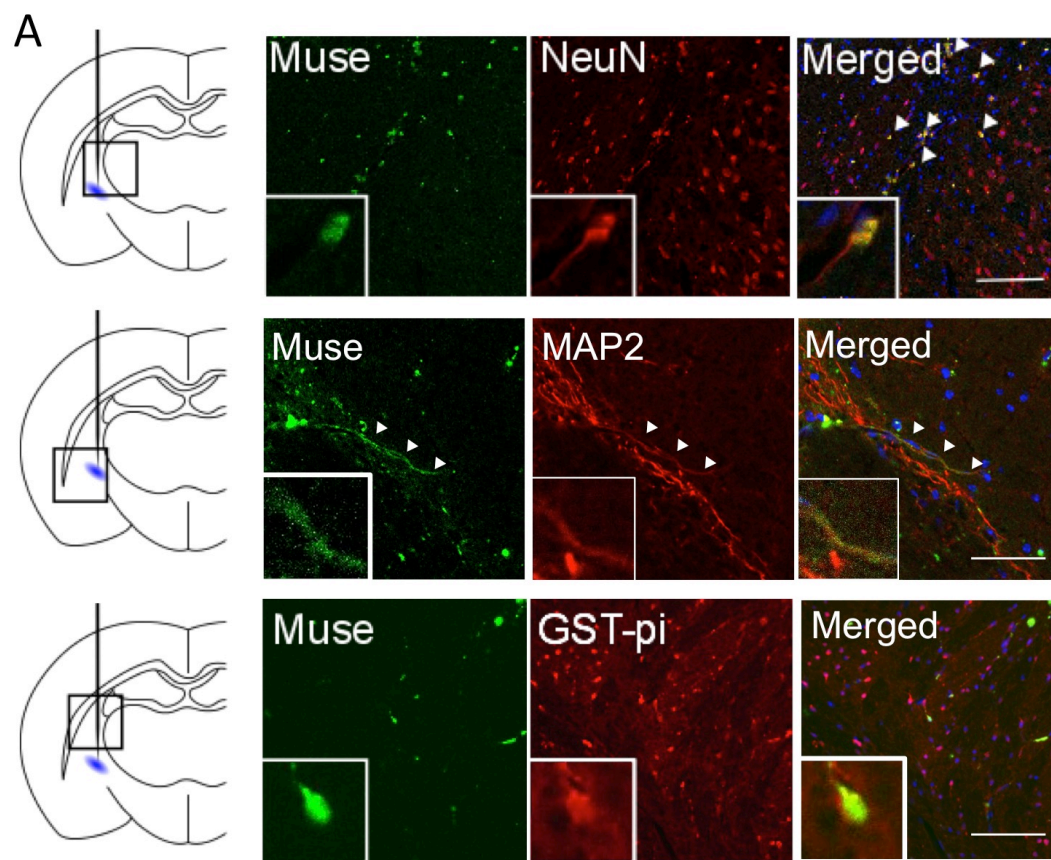


図 4. Muse 細胞の分化

梗塞巣周辺に移植した GFP-Muse 細胞は生着した後、神経系マーカー (NeuN: 神経マーカー, MAP2: 神経マーカー, GST-pi: 乏突起膠細胞マーカー) を発現する細胞 (矢頭) に分化していた (A). GFP-Muse 細胞中における, それぞれの神経系マーカーを発現している細胞の割合を算出した ($n = 3$) (B). 我々が観察しうる限り, GFAP (星状膠細胞マーカー), Iba-1 (ミクログリアマーカー), Ki-67 (細胞増殖性マーカー) 陽性の Muse 細胞はなかった. スケールバーは 1,000 μm を示す. n.d.: not detected.

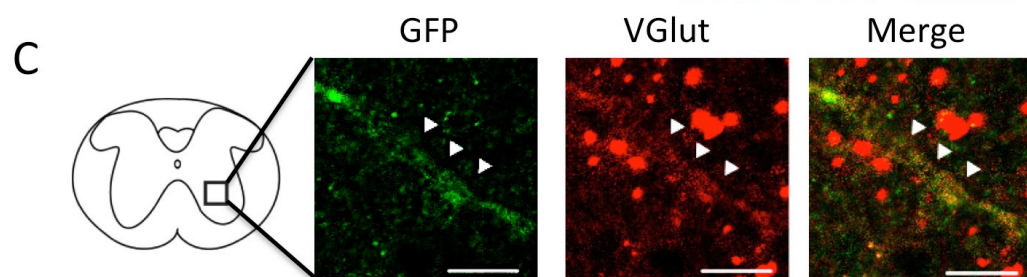
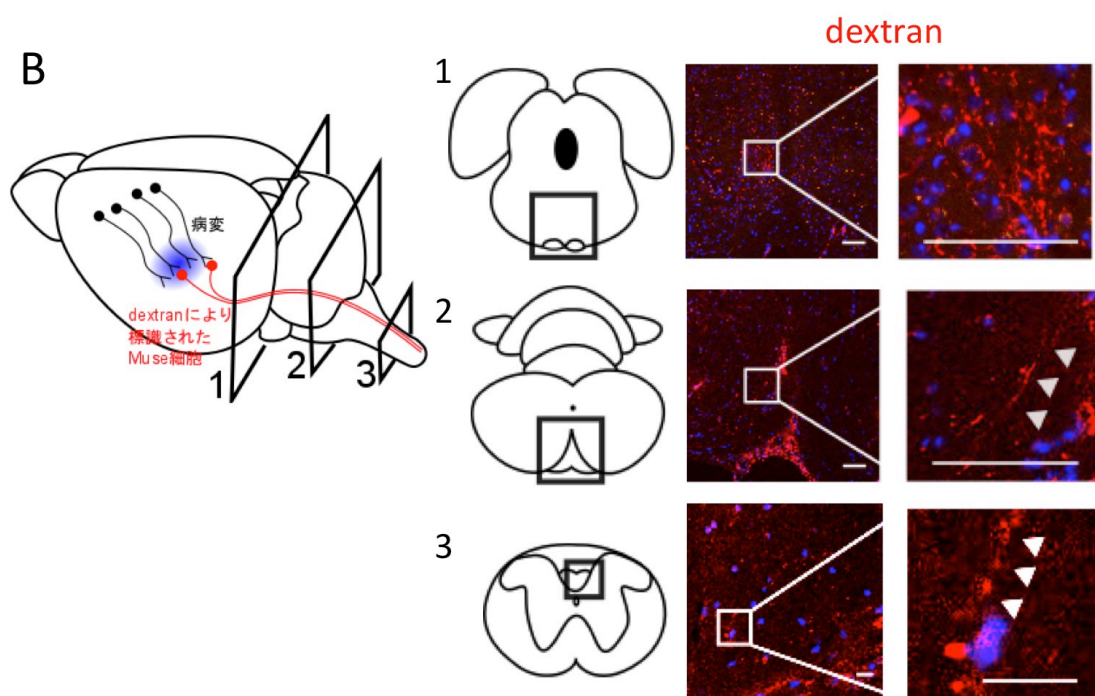
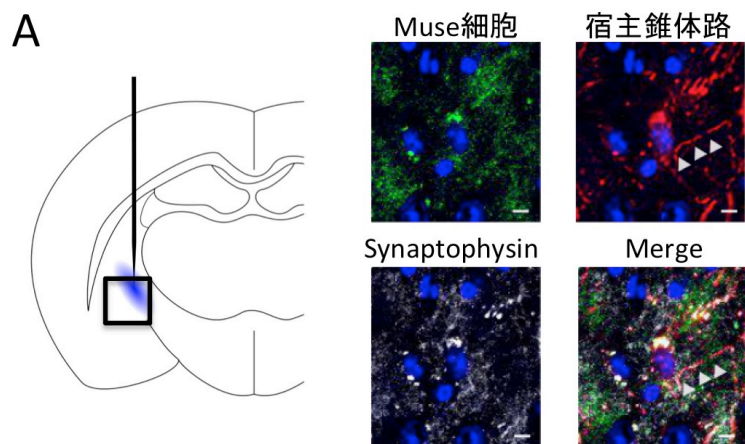


図 5. Muse 細胞による神経回路の再建

梗塞巣の周辺では Muse 細胞（緑）に近接して synaptophysin（シナプス前マーカー）陽性（白）の宿主錐体路（赤）が存在していた（A）. Muse 細胞による錐体路再建のシェーマ（B）. 移植した Muse 細胞を dextran で標識（赤）し，中脳（1），延髄（2），上位頸髄（3）のレベルで Muse 細胞による軸索伸展を評価した（B1-3）. 上位頸髄の脊髓前核にて，VGlut（グルタミン酸作動性神経マーカー）陽性（赤）の Muse 細胞（緑）が検出された（C）. A 及び B-3 のスケールバーは 10 μm を示し，B-1 及び 2 のスケールバーは 10 μm を示す.

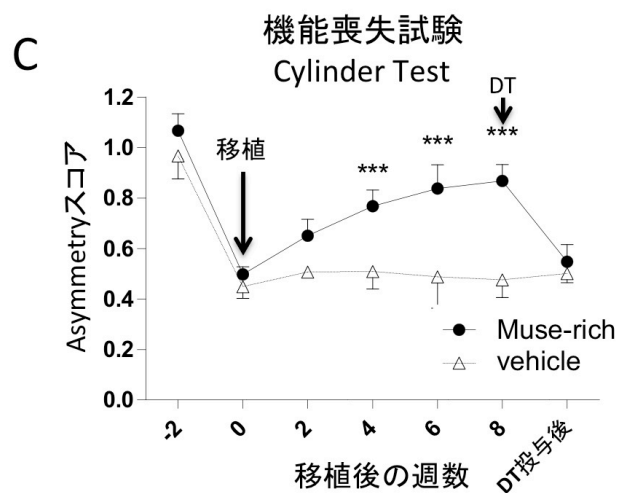
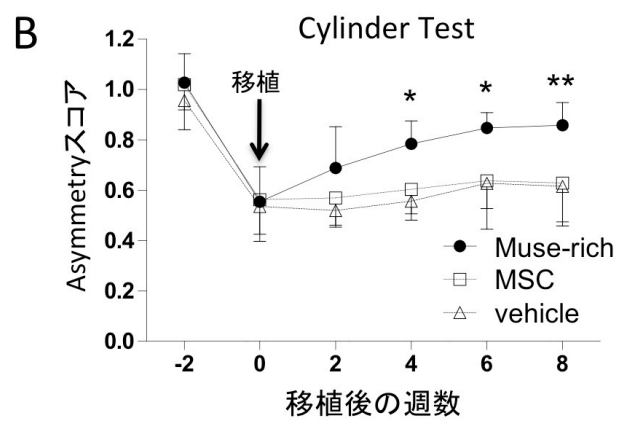
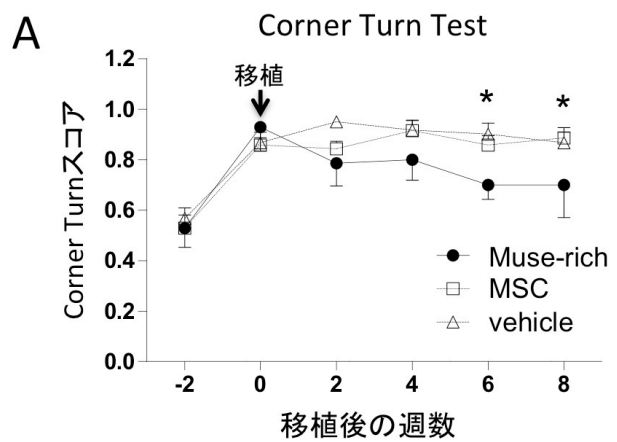


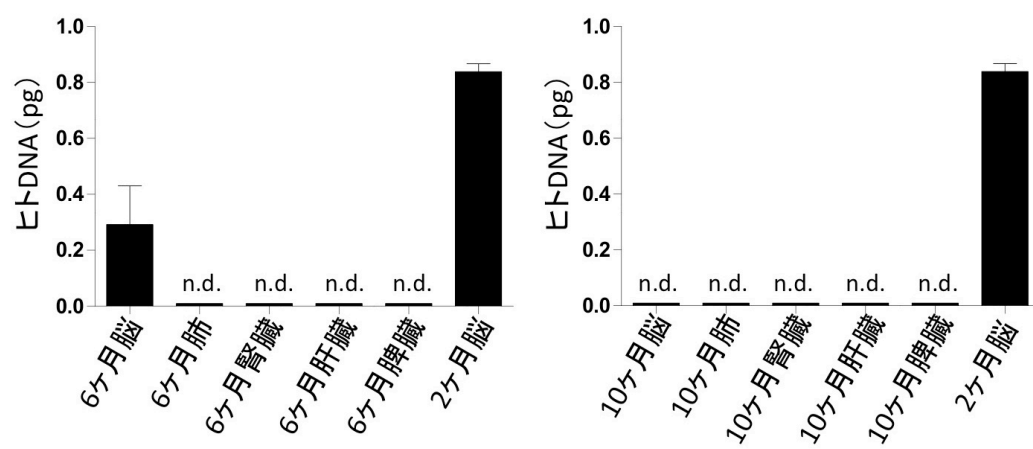
図 6. Muse 細胞による神経機能改善と機能喪失試験

Muse-rich 群では, corner turn test (A) と cylinder test (B) で神経機能改善がみられた. MSC 群及び vehicle 群では機能改善はみられなかった (各群 n = 7).

ジフテリア毒素 (DT) を用いた機能喪失試験では Muse-rich 群のみ DT 投与後に神経機能悪化がみられた (Muse-rich 群; n = 3, PBS 群; n = 4) (C). *p < 0.05,

p < 0.01, *p < 0.001.

A



B

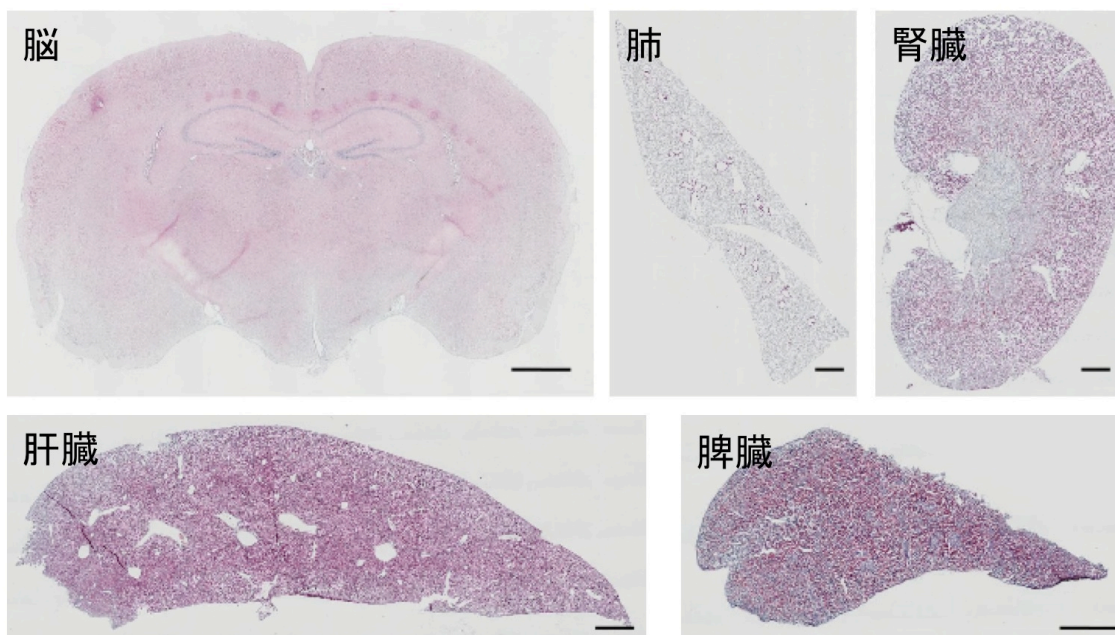


図 7. Muse 細胞の安全性の検証

ヒト特異的 Alu 配列に対するプライマーを用いて Muse 細胞を Q-PCR で検出した。ラクナ梗塞モデルに Muse-rich 細胞移植後 6 ヶ月及び、障害モデルでない通常の SCID マウスに Muse-rich 細胞移植後 10 ヶ月の検体を用いた。陽性コントロールにラクナ梗塞モデルに Muse-rich 細胞移植後 2 ヶ月の脳を用いた。6 ヶ月の脳のみ Muse 細胞が検出された ($n = 3$) (A)。また移植後 6 ヶ月の脳、肺、腎臓、肝臓、脾臓では組織学的に腫瘍形成を認めなかった (B)。スケールバーは 1,000 μm を示す。n.d.: not detected.