

—— 研究助成報告 ——

Muse細胞を用いたてんかん原性治療手法の確立

大 沢 伸一郎¹⁾，新 妻 邦 泰^{1, 2)}，富 永 悌 二¹⁾

要旨：Muse細胞は生体に存在する自然の多能性幹細胞であり，作成に遺伝子導入を必要としない。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，けいれんによる細胞脱落が生じることを組織学的に確認した後，治療介入としてけいれん誘発2日後にMuse細胞投与を行った。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。本細胞は組織内損傷位へ遊走する性質をもつと報告されており，今後行動実験や生化学的評価を追加することで，てんかん原性改善効果の証明が期待される。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2021；32：65-68

Key Words：Stem cell therapy, Muse cell, epileptogenesis, optogenetics

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^{1, 2)}。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。一方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³⁾。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。そのため電氣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⁴⁾。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。

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。

¹⁾ 東北大学大学院 医学系研究科 神経外科学分野
〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1]

²⁾ 東北大学大学院 医工学研究科 神経外科先端治療開発学分野

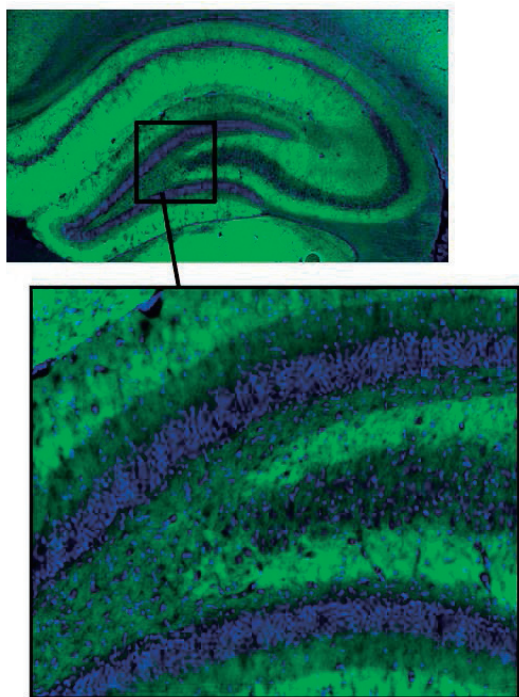


Fig. 1 Thy1.2-ChR2-Venus TG ratの海馬
海馬全体および神経細胞へ非特異的な
ChR2発現を認める。

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 (Fig. 1)。

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（ 3.0×10^6 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。

結果

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 ± 10.5 cells : 175.0 ± 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 (Fig. 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。

考察

本研究においては，光脳内けいれん誘発モデルの組織学的変化を定量的に評価した。さらに同モデルに対してMuse細胞を経静脈的に投与し，脳損傷部位への生着を確認した。

従来のてんかん，けいれんモデルは発作誘発の不安定性，死亡率の高さ，ヒトの発作との相溶性などを改善しつつ発展し，実験目的に沿っ

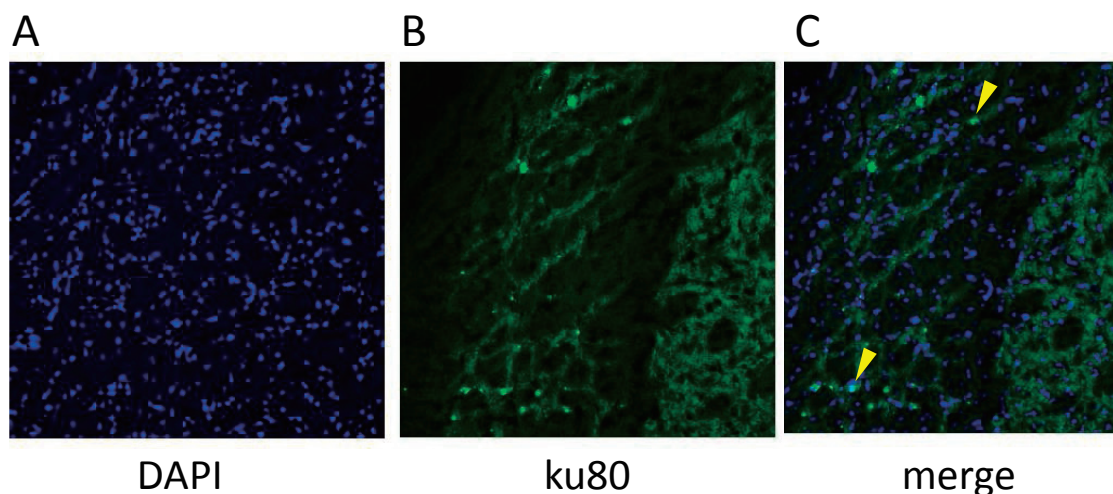


Fig. 2 けいれん後に投与されたMuse細胞の海馬内生着
細胞核染色 (DAPI) とヒト細胞核マーカー (ku80) の重染色により, Muse細胞の生着を認める (merge)。

たモデルが選択されてきた⁴⁾。本実験で用いた光脳内誘発けいれんモデルは, 光感受性イオンチャンネルタンパクを安定して高発現したトランスジェニックラットで実験を行う。その誘発の安定性, 死亡率の低さ, 海馬を焦点とする発作である点など, 他の動物モデルに比して有利な点が存在する。今回発作誘発により組織学的に歯状回のみに有意な細胞脱落を来し, 他のsubdivisionでは有意な細胞減少はないけいれんを惹起することができた。このような比較的軽度の損傷モデルは細胞治療のみならず, 何らかの治療介入を行った際の組織修復評価において有利と考えられる^{3, 4)}。今後, 動物実験において汎用性の高いモデルとして発展が期待される。

またけいれんによる脳損傷急性期に投与したMuse細胞は海馬内に組織生着し, 21週という比較的長期にわたり生存していることを確認した。コントロール群では生着細胞は確認できず, 損傷部位を自己認識して遊走, 生着するとされる同細胞の特徴と合致する所見であった。今後個体数を増やし, 再現性を確認していくことが課題である。

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^{1, 2)}。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。

当科の別実験においてMuse細胞は投与後3-6ヶ月でrejectionされることが示されており(未発表), 免疫抑制による脳内生存期間の延長と機能改善の比較実験を今後計画する。

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)