

## Muse 細胞を用いた重症下肢虚血に対する治療法の研究開発

木谷友哉

京都府立医科大学 循環器内科

### 【研究の背景】

重症下肢虚血には標準治療である血管再建術の非適応症例が多く存在する。そのため細胞治療による血管再生治療が新たな治療選択として期待を集めている。しかし、既存の血管再生治療には侵襲性が高いことや治療効果が限定的であることなど解決すべき課題が残されている。

### 【目 的】

再生医療の新たな細胞ソースとして注目されている内在性組織幹細胞である Muse 細胞の重症下肢虚血に対する治療効果を明らかにすることを目的として研究を実施した。

### 【方 法】

12-14 週齢の雄 BALB/c マウスの左下肢大腿動脈の結紮・切離術により重症下肢虚血モデルを作成した。健常ヒト由来の骨髄由来間葉系幹細胞よりフローサイトメーターを用いて SSEA-3 陽性細胞分画を Muse 細胞として、陰性分画を非 Muse 細胞として単離した<sup>1)</sup>。骨髄単核球は BALB/c マウスの大腿骨より採取した。下肢血流はレーザードップラー血流計を用いて測定した。虚血肢を含めた臓器を固定後に凍結切片を作成し、血管密度は抗 CD31 染色、繊維化は Masson's trichrome 染色にて評価を行なった。画像は蛍光顕微鏡にて取得し、自動定量評価を行なった。mCherry 発現細胞はレンチウイルスベクターより作成したレンチウイルスを細胞に感染させ、フローサイトメーターにて単離した。VEGF 濃度は ELISA を用いて計測した。ヒトゲノム DNA はプローブ法により、種特異的なプライマー・プローブを作成し、血管新生因子 mRNA 発現はインターカーター法によりリアルタイム PCR にて定量を行なった。

### 【結 果】

作成した重症下肢虚血モデルマウスに 30,000 細胞/匹の Muse 細胞、非 Muse 細胞、骨髄単核球を経静脈的投与ないしは虚血肢骨格筋への直接投与を行ない、細胞非投与群と二週間にわたり虚血肢の血流を比較した。すると Muse 細胞投与群では経静脈的投与ないしは虚血肢への直接投与共にほぼ同等の虚血肢の血流改善効果が認められた。また、虚血肢骨格筋の組織学的評価では、Muse 細胞の投与により血管密度の増強と組織繊維化の改善が認められた。次に mCherry にて蛍光標識した Muse 細胞を重症下肢虚血モデルマウスに経静脈的に投与し、一週間後に組織学的評価を行なった。虚血肢骨格筋の虚血境界領域には mCherry 発現 Muse 細胞の生着が確認され、一部の Muse 細胞は内皮細胞マーカー CD31 も陽性であった。さらに経静脈的に Muse 細胞を投与した 1 週間後の重症下肢虚血モデルマウスの組織では、虚血肢、肺、脾臓にヒト特異的ゲノム DNA が検出されたが、非虚血肢や尾部では検出されなかった。次に Muse 細胞および非 Muse 細胞を *in vitro* で培養し、細胞培養液上清中の VEGF 濃度を測定したところ Muse 細胞は通常環境下、低酸素環境下ともに高い VEGF 産生能を示した。経静脈的に Muse 細胞を投与した 2 日後の重症下肢虚血モデルマウスの虚血肢骨格筋では、非 Muse 細胞投与マウスと比較して VEGF 濃度が高値であり、Angpt-1、Pdgfb、Igf-1 などの血管新生因子の遺伝子発現の

上昇も認められた。さらに、重症下肢虚血モデルマウスに 30,000 細胞/匹の Muse 細胞を虚血誘導 1 日後と 3 日後に静脈投与を行った群と 200,000 細胞/匹の骨髄単核球を虚血誘導 1 日後に虚血肢へ直接投与を行った群の虚血肢の血流を比較したところ、Muse 細胞を 2 回静脈投与した群においてより有意な血流改善効果が認められた。

### 【考 察】

本研究により経静脈的に投与された Muse 細胞は障害部位である虚血下肢骨格筋に遊走・生着し、組織中の微小血管密度を増加させ、繊維化を抑制し、虚血肢の血流を優位に改善することが明らかになった。この結果は障害組織の修復促進効果を有する Muse 細胞の投与による効果であると考えられた<sup>2)</sup>。Muse 細胞は HLA-G の発現など免疫調整機構を有しており、本研究における異種移植後の生着および治療効果はこれまでの報告をさらに裏付けるものであると考えられた<sup>3)</sup>。また、Muse 細胞の下肢虚血の機序として Muse 細胞による高い血管新生効果および生着部位での血管内皮への分化が寄与している可能性が示唆された。さらに非侵襲的であり、他家移植が可能な Muse 細胞の特性を活用し、繰り返し投与を実施することで既存の自己骨髄単核球細胞を用いた重症下肢虚血に対する再生医療を上回る治療効果が Muse 細胞を用いた治療では得られる可能性が示唆された。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により重症下肢虚血に対し、Muse 細胞を用いた治療法が有効であることが示された。本研究の成果を元に臨床応用へ向けた研究開発が加速されることが期待される。

### 【参考・引用文献】

1. Kuroda Y, et al. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nat Protoc.* 2013;8(7):1391-415.
2. Kuroda Y, et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(19):8639-43.
3. Yamada Y, et al. S1P-S1PR2 Axis Mediates Homing of Muse Cells into Damaged Heart for Long-Lasting Tissue Repair and Functional Recovery After Acute Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2018;122(8):1069-1083.