

201409002A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

ヒト生体由来多能性幹細胞（Muse細胞）の再生医療への応用に向けた
安全性・有効性の検証

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

ヒト生体由来多能性幹細胞（Muse細胞）の再生医療への応用に向けた
安全性・有効性の検証

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

ヒト生体由来多能性幹細胞 (Muse 細胞) の再生医療への応用に向けた安全性・有効性の検証 出沢 真理	----- 1
---	---------

II. 分担研究報告書

ヒト生体由来多能性幹細胞 (Muse 細胞) の再生医療への応用に向けた安全性・有効性の検証に関する研究 浅田 隆太 清水 忍	----- 8
---	---------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 11
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 12
-----------------	----------

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

ヒト生体由来多能性幹細胞（Muse細胞）の再生医療への応用に向けた
安全性・有効性の検証

研究代表者 出沢真理 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨 Muse 細胞は成人ヒトの骨髄、皮膚などの間葉系組織から多能性幹細胞マーカーと間葉系マーカーの二重陽性細胞として採取可能な生体由来の多能性幹細胞であり、腫瘍性を持たない。3 胚葉性のあらゆる細胞に分化する能力を持ち、そのまま生体内に投与すると損傷部位に生着し、組織に応じて機能的細胞に分化して様々な臓器の再生をもたらす。Muse 細胞を迅速に臨床試験を実現するために、誘導しないそのままの Muse 細胞懸濁液を疾患部位に投与する「医薬品」として開発することを本研究の目的とし、ターゲット臓器を肝臓に絞り非臨床有効性試験、細胞調製の最適化、Muse 細胞製剤の規格の設定、安全性検証等を行った。本年度は急性肝障害モデルを中心に研究を行ったところ、Muse 細胞は肝組織への生着、分化による組織修復を担うが、Muse 以外の非 Muse 細胞にはこのような能力がないことが分かった。Muse 細胞の核型検査を行ったところ、変異等異常は無いことが分かった。Muse 細胞の実用化を推進することにより、幅広い疾患を対象に安定的な効果をもたらす細胞治療が世界に先駆けて実現されると期待される。

研究分担者

浅田隆太

名古屋医療センター・臨床研究センター
臨床研究事業部・研究開発推進室・室長

清水忍

名古屋大学医学部附属病院
先端医療・臨床研究支援センター
病院講師

吉田正順

(株)Clio 社・代表取締役社長

るためには、誘導しないそのままの Muse 細胞懸濁液を疾患部位に投与する「医薬品」として開発が最も現実的であると考えられる。

Muse 細胞はすでにヒトに移植されている骨髄や間葉系細胞に含まれているとはいえ、精製した細胞を投与する際の安全性・有効性評価は必須である。本研究では PMDA の審査官として薬事承認審査等の経験を有する浅田隆太と民間企業（株）Clio 社が研究分担者として参画し、実用化を目指した検証を行う。

A. 研究目的

間葉系幹細胞は 3 胚葉性にまたがる多様な細胞に分化するので ES 細胞のような多能性幹細胞が内在すると推察されていた。今回その説明となる Muse 細胞が発見された。Muse 細胞は多能性幹細胞としての特性を備えているが腫瘍性が無いところが最大の利点である。

誘導せずに、そのまま生体内に投与すると損傷部位に生着し、機能的細胞に分化して様々な組織再生をもたらす (PNAS, 2010)。また特定の誘導をかけると神経、肝細胞、骨細胞などに 90%以上の高率で誘導も可能である。従っていくつかの利用方法が想定できるが、迅速に臨床試験を実現す

ターゲット臓器として肝臓を選択する。血中アルブミンやビリルビンなどの機能改善や有効性を計るための客観的指標があり、有効性・安全性を計るためのパラメーター設定が明確であるためである。

本プロジェクトでは、①有効性検証の指標設定、②非臨床有効性試験（急性と慢性の肝疾患モデルを用いた有効性検証、用量探索、投与速度の最適化）、③細胞調製の最適化、④Muse 細胞製剤の規格の設定、⑤非臨床安全性評価を実施する。①、③、⑤の一部（in vitro の安全性評価）はほぼ終了しており、H24～H25 に②、③、④を実施し、その後、⑤（in vivo の安全性評価を中

心)を行う。また、薬事戦略相談を適宜利用して、安全性が高く再生効果を有する Muse 細胞を出来る限り早く臨床試験に移行できるように進める。

B. 研究方法

【慢性肝障害モデルを用いたヒト Muse 細胞の有効性評価、用量探索試験、投与速度の最適化】

SCID マウスに四塩化炭素 0.5 mg/kgを 3~4 日ごとに 8 週まで腹腔内投与し、慢性モデルを作成する。(出沢)

ヒト骨髄間葉系幹細胞由来の Muse 細胞と非 Muse 細胞を SSEA-3 を指標に分収し尾静脈から投与する群と、さらに同量のリン酸バッファー (PBS)の投与群の 3 群を作成する。また移植細胞数を 2 万と 5 万に絞り、単発の投与と複数回の投与における有効性の比較検討を行う。(出沢、吉田)

8 週をエンドポイントとし、血清アルブミン量、総蛋白量、ビリルビン値の他、体重、一般血液、血液生化学、全身状態、組織学的検討による線維化領域の算出、などによって有効性評価を 8 週で行う。(吉田、出沢)

8 週目において移植細胞の生着率、分布、分化、を免疫組織科学によって検証する。ヒト Muse、非 Muse 細胞の検出はヒトミトコンドリア抗体、ヒト golgi 体抗体を用いて検出する。肝細胞への分化はこれら 2 種の抗体染色に加え、ヒトアルブミン、ヒト anti-trypsin、ヒト特異的な HepPar-1 抗体との二重染色を行い、ヒト Muse、非 Muse 細胞の生着と分化を調べる。(吉田、出沢)

機能的分化能として、アルブミン、解毒作用にかかわる CYP1A2, 糖代謝酵素である Glu-6-Pase のヒトサブタイプの発現が SCID マウス肝臓で検出されるかを RT-PCR を用いて行う。また組織学的によるヒトミトコンドリア、ヒト Golgi 体抗体でのヒト細胞生着をさらに裏付けるために、RT-PCR でヒトアルブミンのシグナル検出も併せて行う。プローブと条件は下記の通りである。human β -actin (annealing temperature (Tm) 55 °C, 40 cycles (C)) sense: 5' - AGGCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACACC-3' and

antisense: 5' -AAGTCCTCGGCCACATTGTGAACTTTG-3' ; mouse β -actin (Tm 55 °C, 32C) sense: 5' -ACCCTAAGGCCAACCGTAAAAAGATGAC-3' and antisense: 5' -CCGCTCGTTGCCAATAGTGATGACCT-3' ; human albumin (Tm 54 °C, 36C) sense: 5' -CACAAGCCCAAGGCAACAAAA-3' and antisense: 5' -AGTGCTGTACCACTCTATTAG-3' ; human cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide2 (CYP1A2) (Tm 58 °C, 36C) sense: 5' -GGCACTTCGACCCTTACAAT-3' and antisense: 5' -TTCAACCAGAGGTTCTCTGTG-3' ; human glucose-6-phosphatase (Glc-6-Pase) (Tm 58 °C, 36C) sense: 5' -GAAAGATAAAGCCGACCTACA-3' and antisense: 5' -GCAGCAGATAAAATCCGATG-3' 。

(出沢)

ホスト SCID マウスの肝細胞との fusion の有無を FISH 法を用いて検証する(浅田、清水、出沢)。

【肝障害モデル以外の動物モデルにおける薬効薬理試験】

肝障害モデルでは機能評価が極めて困難であるので、Muse 細胞の薬効薬理試験(効果試験)は脳梗塞、腎不全モデルで検討する。投与する細胞はヒト骨髄由来 Muse 細胞、対照群として非 Muse 細胞を用いる。

脳梗塞はラットの中大脳動脈を 45 分虚血再還流し、2 日後 Neurological severity score (NSS)で 7 点以上の症状を有するものをモデルとして採択する。細胞は梗塞を起こした皮質の下記 3 ヲ所にそれぞれ 1 万ずつ、合計 3 万細胞を投与する。(1) [from bregma: anterior (A) +2.0 mm, right (R) +2.0 mm, ventral (V) +4.0 mm], (2) [from bregma: A -1.0 mm, R +3.0 mm, V +4.5 mm], (3) [from bregma: A -4.0 mm, R +3.0 mm, V +4.5 mm]。コントロールとして PBS 投与群を作成する。移植後、84 日をエンドポイントとし、一日おきに免疫抑制剤 FK506 を 0.5 mg/kg投与した。評価は NSS, rotarod などの機能評価と共に脳内での細胞生着、神経分化を組織科学的に評価する。(浅田、清水、出沢)。

腎不全モデルは doxorubicin hydrochloride (DOX) (53 mg/kg body) を SCID マウス尾静脈に投

与し作成する。7 日後、Muse、非 Muse 細胞を 2 万細胞尾静脈から投与する。コントロールとして PBS 投与群を作成する。移植後、7 週で血中クレアチニン、クレアチニンクリアランス、BUN、total protein を計測する。また移植細胞の腎臓内への生着、分化を組織科学的に検証する。(浅田、清水、出沢)。

【細胞調製の最適化、 Muse 細胞製剤の規格の設定】

Muse 細胞は SSEA-3 という ES 細胞などの多能性細胞表面マーカーとして知られている抗体を使って分離することができる (Kuroda et al., PNAS, 2010)。そこで FACS, MACS などの方法を用いて SSEA-3 陽性の Muse 細胞を採取し、調整の最適化が可能であるかどうか検討する。

Muse 細胞はそもそもストレス耐性細胞として同定された (Kuroda et al., PNAS, 2010)。SSEA-3 による分収以外の方法として複数のストレスを組み合わせ、Muse 細胞率を上昇させる条件を検討し、さらには組織修復における機能性を解析する (吉田、浅田、清水、出沢)。

【薬事戦略相談】

H25 年 10 月に PMDA で薬事戦略相談を行った (浅田、清水、出沢、吉田)。H26 年には治験デザイン、Muse 細胞製剤の品質等について対面助言面談を目指す。

(倫理面への配慮)

東北大学の遺伝子組換え実験安全専門委員会と動物実験専門委員会の指針に従って研究計画書を提出し、機関承認を得た後に実験を実施しており、今後も承認を得た計画のみを実行する。

ヒト間葉系細胞はスイス Lonza 社やアメリカの ATCC などから購入した細胞を用いる。ヒト各種組織、臓器などは同じく購入によって入手したものを実験に用いる。

遺伝子導入実験は「東北大学 遺伝子組み換え実験計画承認」を得ている (研研 76-20-35 号)。また動物実験委員会の承認に関しては 2011 医動-282、2011 医動-283、2011 医動-284、2011 医動-285 にて承認を得た上で実験を行っている。実験におけるヒト細胞使用に関しては「東北大学医学部・医学系研究科倫理委員

会」より「臍帯に内在する幹細胞の探索と特性解析研究 (2013-1-370 号)」で承認をすでに受けている。

C. 研究結果

【慢性肝障害モデルを用いたヒト Muse 細胞の有効性評価】

慢性モデル (肝線維化モデル) : 慢性肝障害モデルでは四塩化炭素 0.5ml/kg を週に 2 回腹腔内投与を 8 週間続けると、線維化を起し肝細胞の減少を見る。この段階で 2 万、5 万の Muse 細胞を投与しても有効な機能改善、すなわち血中総ビリルビンの低下と血清アルブミン上昇は確認されず、また細胞の有効な肝臓への生着もみられなかった。従って破壊が進み、「場の論理」が荒廃し固まってしまった慢性期にそのまま血中に Muse 細胞を投与しても、有効性は期待できないことが示唆された。

一方、四塩化炭素投与開始から 2 週、4 週、6 週の 3 ポイントで 5 万の Muse 細胞を投与することで、血中総ビリルビンの低下と血清アルブミン上昇が有意に確認された。そこで以下の結果は 2 週、4 週、6 週の 3 ポイントで 5 万の Muse 細胞を投与する実験系で行うこととした。

Muse 細胞の生着率 : ヒト Golgi 体抗体を用いて細胞を検出したところ、1 mm² 肝臓組織中の全細胞における比率が Muse 群では 5.78±2.39% であり、非 Muse 群は 0.27±0.12% であった。両者の間に統計的有意差があり (p<0.001)、Muse 群は非 Muse 群よりも ~21 倍高い生着効率が認められた。また非 Muse 群はそもそも 8 週において細胞がほとんど肝臓内に残っていないことも改めて確認された。

血中総ビリルビンは Muse 群 (0.26±0.05 mg/dl)、PBS 投与の vehicle 群 (0.74±0.05 mg/dl, p<0.001)、非 Muse 群 (0.48±0.12 mg/dl, p<0.001) であり、統計的有意差をもって Muse 群が vehicle、非 Muse 群よりも改善していた。血中アルブミンも同様の傾向を示し Muse 群 (2.99±0.11 g/dl)、vehicle 群 (2.65±0.08 g/dl, p<0.001)、非 Muse 群 (2.81±0.06 g/dl, p<0.01) であった。

Sirius red などのコラーゲンを染色する方法で線維化を調べたところ、Muse 群では統計的有意差をもって顕著に線維化が減少することが確認された。Muse 群における線維化面積は 0.75 ± 0.15 (total area per section) であり、vehicle 群 (2.91 ± 0.35) や非 Muse 群 (1.86 ± 0.13) よりも遙かに低い値を示し統計的有意差 ($p < 0.001$) が確認された。Muse 群は vehicle 群に比べ 75%もの線維化抑制をもたらしていたといえる。

組織学的解析によって肝臓に生着した Muse 細胞は肝細胞に分化していることが示唆された。ヒトミトコンドリア、ヒト Golgi 体によって検出された Muse 細胞のうち、HepPar-1 は $71.1 \pm 15.2\%$ 、human albumin は $54.3 \pm 8.2\%$ 、human anti-trypsin は $47.9 \pm 4.6\%$ が陽性を示した。

FISH 解析によって生着した Muse 細胞のうち、ホストのマウス肝細胞と fusion していることが示唆されたのは 2.6%であった。このことから 97~98%の生着した Muse 細胞は fusion することなしに肝細胞に分化していることが示唆された。

RT-PCR において Muse 群の肝臓ではヒトアルブミン、ヒト CYP1A2、ヒト Glu-6-Pase がヒト beta-actin と同様に検出された。一方非 Muse 群ではこれら 4 つのシグナルはいずれも検出されなかった。このことから RT-PCR レベルにおいてもヒトのシグナルが非 Muse 群で検出されないことから、細胞は 8 週の段階でほとんど肝臓内に残っていないことが裏付けられる。

【肝障害モデル以外の動物モデルにおける薬効薬理試験】

脳梗塞モデル：Muse 細胞投与後、70 日を過ぎてから NSS、rotarod において vehicle、非 Muse 群との統計的有意差を持った顕著な機能回復が確認された。組織学的検討においては、Muse 細胞は広く梗塞を受けた部位の周辺領域、peri-infarct area に生着が確認されたが、非 Muse 細胞はほとんど確認されなかった。マーカーの発現を検討したところ、神経の一般的なマーカーである MAP-2 が $64.6 \pm 0.6\%$ 、NeuN が $32.4 \pm 2.4\%$ 、また介在ニューロンマーカー calbindin が

$27.5 \pm 2.5\%$ 、さらにグリア細胞である oligodendrocyte マーカー GST- π が $25.0 \pm 0.8\%$ であった。一方アストロサイトマーカー GFAP は確認されなかった。このことから 84 日までホスト脳内に残った Muse 細胞は多くが神経細胞に分化することが示唆された。

腎不全モデル：7 週において Muse 群におけるクレアチンクリアランスの改善が確認された。

Muse 群では $76.9 \pm 8.7 \mu\text{l}/\text{min}$ で vehicle 群では $50.4 \pm 6.1 \mu\text{l}/\text{min}$ で両者の間には $p < 0.05$ の統計的有意差があり、Muse 群では 45%の改善率となった。一方非 Muse 群では vehicle との有意差がなかったことから改善が顕著でないと言える。一方血漿クレアチニン、BUN、総蛋白では 3 群間に有意差は無かった。腎臓内に生着した Muse 細胞は足細胞マーカー WT-1、podocin、Mesangial 細胞マーカー megsin、毛細血管マーカー CD31 を発現していた。

【細胞調製の最適化、Muse 細胞製剤の規格の設定】

閉鎖系培養でヒト骨髄間葉系幹細胞を培養することで Muse 細胞の比率を上げることが分かった。さらには振盪などのストレス条件を与えることで一定の比率を超える Muse 比率を有する細胞群を得る事が分かった。

【薬事戦略相談】

2014 年 12 月に対面助言 第一回目を PMDA で実施した。閉鎖系培養とストレスを組み合わせることで Muse 細胞の基となる骨髄間葉系幹細胞での Muse 細胞の濃縮、比率向上の方法を用いて製剤化する方針とした。また安全性試験の具体的な項目の設定に関して合意に至った。なお、治験デザインに関する対面助言は今後、実施予定である。

D. 考察

Muse 細胞は骨髄、脂肪、臍帯、皮膚などのアクセスしやすい組織から SSEA-3 表面マーカーで分取可能で、またストレス耐性であることからストレスの組み合わせなどにより比率を高めることが可能である。最大の特徴は、ES、iPS 細胞では必須とされる移植前の分化誘導を必要とせず、上

述のソースから分取し、そのまま血中に投与するだけで有効な再生治療効果をもたらすことができることである。これは Muse 細胞に備わる特異な性質、傷害部位への遊走と傷害組織から出されるシグナルに応じて自発的に組織にマッチする細胞への分化能力が備わっているためである。このためにコストと時間がかかり、ハードルが高いとされてきた再生医療を大きく変えることができると期待されている。

本年度の研究結果によって、慢性肝障害モデルにおいて機能回復、線維化抑制などの効果が統計的有意差を持って示され、また Muse 細胞は一般の骨髄間葉系幹細胞とは異なり 8 週という長期にわたってホストの肝臓内に肝細胞として生着・残存すること、さらにはマウスの肝臓内においてヒト肝細胞のもつ機能性を備えていることが示唆された。

肝臓はそもそも 2 核以上の多核の細胞が正常でも存在し、肝細胞同士の fusion が起こる組織である。今回、FISH で検証したところ、少なくとも 8 週において Muse 細胞はそのほとんどが fusion によって見せかけ上肝細胞になっているようにみえるのではなく、機能的な肝細胞に分化を遂げてホスト肝臓内に存在することが示唆された結果は大きい。

慢性肝障害モデルだけではなく、脳梗塞、腎不全モデルにおいても Muse 細胞の生着、機能回復がしめされたことは Muse 細胞の汎用性が示唆される。いずれのモデルにおいても共通していたことは、Muse 細胞は傷害組織に長期にわたり残存するが非 Muse 細胞はしない、ということ、また肝臓、脳、腎臓いずれも自発的にその組織に応じた細胞に分化することである。このような機構の解明は今後必要であると思われる。

Muse 製剤を作成することは本プロジェクトの目標の一つであるが、現在世界中で使われている Millipore 社、BioLegend 社等の SSEA-3 は出所が一つのハイブリドーマに由来すること、しかしながらそのトレーサビリティが追えないことから、実際に臨床試験用の Muse 製剤作成には使えないことが判明した。一方今回の実験で、培養条件を調整することで Muse 細胞の比率が一定程度以上

に向上されることも分かった。ストレスであれば GMP 基準を満たした上で作成することも可能であるので実用面では利便性があると考えられる。

間葉系幹細胞は肝硬変、心筋梗塞、脊髄損傷、脳梗塞、変形性関節症などの多岐にわたる疾患において、ドイツ、イギリス、アメリカを含め、世界中で臨床試験が展開され一定の効果を挙げている。もたらす効果として、間葉系幹細胞の産生するサイトカインによる保護効果の他に、投与したごく一部の細胞が損傷を受けた組織に生着して分化し、失われた細胞を replace する再生効果が報告されている。ただサイトカイン効果は一過性であり、持続的な機能回復は再生効果が担う。このような細胞の探索が世界中で進められていたが、今回 Muse 細胞が再生効果を担うことが明らかになったことから、細胞治療のパラダイムシフトがもたらされる可能性があると考えられる。

E. 結論

急性・慢性肝障害、脳梗塞、腎不全モデルを用いて、血管から投与された Muse 細胞が傷害組織に遊走、生着し、さらに機能的な肝細胞、神経細胞、腎糸球体細胞に自発的に分化すること統計的有意差を持った機能回復がもたらされることが示唆された。Muse 細胞は現在世界中で患者へ投与されている間葉系幹細胞の数パーセントに相当するが、この細胞を有効に活用することで、安全で再生効果の高い治療が低コスト、短時間で提供できる可能性が示唆された。今後、これらのデータや現状を踏まえ、さらに PMDA との面談をさらに進めて行きたいと考えている。

F. 危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. *Cells Tissues Organs*. 2015 . [Epub ahead of print]

- Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, Shichinohe H, Houkin K, Dezawa M, Kuroda S. Therapeutic Effects of Human Multilineage-Differentiating Stress Enduring (MUSE) Cell Transplantation into Infarct Brain of Mice. PLoS One. 10(3): e0116009. 2015.
 - Mannoji C, Koda M, Kamiya K, Dezawa M, Hashimoto M, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived neuroregenerative cells promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. Acta Neurobiol Exp (Wars). 74(4):479-88. 2014.
 - Wakao S, Akashi H, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues. Spinal Surgery (in press).
 - Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. Pathology International. 64(1):1-9, 2014.
 - Y. Kuroda, M. Dezawa. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine. Anat Rec. 297(1):98-110, 2014.
 - Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. Stem Cells Dev. 23(7):717-28, 2014.
 - 若尾昌平、出澤真理「体性幹細胞と Muse 細胞の位置づけ」*膝島の再生医学* 73-78, 2015.
 - 出澤真理「生体内多能性幹細胞：Muse細胞」*脳神経系の再生医学* 19-26, 2015
2. 学会発表
- Mari Dezawa Clinical Applications of Stem Cells, Discovery of Muse Cells shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, Singapore, Feb. 2015.
 - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第 5 回先進医療開発コアセンターシンポジウム, 東北大学, 12 月, 2014.
 - 出澤真理 Discovery of Muse Cells shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, 日仏再生医学シンポジウム, 東京, 11 月, 2014.
 - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第 56 回日本先天代謝異常学会, 仙台, 11 月, 2014.
 - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 弘前再生医療講演会, 弘前大学, 11 月, 2014.
 - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第 31 回細胞療法研究会, 愛知医科大学, 11 月, 2014.
 - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 未来医療開発プロジェクト (MIAST) シンポジウム, 岩手医科大学, 8 月, 2014.
 - 出澤真理 腫瘍性の無い生体由来多能性幹細胞 Muse 細胞の発見：ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 第 14 回日本外傷歯学会, 大阪歯科大学, 7 月, 2014.
 - 出澤真理 再生医療研究の現状と Muse 細胞の将来展望, 特許庁 平成 26 年度先端技術研修, 東京, 6 月, 2014.
 - 出澤真理 骨髄と結合組織を足場とする多能性幹細胞 Muse 細胞の担う生体内修復機能, 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 名古屋

屋, 6月, 2014.

- 出澤真理 Muse 細胞発見のもたらす間葉系幹細胞のパラダイムシフト, 第 55 回日本神経学会, 福岡, 5月, 2014.
- Mari Dezawa Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure., Seminar at Nelson Biological Labs in Rutgers, Rutgers, The State University of New Jersey, USA., April, 2014.
- Mari Dezawa Making three dimensional human colored skin by using Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, Stem Cells and Tissue Injury Platform Session at EB 2014, San Diego Convention Center, USA., April, 2014.
- Mari Dezawa Discovery of Muse Cells, Novel Pluripotent Stem Cells That Reside in Human Mesenchymal Tissues: Implications for New Concepts of Regenerative Homeostasis and Stem Cell Failure, PPSSC 2014, Taipei, Taiwan, April, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

ヒト生体由来多能性幹細胞（Muse細胞）の再生医療への応用に向けた
安全性・有効性の検証に関する研究

研究分担者 浅田 隆太
名古屋医療センター臨床研究センター臨床研究事業部研究開発推進室 室長
研究分担者 清水 忍
名古屋大学医学部付属病院先端医療・臨床研究支援センター 病院講師

研究要旨

ヒト骨髄由来のヒト生体由来多能性幹細胞（Muse 細胞）を再生医療等製品として開発するための予備データを取得することを目的に、Muse 細胞の正常ラットにおける単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験を実施した結果、ヒト Muse 細胞による一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査において、毒性は認められなかった。一方、投与したヒト Muse 細胞由来の DNA は、投与 4 週後の 1 例で大動脈に認められた以外は、2 週後、4 週後、8 週後時点で検出されなかった。

A. 研究目的

研究代表者の出沢により発見された Muse (Multilineage-differentiating Stress Enduring) 細胞は、ヒト生体内に存在し、あらゆる細胞に分化する能力を有する多能性幹細胞であることから、様々な疾患に対する組織再生や機能回復をもたらすことが期待される。既に世界各国でヒトに移植されている骨髄や間葉系細胞にも Muse 細胞は含まれていることから、一定の安全性は示唆されていると考えられる。しかし、この Muse 細胞を再生医療への応用に向けて開発、つまり、Muse 細胞製剤を「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（昭和 35 年 8 月 10 日 法律第 145 号（平成 26 年 11 月 27 日 法律第 122 号）（以下、医薬品医療機器等法）における「再生医療等製品」として開発を行うためには、臨床試験の実施前に「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について」（平成 22 年 2 月 19 日 薬食審査発 0219 第 4 号）（ICH M3 ガイドライン）を参考に、必要な非臨床試験を実施する必要がある。その中の一つとして、投与時の分布及び安全性の確認を行う必要がある。

一方、ヒトの細胞を用いた非臨床試験を実施するためには、拒絶の問題を解決する必要がある。しかし、Muse 細胞は免疫担当細胞に存在する HLA クラス II 抗原をほとんど発現していないため、同種移植が可能と考えられていること、また、ある疾患モデル動物において、免疫抑制剤を使用しなくても、ヒト Muse 細胞投与により生着することを確認していることから、免疫不全動物又は免疫抑制剤を使用せずに、ヒト Muse 細胞を用いた非臨床毒性試験の実施が可能と考えた。

そのため、正常ラットにおけるヒト Muse 細胞の単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験を実施し、Muse 細胞の安全性を評価することとした。

B. 研究方法

株式会社イナリサーチに委託し、実施した。

本試験の毒性評価項目については、「単回投与及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」（平成 5 年 8 月 10 日 薬新薬第 88 号）（ICH S4 ガイドライン）及び「反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について」（平成 11 年 4 月 5 日 医薬審第 655 号）（ICH S4A ガイドライン）を一部参考に実施した。

雄性ラットを2週観察群、4週観察群、8週観察群に分けて、ヒト Muse 細胞 1×10^7 個/kg を単回静脈内投与し、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球色素量、平均赤血球色素濃度、網赤血球率、網赤血球数、血小板数、白血球数、白血球分類率、白血球分類数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間）、血液生化学的検査（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、クレアチンキナーゼ、グルコース、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、総コレステロール、中性脂肪、リン脂質、無機リン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、クロール、総蛋白、アルブミン、アルブミン・グロブリン比）、尿検査（尿量、色調、比重、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、沈渣、ナトリウム、カリウム、クロール）、剖検（心臓、大動脈（胸部）、胸骨、胸骨骨髓、大腿骨、膝関節、大腿骨骨髓、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、気管、気管支、肺、舌、顎下腺、大舌下腺、耳下腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、パイエル板、盲腸、結腸、直腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、凝固腺、脳、脊髄（胸部）、坐骨神経、眼、視神経、ハーダー腺、骨格筋（大腿筋）、皮膚（腹部）、投与部位（尾））、器官重量（心臓、胸腺、脾臓、気管支、肺、顎下腺、大舌下腺、肝臓、腎臓、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、凝固腺、脳）、病理組織学的検査（剖検組織に加え、剖検で異常の認められた器官・組織）が実施された。また、剖検が実施された組織でヒト Muse 細胞由来の DNA の測定が行われた。

なお、DNA の測定に関し、事前に測定方法のバリデーションが行われている。

（倫理面への配慮）

本試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施された。なお、試験実施施設はAAALAC International により認証されている（認証番号：001107）。

C. 研究結果

いずれの動物においても、死亡は認められず、一般状態の変化、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査、生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査のいずれの所見にも、ヒト Muse 細胞投与に関連した変化は認められなかった。

体内分布に関しては、投与後4週の検査では、1例の大動脈で総 DNA 量あたりのヒト DNA 量が 0.09237 pg/ng であったが、その他投与後2週、4週、8週時の試料ではヒト DNA は検出されなかった。

D. 考察

正常ラットにヒト Muse 細胞 1×10^7 個/kg を単回静脈内投与し、8週後までの一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査において、ヒト Muse 細胞による安全性上問題となる所見は認められなかった。しかし、組織中にヒト DNA は、投与後4週の1例の大動脈以外に検出されなかったことから、毒性評価のための十分な曝露ができていない可能性も否定できない。

一方、免疫不全マウスにおいてヒト Muse 細胞 1×10^4 個/body 単回静脈内投与時の体内分布を確認した際には、投与2週後においても肺にヒト DNA が相当量存在することを確認しているため、今回も同様に、投与2週後に少なくとも肺でヒト DNA が確認できると考えていた。しかし、今回、静脈

内投与 2 週後のいずれの組織の試料でもヒト DNA が検出されなかった。これは、適切に投与できていなかったのか、免疫不全の有無によるのか、マウスとラットの種差によるものであるかは、不明である。

本検討結果を踏まえ、今後実施する毒性試験及び分布試験においては、静脈内投与 2 週後よりも早い段階でヒト DNA の組織分布を確認し、Muse 細胞の全身曝露を確認すると共に、各種毒性所見の有無を検討する必要があると考える。また、今後、臨床試験を可能な限り早期に実施できるようにするために、薬理試験成績を踏まえ、「「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について」（平成 22 年 2 月 19 日 薬食審査発 0219 第 4 号）（ICH M3（R2）ガイドライン）、「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日 薬食発 0907 第 2 号）、「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日 薬食発 0907 第 3 号）等を参考に、実際に製造販売する製造方法で製造した Muse 細胞製剤を用いて非臨床試験（薬理試験、薬物動態試験、安全性薬理試験、単回投与毒性試験等）を実施することが必要である。なお、平成 26 年 12 月 16 日に医薬品医療機器総合機構（PMDA）と薬事戦略相談（対面助言）（戦確 P27 号）を実施し、再生医療等製品としての開発に向けた非臨床安全性試験の実施項目について確認しており、今後、PMDA の助言を踏まえた非臨床試験の充実を諮っていくこととする。

E. 結論

正常ラットにヒト Muse 細胞を投与しても、組織中にヒト DNA はほとんど検出されず、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査において、ヒト Muse 細胞の影響が認められないことが確認できた。

今後、正常動物を用いたヒト Muse 細胞の毒性試験及び分布試験を実施する場合には、単回静脈内投与 2 週後よりも早い時期に評価を行う必要があると考える。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wakao S, Matsuse D, <u>Dezawa M.</u>	Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration.	Cells Tissues Organs	—	[Epub ahead of print]	2015
Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, et al	Therapeutic Effects of Human Multilineage-Differentiating Stress Enduring (MUSE) Cell Transplantation into Infarct Brain of Mice.	PLoS One	10(3)	e0116009	2015
Mannoji C, Koda M, Kamiya K, et al	Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived neuroregenerative cells promotes functional recovery after spinal cord injury in mice.	Acta Neurobiol Exp (Wars)	74(4)	479-88	2014
Wakao S, Akashi H, <u>Dezawa M.</u>	Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues.	Spinal Surgery	—	In Press	2014
Wakao S, Akashi H, Kushida Y, <u>Dezawa M.</u>	Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues.	Pathology International	64(1)	1-9	2014
Y. Kuroda, <u>M. Dezawa.</u>	Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine.	Anat Rec.	297(1)	98-110	2014
Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, et al	Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine.	Stem Cells Dev.	23(7)	717-28	2014
若尾昌平、 <u>出澤真理</u>	体性幹細胞とMuse細胞の位置づけ	膝島の再生医学	—	73-78	2015
<u>出澤真理</u>	生体内多能性幹細胞：Muse細胞	脳神経系の再生医学	—	19-26	2015

RESEARCH ARTICLE

Therapeutic Effects of Human Multilineage-Differentiating Stress Enduring (MUSE) Cell Transplantation into Infarct Brain of Mice

Tomohiro Yamauchi¹, Yasumasa Kuroda², Takahiro Morita², Hideo Shichinohe¹, Kiyohiro Houkin¹, Mari Dezawa², Satoshi Kuroda^{1,3*}

1 Department of Neurosurgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan, **2** Department of Stem Cell Biology and Histology, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan, **3** Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine and Pharmacological Science, University of Toyama, Toyama, Japan

* skuroda@med.u-toyama.ac.jp



OPEN ACCESS

Citation: Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, Shichinohe H, Houkin K, Dezawa M, et al. (2015) Therapeutic Effects of Human Multilineage-Differentiating Stress Enduring (MUSE) Cell Transplantation into Infarct Brain of Mice. *PLoS ONE* 10(3): e0116009. doi:10.1371/journal.pone.0116009

Academic Editor: Eva Mezey, National Institutes of Health, UNITED STATES

Received: August 15, 2014

Accepted: December 3, 2014

Published: March 6, 2015

Copyright: © 2015 Yamauchi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This manuscript adheres to the appropriate reporting guidelines and community standards for data availability. Any related manuscripts currently in press or under consideration elsewhere are mentioned in the cover letter and will be uploaded as part of your submission as a related manuscript. Any persons named in the Acknowledgments section of the manuscript, or referred to as the source of a personal communication, have agreed to being so named. All authors have read, and confirm that they

Abstract

Objective

Bone marrow stromal cells (BMSCs) are heterogeneous and their therapeutic effect is pleiotropic. Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are recently identified to comprise several percentages of BMSCs, being able to differentiate into triploblastic lineages including neuronal cells and act as tissue repair cells. This study was aimed to clarify how Muse and non-Muse cells in BMSCs contribute to functional recovery after ischemic stroke.

Methods

Human BMSCs were separated into stage specific embryonic antigen-3-positive Muse cells and -negative non-Muse cells. Immunodeficient mice were subjected to permanent middle cerebral artery occlusion and received transplantation of vehicle, Muse, non-Muse or BMSCs (2.5×10^4 cells) into the ipsilateral striatum 7 days later.

Results

Motor function recovery in BMSC and non-Muse groups became apparent at 21 days after transplantation, but reached the plateau thereafter. In Muse group, functional recovery was not observed for up to 28 days post-transplantation, but became apparent at 35 days post-transplantation. On immunohistochemistry, only Muse cells were integrated into peri-infarct cortex and differentiate into Tuj-1- and NeuN-expressing cells, while negligible number of BMSCs and non-Muse cells remained in the peri-infarct area at 42 days post-transplantation.

Conclusions

These findings strongly suggest that Muse cells and non-Muse cells may contribute differently to tissue regeneration and functional recovery. Muse cells may be more responsible

meet, ICMJE criteria for authorship. All contributing authors are aware of and agree to the submission of this manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

for replacement of the lost neurons through their integration into the peri-infarct cortex and spontaneous differentiation into neuronal marker-positive cells. Non-Muse cells do not remain in the host brain and may exhibit trophic effects rather than cell replacement.

Introduction

Cell transplantation therapy has been expected to promote functional recovery in various kinds of central nervous system (CNS) disorders including cerebral infarct. The bone marrow stromal cells (BMSCs) may have the enormous therapeutic potential because they can be harvested from the patients themselves and donors without posing ethical or immunological difficulties [1–3]. Based on recent knowledge, allogeneic BMSC transplantation may also be available [4]. More importantly, they are non-tumorigenic and are already applied to the patients with CNS disorders, thus they are highly feasible [5]. The BMSCs are non-hematopoietic cells and are also known as mesenchymal stromal cells [1,2]. For the decades, numerous numbers of studies have indicated that the transplanted BMSCs enhance motor function recovery after the insults in animal models of various neurological disorders, including cerebral infarct [3,6–9]. They also have the potential to ameliorate cognitive dysfunction under certain conditions in diffuse axonal injury and chronic cerebral ischemia models [10,11]. However, there are many variables that may affect the efficacy of BMSC transplantation in the clinical setting. They include donor cell factors (safety, autologous or allogeneic, ex vivo cell expansion), patient factors (age, stroke type), treatment factors (interval since onset, delivery route, cell dose), and validation factors (neurological assessment, imaging) [1]. More importantly, the mechanisms through which the BMSCs promote functional recovery should be clarified. Thus, these functional recoveries may be based on pleiotropic effects of BMSCs, including inflammation modulation and production of neurotrophic factors, as well as replacement of lost neuronal cells by neuronal differentiation of BMSCs. Such multiple properties may result from heterogeneity of BMSCs [12]. Since the geometry of BMSCs is still obscure, however, the cells responsible for neuronal differentiation are not clarified yet. Nevertheless, if the cells that can be integrated into the damaged CNS tissue and spontaneously differentiate into neuronal cells are identified in BMSCs, those would be ideal for regenerative medicine of CNS disorders, and would be expected to improve the efficiency of currently performed BMSC transplantation [1,2].

Recently, multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are identified in BMSCs [13]. They correspond to several percentages of total BMSCs, and can be efficiently isolated as cells positive for well-known human embryonic stem (ES) cell marker, stage specific embryonic antigen-3 (SSEA-3). Muse cells can self-renew, express a set of genes associated with pluripotency such as Nanog, Oct3/4 and Sox2, and are able to differentiate into endodermal-, ectodermal-, and mesodermal-lineage cells from a single cells. Under cytokine induction, Muse cells differentiate into neuronal marker positive cells with very high ratio of ~90% [14]. Interestingly, they act as tissue repair cells when transplanted *in vivo*; they migrate toward and home into damaged tissues and spontaneously differentiate into cells compatible with the homed-into tissue in fulminant hepatitis, muscle degeneration and skin injury models [13]. Unlike well-known pluripotent stem cells such as ES cells and induced pluripotent stem (iPS) cells, their telomerase activity is low and do not form teratoma in immunodeficient mice testes [14,15]. In contrast, the remainder of BMSCs, non-Muse cells, does not originally express pluripotency genes, nor do they self-renew, differentiate into triploblastic lineages or function as tissue repair

cells *in vivo* [14,15]. These results strongly suggest that Muse cells may play a major role in the neural differentiation and thus may directly contribute to tissue regeneration of damaged CNS, although they are only several percentage of total BMSCs. In the past decade, most of transplantation experiment of BMSCs into ischemia model have been conducted by a mixture of heterogeneous BMSCs, and analysis based on a certain subpopulation in BMSCs have not been focused yet.

In this study, therefore, the authors separated human BMSCs into Muse and non-Muse cells, and transplanted each of them into focal cerebral ischemia model to analyze their contribution to tissue regeneration and functional recovery. They also compared the effect exerted by Muse and non-Muse cell transplantation with that of regular BMSC transplantation.

Materials and Methods

Cell preparation

Human BMSCs were purchased from Lonza Co. The cells were plated at $5.0 \times 10^5 / 75 \text{cm}^2$ in non-coated flask (EasyFlask 159910; Nunc) in α -MEM (Sigma), 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), and 1% kanamycin (Invitrogen). They were incubated at 37°C and 5% CO_2 . The culture medium was replaced 3 times a week. When the cells were grown to confluence, the cells were lifted by 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in PBS. The cells were passed 3 times before cell sorting. To obtain Muse cells, human BMSCs were incubated with rat anti-SSEA-3 IgM antibody (1:50; Millipore, Billerica, MA; detected by fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rat IgM, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) in the FACS antibody diluents and sorted by Special Order Research Products FACSAriaII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) as described previously [13,14]. Cells negative for SSEA-3 were collected as non-Muse cells, and cells unsorted were used as BMSCs.

For preparation of green-fluorescent protein (GFP)-labeled cells, BMSCs were introduced with GFP-lentivirus at the efficiency of ~80% as described previously. GFP-expressing BMSCs (GFP-BMSCs) were selected by the expression of GFP by FACS, and GFP-Muse (GFP (+) / SSEA-3 (+)) and non-Muse (GFP (+) / SSEA-3 (-)) were separated by the expression of SSEA-3 and GFP as described by Kuroda et al. (2010) [13].

Mice permanent middle cerebral artery occlusion model

All animal experiments were approved by the Animal Study Ethical Committee of Hokkaido University Graduate School of Medicine. Male 6-week-old severe combined immunodeficiency (SCID) mice ($n = 24$) were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). Permanent middle cerebral artery (MCA) occlusion was induced as described previously with minor modifications [16,17]. Briefly, anesthesia was induced with 4.0% isoflurane in $\text{N}_2\text{O}:\text{O}_2$ (70:30) and maintained with 2.0% isoflurane in $\text{N}_2\text{O}:\text{O}_2$ (70:30). A 1.0-cm vertical skin incision was made between the right eye and ear, and the temporal muscle was mobilized. Under surgical microscope, a 2.0-mm burr hole was made just on the MCA, using a small dental drill. The dura mater was kept intact, and the right MCA was ligated using 10–0 nylon thread through the dura mater. Core temperature was kept between 36.5 and 37.5°C during and after the procedures. Only animals that circles towards the paretic side were included in this study. Triphenyl-tetrazolium chloride (TTC; Sigma) staining was performed to quantify infarct volume at 24 hr after the onset of ischemia ($n = 4$) [18]. Infarct volume was quantified in each animal according to the method described previously [19].

Cell transplantation

Vehicle, Muse cells, non-Muse cells, or BMSCs ($n = 5$ in each group) were transplanted into the ipsilateral striatum at 7 days after the onset of permanent MCA occlusion [17,20]. The timing of transplantation was determined according to previous data that the BMSC given 7 days after injury led to significantly larger numbers of surviving cells than immediate treatment and significant improvements of gait [21]. In fact, we have confirmed that the BMSCs significantly promote functional recovery after ischemic stroke when directly injected into the ipsilateral striatum at 7 or 28 days after the onset [22–24]. Briefly, the animals were fixed to a stereotactic apparatus under deep anesthesia with 4.0% isoflurane in $N_2O:O_2$ (70:30), and the cranium was exposed through midline skin incision. A burr hole was made 2 mm right to the bregma, using a small dental drill. A Hamilton syringe was inserted 3 mm into the brain parenchyma from the surface of the dura mater, and 10 μ L of cell suspension (2.5×10^4 cells) or 10 μ L of vehicle (PBS) were introduced into the striatum during a period of 5 minutes, using an automatic microinjection pump. Cell dose was determined on the basis of previous data; $1 \sim 2 \times 10^5$ of BMSCs can significantly promote functional recovery after ischemic stroke in the rats whose brain is ~ 2.0 g. The weight of mouse brain is ~ 0.4 g and therefore we transplanted 2.5×10^4 cells in this experiment [22,25,26].

Motor function test

Motor function of the animals was serially assessed before and at 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, and 49 days after the onset of ischemia, using a Rotarod treadmill. This behavioral test was performed in all the Muse cell-, non-Muse cell-, BMSC-, and vehicle-treated mice. The Rotarod was set to the acceleration mode from 4 to 40 rpm for 3 minutes. The maximum time that the animal stayed on the Rotarod was recorded for each performance [27].

Spatial memory test

Using an eight-arm radial maze test, spatial memory was serially examined before and at 7 and 35 days after the onset of ischemia. The maze consisted of a central platform (24 cm in diameter) with eight arms that extended radially. The mice were allowed to visit each arm to eat eight pellets in food cups located near the end of each arms. Each animal was trained once per day to memorize the apparatus. Their performance in each trial was assessed using two parameters: number of correct choices in the initial eight chosen arms, and number of errors (defined as choosing arm that had already been visited). When the animals made seven or eight correct choices and no more than one error in three successive sessions, they were deemed to have memorized the maze. In other words, the animals had acquired spatial memory of the eight-arm radial maze. [28]

Histological analysis

At 42 days after transplantation, the animals were deeply anesthetized with 4.0% isoflurane in $N_2O:O_2$ (70:30) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. The brain was removed, immersed in 4% paraformaldehyde for another 2 days, and 10 μ m thick cryosections were made. They were then incubated with block solution, and reacted with primary antibody against human mitochondria (mouse IgG, 1:100, Abcam), GFP (chicken IgG, 1:1000; Abcam), Tuj-1 (mouse IgG, 1:200, Sigma), NeuN (mouse IgG, 1:1000, Chemicon), and GFAP (mouse IgG, 1:300; Sigma). Samples were further incubated with secondary antibodies either to anti mouse IgG or chicken IgG conjugated with Alexa Fluor 488 or 568 (Invitrogen) and counterstained with DAPI (Invitrogen). Then they were examined using a c1si Nikon confocal

microscope system (Nikon, Tokyo, Japan). Using the coronal slice at the level of the striatum (3 slices for each animal), 18 ROIs (800 μ m x 800 μ m) were placed in the dorsal neocortex adjacent to the cerebral infarct to count the number of human mitochondria, Tuj-1, NeuN and GFAP-positive cells in each animal.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm SD. Continuous data were compared by one-factor analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test among 4 groups. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. A priori power analysis was employed to determine total sample size, using G*Power Software version 3.1.

Results

Infarct volume of permanent MCA occlusion in SCID mice

All animals could survive after the onset of cerebral ischemia through the experiment. At 24 hr after the onset of ischemia, cerebral infarct was widely distributed in the ipsilateral neocortex. Infarct volume was measured as $22.9 \pm 2.9\%$ of the contralateral hemisphere on TTC staining (Fig. 1).

Effect of cell transplantation on motor function recovery

As shown in Fig. 2, all animals exhibited severe neurological deficit during 7 days after the onset of focal cerebral ischemia. There was no significant difference in motor function among 4 experimental groups. At 7 days after ischemia, cell transplantation was performed. The vehicle group did not show any significant improvement of motor function throughout the experiment. BMSC-transplanted animals started to show functional recovery at 21 days after transplantation, compared with vehicle-transplanted animals ($P < 0.01$). Stereotactic transplantation of non-Muse cells also significantly promoted functional recovery at 21 days after transplantation ($P < 0.01$), but did not show any significant improvement thereafter. Motor function at 28, 35

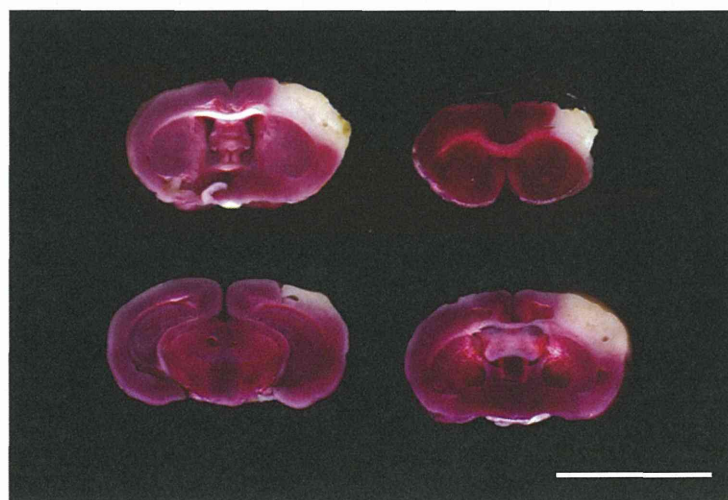


Fig 1. Representative coronal sections of infarct area on triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining at 24 hr after permanent middle cerebral artery occlusion. Infarct volume was measured as $22.9 \pm 2.9\%$ of the contralateral hemisphere. Scale bar = 5 mm.

doi:10.1371/journal.pone.0116009.g001

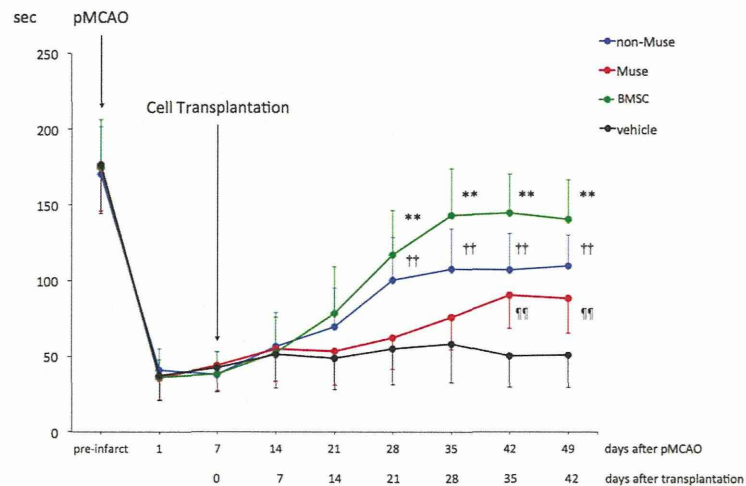


Fig 2. Rotarod treadmill performance. Line graph shows the temporal profile of functional recovery in vehicle-, BMSC-, non-Muse cell-, and Muse cell-treated mice subjected to permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). **, ††, ††† P<0.01 vs. vehicle-treated mice. Sec indicates seconds.

doi:10.1371/journal.pone.0116009.g002

and 42 days post-transplantation was significantly better in BMSC group than in non-Muse cell group (P<0.05). In Muse cell group, any therapeutic effect was not observed for up to 28 days after transplantation. However, significant improvement became apparent after 35 days post-transplantation, compared with vehicle group (P<0.01), which was later than BMSC and non-Muse cell groups. Motor function at 35 and 42 days post-transplantation was significantly better in BMSC group than in Muse cell group (P<0.05). There were no significant differences in motor function between Muse and non-Muse groups at 35 and 42 days post-transplantation.

Effect of cell transplantation on spatial memory

The mice subjected to permanent MCA occlusion showed a decrease in the number of correct choices and an increase in the number of errors at 7 days after the onset of ischemia (Fig. 3).

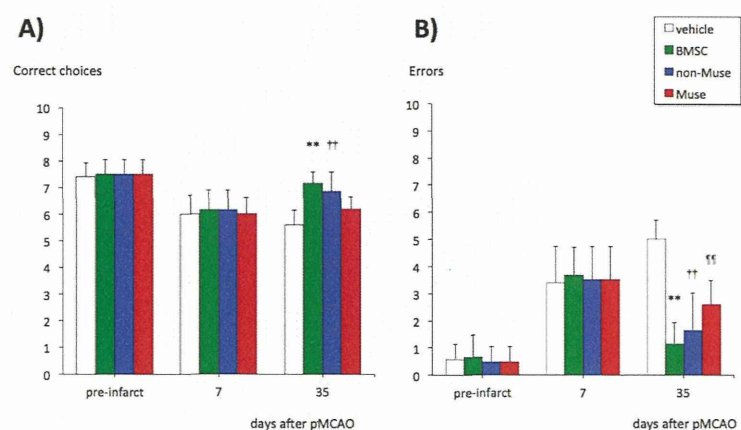


Fig 3. Effects of cell therapy with vehicle, BMSCs, non-Muse cells, and Muse cells on memory impairment at 7 and 35 days after permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). Correct choices (A) and errors (B) in the eight-arm radial maze task. **, ††, ††† P<0.01 vs. vehicle-treated mice.

doi:10.1371/journal.pone.0116009.g003