

平成 31 年 3 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10321

研究課題名(和文) ヒト脂肪組織由来幹細胞移植による脳梗塞再生療法の臨床応用のための研究

研究課題名(英文) human Adipose-derived stem cell therapy for cerebral ischemia

研究代表者

吉村 紳一 (Shinichi, Yoshimura)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40240353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まずヒト脂肪組織から幹細胞を分離する方法を確立し、その細胞が間葉系幹細胞であること、良好な増殖能を持つこと、多分化能を有すること、ならびに神経分化可能であることを示した。その上で、ヒト脂肪組織由来幹細胞の投与が、脳梗塞による神経行動学的な悪化を改善し得るかどうかを検討した。結果、脳梗塞モデルマウスに対し、ヒト脂肪組織由来幹細胞の急性期における静脈内投与により、脳梗塞後の神経障害が改善することが示された。今後、臨床応用を目指した安全試験などが必要である。

研究成果の概要(英文)：First, we confirmed the method to obtain the stem cells from human adipose tissue. We demonstrated human adipose-derived stem cells (hADSC) had a good proliferation ability, multi-potency, and an ability to differentiate into neurons. The efficacy for neurological findings after cerebral infarction was evaluated using mouse model of cerebral infarction. The neurological findings were improved at chronic stage after cerebral ischemia by transvenous delivery of hADSC. For the clinical application in the future, safety testing will be needed.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 間葉系幹細胞 脳梗塞 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

脳卒中の診療現場においては、アルテプラゼ静注療法や脳血管内治療による脳虚血超急性期治療が注目されているが、脳梗塞や脳内出血などにより損傷された脳機能を回復させることは困難とされている。同様に、頭部外傷や脊髄損傷などによる脳神経傷害に対しても現時点で有効といえる治療法は存在しない。このような背景から、世界的に新たな再生医療の開発を目指して脳神経傷害モデルにおける種々の幹細胞を用いた研究が行われており、内在性幹細胞活性化、外来性幹細胞移植という2つのアプローチについて研究されている。その中で脳虚血後の幹細胞移植は様々な実験系で効果が示されており、有望視されている。

我輪はこれまで一貫して神経再生および幹細胞移植に関する研究を行ってきた。内因性神経幹細胞による神経再生療法 (Yoshimura S, Proc Natl Acad Sci USA 2001; J Clin Invest 2003)、神経幹細胞 (前駆細胞) の分化誘導 (Yoshimura S, Mol Cell Neurosci 2003; Kitajima H, J Neurosci Res 2005)、間葉系幹細胞移植による実験的脳虚血治療 (Ikegame Y, Cytotherapy 2011) などである。この中で脂肪由来幹細胞 (ADSC) 移植による治療効果に特に注力しており、治療効果のメカニズムとして、移植された幹細胞の分化による再生のみならず、幹細胞からの分泌因子による神経保護や内在性幹細胞の活性化が関与する可能性を示してきた (Egashira Y, Brain Res 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト ADSC 移植の臨床応用を見据え、その分離培養法の至適条件決定と前臨床試験での有効性の検討を目的とする。

3. 研究の方法

本研究においてはまずヒト ADSC 培養と移植の至適条件を決定する。具体的には、

1) ADSC 培養における血清の有無や濃度による増殖の違いを検討する。

2) 脳梗塞後の時期と細胞の量を比較する。

ヒト ADSC の分離・培養を行い、血清の有無や濃度による増殖速度の違い、得られる細胞量の違いを検討する。また細胞移植時に培養上清濃縮液を併用することの有無による生着の差異を確認する。

次に、マウス脳梗塞モデルを作成し、投与時期や投与法の至適化についての解析を行う。また細胞移植に培養上清濃縮液を併用することによる細胞生着度の確認を行う。最終的には決定された投与量とタイミングでの神経機能改善を検討する。

4. 研究成果

(1) 臨床応用のためのヒト脂肪由来間葉系幹細胞の分離培養法確立。臨床応用を視野に入れ、以下の項目を検討した。

・添加する血清の検討：自己血清および無血清培養にて細胞培養を開始し、両者を比較した。自己血清培養では培養効率は良好であったが、静脈内投与に必要な細胞数の確保のために必要な血清量が多量となるため、現実的には自己血清培地での培養は困難であった。無血清培地では 5~6 継代にて、静脈内投与に必要な細胞数の確保が可能であった。この結果より、本研究では無血清培地を使用することに決定した。

・分離酵素の検討：リペラーゼ、コラゲナーゼを使用したそれぞれの分離・培養効率の検討ではリペラーゼの効率が優れていた。よって、分離酵素にはリペラーゼを採用した。上記検討を加味し、ヒト脂肪由来幹細胞の培養プロトコルを完成した。

・脂肪由来幹細胞であることの確認：FACS を用いて細胞表面マーカーを評価し、脂肪組織由来幹細胞が間葉系幹細胞であることを確認した。また脂肪由来幹細胞の骨、脂肪、神経への3分化を確認した。

・幹細胞能の確認

脂肪由来幹細胞を別の条件 (浮遊培養) にて培養したところ、神経幹細胞塊 (ニューロスフィア) を形成することを確認した。また免疫染色にて、神経幹細胞マーカー (nestin) および神経マーカー (Tuj-1) の発現を確認し、神経への分化能を改めて確認した。

・凍結・解凍による細胞生存率の確認：凍結による細胞保存による細胞生存率を確認し、凍結・解凍による細胞への障害が軽度であることを確認した。

(2) 前臨床試験にて安全性と有効性の確認を行った。

・脳梗塞モデルマウスにおけるヒト脂肪由来幹細胞の有効性

永久閉塞脳梗塞モデルマウス (CB17 8±1 週) を用い、脳梗塞誘導 24 時間後にヒト脂肪由来幹細胞の静脈内投与を行った。

神経行動学的評価の結果

オープンフィールドテスト (活動性・衝動性・記憶)、オープンスペース水泳テスト (活動性、運動機能)、受動的回避学習試験 (記憶、学習) の改善を認めた。

・脳梗塞モデルマウスにおけるヒト脂肪由来幹細胞の有効性

MCAO 群と比較して hADSC 群にて行動学的試験の改善効果を認めた。脳萎縮評価では MCAO 群と比較して hADSC 群において、脳萎縮の減少を認めた。

・脳梗塞モデルマウスにおけるヒト脂肪由来幹細胞の効果機序

血清サイトカイン評価では MCAO 群、hADSC 群間に明らかな差異を見出せなかったが、脳梗塞半球の FACS 評価では CD11b+CD45high を macrophage として評価し、hADSC 群における Day4 における macrophage の増加、及び Day8 における macrophage の減少を認めた。

またマクロファージの機能的亜群である CD11b+CD86+M1 マクロファージ (炎症誘導性

マクロファージ) CD11b+CD163+M2 マクロファージ(炎症抑制性マクロファージ)のFACS評価ではhADSCはDay4でのM2マクロファージの増加に関与している可能性が考えられた。一方単球のリザーバーとされる脾臓でのFACS評価ではCD11b+単球のDay4における減少、及びDay8における増加を認めた。

我々はhADSCの無血清培養法を確立し、培養した細胞が間葉系幹細胞の基準を満たすことを確認した。マウスMCAOモデルにヒト脂肪由来幹細胞を静脈注射したところ、慢性期における神経学的改善効果と、脳萎縮の抑制効果を認めた。これまでの先行論文では炎症環境下で脾臓より誘導された単球細胞は、M1マクロファージもしくはM2マクロファージに分化するとされている。M1マクロファージは各種炎症性サイトカインを放出し、局所の炎症を促進する。一方M2マクロファージは細胞増殖と組織修復を促進する。間葉系幹細胞と単球を共培養した先行研究ではM2マクロファージへの分化促進がなされたとの報告がある。我々の結果ではhADSCが急性期に脾臓からの単球遊走を促し、M2マクロファージの脳梗塞周辺領域における分化を促進することで、早期の炎症の沈静を促し、亜急性期におけるマクロファージの梗塞巣への浸潤を減少させたものと考えた。hADSCの経静脈的投与は脳梗塞におけるマクロファージの脳梗塞周辺領域への集積、M2マクロファージへの分化に影響し、神経保護効果を発揮すると考えられた。

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. Kotaro Tatebayashi, Yasue Tanaka, Akiko Nakano-Doi, Rika Sakuma, Saeko Kamachi, Manabu Shirakawa, Kazutaka Uchida, Hiroto Kageyama, Toshinori Takagi, Shinichi Yoshimura, Tomohiro Matsuyama, Takayuki Nakagomi: Identification of multipotent stem cells in human brain tissue following stroke. *Stem Cells Dev* 26(11):787-797, 2017
2. Toshinori Takagi, Shinichi Yoshimura, Rika Sakuma, Akiko Nakano-Doi, Tomohiro Matsuyama, Takayuki Nakagomi: Novel regenerative therapies based on regionally induced multipotent stem cells in post-stroke brains: their origin, characterization, and perspective. *Transl Stroke Res* 8(6):515-528, 2017
3. Shinichi Yoshimura, Kazutaka Uchida, Takashi Daimon, Ryuzo Takashima, Kazuhiro Kimura, Takeshi Morimoto; on behalf of ASSORT Trial Investigator: Randomized controlled trial of early versus delayed

statin therapy in patients with acute ischemic stroke ASSORT Trial. *Stroke* 48(14). Kiyofumi Yamada, Shinichi Yoshimura, Masatomo Miura, Takuya Kanamaru, Seigo Shindo, Kazutaka Uchida, Manabu Shirakawa, Masahiko Shibuya, Takahiro Imanaka, Masaharu Ishihara, Tohru Masuyama, Reiichi Ishikura, Masanori Kawasaki: Potential of new-generation double-layer micromesh stent for carotid artery stenting in patients with unstable plaque: a preliminary result using OFDI analysis. *World Neurosurg* 105:3057-3063, 2017

5. Takagi T, Imai T, Mishiro K, Ishisaka M, Tsujimoto M, Ito H, Nagashima K, Matsukawa H, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Kozawa O, Iwama T, Hara H. Cilostazol ameliorates collagenase-induced cerebral hemorrhage by protecting the blood-brain barrier, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37: 123-139, 2017.

6. Imai, T., Takagi, T., Kitashoji, A., Yamauchi, K., Shimazawa, M., Hara, H. Nrf2 activator ameliorates hemorrhagic transformation in focal cerebral ischemia under warfarin anticoagulation, *Neurobiology of Disease*, 89: 136-146, 2016.

[学会発表](計6件)

1. Shinichi Yoshimura: Frontline of acute stroke intervention. WFNS Foundation, Beijinglive Surgery Seminar, Beijing, China, 2017.4.28-30 (2017.4.29)
2. Shinichi Yoshimura: New perspectives in clinical trial design: the importance of registries. (Lecture) Society of NeuroInterventional Surgery 14th Annual Meeting, Colorado Springs, USA, 2017.7.24-28 (2017.7.24)
3. Shinichi Yoshimura: Potential of new generation double-layer micromesh stent for carotid artery stenting in patients with unstable plaque - A preliminary result using OFDI analysis. 14th Congress of the World Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology, Budapest, Hungary, 2017.10.16-19 (2017.10.16)
4. Shinichi Yoshimura: Current status of acute stroke intervention in Japan: from RECUE-Japan Project. (Symposium) The 8th Korea-Japan Joint Stroke Conference, Niigata, Japan, 2017.10.19-21 (2017.10.21)
5. 吉村紳一: 急性期脳梗塞治療の最前線と再発予防。(ランチョンセミナー)第37回日本脳神経外科コンgres総会, 横浜, 2017.5.11-14 (2017.5.14)
6. 吉村紳一: 急性期脳梗塞治療の現状と課題。(ランチョンセミナー)第20回日本臨床救急医学会総会・学術集会, 東京,

2017.5.26-28 (H29.5.27)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉村 紳一 (Yoshimura, Shinichi)
兵庫医科大学 医学部 主任教授
研究者番号：40240353

(2)研究分担者

高木 俊範 (Takagi, Toshinori)
兵庫医科大学 医学部 助教
研究者番号：00452152
白川 学 (Shirakawa, Manabu)
兵庫医科大学 医学部 講師
研究者番号：50425112
内田和孝 (Uchida, Kazutaka)
兵庫医科大学 医学部 助教
研究者番号：10570674

(4)研究協力者

立林 洸太郎 (Tatebayashi, Koyaro)
兵庫医科大学 医学部
研究者番号：90759127