

令和元年5月29日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09993

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞移植を用いた難治性てんかんに対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapies for intractable epilepsy with bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

福村 忍 (Fukumura, Shinobu)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30718341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、けいれん重積後にてんかんを生じる動物モデルに対して、けいれん重積後早期に骨髄幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)を経静脈的に移植することにより、けいれん数の減少、認知機能低下を抑制することを明らかにした。海馬の細胞数および苔状線維発芽の組織学的解析では、けいれん重積後の海馬細胞数減少およびGABAニューロン数減少は、MSC投与により抑制されていた。またマンガン造影MRIおよびTimm染色のいずれにおいても、MSC投与により異常苔状線維発芽の減少を認めた。MSCは、けいれん重積後のてんかん発症を予防および認知機能保持に有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の抗てんかん薬は、けいれん発作を抑えるが、形成された異常神経回路(てんかん回路)を正常化する治療法ではないため、治療の長期化や認知機能への影響が問題となっており、より根本的で有効な治療法が望まれている。本研究において、けいれん重積後の急性期に骨髄間葉系幹細胞を移植により、てんかん発症予防効果および認知機能低下予防効果を示した。さらにてんかん回路を正常化するメカニズムとして、骨髄間葉系幹細胞による海馬細胞消失の軽減、異常神経回路形成の抑制が起こることを明らかにし、新たな創薬ターゲットにもつながる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The present study tested the hypothesis that systemically infused mesenchymal stem cells (MSCs) reduce epileptogenesis by inhibiting neuronal cell death and suppressing aberrant MFS, leading to preservation of cognitive function in a rat model of epilepsy. Status epilepticus (SE) was induced using the lithium-pilocarpine injection. MSC infusion inhibited epileptogenesis and preserved cognitive function after SE. The infused MSCs preserved GAD67+ and NeuN+ hippocampal neurons. Furthermore, the MSC infusion suppressed the aberrant MFS in the hippocampus as evidenced by manganese enhanced MRI and Timm staining. This study demonstrated that the intravenous infusion of MSCs mitigated epileptogenesis, thus advancing MSCs as an effective approach for epilepsy in clinical practice.

研究分野：てんかん

キーワード：てんかん 再生医療 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは有病率が 1%と頻度の高い神経疾患であり、その病態メカニズムは、1、興奮性伝達が抑制性伝達よりも相対的に優勢になることにより過剰な異常放電が生じ(抑制ニューロンの消失)、2、繰り返す異常放電により、脳内に興奮しやすい回路が形成される(異常神経回路形成)こととされている。

実際に、頻度の高い内側側頭葉てんかんでは、幼少期に痙攣を繰り返すことにより、抑制系の GABA ニューロンの脱落とともに、異常苔状線維発芽といった興奮回路(てんかん回路)の再構築が起きることで、後にてんかんを発症することが知られている。

従来の抗てんかん薬による薬物治療は、発作を抑える対症療法が主で、異常神経回路を正常化させることはできないため、長期服用が必要となる。そのため、怠薬などによる発作誘発が交通事故につながることもあり、昨今、大きな社会問題となっている。またてんかんは、けいれん発作だけではなく、それに伴う認知機能異常も問題となっており、より根本的治療法が望まれている。外科的な焦点切除は、唯一の根本的解決方法として認知されているが、適応症例は限られる。

2. 研究の目的

近年、難治性神経疾患に対する細胞移植療法が注目されている。我々は今までに経静脈的に移植された骨髄幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSC)が多くの神経疾患(脳梗塞、脊髄損傷、脱髄疾患、末梢神経損傷など)において治療効果を呈するという多くの報告を行ってきた。特に脊髄損傷に対する自己 MSC による治療は、2018 年末に条件・期限付き承認を得て、2019 年春からの実用化に期待が集まっている。

MSC による治療メカニズムは、神経栄養因子を介した神経保護作用、抗炎症作用、血液脳関門の安定化、血管新生作用、神経軸索の sprouting、再有髄化、神経可塑性の亢進、神経系細胞への分化などが多段階に時間経過とともに生ずることによって治療効果を発揮すると考えている。本研究では、てんかんモデル動物に MSC を経静脈的に移植することにより、MSC のてんかん発症の予防効果、てんかんの治療効果、認知機能への改善効果の検討を行う。また、その機序をとって、MSC が形成された異常神経回路を正常化するメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

実験的てんかんモデルとして、ラットリチウム-ピロカルピンモデルを用い、MSC 移植によるてんかん発症予防と認知機能の改善とそのメカニズムの検討を行った。具体的には、けいれん重積直後に MSC 移植を行うことで、のちの自発痙攣の予防効果と認知機能(モリスの水迷路)改善効果を検討した。さらにそのメカニズムを、以下の 2 点に注目し、画像的、組織学的に解析した。

(1) 神経細胞、特に抑制ニューロンの消失に対する効果

けいれん後の海馬ニューロン消失に対する移植細胞の阻害効果、特に抑制ニューロンである GABA ニューロンに注目した。

(2) 異常神経回路形成に対する効果

移植細胞が、海馬歯状回における異常苔状線維芽などの神経再構築を阻害する作用を画像的、組織的に解析した。リアルタイムに異常苔状線維芽をとらえることができる非侵襲的なマンガン造影 MRI を用いた。

4 . 研究成果

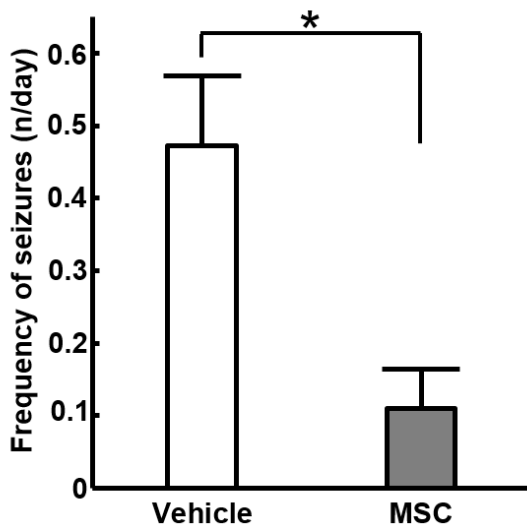
成体ラットに、リチウム・ピロカルピンを投与することで、60 分のけいれん重積を起こさせ、けいれん停止 24 時間後、ラットより採集・培養した MSC をラットてんかんモデルに経静脈的に投与した。対象としてけいれんなし (Normal) 群、けいれん重積 + DMEM 同量投与 (Vehicle) 群をおいた。

(1) けいれん重積後の自発けいれん予防効果：

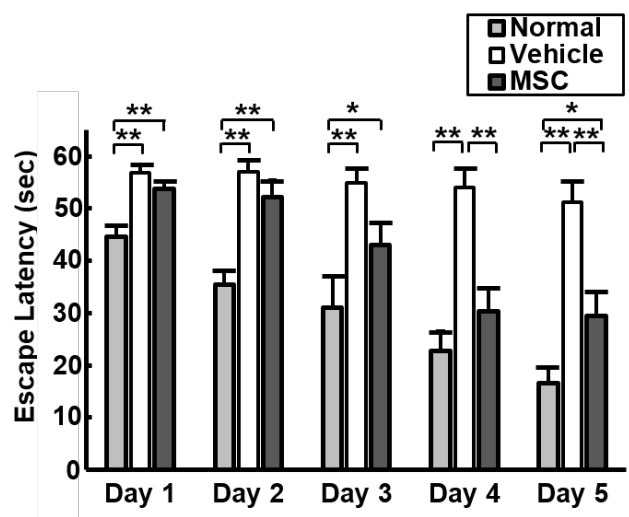
重積後 21 日から 30 日まで、1 日 12 時間ビデオモニタリングし、自発けいれん数を Racine scale (けいれん重症度尺度) で計測した。自発けいれん数を各群で比較検討したところ、MSC 群は、Vehicle 群と比べ有意に減少していた (図 1)。

(2) けいれん重積後の認知機能低下予防効果：

けいれん重積後 55-59 日の連続 5 日間モリスの水迷路試験を行った。3 日目、4 日目、5 日目で、MSC 群は Vehicle 群と比べ有意に目標物への到達時間が短かった (図 2)。



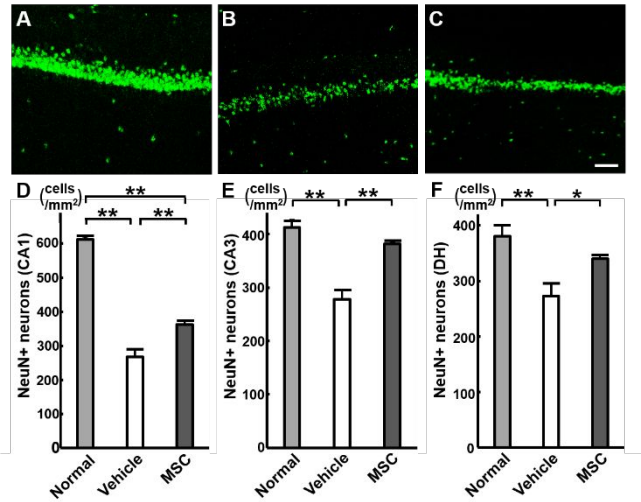
< 図 1 : 自発けいれん数 >
(Fukumura, 2018 より引用)



< 図 2 : 認知機能試験 >
(Fukumura, 2018 より引用)

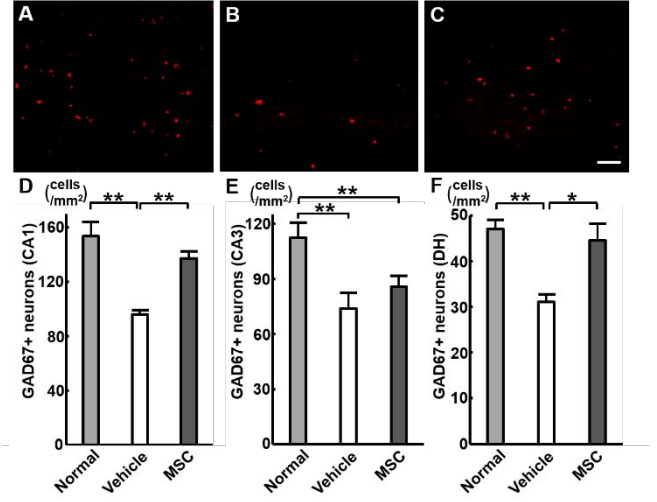
(3) 海馬の細胞減少予防効果：

組織評価として海馬におけるニューロンを NeuN で抑制ニューロンを GAD67 で免疫染色し、各群で海馬の CA1、CA3、歯状回門 (DH) での陽性細胞数を比較した。MSC 群は Vehicle 群に比べ、NeuN では、CA1、CA3、DH の全領域で (図 3)、GAD67 では、CA1、DH の領域で (図 4) 細胞数減少抑制効果を認めた。



< 図 3 : 神経細胞数 >

(Fukumura, 2018 より引用)

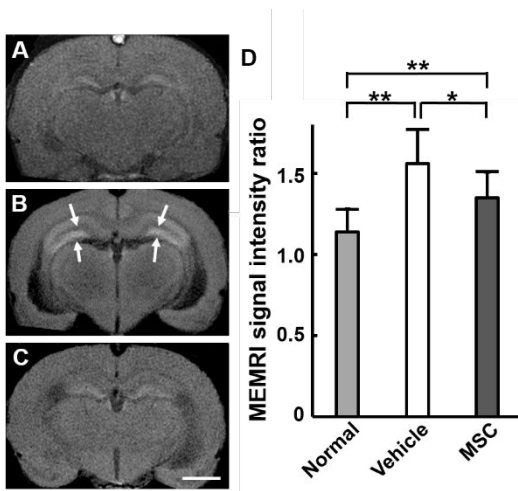


< 図 4 : GABA ニューロン数 >

(Fukumura, 2018 より引用)

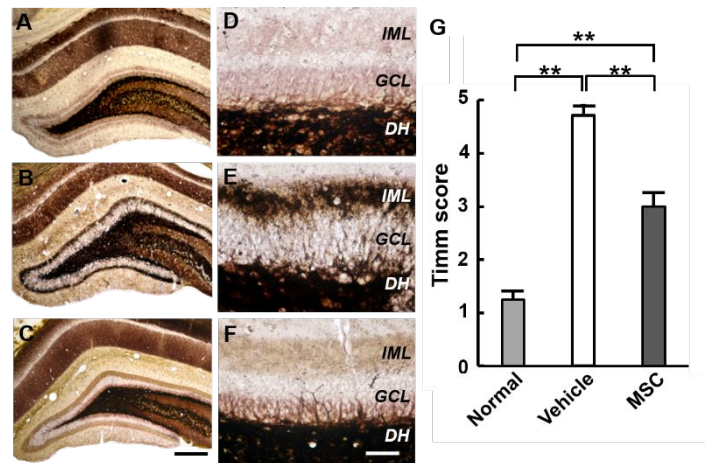
(4) 異常苔状線維発芽予防効果：

画像的、組織的評価としてけいれん後 60 日にマンガン造影 MRI (MEMRI) にて異常苔状線維発芽を示す歯状回の造影効果(脳梁に対する強度比)を各群で比較した(図 5)、MSC 群は、Vehicle 群に比べ、有意に造影効果が低かった。また組織的に Timm 染色でも比較し(図 6)、異常苔状線維発芽を示す Timm スコアも、有意に低かった。



< 図 5 : マンガン造影 MRI >

(Fukumura, 2018 より引用)

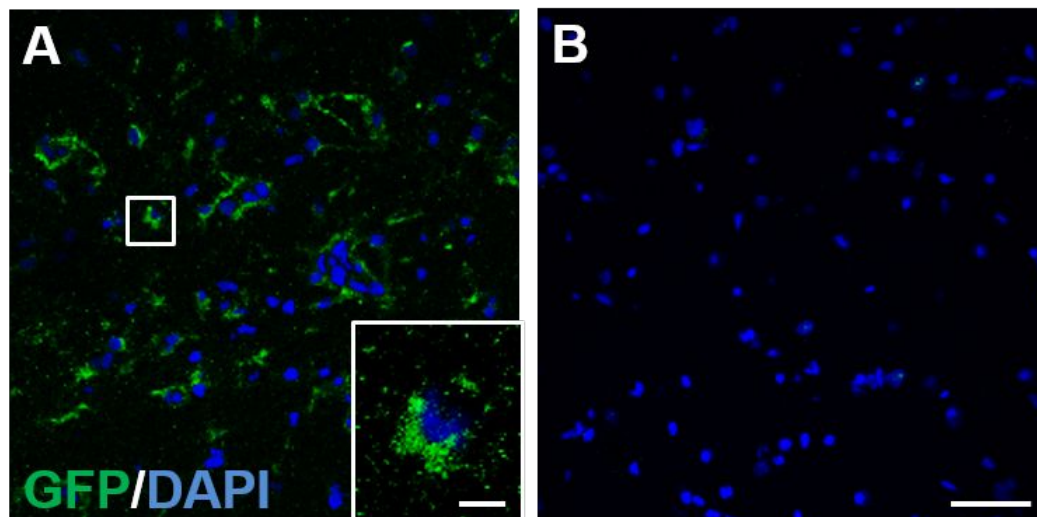


< 図 6 : Timm 染色 >

(Fukumura, 2018 より引用)

(5) MSC の Homing :

GFP*MSC を静注したところ、24 時間後に海馬に集積を認めた (図 7A)。非静注群では蛍光を認めないことから、自己蛍光を否定した (図 7B)。



< 図 7 : GFP*MSC >

(Fukumura, 2018 より引用)

以上より、静脈内投与した MSC は海馬に集積し、海馬歯状回門における抑制系 GABA ニューロンの減少を軽減させ、また海馬 CA3 における錐体細胞の減少を軽減させることで異常苔状線維発芽を抑制させ、てんかん原性形成を減少させた。さらに海馬における神経細胞減少を軽減させることで、認知機能低下は抑制された。従って、MSC の静脈投与はけいれん重積後のてんかん、認知機能低下予防に有効である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Fukumura, S., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S., Nakazaki, M., Nagahama, H., Morita, T., Sakai, T., Tsutsumi, H., Kocsis, J.D., Honmou, O. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells reduces epileptogenesis in a rat model of status epilepticus. *Epilepsy Research* 141, 2018, 56-63. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2018.02.008

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 祐典

ローマ字氏名：SASAKI, masanori

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：20538136

研究分担者氏名：坂井 拓朗

ローマ字氏名：SAKAI, takuro

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：8063229

研究分担者氏名：本望 修

ローマ字氏名：HONMOU, osamu

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90285007

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。