

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10724

研究課題名(和文) 脳梗塞ラットに対するヒト頭蓋骨髄間葉系幹細胞移植

研究課題名(英文) Early Transplantation of Human Cranial Bone-derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats.

研究代表者

岡崎 貴仁 (Takahito, Okazaki)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：60437613

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)：これまで、ヒト間葉系幹細胞を脳梗塞モデルラットへ移植することで、機能改善が確認されています。その多くはヒト腸骨由来MSCs (hiMSCs) であるため、ヒト頭蓋骨から樹立したMSCs (hcMSCs) の細胞学的特徴と脳梗塞モデルラットへの移植効果をhiMSCsと比較検討しました。その結果、神経栄養因子の発現はhiMSCsに比べhcMSCsで高く、hcMSCsを脳梗塞モデルラットへ早期移植することで、無移植例やhiMSCs移植例に比べ、良好な機能改善を確認しました。hcMSCsはhiMSCsに比べ高い神経保護効果が期待され、脳梗塞後早期の投与で効果的な機能改善が見込まれると考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中によって脳にダメージが生じると、重篤な機能障害をきたし、最悪の場合、死に至ることもあります。近年、薬物療法や血管内治療などの外科的治療の進歩により、機能予後の改善が期待されています。一方、損傷を受けた脳組織は再生せず、十分な機能改善が見込まれないことも現状です。新たな治療方法として、中枢神経損傷に対する間葉系幹細胞の機能改善効果が注目されています。我々の研究結果では、腸骨骨髄から樹立されたものに比べ頭蓋骨骨髄から樹立した間葉系幹細胞は、脳梗塞モデルラットに対し機能改善が高いことが判明しました。今後は、ヒトを対象にした臨床研究も含めて、実臨床への応用に向け研究をすすめていく予定です。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the cell characteristics, neuroprotective, and transplantation effects of human cranial bone-derived mesenchymal stem cells (hcMSCs) in ischemic stroke model rats compared with human iliac bone-derived mesenchymal stem cells (hiMSCs). The expressions of brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor were higher in hcMSCs than in hiMSCs. HcMSCs transplantation at 3 h after middle cerebral artery occlusion resulted in significant functional recovery compared with that in the hiMSCs or control group. The survival rates of neuroblastoma × glioma hybrid cells cultured with hcMSCs-conditioned medium after 3 h oxidative or inflammatory stress were significantly higher than in the control group. Our results suggest that hcMSCs transplantation in the early stage of ischemic stroke suppresses the damage of residual cells and leads to functional recovery through the strong expressions of neurotrophic factors.

研究分野：脳血管障害

キーワード：間葉系幹細胞 頭蓋骨 脳卒中 移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中によって脳にダメージが生じると、重篤な機能障害をきたし、最悪の場合、死に至ることもある。近年、薬物療法や血管内治療などの外科的治療の進歩に伴い、脳卒中後の機能予後改善が期待されている。一方、損傷を受けた脳組織は再生せず、十分な機能改善が見込まれないことも現状である。脳卒中や頭部外傷など中枢神経損傷に対する新たな治療法として、間葉系幹細胞移植による機能改善効果が注目されている。げっ歯類のみならずヒトを含めた哺乳類において、虚血性脳損傷後にヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells : hMSCs) を移植することで、機能予後の改善が報告されている。MSCs が放出する神経栄養因子が、神経保護効果や神経再生、血管新生に重要な役割を果たすと考えられている。hMSCs は、腸骨骨髓をはじめ、脂肪、皮膚、臍帯、胎盤など様々な組織から樹立可能であり、採取する部位により特性が異なるとされる。以前我々は、ヒト頭蓋骨由来 MSCs (human cranial bone-derived MSCs: hcMSCs) の樹立に成功し、ヒト腸骨由来 MSCs (human iliac bone-derived MSCs: hiMSCs) に比べ、神経堤マーカーの発現が高く、神経系細胞へ分化しやすいことを報告している (Shinagawa K, et al. Neuroscience Letters, 606:161-166, 2015)。これまで虚血性脳損傷に対する機能予後改善効果は、hiMSCs で検討されたものがほとんどであり、hcMSCs での報告はない。中胚葉由来である腸骨と神経堤由来である頭蓋骨では、細胞学的特徴のみならず、中枢神経損傷に対する機能予後改善効果も異なる可能性が高い。また、MSCs を移植するタイミングについて、必ずしも明瞭化されていないのが現状である。

2. 研究の目的

虚血性脳損傷に対する hcMSCs 移植による神経予後改善効果を確認するため、hcMSCs の細胞学的特徴と脳梗塞モデルラットへの移植効果について、hiMSC と比較検討することとした。また、脳梗塞モデルラットに対する hcMSCs の早期移植効果についても検討した。

3. 研究の方法

開頭術時に側頭骨、蝶形骨から頭蓋骨を採取し、以前報告したものと同様の方法で hcMSCs を樹立した。樹立した hcMSCs については、以前報告した論文において、フローサイトメトリーや多分化能を分析し、MSC の特徴を満たしていることを確認している。hiMSCs は Lonza 社より購入した。

以下の3項目について分析した。

細胞学的特徴を検討するため、神経栄養因子 (BDNF、VEGF) の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

hMSCs の移植に先立ち、intraluminal thread occlusion method にて、脳梗塞モデルラットを作成した。具体的には、250-300g のオスの Sprague-Dawley ラットにイソフルラン吸入麻酔を行い、頸部を切開し、顕微鏡下に右総動脈、内頸動脈、外頸動脈を露出した。先端にシリコンコートをした 4.0 ナイロン糸を、外頸動脈切断断端から内頸動脈へ頭蓋内に向かって挿入し、中大脳動脈起始部を 2 時間閉塞した後、抜去した。hMSCs 移植に先行して、脳梗塞作成 24 時間後に MRI 撮影や脳切片の 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) 染色を行い、脳梗塞が作成できていることを確認した。ついで、hMSCs の移植効果を確認するべく、脳梗塞モデルラット作製 3 時間もしくは 24 時間後に、 1.0×10^6 個の hcMSCs もしくは hiMSCs を尾静脈から経静脈的に投与し、コントロール群も含め投与後の神経機能を、脳梗塞作成後 28 日目まで評価した。

In vitro で、模擬脳梗塞モデルを作成するべく、NG108-15 (Neuroblastoma x glioma hybrid cell) を炎症ストレス (lipopolysaccharide を添加) あるいは酸化ストレス (H_2O_2 を添加) に曝露した。脳虚血後の神経細胞損傷を確認するため、3 時間もしくは 24 時間、酸化もしくは炎症ストレスに曝露した後、コントロール群も含め、NG108-15 の生存率を確認した。ついで、hMSCs の神経保護効果を検討するため、NG108-15 を 3 時間もしくは 24 時間、酸化もしくは炎症ストレスに曝露した後、hcMSCs もしくは hiMSCs の馴化培地を加え、コントロール群も含め、馴化培地投与 24 時間後の NG108-15 生存率を確認した。

4. 研究成果

各々の検討項目についての結果を報告する。

神経栄養因子 (BDNF、VEGF) の発現は hiMSCs に比べ hcMSCs で高かった。

脳梗塞モデルラットの神経機能は、脳梗塞 24 時間後の投与では、hcMSCs 群、hiMSCs 群ともにコントロール群と同等であったが、脳梗塞 3 時間後の投与では、hiMSCs 群やコントロール群に比べ、hcMSCs の投与で、脳梗塞後 2 日目から 28 日目まで、早期から神経機能が改善した。

炎症・酸化ストレス曝露後の NG108-15 生存率は 3 時間ストレス群、24 時間ストレス群ともにコントロール群にくらべ低く、炎症・酸化ストレス各々の曝露群間においても、3 時間ストレス群にくらべ 24 時間ストレス群で NG108-15 の生存率は有意に低かった。ストレス曝露後の NG108-15 に hcMSCs 馴化培地を加えることで、3 時間ストレス曝露群では炎症・酸化ストレス群で、24 時間ストレス曝露群では炎症ストレス群で生存率が改善した。一方、hiMSCs 馴化培地は、炎症・酸化ストレスの両群で、3 時間もしくは 24 時間ストレス曝露後の NG108-

15の生存率をコントロール群と比較し改善させなかった。

今回の検討では、まず hcMSCs と hiMSCs の細胞学的特徴について分析した。以前われわれは、hcMSCs が hiMSCs にくらべ神経提マーカーの発現が高いことを報告した。今回、さらに神経栄養因子について検討したが、hiMSCs にくらべ hcMSCs は神経栄養因子の発現が高いことが確認された。神経栄養因子は神経保護効果、神経新生、血管新生効果を有し、中枢神経損傷に対する機能予後改善に重要な因子となることが報告されている。hiMSCs が中胚葉由来である腸骨、hcMSCs が神経堤由来である頭蓋骨から樹立されたものであるため、由来により特徴が異なり、hcMSCs は神経栄養因子を豊富に発現することが確認できた。ついで、脳梗塞モデルラットに対する hcMSCs の移植効果について検討したところ、脳梗塞作成 24 時間後投与では脳梗塞後 28 日目まで全期間にわたり神経機能の改善は確認されなかったが、3 時間後投与では脳梗塞後 2 日目の早期から 28 日目までほぼ全期間にわたり神経機能の有意な改善を認めた。脳梗塞後早期に hcMSCs を移植することで、効果的な神経機能改善が期待できると考えられた。虚血性脳損傷に対する hcMSCs の早期移植効果を *in vitro* でも確認するため、まず *in vitro* での脳梗塞モデルを作成した。NG108-15 に炎症・酸化ストレスを加え、生存率を分析したところ、ストレス曝露時間に伴い NG108-15 の生存率は急激に低下し、脳梗塞後早期に急速な神経細胞損傷が生じることが示唆された。ついで、*in vitro* で脳梗塞後の hMSCs 移植を再現するため、ストレス曝露後の NG108-15 に、hMSCs の馴化培地を加え、生存率を分析した。hiMSCs の馴化培地は 3 時間もしくは 24 時間の炎症・酸化ストレス曝露後の NG108-15 生存率を改善させなかった。hcMSCs の馴化培地は炎症・酸化ストレス曝露 3 時間後の NG108-15 の生存率は改善させたが、神経細胞損傷が進行した 24 時間ストレス曝露後では、生存率の改善は限定的であった。*In vitro* での分析でも、hiMSCs は hcMSCs にくらべ脳虚血損傷後の神経保護効果が高く、hcMSCs は神経損傷が進行していない早期により高い神経保護効果をもたらすことが確認できた。今回の検討では、脳梗塞後早期に hcMSCs を移植することで、虚血後の神経細胞死が進行する前に、hcMSCs に由来する豊富な神経栄養因子が神経細胞の細胞死を予防することで機能改善につながったことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Jumpei Oshita, Takahito Okazaki, Takafumi Mitsuhashi, Takeshi Imura, Kei Nakagawa, Takashi Otsuka, Tomoyuki Kurose, Takayuki Tamura, Masaru Abiko, Masaaki Takeda, Yumi Kawahara, Louis Yuge, Kaoru Kurisu | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Early Transplantation of Human Cranial Bone-derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica | 6. 最初と最後の頁 83-93 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2019-0186. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Abiko M, Mitsuhashi T, Okazaki T, Imura T, Nakagawa K, Otsuka T, Oshita J, Takeda M, Kawahara Y, Yuge L, Kurisu K. | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Rat Cranial Bone-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Promotes Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells Dev | 6. 最初と最後の頁 1053-1061 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2018.0022. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 大下純平, 岡崎貴仁, 光原崇文, 武田正明, 阿美古 将, 猪村剛史, 大塚貴志, 黒瀬智之, 中川 慧, 河原裕美, 辻 紘一郎, 弓削 類, 栗栖 薫 |
| 2. 発表標題 脳梗塞モデルラットに対するヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の移植効果について |
| 3. 学会等名 第1回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿美古 将, 光原崇文, 岡崎貴仁, 武田正明, 大下純平, 猪村剛史, 大塚貴志, 中川 慧, 河原裕美, 弓削 類, 栗栖 薫 |
| 2. 発表標題 ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脳梗塞モデルへの移植効果の検討 |
| 3. 学会等名 第17回 日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大下純平, 光原崇文, 岡崎貴仁, 武田正明, 阿美古 将, 猪村剛史, 大塚貴志, 中川 慧, 河原裕美, 弓削 類, 栗栖 薫 |
| 2. 発表標題 側頭骨、蝶形骨および後頭骨から採取した頭蓋骨由来ヒト骨髄間葉系幹細胞の細胞学的特徴の比較 |
| 3. 学会等名 第17回 日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大下純平, 岡崎貴仁, 光原崇文, 猪村剛史, 中川 慧, 大塚貴志, 黒瀬智之, 田村隆行, 阿美古 将, 武田正明, 河原裕美, 弓削 類, 栗栖 薫 |
| 2. 発表標題 ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の細胞学的特徴と脳梗塞モデルラットに対する移植効果の検討 |
| 3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 弓削 類 (Yuge Louis) (20263676) | 広島大学・医系科学研究科(保)・教授 (15401) | |