

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：32666  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16K10742  
研究課題名(和文) 歯髄由来幹細胞とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の融合による新規脳出血治療の開発  
  
研究課題名(英文) Combination therapy with dental pulp stem cells and histone deacetylase inhibitor against intracerebral hemorrhage in rat  
  
研究代表者  
須田 智 (SUDA, SATOSHI)  
  
日本医科大学・医学部・講師  
  
研究者番号：00366733  
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)：我が国の脳卒中の特徴として、脳出血の発症率が高いことがあげられる。脳梗塞モデルに対する歯髄幹細胞の報告はあるが、脳出血モデルでの検討は十分にはなされていない。今回の研究では、脳出血モデルに対して、歯髄幹細胞および歯髄幹細胞単独とエビジェネティクス作用を有するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤との併用療法の検討を行った。併用療法は単独療法と比較して、脳出血後の脳浮腫や脳萎縮の軽減および運動機能や認知機能の改善を認めた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の脳卒中の特徴として、脳出血が欧米と比べると発症率が高いことがあります。脳梗塞はカテーテル治療など治療の目覚ましい進歩がありますが、脳出血は機能改善に繋がるような治療はほとんどありません。本研究では、脳出血モデルを用いて、歯髄幹細胞と既存の汎用薬剤であるバルプロ酸の併用療法の効果を認めました。今後、脳出血の治療を前進させる一歩になると考えます。

研究成果の概要(英文)：One of the characteristics of stroke in Japan is the high incidence of intracerebral hemorrhage (ICH). Dental pulp stem cells (DPSCs) are a potential therapy for ischemic stroke. However, the effect of DPSCs in ICH has not been fully studied. In the present study, we investigated the effects of DPSCs in experimental ICH. ICH was induced by infusion of autologous blood into the left striatum in rats. Twenty-four hours after ICH, rats were randomized to receive an intravenous administration of DPSCs alone, or DPSCs plus valproic acid (VPA), or vehicle. Brain water content, and neurological and immunohistological assessments were performed to examine the effects of these therapies. Combination therapy significantly reduced brain edema in the perihematomal area, and brain atrophy and improved spatial learning and memory and motor functional recovery in rats after ICH.

研究分野：脳神経内科

キーワード：脳出血 幹細胞 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の脳卒中の特徴として、脳出血の発症率が高いことがあげられる。欧米と比較すると発症率は2倍であり、抗凝固薬内服下では4倍に上昇する。脳出血の初期治療は、血腫の大きさや臨床症状により、主に救命を目的とした手術が一部の症例で行われているが、その他の多くの患者については、臨床転帰改善に結びつく有効な治療法が存在せず、新規の治療法開発が待望される。

2000 年前後から、神経疾患モデルに対して、幹細胞移植による機能改善効果が報告され、申請者も骨髄由来の単核球や間葉系幹細胞移植による虚血性および出血性脳損傷軽減効果を示してきた DPSC は間葉系幹細胞と神経外胚葉の両方の性質を兼ね備えた細胞で有り、脱落乳歯や智歯(親知らず)から採取出来るため、最小限度の生体侵襲で採取可能な多能性体性幹細胞である。本研究では、脳出血に対する新規の治療法として、DPSC に注目し、ラット脳出血モデルに対する DPSC 移植の脳保護効果を多面的に検討する。更に、DPSC 移植の効果を劇的に増強させることを狙い、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤をプライミングさせた DPSC の移植の検討も行う。

## 2. 研究の目的

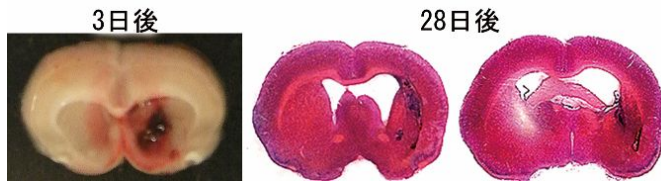
本研究では、ラット脳出血モデルを作成し、新たな幹細胞ソースとして注目される歯髄由来幹細胞移植および効果増強を目的としたエピジェネティクス作用を有するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤との融合治療を行い、長期的な行動学的評価および組織学的検討を行う。本研究を進めることで、依然として劣悪な脳出血の転帰改善に貢献することを目的とする。

## 3. 研究の方法

自己動脈血(100  $\mu$ )をラット左線条体に注入することで脳出血モデルを作成する。脾臓を介した2次的な脳損傷に注目して、脳浮腫および neurovascular unit の構造に与える影響を明らかにする。作用機序の解明のために移植細胞の生体内分布・生存・分化を明らかにする。長期的なアウトカム評価として縦断的な運動機能検査および空間学習能検査も施行し、総合的に治療効果を評価すると共に、血腫周囲・海馬・脳梁の組織変化や脳萎縮に与える影響を明らかにする。遊走能の向上および神経系細胞への分化促進を目的として、HDAC 阻害剤をプライミングさせた DPSC の効果も併せて検討する。

## 4. 研究成果

まず、ステレオタキシックフレームを用いて脳出血モデルを作成した。当初、脳出血モデルの安定性が不良であった。脳出血モデル作成から3日後に、脳切片を作成したところ、血腫量や血腫の拡大などにばらつきが生じていた。そのため、麻痺や姿勢異常などの神経徴候が一定しなかったと考えられた。脳内に注入する自己血液が 31 gage needle 内で凝固が始まり、注入スピードが途中で低下してしまい予定の注入量を注入することが出来なくなってしまうことがしばしば認められた。尾動脈からの血液採取から脳内注入までの一連のプロセスの迅速化を行うことで注入する血腫量や麻痺・姿勢異常などの神経徴候も安定させることが出来た(下図)。



齒髓由来幹細胞を尾静脈から投与する群、齒髓由来幹細胞とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤との併用療法群、vehicle 群の 3 群に分けて、比較検討を行った。併用療法群は齒髓単独群と比較して、脳含水量および脳出血後の脳萎縮の減少および神経徴候が改善された。更に、4 週間後の観察において、Y 迷路で評価した認知機能も改善した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yokobori S, Sasaki K, Kanaya T, Igarashi Y, Nakae R, Onda H, Masuno T, Suda S, Sowa K, Nakajima M, Spurlock MS, Onn Chieng L, Hazel TG, Johe K, Gajavelli S, Fuse A, Bullock MR, Yokota H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Feasibility of Human Neural Stem Cell Transplantation for the Treatment of Acute Subdural Hematoma in a Rat Model: A Pilot Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neurol	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.00082.	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 Nito C, Sowa K, Nakajima M, Sakamoto Y, Suda S, Nishiyama Y, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Ueda M, Okada T, Kimura K	4. 巻 108
2. 論文標題 Transplantation of human dental pulp stem cells ameliorates brain damage following acute cerebral ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 1005-1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2018.09.084	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 Sowa K, Nito C, Nakajima M, Suda S, Nishiyama Y, Sakamoto Y, Nitahara-Kasahara Y, Nakamura-Takahashi A, Ueda M, Kimura K, Okada T	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of Dental Pulp Stem Cells Overexpressing Hepatocyte Growth Factor after Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 :281-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2018.07.009	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 Houkin K, Shichinohe H, Abe K, Arato T, Dezawa M, Honmou O, Horie N, Katayama Y, Kudo K, Kuroda S, Matsuyama T, Miyai I, Nagata I, Niizuma K, Sakushima K, Sasaki M, Sato N, Sawanobori K, Suda S, Taguchi A, Tominaga T, Yamamoto H, Yamashita T, Yoshimine T	4. 巻 49(4)
2. 論文標題 Accelerating Cell Therapy for Stroke in Japan: Regulatory Framework and Guidelines on Development of Cell-Based Products.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 e145-e152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.117.019216.	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仁藤智香子
2. 発表標題 歯髄幹細胞移植による新規脳梗塞治療の開発
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁藤智香子
2. 発表標題 Transplantation of dental pulp stem cells ameliorates brain damage after focal cerebral ischemia
3. 学会等名 第57回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 嶋康太
2. 発表標題 Therapeutic Effect of Human Dental Pulp Stem Cells OverexpressingHepatocyte Growth Factor in Experimental Ischemic Stroke
3. 学会等名 International Stroke Conference 2018
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 嶋 康太, 仁藤智香子, 中島壯崇, 須田 智, 上田雅之, 笠原優子, 今川 究, 平戸徹, 岡田尚巳, 木村和美
2. 発表標題 ラット局所脳虚血モデルにおけるHGF強発現歯髄幹細胞移植の神経保護効果
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Satoshi Suda	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 156
3. 書名 Cell Therapy against Cerebral Stroke: Comprehensive Reviews for Translational Researches and Clinical Trials.	

〔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	仁藤 智香子 (Nito Chikako)  (30409172)	日本医科大学・医学部・准教授  (32666)	
研究協力者	横堀 将司 (Yokobori Shoji)  (70449271)	日本医科大学・医学部・教授  (32666)	
研究協力者	中島 壯崇 (Nakajima Masataka)		
研究協力者	岨 康太 (Sowa Kota)		