

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01513

研究課題名(和文) 脳梗塞に対する骨髄幹細胞とリハビリ併用による脳と脊髄のplasticityの解析

研究課題名(英文) Induced neural plasticity following combination of intravenous infusion of Mesenchymal Stem Cells and Rehabilitation after stroke in rats

研究代表者

佐々木 雄一 (Sasaki, Yuichi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00570136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：実験的脳梗塞に対するリハビリテーション(リハビリ)と骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)の経静脈内投与(MSC治療)の併用療法による治療メカニズムを検討した。MSC治療により、神経可塑性の亢進や血漿内BDNFの増加を認めた。これらの結果は、MSC治療の効果を判断する新たな指標になりうる可能性が考えられた。さらに、リハビリ併用群においても、同様の傾向が得られたことから、今後は、リハビリ併用による神経可塑性の検討を継続し、治療効果を最大限に引き出すリハビリプロトコルの確立に向けた研究を進める必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療におけるリハビリの重要性は高く、治療効果を最大限に引き出すリハビリプロトコルの確立は非常に重要である。2019年より、脊髄損傷の後遺症に対する再生医療等製品として自己骨髄間葉系幹細胞(ステミラック注)の期限・条件付き承認を受け、実用化が開始された。今後、ステミラック注を用いた再生医療の対象疾患は、脊髄損傷だけではなく脳梗塞などの疾患にも拡大していくことが推測される。MSC療法の治療効果を最大限に引き出すため、リハビリプロトコルの確立と治療効果を反映するバイオマーカーの開発は、大きな役割を果たすものと推測される。

研究成果の概要(英文)：We investigated induced neural plasticity following combination of intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) and rehabilitation after stroke in rats. The neural plasticity and plasma BDNF levels increased following MSC infusion. These results support the hypothesis that BDNF levels in plasma and DTI tractography might be appropriate to detect therapeutic efficacy in a rat model of ischemic stroke. Future research should be performed to establish a rehabilitation protocol that maximizes the therapeutic efficacy of combination of MSC therapy and rehabilitation.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨髄間葉系幹細胞 リハビリテーション 可塑性

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでの良好な基礎研究の結果を基盤として、自己骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)を脳梗塞患者 12 例に対して経静脈的に投与する臨床研究を行い、安全性の確認および良好な結果を得た。上記を踏まえ、札幌医科大学では、脳梗塞に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた医師主導治験を実施し、並行して脊髄損傷に対しても医師主導治験を進めていた。

これまでの研究の知見を総合して MSC 治療の治療メカニズムを検討した結果、 サイトカインによる神経栄養作用、 血液脳関門機能の修復、 血管新生、 脱髄軸索の再有髄化、 神経再生による神経系の plasticity の調節など、 と多段階・協奏的に作用すると考えている。

また、我々は、ラット脳梗塞モデルに対する MSC 投与にリハビリテーション(リハビリ)を併用し、運動機能などの回復を観察した結果、リハビリ単独群や MSC 投与単独群よりも、併用群の方がさらに高い運動機能の回復が得られることを報告した (Sasaki Y. et al., PTJ, 2016)。投与された MSC は、1)梗塞巣周囲に集積し、2)脳梗塞体積を減少させ、3)脳梗塞周辺領域のシナプス新生を誘導し、4)脳梁萎縮を抑制するが、リハビリを併用すると、脳の plasticity のさらなる亢進を誘導し、より高い治療効果が得られることを明らかにした。

さらに、我々の fMRI を用いた研究では、ラット脳梗塞モデル作製後に経静脈的に MSC を投与した結果、脳梗塞周囲のみならず健常側の脳においても、MSC によって plasticity の賦活化が誘導されていることが示唆されていた。

2. 研究の目的

骨髄間葉系幹細胞(MSC)の経静脈的投与 (MSC 治療) は脳梗塞に対する新しい治療法として注目されており、我々は、ラット脳梗塞モデルに対する MSC 治療にリハビリを付加した結果、梗塞周辺領域の脳の plasticity が賦活化されることで、運動能力のさらなる回復が得られることを報告した (Sasaki Y. et al., PTJ, 2016)。これらの臨床および基礎研究における良好な成果を踏まえ、MSC 治療が実用化された暁には、リハビリは益々重要な役割を担ってくると考えられる。

本研究では、リハビリと MSC 投与の併用で得られる治療効果の分子メカニズムを詳細に比較解析し、新しいリハビリ方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MSC の培養

SD ラット及び GFP 陽性ラットの大腿骨から骨髄を採取・培養を行なった。3 継代目の MSC を投与に使用した。

(2) 脳梗塞モデル

脳梗塞モデルは中大脳動脈永久閉塞 (Middle Cerebral Artery Occlusion : MCAO) モデルを使用した。ナイロン製の糸を、深麻酔下にした SD ラット (メス、250g-300g) の外頸動脈から内頸動脈へと侵入させて、中大脳動脈を閉塞した。作製した MCAO ラットをランダム化し、vehicle 投与群、 リハビリテーション群、 MSC 投与群、 MSC +リハビリテーション群の 4 群に分けた。

(3) リハビリテーション

リハビリテーションを行う2群(リハビリテーション群、MSC+リハビリテーション群)には、MCAO作製1日後より毎日20分間のトレッドミル走行を6週間行った。運動強度は3 m/minから開始し、1週ごとに速度を3 m/min上げ、6週後には18 m/minになるように設定した。

(4) MSCの投与方法

MSCを投与する2群(MSC投与群、MSC+リハビリテーション群)には、MCAO作製6時間後に、大腿静脈からMSCを投与した。また、vehicle投与を行う2群(vehicle投与群、リハビリテーション群)には、MCAO作製6時間後に、DMEMを1 ml 大腿静脈より投与した。

(5) MRIの撮影方法

動物用7T MRIを使用して、深麻酔下にしたラットの脳のT2強調画像を撮影した。評価日はMCAO作製1日、4日、7日、14日、28日、42日後とした。

また、MCAO作製42日後に、深麻酔下にしたラットを脱血・還流固定し、脳組織を採取した。採取した脳を用いて、Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging(DTI)を撮影した。

(6) 組織学的解析

MCAO作製42日後に、深麻酔下にしたラットの脳の障害側運動野に神経トレーサーを局所注入し、共焦点顕微鏡を用いて画像を取得し、神経回路と非障害側運動野のGFP陽性細胞を定量解析した。

また、MCAO作製50日後に、深麻酔下にしたラットを脱血・還流固定し、脳組織を採取した。採取した脳を、シナプスのマーカーであるSynaptophysin抗体を用いて免疫染色を行ない、共焦点顕微鏡を用いて画像を取得し、解析ソフトを用いてシナプス数を定量解析した。

(7) BDNFの定量

MCAO作製3日後に、深麻酔下にしたラットから血液を採取し、その後、脱血・還流固定し、脳組織を採取した。ELISA法を用いてそれぞれの試料に含まれるBDNFを定量解析した。

(8) 行動学解析：

6種類のテストから構成されるLimb Placement Test(LPT)を用いて、損傷半球の対側四肢の機能レベルを計測した。計測日はMCAO作製1日、4日、7日、14日、28日、42日後とした。

4. 研究成果

(1) 運動機能の経時的変化

LPTにおいては、MSC投与+リハビリテーション群、MSC投与群、リハビリテーション群、vehicle投与群の順に有意に運動機能の改善を認めた。

(2) 免疫組織学的解析

シナプスのマーカーであるSynaptophysin抗体を用いて免疫染色を行ない、共焦点顕微鏡によって観察し、健常側の海馬および基底核におけるシナプス数を定量解析した結果、シナプス数はリハビリ併用群において有意な増加傾向を示した。

(3) MRI ex vivo DTI

DTI tractography において、病側大脳皮質の運動野から半球間をつなぐ神経回路を観察した。神経繊維の本数は、vehicle 投与群よりも MSC 投与群の方が有意に多く、正常の脳よりも MSC 投与群の方が少ない結果が得られた。

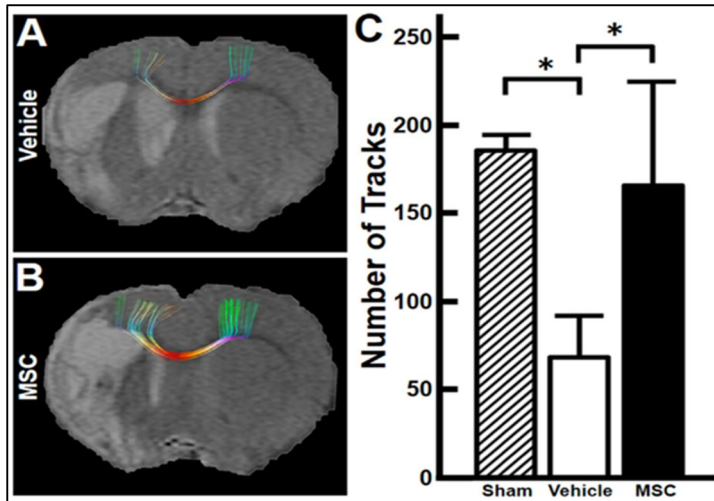


図 1: 脳梗塞ラットの DTI
A: 非 MSC 投与群、B: MSC 投与群
左右大脳半球を連絡する神経線維数は MSC 投与群で有意に多い。
(Nagahama et al., Brain Res, 2018 より一部改変引用)

(4) 神経解剖学的解析

順行性神経トレーサーを障害側大脳皮質の運動野に投与し、半球間をつなぐ神経回路を観察した。非障害側運動野のレイヤー I、II、III、IV、V において、GFP 陽性細胞数は、vehicle 投与群よりも MSC 投与群の方が有意に多く、正常脳よりも MSC 投与の方が少ない結果が得られた。

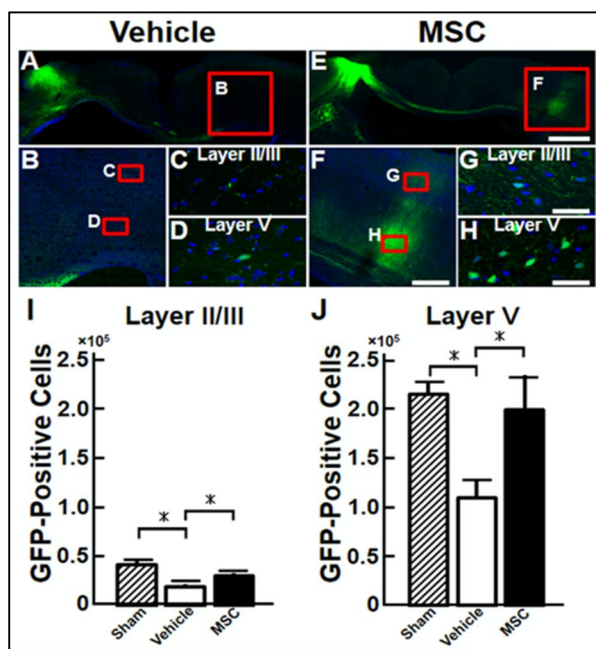


図 2: 図 1 の神経線維の蛍光染色による神経線維追跡
A: 非 MSC 投与群、E: MSC 投与群
脳梗塞側より順行性神経トレーサーを注入することで神経線維を染色し、健常側との連絡を描出、定量した。MSC 投与群において有意に神経線維数が多いことを明らかにした。
(Nagahama, et al., Brain Res, 2018 より一部改変引用)

(5) 神経栄養因子の変化

脳実質、血漿そして血清に含まれる brain derived neurotrophic factor (BDNF) を解析した。脳実質と血漿に含まれる BDNF は、vehicle 投与群よりも MSC 投与群の方が有意に増加していた。さらに、脳実質と血漿に含まれる BDNF には、正の相関関係を認めた。血清に含まれる BDNF は、vehicle 投与群と MSC 投与群の間に差を認めなかった。

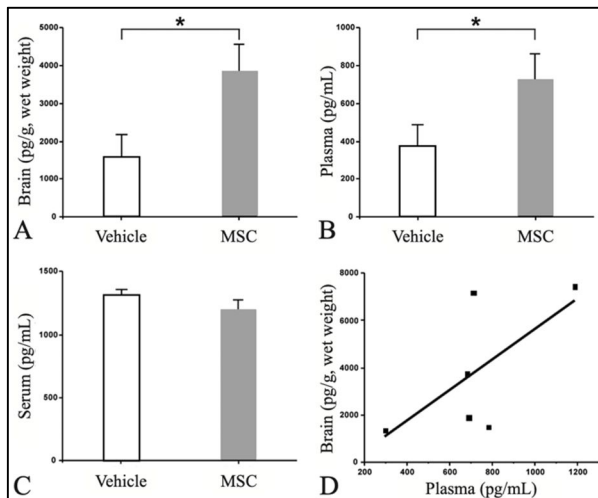


図 3: BDNF の解析

A: 脳実質内の BDNF、B: 血漿内の BDNF、C: 血清内の BDNF、D: 脳実質内と血漿内の BDNF の相関

脳実質と血漿に含まれる BDNF は、MSC 投与で有意に増加しており、正の相関関係を認めた。血清に含まれる BDNF は、vehicle 投与群と MSC 投与群の間に差を認めなかった。

(Nakamura, et al., Journal of Neurosurgical Sciences, 2019 より一部改変引用)

以上の結果から、MSC 治療にリハビリを併用することで、運動機能の回復に相乗効果が得られるだけでなく、健常側の脳半球においてもシナプス新生を亢進することがわかった。

先行研究において、我々は、病側の脳皮質運動野の脳梗塞巣周囲の脳において、シナプス新生が生じることが、運動機能の回復に貢献する可能性があることを報告している (Sasaki Y. et al., PTJ, 2016)。今回の研究において、健常側の海馬および基底核におけるシナプスのマーカーである synaptophysin 発現の上昇が認められ、シナプス新生が起こっていることが観察された。これらの脳における広範な plasticity の賦活化は、MSC 治療にリハビリを併用することによって、病側のみならず健常の脳においても、シナプスの新生が誘導され、皮質-線条体、皮質-視床および皮質-脊髄間など脳・脊髄中枢神経全体の神経回路における rewiring の再構築が惹起されることにより、神経機能回復に寄与していると考えた。

本研究では、DTI tractography での画像診断学的解析や神経トレーサーを用いた組織学的解析において、神経回路の変化を検討した結果、病側脳皮質の運動野から半球間をつなぐ神経回路は、MSC 投与群が vehicle 投与群と比較して有意に多いという変化を認めた。また、脳実質内と血液中に存在する BDNF を計測し、その量を比較検討した。脳実質内の BDNF は、MSC 投与群が vehicle 投与群よりも有意に増加していた。血液中の BDNF は、血漿において脳実質内の BDNF と同様に、MSC 投与群が vehicle 投与群よりも有意に増加していたのに対し、血清においては、MSC 投与群と vehicle 投与群の間に有意な差を認めなかった。さらに、脳実質内の BDNF と血漿中の BDNF の間には、正の相関も認めた。これらの結果から、血漿中の BDNF の計測が、MSC 投与の functional viability を反映する可能性があるかと推測された。血漿の測定が有効であった理由として、血漿中の BDNF が血清中の BDNF よりも安定していること、血漿は BDNF のように小さいタンパク質の計測に適していることが考えられた。

現在、MSC 投与にリハビリを併用した群においても、DTI tractography や血漿中の BDNF の計測を行い、先に述べた結果と同様に、治療効果の指標になり得ることを示唆する良好な結果が得られている。

臨床における MSC 治療後の治療効果の経時的な判定には、これまで身体機能検査や脳梗塞体積などの画像診断を主に用いており、それ以外に有効な指標は乏しい。しかし、本研究の結果により、DTI tractography を用いた神経回路の解析や血漿を用いた BDNF のモニタリングなどが、新たな指標になりうる可能性があることが推測された。

今後は、リハビリ併用群においてさらなる脳における可塑性の解析を進め、治療効果を反映するバイオマーカーの確立と、MSC 治療の効果を最大限に引き出すリハビリプロトコルの確立に向けた研究を進める必要がある。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagahama Hiroshi, Nakazaki Masahito, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Namioka Takahiro, Namioka Ai, Oka Shinichi, Onodera Rie, Suzuki Junpei, Sasaki Yuichi, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 1695
2. 論文標題 Preservation of interhemispheric cortical connections through corpus callosum following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 37～44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.05.033	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 該当する

1. 著者名 Nakamura Hideyuki, Sasaki Yuichi, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Nakazaki Masahito, Namioka Takahiro, Namioka Ai, Onodera Rie, Suzuki Junpei, Nagahama Hiroshi, Mikami Takeshi, Wanibuchi Masahiko, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 63
2. 論文標題 Elevated brain derived neurotrophic factor levels in plasma reflect in vivo functional viability of infused mesenchymal stem cells for stroke in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgical Sciences	6. 最初と最後の頁 42-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.23736/s0390-5616.17.03989-3	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木 雄一
2. 発表標題 実験的脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞移植とリハビリテーションの相乗効果
3. 学会等名 第37回日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2018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	佐々木 祐典 (Sasaki Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	本望 修 (Honmou Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	山下 達郎 (Yamashita Taturou) (60815439)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	