

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10854

研究課題名(和文) 脳出血に対するヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた神経再生療法

研究課題名(英文) human adipose-derived stem cell therapy for hemorrhagic stroke

研究代表者

高木 俊範 (Takagi, Toshinori)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00452152

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)：コラゲナーゼ誘発脳出血モデルマウス(C57BL/6)に対し、脳出血誘導24時間後にヒト脂肪由来幹細胞(hADSC)の静脈内投与により、脳出血により悪化する高次脳機能障害ならびに運動機能障害が改善することを示した。またその有効性メカニズムとしては、亜急性期にhADSC群で血腫周囲のCD11b+細胞の減少を認めた。次にフローサイトメトリーにて評価を行ったところ、マクロファージやミクログリアはhADSC投与により絶対数が脳内で抑制されていることが示された。これらの結果からhADSCは脳出血の急性期から亜急性期において、免疫担当細胞を抑制することで慢性期の神経所見を改善する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、予後を改善し得る治療に乏しい急性期脳出血において、慢性期の神経学的後遺症を軽減し得る治療が、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いることで達成可能である可能性を示している。すでに脳梗塞に対する骨髄由来間葉系幹細胞を用いた治験が多数行われているが、本研究の結果は、間葉系幹細胞を用いた細胞治療が、脳出血という新たな疾患をターゲットとし得ること、またより侵襲が少なく入手可能な脂肪組織由来の間葉系幹細胞によっても、脳卒中の予後を改善し得る可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Intravenous administration of human adipose-derived stem cells (hADSC) 24 hours after induction of cerebral hemorrhage improved motor functions and cognitive functions worsened by cerebral hemorrhage using collagenase-induced cerebral hemorrhage model mice (C57BL/6). The neurological improvement after intracranial hemorrhage was achieved by a decrease in CD11b+ cells around hematomas in the hADSC group at the subacute stage. Subsequent evaluation by flow cytometry showed that the absolute numbers of macrophages and microglia were suppressed in the brain by administration of hADSC. These results indicate that hADSC suppresses immune cells during the acute to subacute phase of cerebral hemorrhage and improves neurological findings at the chronic phase.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脂肪組織由来間葉系幹細胞 脂肪 間葉系幹細胞 脳出血 細胞治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳出血は現在でも脳卒中の約 20%を占め、高率に後遺症を残す疾患である。同じ脳卒中である脳梗塞には、血栓溶解療法や血栓回収療法といった新たな治療法が確立されたが、未だ脳出血に対する根本的治療はなく、出血により損傷された脳機能の回復は困難とされている。世界中で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いるが、脳虚血や外傷性脳損傷が中心であり、脳出血に対する再生医療の研究はまだ少ないのが現状である。

脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell : ADSC) は多様な分化を示す間葉系幹細胞の一種であり、ある条件下においては神経幹細胞としての特性を獲得する (Qin Y, Cellular Reprogramming 2015)。また、比較的低侵襲に細胞の採取が可能であるため、細胞治療における有望なソースである。

当研究室では、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。我々はこれらの実験の中から、ADSC の培養法を確立し、さらに本学倫理審査委員会の承認後、ヒト脂肪組織を採取し、hADSC の分離培養に成功している。つまり、幹細胞移植のソースとしての hADSC を保有している状況である。

このような背景から、現在でも有効な治療法がない脳出血に対し、hADSC を用いた神経再生治療に着目し、臨床応用まで視野に入れて取り組む。本研究においては、まずマウス脳出血モデルを用い、hADSC の頭蓋内局所投与による神経再生の確認および機能改善効果を検討する。

2. 研究の目的

本研究期間内に明らかにする目標は、マウス脳出血モデルを用い、hADSC の頭蓋内投与による神経再生の確認と、神経機能改善の確認である。またそのメカニズムとして、急性期の酸化ストレスの改善効果・抗炎症作用について検討を行う。また神経再生の確認と共に、周囲の神経とのネットワーク形成について検討を行う。次に、hADSC を用いた神経再生療法が有効な時間について明らかにする。これは、急性期投与であれば、他家 hADSC を要するのに対し、慢性期投与で効果があれば自家 hADSC による治療も視野に入るからである。

以上の検討終了後に、hADSC の細胞規格の設定ならびに造腫瘍性をはじめとした安全性試験を行い、前臨床試験の完遂を目標とする。

3. 研究の方法

マウス脳出血モデルを用い、hADSC による神経機能改善効果の確認および神経再生および神経ネットワーク形成の確認を行う。これらは神経行動学的試験ならびに免疫染色・ウェスタンブロットおよび PCR を用いて解析を行う。

また、hADSC の細胞規格設定ならびに造腫瘍性を含めた安全性試験を併せて行う。これらの検討は、FACS ならびに免疫染色法により評価する。

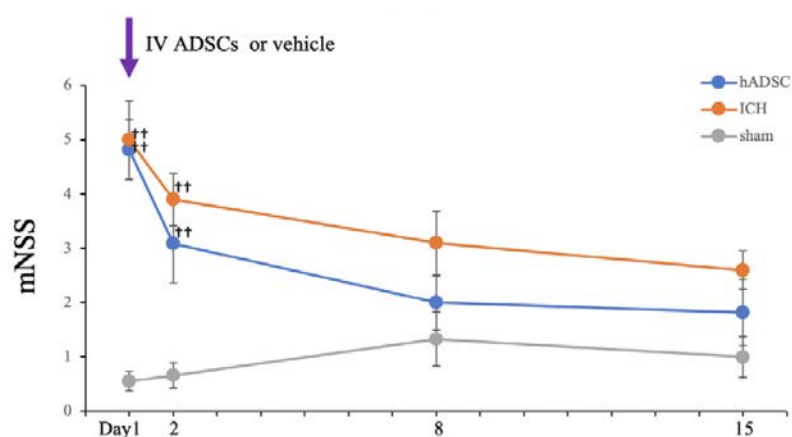
4. 研究成果

(1) マウス脳出血モデルに対する hADSC による神経機能改善効果の検討

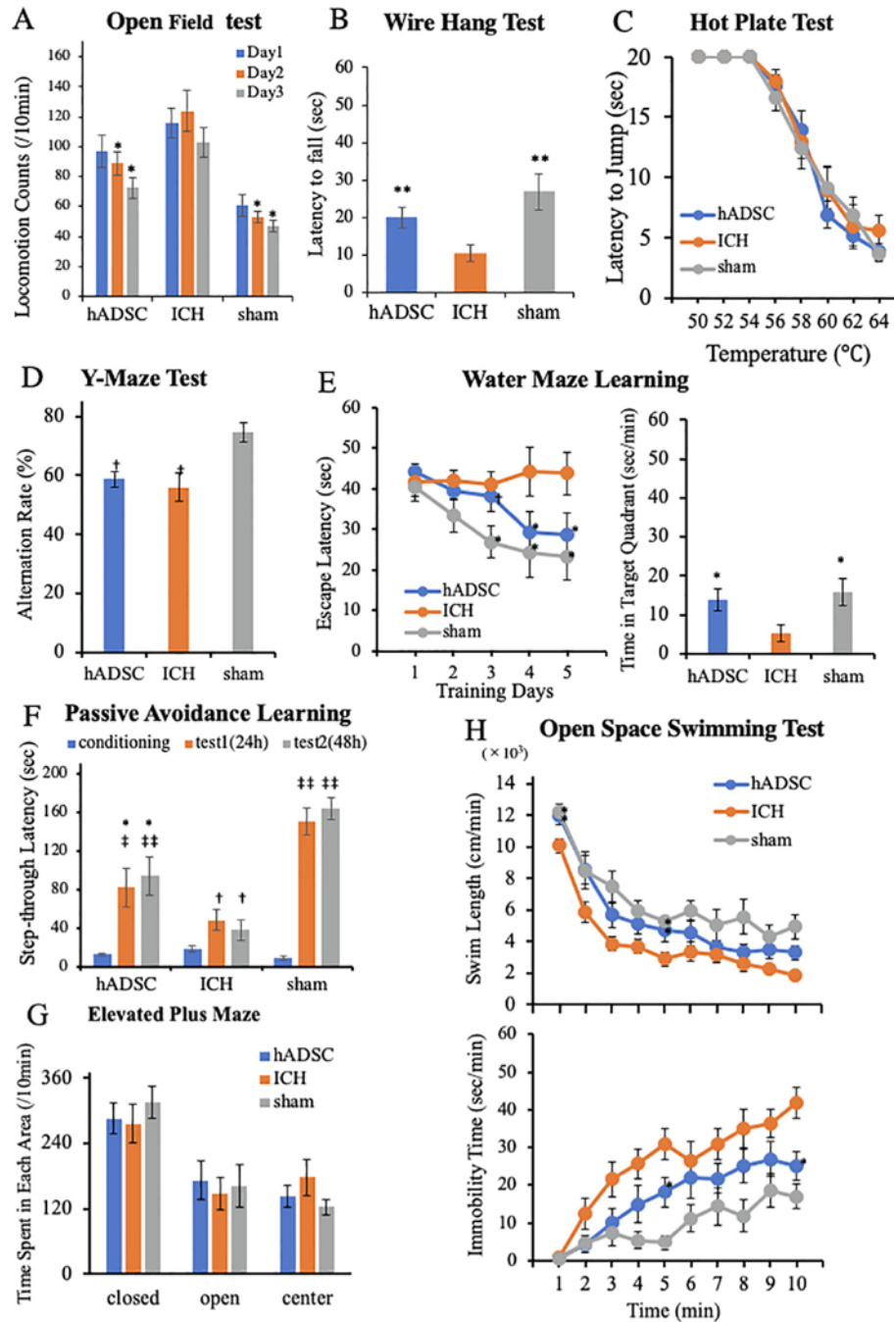
マウス脳出血モデルを作成し、hADSC を頭蓋内投与した。投与は出血巣のやや外側に投与する。頭蓋内出血誘導後、24 時間後に hADSC を投与する。経時的な modified Neurological Severity Score (mNSS) および 2 か月前後の慢性期に詳細な神経学的評価を、株式会社 行医研にて行った。

mNSS の経時的变化を右に示す。Day1 での神経学的重症度は hADSC 群と ICH 群で差は無かったが、Day8 ならびに Day15 では hADSC 群で mNSS が ICH 群と比べて改善していたが、有意差は認めなかった。

次に脳出血誘導 2 か月前後にて、次項に示す神経学的評価を詳細に行った。

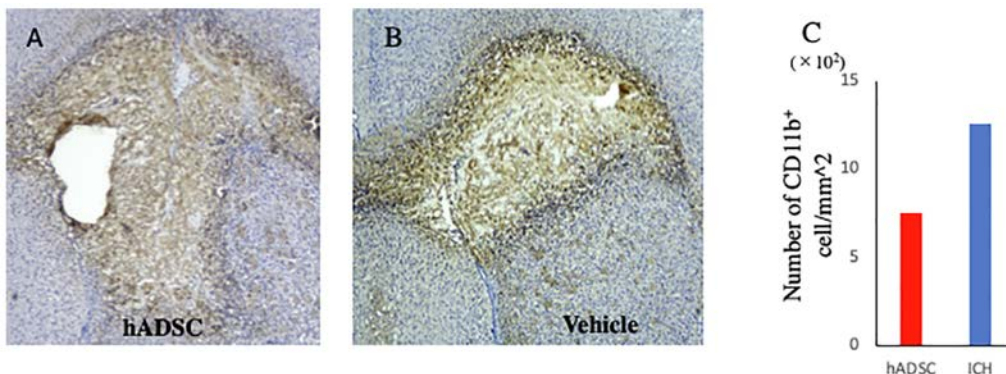


まず、Open field testでは、脳出血後には不安行動が見られるが、hADSC群で改善が見られた。また日ごとの馴化も脳出血群では見られなかったが、hADSC群で改善していた。Wire hang testでは、hADSC群で運動機能、意欲の改善が見られた。同様の結果はOpen Space swimming testでも認められた。Water Maze LearningおよびPassive Avoidance Learningでは、脳出血により悪化した記憶・学習機能がhADSC投与により改善が認められた。一方でHot Plate testでは、本モデルでは感覚機能が障害されていないことが明らかとなった。以上の結果より、hADSC投与は、脳出血後の運動機能、記憶学習機能・不安行動を改善し得る。



(2) マウス脳出血モデルに対する hADSC による神経機能改善メカニズムの検討

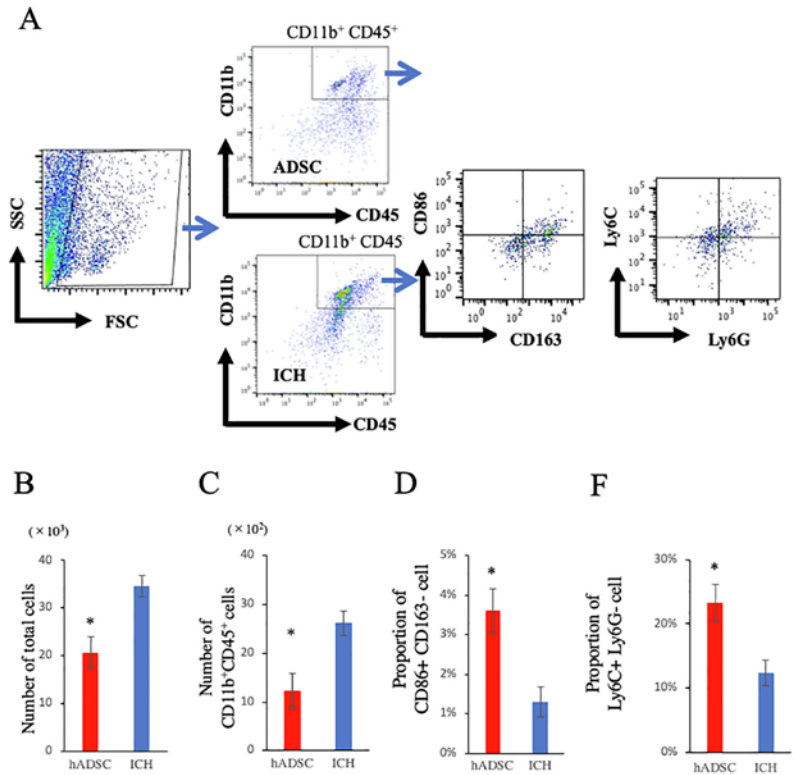
脳出血誘導 1 週間後では、hADSC 投与群において CD11b(+) で表される、ミクログリア・マクロファージの血腫周囲への集積が抑制されていた (下図)。



次に CD11b(+) 細胞を詳細に評価すべく、Flow cytometry を用いて評価を行った。

右図 A が本検討のシェーマである。まず hADSC 投与群では、総細胞数および CD11b(+)/CD45(+) の細胞数の減少していた。その分画について更に検討したところ、CD86(+)/CD163(-) 細胞および Ly6C(+)/Ly6G(-) 細胞の hADSC 群での上昇を認めた。

これらの結果から、hADSC 投与は亜急性期の炎症細胞浸潤自体を抑制し、その分画としては M2 に相当するマクロファージの分画が主体となっていることが示された。

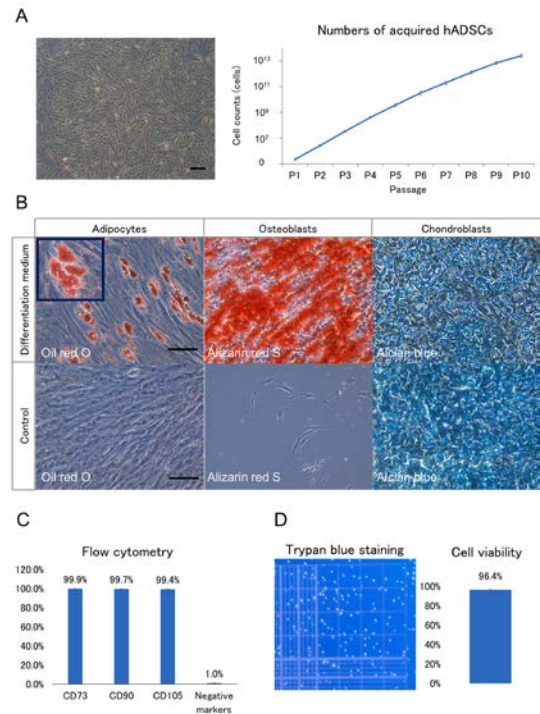


(3) hADSC の前臨床試験

hADSC の臨床応用を視野に入れた前臨床試験のまとめを右に示す。hADSC は増殖能が良好であり、形状・表面マーカーは間葉系幹細胞の criteria を満たした。また骨・脂肪・軟骨への分化能を認めた。凍結保存、融解によっても、高い細胞生存率を示した。

次に造腫瘍能についても評価した。hADSC は長期間継代しても、腫瘍形成能は認めなかった。

これらの結果から、hADSC は間葉系幹細胞であり、凍結保存可能であり、急性期の投与も可能な細胞製剤として開発可能であると考えられた。



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 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Kuramoto Y, Takagi T, Tatebayashi K, Beppu M, Doe N, Fujita M, Yoshimura S. | 4. 巻 1711 |
| 2. 論文標題 Intravenous administration of human adipose-derived stem cells ameliorates motor and cognitive function for intracerebral hemorrhage mouse model. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Brain Res. | 6. 最初と最後の頁 58-67 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.12.042. | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Tatebayashi K, Takagi T, Fujita M, Doe N, Nakagomi T, Matsuyama T, Yoshimura S. | 4. 巻 1712 |
| 2. 論文標題 Adipose-derived stem cell therapy inhibits the deterioration of cerebral infarction by altering macrophage kinetics. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Brain Res. | 6. 最初と最後の頁 139-150 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.01.037. | 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0件

〔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 | 内田 和孝 (Uchida kazutaka) (10570674) | 兵庫医科大学・医学部・講師 (34519) | |
| 研究分担者 | 吉村 紳一 (Yoshimura Shinichi) (40240353) | 兵庫医科大学・医学部・教授 (34519) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 白川 学 (Shirakawa Manabu) (50425112) | 兵庫医科大学・医学部・講師 (34519) | |
| 研究 分 担 者 | 中込 隆之 (Takayuki Nakagomi) (80434950) | 兵庫医科大学・医学部・教授 (34519) | |