

令和 2 年 5 月 27 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：17K10901

研究課題名(和文) 脳梗塞に対する骨髄幹細胞移植による脳のplasticity亢進による神経機能回復

研究課題名(英文) Improvement in neural function following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in experimental cerebral stroke

研究代表者

鈴木 淳平 (Suzuki, Junpei)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00572596

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)：実験的脳梗塞に対してMSCを経静脈的に移植した結果、運動機能の改善が得られることが判明した。神経機能の回復をもたらすMSCの治療メカニズムとして、投与したMSCによって脳の機能的代償変化が賦活化されるとともに、特に左右大脳半球を結ぶ神経線維を損傷から保護することで、自然回復で得られる以上の運動機能の改善に貢献していることを報告した(Nagahama et al., Brain Res, 2018)。この結果から我々は、MSC治療によって、脳内には明らかな神経回路の再構築が惹起される可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験的脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与は、すでに臨床における安全性や有効性の検討がなされている。本研究における研究成果によって、骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与による治療効果を発揮するメカニズムとして、骨髄間葉系幹細胞の投与によって、脳梁を介する両側大脳皮質運動野の連絡線維の保護が惹起され、それが神経機能の回復に貢献している可能性を明らかにしたことは、骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与によって、病側脳のみならず反対側の皮質に対して喪失した神経機能の回復に貢献するメカニズムが作動することを示唆しており、今後の臨床における有用性を考慮した際の社会的意義は高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intravenous of mesenchymal stem cells (MSCs) following cerebral infarction exerts functional recovery. Previous study has suggested potential therapeutic mechanisms that promote neuroprotection and synaptogenesis, secretion of neurotrophic factors, remodeling of neural circuits, and elevation of trophic factors. In addition to these mechanisms, we hypothesized that restored interhemispheric connectivity might be an additional mechanism of neural improvements. In this study, we have demonstrated that there was anatomical restoration of cortical interhemispheric connections after infused MSCs in middle cerebral artery occlusion (MCAO). These results suggest that distinct preservation of interhemispheric cortical connections through corpus callosum was preserved by intravenous infusion of MSCs. This anatomical preservation of the motor cortex in the contralateral hemisphere may contribute to improvements in neural function after MSC therapy for cerebral stroke.

研究分野：脳神経外科学、再生医学

キーワード：脳梗塞

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、ラット脳梗塞モデル (MCAO) へ骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を静脈内投与すると、治療効果が得られることを報告してきた (研究業績参照)。これまでの基礎研究の知見より、MSC による治療効果のメカニズムは、サイトカインによる神経栄養作用、血管新生、脱髄軸索の再有髓化、神経再生による脳の可塑性の調節等、と多段階的・協奏的に発揮することによることが判明している (研究業績参照)。

MSC 移植により運動・感覚機能が回復する過程における脳の plasticity の変化を、動物用 MRI (7T) による functional MRI (fMRI) を用いて研究した結果、MSC 非移植群で検出された左前肢刺激による fMRI の賦活信号は右体性感覚野皮質内に限局していたのに対し (図 1 上段)、MSC 移植群では fMRI 賦活信号パターンが右体性感覚野皮質内に限局していた群 (片側賦活化群: 図 1 中段) と両側皮質に信号が検出された群 (両側賦活化群: 図 1 下段) の 2 パターンに分かれることが判明した。

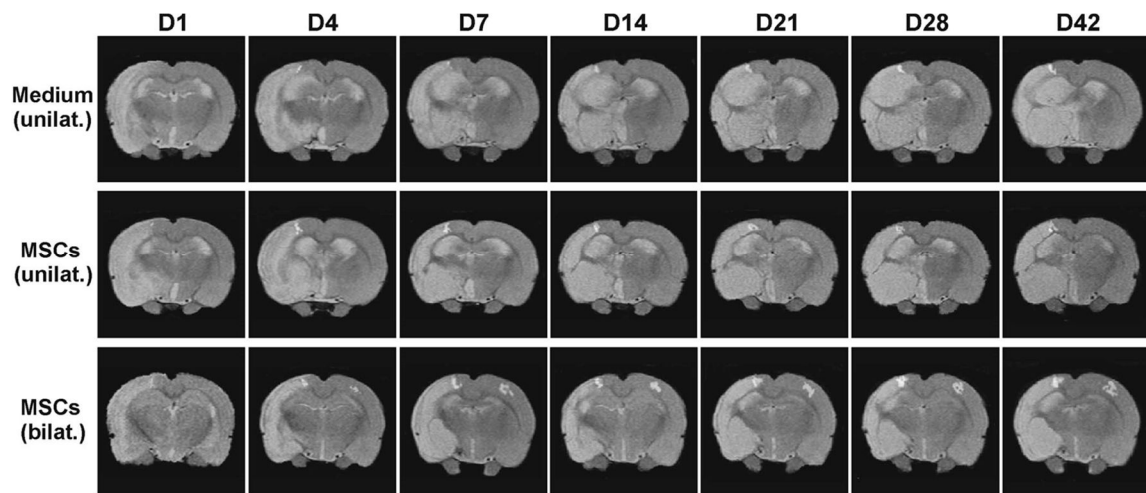


図 1: 骨髄間葉系幹細胞を移植後の継続的 fMRI 画像

骨髄間葉系幹細胞移植群では、病側 (右) 皮質の可塑性が亢進するのみならず、健常側皮質の可塑性を賦活化し、本結果は運動機能の改善とも相関した。(Suzuki et al., 2013)

運動機能の回復は、移植後次第に、両群ともに有意に回復していたが、両側賦活化群と片側賦活化群を比較すると、MRI T2 強調画像より算出した梗塞巣体積の経時的変化には有意差が無いにも関わらず、興味深いことに、健常側を含む両側の皮質に fMRI 信号が検出される群のトレッドミルを用いた運動機能の改善度は、病側皮質に fMRI 信号が検出される群、および非移植群よりも高く、シナプス新生も促進された (Sasaki et al., 2016)。

このメカニズムは、ラット脳梗塞モデルに対して MSC を移植した後に、脳の plasticity が変化することによって、脳梁を介する皮質-皮質間、皮質-線条体間、皮質-視床間、皮質-脊髄間の軸索が構築する神経回路の rewiring の増加が生じた結果、神経機能の回復に寄与した可能性があると考えられた (Suzuki et al., 2013)。さらに、最近、ラット脳梗塞モデルに対する MSC 移植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 移植単独群よりも、併用群の脳梁の厚さの増加および脳梗塞周囲にシナプスの新生による脳の plasticity の亢進が誘導されることにより、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 et al., 2016)。

2. 研究の目的

上述の研究結果から、MSC 移植による脳梗塞の運動機能の回復過程で、脳の plasticity の変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究では、脳梗塞モデルラットに MSC を経静脈的に投与した後に生じるこれらの脳の plasticity の変化を、Ex vivo MRI Diffusion

Tensor Imaging および組織学的に解明し，新しい治療法の開発の基礎的なデータとすることを目的とした．

3．研究の方法

実験的脳梗塞モデルは，SD ラットに対して Intraluminal thread method を用い，中大脳動脈永久閉塞（MCAO）モデルを作成した．作成後にラットより採集・培養した MSC を経静脈的に投与し，下記の実験群を設定して治療効果の検討を行った．

Group 1：コントロール群；培養液（DMEM）静脈内投与

Group 2：MSC 投与群；骨髄間葉系幹細胞静脈内投与（脳梗塞発症後翌日）

（1）行動学的評価

経時的にトレッドミルを用いてラットの最大走行速度を測定し，運動機能を評価した．

（2）組織学的解析

ラット脳に神経トレーサーを局所注入した組織を採集し，作成した凍結切片を超解像共焦点顕微鏡（ZeissLSM780, ELYRAS.1）を用いて解析を行った．

（3）生化学的解析

観察期間の終了したラットより，組織および血漿，血清を採集し，ELISA 法によって BDNF 量の定量解析を行った．

（4）Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)

動物用 MRI（7T）を用いた Ex vivo MRI Diffusion Tensor 法により，MSC 移植後の脳梗塞によって損傷を受けた神経回路の修復の程度などを評価した．

4．研究成果

（1）行動学的解析

トレッドミル試験によって，ラットの最大走行速度を測定した結果，細胞移植群において，運動機能が回復し，非移植群と統計学的に有意な差を認めた．

（2）組織学的解析

組織学的解析によって，MSC 移植群において，脳梁を介した神経線維連絡が強化されていることが判明した．さらに，脳梗塞周囲の組織で，pre-synaptic マーカーであるシナプトフィジンの発現の上昇を認め，脳の可塑性の亢進が誘導されていることが明らかになった．

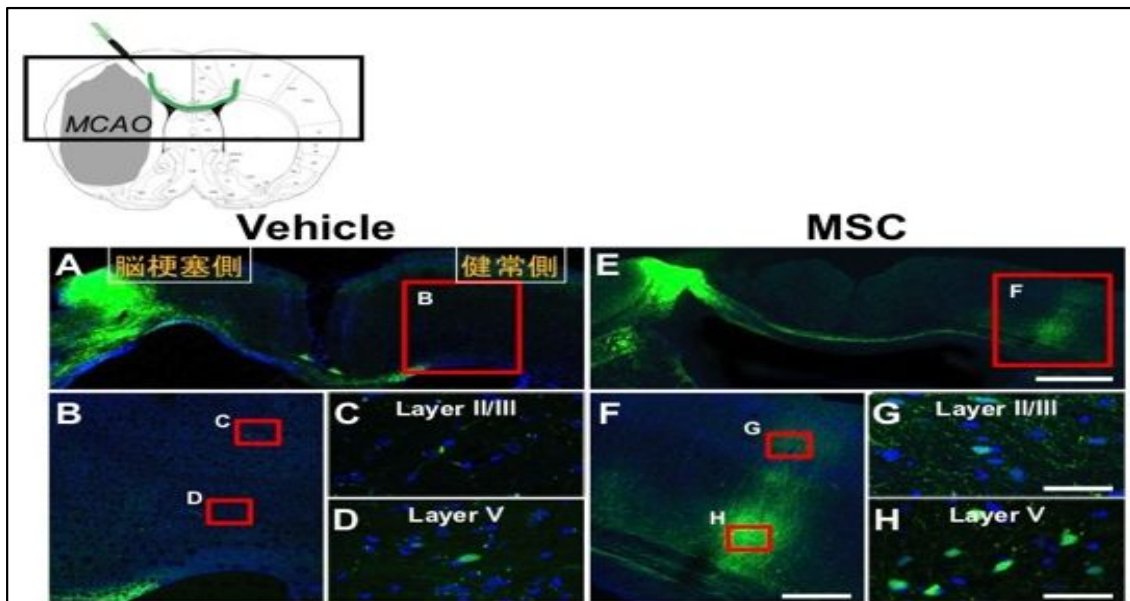


図2：図1の神経線維の蛍光染色による神経線維追跡

A：非 MSC 移植群，E：MSC 移植群，脳梗塞側より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，MSC 移植群で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)

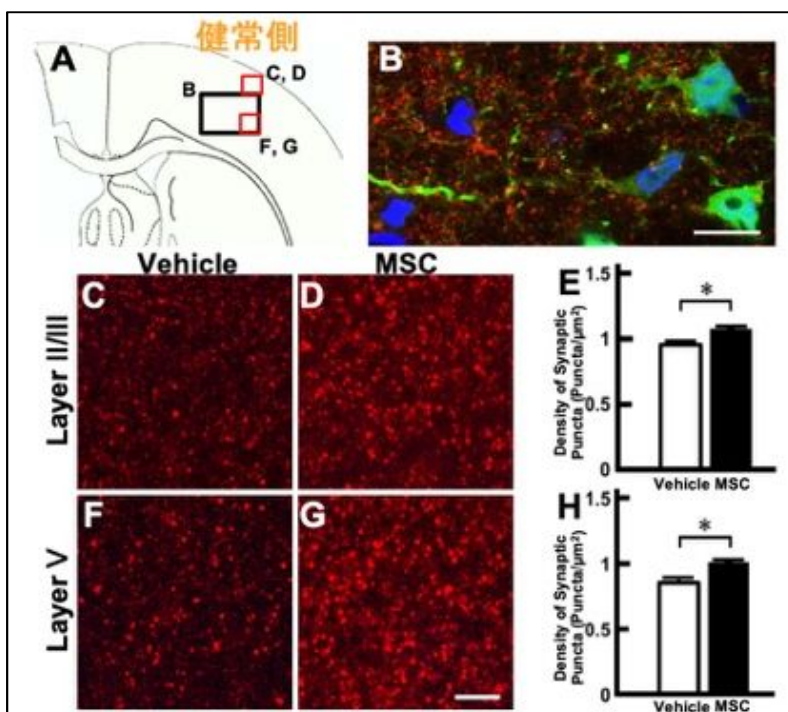


図3：健常側大脳皮質のシナプス新生

B：健常側大脳皮質，赤) 神経細胞，緑) 神経トレーサー，青) 細胞核，C, F：非 MSC 移植群，D, G：MSC 移植群，健常側大脳皮質のシナプス新生の数は MSC 移植群で有意に多い。(Nagahama et al., Brain Res, 2018 より一部改変引用)

(3) 生化学的解析

実験的脳梗塞モデルの損傷側の脳実質および血漿，血清から，ELISA 法を用いて，BDNF 量の定量解析を行った結果，MSC 移植群において，脳実質および血漿において BDNF が増加しているこ

とが明らかとなった。

(4) Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)

観察期間終了後に、ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳および脊髄組織を dissect した。組織は、4%パラホルムアルデヒドで後固定を行なって、動物用 MRI (7T) を用いて Ex vivo MRI による Diffusion Tensor Imaging を行なった。Ex vivo 法は撮像時間の制限・体動がないために、極限まで空間分解能を向上させており、作成した高精度の DTI 画像は、MSC 移植後の神経回路および損傷軸索の修復過程に対する有効な評価法となると思われた。

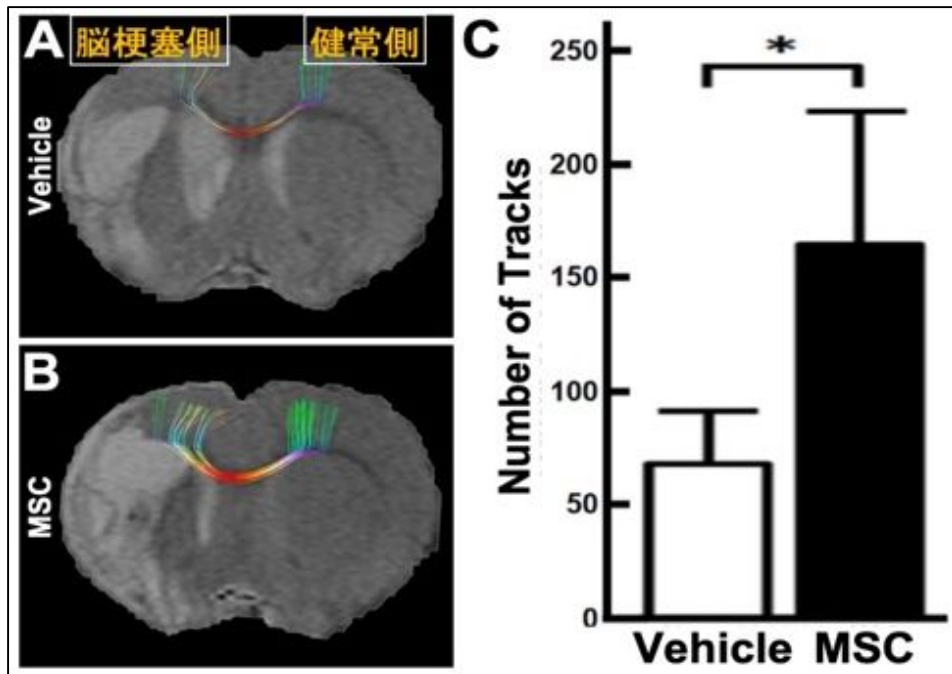


図 4：脳梗塞ラットの DTT

A：非 MSC 移植群，B：MSC 移植群，脳梁を介した左右大脳半球を連絡する神経線維数は MSC 移植群で有意に多い。(Nagahama et al., Brain Res, 2018 より)

以上より、脳梗塞モデルに対する MSC の静脈内投与によって誘導される脳の plasticity の変化を組織学的および MRI DTI によって解析することが可能であった。以上より、本研究費は有効に使用された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Nakazaki Masahito, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Suzuki Junpei, Sasaki Yuichi, Nagahama Hiroshi, Hashi Kazuo, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 408
2. 論文標題 Intravenous infusion of mesenchymal stem cells improves impaired cognitive function in a cerebral small vessel disease model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 361 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.04.018	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 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 Namioka Ai, Namioka Takahiro, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Nakazaki Masahito, Onodera Rie, Suzuki Junpei, Sasaki Yuichi, Nagahama Hiroshi, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 131
2. 論文標題 Intravenous infusion of mesenchymal stem cells for protection against brainstem infarction in a persistent basilar artery occlusion model in the adult rat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1308 ~ 1316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2018.4.JNS173121	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 Namioka Takahiro, Namioka Ai, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Nakazaki Masahito, Onodera Rie, Suzuki Junpei, Sasaki Yuichi, Nagahama Hiroshi, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 131
2. 論文標題 Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of chronic cerebral infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2018.5.JNS18140	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 Sakai Takuro, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Nakazaki Masahito, Fukumura Shinobu, Kobayashi Masaki, Tsutsumi Hiroyuki, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 22
2. 論文標題 Functional recovery after the systemic administration of mesenchymal stem cells in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Pediatrics	6. 最初と最後の頁 513 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2018.5.PEDS1845	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 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 Nakazaki Masahito, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Namioka Takahiro, Namioka Ai, Onodera Rie, Suzuki Junpei, Sasaki Yuichi, Nagahama Hiroshi, Mikami Takeshi, Wanibuchi Masahiko, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 127
2. 論文標題 Intravenous infusion of mesenchymal stem cells inhibits intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator therapy for transient middle cerebral artery occlusion in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 917 ~ 926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2016.8.JNS16240	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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 わが国の再生医療の現状と未来
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 Cell therapy for spinal cord injury
3. 学会等名 第46回国際腰椎学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脊髄再生治療のリハビリテーション医療
3. 学会等名 第56回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脊髄損傷の新たな幹細胞製品
3. 学会等名 第8回PMDA戦略相談連携セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 Intravenous injection of mesenchymal stem cells for spinal cord injury
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 札幌医科大学の再生医療
3. 学会等名 第4回フォーラム「これからの産業とさっぽろの未来-医療関連産業の集積に向けて~」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脊髄損傷に対する新しい幹細胞製剤（再生医療等製品）
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 急性期の脊髄損傷治療 ステミラック注について
3. 学会等名 NPO法人 日本せきずい基金 再生医療講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脊髄損傷患者に対する新しい幹細胞製剤
3. 学会等名 AMEDシンポジウム（成果報告）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脳梗塞に対する再生治療
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 再生医療の現状
3. 学会等名 第25回日本義肢装具士協会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療
3. 学会等名 第68回日本病院学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療－医師主導治験による実用化－
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脊髄損傷の再生医療 - 医師主導治験による実用化 -
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 中枢神経再生とリハビリテーション
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 本望 修
2. 発表標題 脳卒中と細胞治療:臨床への諸問題
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学会学術集会 STROKE 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療 医師主導治験による実用化
3. 学会等名 第23回日本脳神経外科救急学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本望 修
2. 発表標題 老年医学領域の再生医療の現状と課題
3. 学会等名 第59回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sasaki, Masanori, M.D., Ph.D. (et al.)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer Japan	5. 総ページ数 156
3. 書名 Cell Therapy Against Cerebral Stroke	

〔産業財産権〕

〔その他〕

その他の業績については、札幌医科大学 医学部 フロンティア医学研究所 神経再生医療学部門ホームページ等で報告している。

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)	2018.2.8 削除 2019.3.25 追加

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	長濱 宏史 (Nagahama Hiroshi) (20725676)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究 分担者	中崎 公仁 (Nakazaki Masahito) (70722461)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	2019.3.25 削除
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 協力者	岡 真一 (Oka Shinichi)		
研究 協力者	佐々木 優子 (Kataoka-Sasaki Yuko)		