

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11595

研究課題名(和文)再生医療を用いた重症頭部外傷治療戦略の確立と効率化

研究課題名(英文)Strategies and methods of regeneration medicine for severe head trauma

研究代表者

金谷 貴大 (Kanaya, Takahiro)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00787591

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)：本研究はラット頭部外傷モデルにヒト胎児神経幹細胞およびiPS由来神経細胞を移植し、行動実験及び組織学的、生化学的検討から頭部外傷に対する再生医療の有用性を示すことを目的としたものであり、将来的には重症頭部外傷に対する神経再生医療の導入を目指すものである。本研究で我々は重症頭部外傷モデルを作りヒト胎児神経幹細胞およびiPS由来神経細胞を移植することで神経再生が可能か評価することを目的としたが、統計学な有意差を得るには至らなかった。しかし本研究を通して得られた知見は今後本研究をさらに推進する上で必要なものであり、この結果を基に研究を継続していく方針である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で我々は重症頭部外傷モデルを作りヒト胎児神経幹細胞およびiPS由来神経細胞を移植することで神経再生が可能か評価することを目的としたが、統計学な有意差をえるには至らなかった。しかし本研究を通して得られたモデル構築のアルゴリズムや実験方法は今後同様の研究を推進する上で礎となるものである。知見は今後本研究をさらに推進する上で必要なものであり、この結果を基に研究を継続していく方針である。

研究成果の概要(英文)：The aim of our research is to evaluate how regenerate medicine can contribute to head trauma through examination of rat models which are artificially given traumatic damage and human stem cell or iPS cell transplant. This study may finally lead regenerate medicine to human's severe head trauma and can recovery neurological functions once they had lost. We tried to make several head trauma models to transplant stem cells or iPS cell and confirm how these transplant cells work for recovery of neurological dysfunctions, but we could not obtain statistically significant outcomes. However, this our examination methods could become one of the basis of researches which intend to develop regeneration medicine for head trauma. On the basis of this study, we are going to promote animal model researches for ultimate goal of establishing regeneration medicines for human beings.

研究分野：救命救急

キーワード：重症頭部外傷 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷は近年死亡率の減少を見る一方で、後遺症のため要介護・要介助者が大きく増加している。これらを克服すべく、従来多くの治療法が研究されてきたが、多くの臨床研究では依然、急性期集中治療の有効性を実証できていない。

頭部外傷は一次的脳損傷と二次的脳損傷に大別されるが、従来の治療は二次的脳損傷を最小限に抑えること、すなわち頭部外傷の付加的増悪因子により進行する脳損傷の予防・軽減に重点が置かれており、外傷インパクトによって失われる脳機能(一次的脳損傷)を回復させる手段は現存しない。

これまで様々な臨床研究を通して二次的脳損傷に対する有効な治療法が確立され死亡率の減少に寄与してきたが、一次的脳損傷自体が大きい重症頭部外傷では二次的脳損傷を最小限に抑制し得たとしても外傷インパクトによって既に失われた機能を回復することはできないため、結果として後遺症のため要介護・要介助者が増加する傾向にある。

一度要介護者、要介助者となった場合、特に若年者や生産人口年齢に相当する年代ではその後の人生設計の変更を余儀なくされ、これは個人の限定した問題に留まらず、人口減少の過程にある我が国にとって重要な働き手を失うという点で社会的な損失でもある。

この現状を打破する一つの方法として、一次的脳損傷による脳組織破壊を修復するための頭部外傷治療として、再生医療の応用が期待されている。

再生医療に関しては一部の分野では既に実臨床化されている、中枢神経系分野に関しては頸髄損傷等のごく一部に限られる。

我々の研究は脳実質そのものに対する再生医療の第一歩となるべく立案されたものであり、長期的な目標としてはヒトを対象とした中枢神経系全般に対する再生医療の確立である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は頭部外傷の一次的脳損傷によって失われた機能の回復を主眼とする。

上記の通り、従来の頭部外傷の治療戦略は二次的脳損傷の最小化が目的であったのに対し、我々の研究でこれまで介入していなかった一次的脳損傷を実現させるための礎を築くことを目的とする。

最終的な目的はヒトの中枢神経損傷に対する再生医療の確立であるが、その前段階として、動物実験レベルで我々の手法が有効であるか、また問題点は何かを知る必要がある。

動物実験レベルでの安全性を確保するための土台として、動物に対して外傷を人工的に発生させることで外傷モデルを作成することとした。

外傷には急性硬膜下血腫、急性硬膜外血腫、脳挫傷、びまん性軸索損傷等、びまん性脳腫脹等の複数の受傷形態が存在しており、それによる脳損傷の形態も様々で機能予後もそれぞれ異なる。今回の研究では、急性硬膜下血腫モデル、脳挫傷モデル、爆傷損傷モデル、弾丸損傷モデル、脳虚血再灌流モデルを作成することとした。

この外傷モデルの作成は今回の研究のみならず、今後も外傷による脳損傷の研究を進める上で重要な工程である。

これらの外傷モデルに対し神経幹細胞や iPS 細胞を移植することで、頭部外傷によって失われた機能がどの程度回復するかを定量的に評価することを目的とした。

具体的には運動能力の回復の程度として遊泳時間を測定すること、また移植した GFP 導入 iPS 由来ヒト神経幹細胞または iPS 細胞由来神経幹細胞の発現の程度を数値化すること目標とした。

この研究を基に再生医療の有効性を明確にするとともに、再生医療が特に有効である外傷形態を明確にすることで、将来的な再生医療の効率化・適正化を目指す。

最終的には我が国が主導している再生医療の恩恵を、他分野に比べ未開の領域である重症頭部外傷患者にも篤く享受させることを最終目標とする。

### 3. 研究の方法

本研究では上記のように異なるラット頭部外傷モデルを作成することを予定した。頭部外傷は受傷機転によって損傷の部位や程度が大きく異なるため、複数のモデルを用意することとした。

具体的には急性硬膜下血腫モデル、脳挫傷モデル、爆傷損傷モデル、弾丸損傷モデル、脳虚血再灌流モデルの5つの外傷形態である。

これらの外傷モデルに対し同一のプロトコールで神経幹細胞や iPS 由来神経幹細胞を移植する。損傷形態によって神経細胞の生着度合には差が生じると予想され、複数のモデルを作ることは将来的には再生医療が特に有効な外傷形態の特定にすることにもつながり、また有効性の低い外傷に対しての過剰な資源投入を抑制することにもなる。

これらの移植された細胞は GFAP を発現するようになっており、これを定量化することで数値として有効性を示すことができる。

移植するのは GFP 導入非 iPS 由来ヒト NSC(NSI-566)または GFP 導入ヒト iPS 細胞由来神経細胞(iCellTM Induced Neurons) 400,000 個/4 $\mu$ L で、移植部位は傍損傷部位の海馬 - 運動野である。移植前に予め神経細胞のバイオマーカーである血清 UCH-L1 および グリオシスのバイオマーカーである GFAP を測定しておき、移植前後で発現量を比較する。

また生着した細胞が実際の機能回復にどの程度影響を与えているかの定量化として、運動機能の回復度合として数値化、具体的には外傷作成前、作成後 1 週間後、移植後 4~8 週間後にそれぞれ遊泳時間・遊泳距離を測定することとした。

またバイオマーカーも用いて、移植の適正なタイミングを明確にし、最終的には結果を集約し前臨床研究に向けたプロトコールの策定を達成することとした。

### 4. 研究成果

本研究ではモデル個体による差が出ないよう、安定した外傷モデル作成の作成が必須であった。我々は複数の方法で外傷モデルを作成したが、脳損傷が大きい場合は行動実験そのものが困難であり、一方で軽度の脳損傷では外傷モデルとしての役割を果たせないため、脳損傷の程度を決めることが重要点であったが、この外傷モデルの作成は想定以上に困難であった。

いくつかの個体は行動実験まで可能であったが、統計学的な評価を行うに十分なデータを確保することが困難であったため、当初の予定を 1 年延期して研究を進めたが想定した結果を得るには至らなかった。

中枢神経系への治療にアプローチする一環として海外での成果発表の機会は得たが、我々が目指した中枢神経系への再生医療を確立する第一歩としての本研究が最終的に目指した目標までは到達が困難であったのが実情である。

しかし、今回の研究を通して得られた知見、例えば動物モデルの作成に関する神経幹細胞の移植方法や外傷モデル構築の工夫など今後同様の研究を推し進める上で有用な情報は得られており、当初の目標には遠からず近づきつつあると感じている。

今後は今回の研究を通して明らかになった反省点を活かしつつ、将来的なヒトに対する治療の確立に向け、より発展した内容も実現できるよう継続的に研究を推進する所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金谷 貴大
2. 発表標題 Tailored management for PCAS with multidisciplinary biomarker strategy: Challenge for Guideline 2020.
3. 学会等名 Neurocritical Care Society (国際学会)
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	須田 智 (Suda Satoshi) (00366733)	日本医科大学・医学部・講師  (32666)	
研究分担者	山口 昌紘 (Yamaguchi Masahiro) (10787592)	日本医科大学・医学部・助教  (32666)	
研究分担者	菅野 晴夫 (Kanno Haruo) (40646808)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	
研究分担者	田中 佐智子 (Tanaka Sachiko) (50453824)	滋賀医科大学・医学部・准教授  (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	五十嵐 豊  (Igarashi Yutaka)  (50771101)	日本医科大学・医学部・助教    (32666)	
研究 分 担 者	横堀 将司  (Yokobori Shoji)  (70449271)	日本医科大学・医学部・准教授    (32666)	
研究 分 担 者	山田 真吏奈  (Yamada Marina)  (70508621)	日本医科大学・医学部・講師    (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関