

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K18130

研究課題名(和文)新規脳梗塞霊長類モデルの開発と再生研究

研究課題名(英文)Development and regenerative research of a novel primate model of cerebral infarction

研究代表者

小松 鉄平(Komatsu, Teppei)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60723856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後遺症に対する再生医療実現に有用である、デジタルサブトラクション血管造影装置を用いた経皮的尾動脈穿刺によるラット脳梗塞モデル作製に成功した。低侵襲かつ短時間で中大脳動脈領域脳梗塞を繰り返し再現できる。尾動脈にカテーテルを留置し脳血管造影を繰り返し行えるため、閉塞血管や再開通、血管再生の評価や経動脈的治療介入が可能である。本技術を応用しコモンマーモセットの脳血管造影に成功した。また再生治療に応用可能な細胞含有放射線視認性ハイドロゲルマイクロファイバーの作成に成功した。体内投与後の長期的な細胞保持を可能にし、サイトカインによる長期のパラクライン効果が期待出来る。本技術の特許を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳は一度損傷を受けると再生しないため脳卒中は治らない病気であり、寝たきり原因の第一位である。脳梗塞後遺症に対する再生医療が期待され、経動脈的細胞投与を検証可能な動物モデルの開発が急務であり、本研究において確立した。また経動脈的に投与可能かつX線を撮像するのみでモニタリング可能、そして長期生存できるファイバー形状の細胞を開発した。本技術は既存治療では克服出来ない脳梗塞や慢性腎障害、大動脈血管障害、心筋梗塞、肝不全などの多くの疾患の再生治療を行うことが可能であり、超高齢社会のニーズに応えることが出来る。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in creating a rat cerebral infarction model by percutaneous tail artery puncture using a digital subtraction angiography system to realize regenerative medicine for post-stroke syndrome. It can reproduce middle cerebral artery territory cerebral infarction in a minimally invasive and short time. Since we can repeatedly perform cerebral angiography by placing a catheter in the caudal artery, it is possible to evaluate occluded vessels, recanalization, vascular regeneration, and transarterial therapeutic intervention. By applying this technology, we have successfully performed cerebral angiography of common marmosets. We have also succeeded in creating radiopaque cell-encapsulated hydrogel microfibers that can be applied to regenerative therapy. It enables long-term retention of cells after intravitreal administration, and is expected to have a long-term paracrine effect by cytokines. We have applied for a patent for this technology.

研究分野：脳梗塞

キーワード：脳梗塞 動物モデル 再生医療 細胞治療 脳血管造影 マーモセット ラット MRI

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成体は乳類の中枢神経は一度損傷を受けると再生しないため、脳卒中は治らない病気であり、寝たきりになる原因の第1位である。脳卒中の患者数は現在約130万人を占め全医療費の1割を費やし、高齢化や生活習慣病の増加により2020年には300万人を超すことが予想され、脳卒中は国民を障害者にするだけでなく、医療財政に重大な影響を及ぼす。このような背景から幹細胞を用いた脳梗塞再生医療の実現が期待され、動物レベルでの治療効果は複数報告されているが、ヒトに対してはまだない。その理由に以下の2点が挙げられる。

#### 1) 齧歯類を用いた脳梗塞動物モデル：

齧歯類とヒトは系統的に離れているため、齧歯類で得られた研究結果を直接ヒトに当てはめることができない。かつて妊婦が服用し奇形胎児が多く生まれたサリドマイドは、ラットでの実験では奇形は生じなかったが、マーモセットで追試した結果、奇形児が生まれたという話は有名である。そのため新規治療法開発を目指した前臨床研究にはヒトに近い霊長類の脳卒中モデルが求められ、小型霊長類であるマーモセットに期待が寄せられている。

#### 2) 脳梗塞モデルの作製方法：

これまでの一般的な脳梗塞モデルは外頸動脈からナイロン糸を盲目的に挿入し中大脳動脈及びその近傍の血管を一時的に閉塞させる方法であるため、梗塞範囲が安定せず、頸部を大きく切開する上、外頸動脈を結紮するため手術侵襲が高いことが問題である。また脳梗塞に対する骨髄間葉系細胞の静脈投与による治験が開始されているが、静脈投与では肺など目的外臓器に取り込まれ治療効果が減弱するため神経再生作用は乏しく、経動脈的細胞投与が期待されるが検証可能な脳梗塞動物モデルは存在しない。

### 2. 研究の目的

脳梗塞後遺症に対する再生医療実現に有用である、超低侵襲かつ標的血管選択性の高い、そして繰り返し経動脈的細胞投与が可能な新規脳梗塞動物モデルを確立する。

### 3. 研究の方法

イソフルラン吸入による全身麻酔下で、ヒトの手術同様心拍数、呼吸数、体温、酸素飽和度を連続モニタリングする。尾根部腹側から、尾動脈を穿刺しガイドワイヤー及び細径カテーテルを挿入し、X線透視下に右中大脳動脈にカニューレションし、塞栓物質を投与する。再度動脈造影を行い完全に閉塞出来たことを確認する。脳梗塞作製後に頭部MRIと神経行動学評価を行い、その後病理学的解析をする。まずラット中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルを確立する。その後、小型霊長類であるコモンマーモセットに同技術を応用し、霊長類の中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルを確立する。

### 4. 研究成果

本研究において、デジタルサブトラクション血管造影装置を用いた経皮的尾動脈穿刺によるラット脳梗塞モデルの作製に成功した(図1)。低侵襲かつ短時間(尾動脈穿刺から塞栓終了までの時間は約10分間)に中大脳動脈領域脳梗塞を再現可能である(Sci rep. in press)。尾動脈にカテーテルを留置することで、脳梗塞モデル作製後に脳血管造影を繰り返し行えるため、閉塞血管や再開通、血管再生の評価が可能である。また治療介入についても、超選択的に標的動脈へ直接薬剤投与が繰り返し可能である。さらに尾動脈穿刺のみで作成可能な低侵襲動物モデルであるため、実験動物の苦痛は軽減し動物愛護の観点からも望ましいモデルである。本技術を応用し、小型霊長類であるコモンマーモセットの経皮的尾動脈穿刺による脳血管造影、大動脈造影に成功した(PLoS One. 2021, 16:e0250576.) (図2, 3)。



図1:ラット中大脳動脈選択的閉塞脳梗塞  
9.4テスラMRI T2強調像

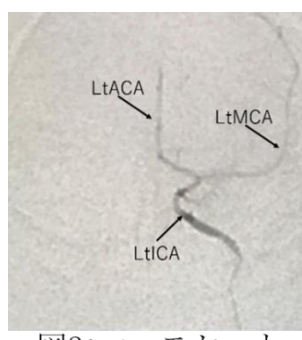


図2:マーモセット  
脳動脈造影



図3:マーモセット  
大動脈造影

また、脳梗塞モデル作成だけでなく再生治療にも応用可能な X 線不透過細胞含有ハイドロゲルマイクロファイバーの作成に成功した (図 4)。我々が作製した細胞含有ハイドロゲルマイクロファイバーは体内投与後の長期的な細胞保持を可能にし、サイトカインによる長期のパラクリン効果が期待出来る。本ファイバーを中大脳動脈に留置することで、脳梗塞モデル作成と同時に長期的な細胞治療の効果を検証することが可能である。X 線を撮像するだけでファイバーの位置特定 (モニタリング) が可能 (図 5)。移植した臓器に細胞がどの程度残存しているか評価でき、細胞治療の効果を検証可能にする。またファイバーの外に迷入しないため、細胞が癌化した際は体内に残すことなく取り出すことができる。本技術の特許を取得し PCT 出願を完了した。

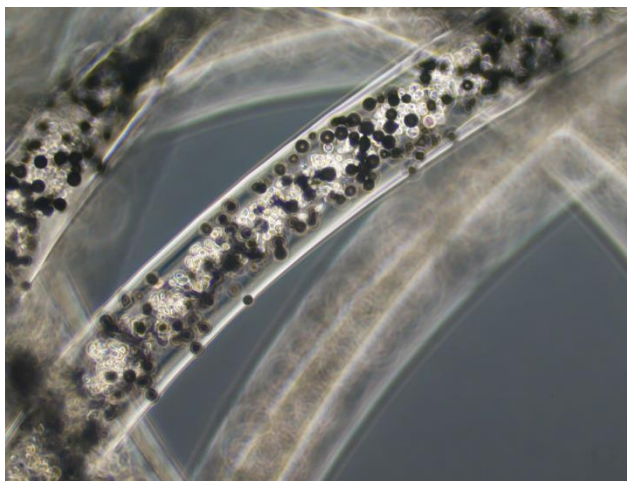


図4：間葉系幹細胞含有X線不透過ハイドロゲルファイバー



図5：脳動脈に投与後のX線不透過ファイバー X線を撮像するだけで体内の位置が特定可能

X 線不透過細胞含有ハイドロゲルマイクロファイバーとカテーテル動脈投与技術を応用することで、既存治療では克服出来ない脳梗塞や慢性腎障害、大動脈血管障害、心筋梗塞、肝不全などの多くの疾患の再生治療を行うことが可能であり、超高齢社会のニーズに応えることが出来る (図 6)。

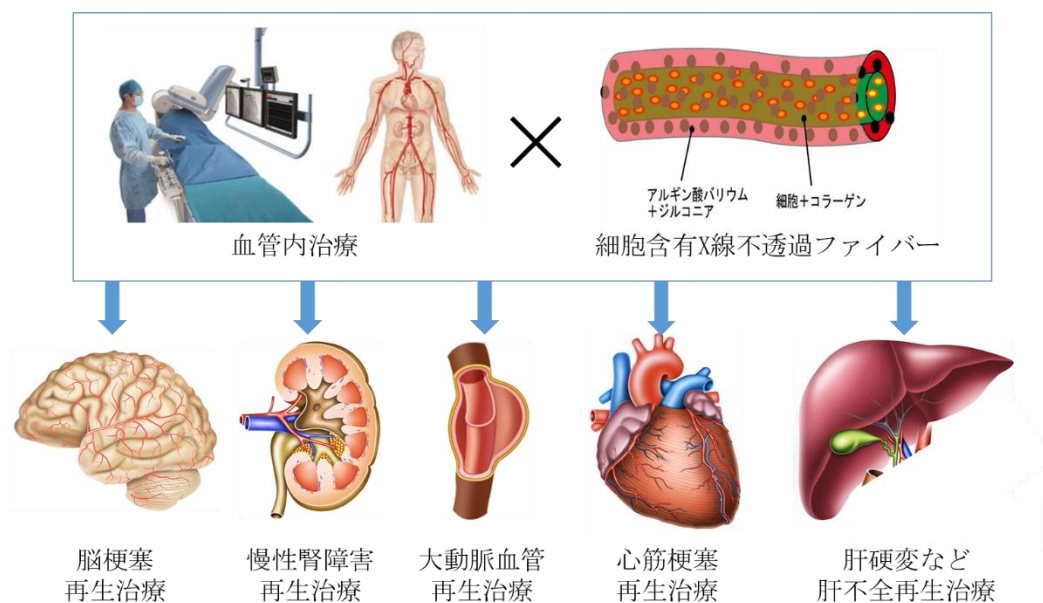


図6：『血管内治療』×『X線不透過細胞含有ハイドロゲルファイバー』＝破壊的イノベーション

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 2件）

1. 著者名 Ohta Hiroki, Komatsu Teppei, Muta Kanako, Koizumi Makoto, Iguchi Yasuyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 16
2. 論文標題 Marmoset angiography just by percutaneous puncture of the caudal ventral artery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0250576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0250576	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 Komatsu Teppei, Ohta Hiroki, Motegi Haruhiko, Hata Junichi, Terawaki Koshiro, Koizumi Makoto, Muta Kanako, Okano Hiroataka James, Iguchi Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel model of ischemia in rats with middle cerebral artery occlusion using a microcatheter and zirconia ball under fluoroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92321-w	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Teppei Komatsu, Hiroki Ohta, Junichi Hata, Haruhiko Motegi, Koshiro Terawaki, Makoto Koizumi, Kanako Muta, Hiroataka James Okano, Yasuyuki Iguchi
2. 発表標題 A Bland-new Rat Model of Embolic Cerebral Ischemia Using Micro Catheter Under Fluoroscopic Guide
3. 学会等名 International Stroke Conference 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松鉄平, 太田裕貴, 小泉誠, 畑純一, 岡野ジェイムス洋尚, 井口保之
2. 発表標題 新規脳梗塞長類マーマセットモデルの開発
3. 学会等名 第60回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takakura N, Ohta H, Komatsu T, Kurashina Y, Okano H, Onoe H
2. 発表標題 Radiopaque Hydrogel Microfiber for Arterial Embolization
3. 学会等名 MicroTAS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Komatsu T, Ohta H, Takakura N, Kitagawa T, Hata J, Terawaki K, Koizumi M, Muta K, Kurashina Y, Onoe H, Okano H, Iguchi Y.
2. 発表標題 A Novel Rat Model of Embolic Cerebral Ischemia Using a Cell-implantable Radiopaque Hydrogel Micro Fiber
3. 学会等名 International Stroke Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松鉄平, 太田裕貴, 畑純一, 茂木晴彦, 寺脇幸四郎, 小泉誠, 牟田佳那子, 岡野ジェイムス洋尚, 井口保之
2. 発表標題 デジタルサブトラクション血管造影装置を用いた経皮的尾動脈穿刺による新規ラット脳梗塞モデルの開発
3. 学会等名 第45回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松鉄平, 太田裕貴, 高倉直輝, 北川友通, 畑純一, 寺脇幸四郎, 小泉誠, 牟田佳那子, 倉科佑太, 尾上弘晃, 岡野ジェイムス洋尚, 井口保之
2. 発表標題 幹細胞を含有可能な放射線視認性ハイドロゲルマイクロファイバーを用いた新規ラット脳梗塞モデルの開発
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 X線不透過マイクロゲルファイバ	発明者 岡野洋尚、太田裕 貴、小松鉄平、尾上 弘晃、高倉直輝、倉	権利者 慈恵大学、慶応 大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-206618	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------