

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18132

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞シートを用いた脳梗塞モデルに対する神経再生研究

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell sheets for neural regeneration in a cerebral infarction model

研究代表者

劉 美憬 (Ryu, Bikei)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10770985

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)：我々は中枢神経疾患における新たな細胞移植法として脳梗塞動物モデルにおける他家間葉系幹細胞シート移植の有効性を報告した。血管新生能と神経再生能を持つ幹細胞シートが脳梗塞動物モデルにおける運動障害の改善をもたらすことを証明し、非侵襲的に幹細胞シートを患部脳表へ移植することが可能となった。細胞シート移植は真の意味での細胞置換療法となる可能性を秘めており、重度後遺症を来した脳梗塞患者への臨床応用へ向けた第一歩となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一度脳梗塞で細胞死した神経細胞の回復は困難とされ、重度の後遺症を残すことがある。これまで多くの治療薬が開発されてきたが、失われた神経機能を回復させる点ではその効果は未だ十分ではなかった。新たな治療法が開発が必要とされるようになり、中でも幹細胞を用いた再生医療研究は大きな注目を集めている。本研究では、脳梗塞モデルに対する他家脂肪由来間葉系幹細胞シート移植の有効性を報告した。これにより、中枢神経疾患における新たな細胞移植法として、細胞シート移植が中枢神経再生における次世代の治療ツールになり得る可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We reported the efficacy of stem cell sheets transplantation in an animal model of cerebral infarction as a novel cell transplantation method in central nervous system disease. We have demonstrated that stem cell sheets with angiogenic and neural regenerative potential can improve motor deficits in an animal model of cerebral infarction, allowing noninvasive transplantation of stem cell sheets into the affected brain surface. Cell sheet transplantation has the potential to become a true cell replacement therapy, and is expected to be the first step toward clinical application for patients with severe cerebral infarction.

研究分野：中枢神経

キーワード：脳梗塞 細胞移植 細胞シート 血管新生 神経再生 間葉系幹細胞 他家移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞で細胞死した神経細胞の回復は困難とされ、梗塞部位によって認知機能障害や言語障害、麻痺等の重度後遺症を残す。これまで多くの治療薬が開発されてきたが、失われた神経機能を回復させる点ではその効果は未だ十分といえなかった。社会的・経済的負担も大きく、新たな治療法の開発が望まれるようになった。そこで、新たな治療法として再生医療分野は大きく注目されるようになり、神経幹細胞や間葉系幹細胞を用いた神経再生研究も複数報告されるようになった。中でも間葉系幹細胞は、その血管新生能や分泌する神経栄養因子により脳梗塞体積の減少や神経機能の改善に繋がることが報告され(Chen J, et al. Circ Res, 2003)、脳梗塞患者に対する他家・自家間葉系幹細胞浮遊液の経動脈・静脈投与や脳内注入による治験が広く行われるようになった。一方で、これら従来の細胞移植にはいくつかの課題が残されており、注入した移植細胞が肺や肝臓、脾臓などでトラップされ、実際に患部である脳梗塞巣に生着する細胞が1%程度と少なくなってしまうことが知られていた。また、経動脈投与による脳塞栓症リスクや、直接脳内注入による脳損傷は避けられないことも事実であった(Fisher UM, et al. Stem Cells Dev, 2009)。非侵襲的に移植細胞を患部へ十分量移植し、患部で細胞を維持させることが未だ重要な課題であり、より治療効果の高い最良な移植方法の検討が必要とされていた。

2. 研究の目的

非侵襲的に多くの細胞を患部に移植することができる最良の方法を検討する中で、我々は新たな細胞移植法として幹細胞シート移植に注目した。間葉系幹細胞シート移植が、既存の細胞移植方法における課題点を克服しうる次世代の治療ツールとなり得るかを証明する必要がある。そこで、本研究では脳梗塞動物モデルにおける他家間葉系幹細胞シート移植の有効性を科学的に検証することを目的とした。また、動物モデルにおけるその治療メカニズムを解明し、臨床応用へ向けたより治療効果の高い細胞シート移植の開発を目指した。

3. 研究の方法

移植細胞として、他家ラット鼠径部脂肪組織から間葉系幹細胞を作成し、温度応答性培養皿を用いて細胞シート化した。一過性中大脳動脈閉塞法によりラット脳梗塞障害モデルを作成し、脳梗塞後3日目に、積層化した他家(GFP 遺伝子導入ラットより作成)間葉系幹細胞シートをラット脳表へ移植した。脳梗塞に対する細胞シート移植の治療効果を検証し、細胞シート移植群と非移植群での治療効果の比較において、移植後の経時的な神経機能変化や、組織学的解析による梗塞体積の変化を確認した。また、組織学的に移植細胞と脳梗塞巣との関係や、血管新生、神経再生の有無を確認した。

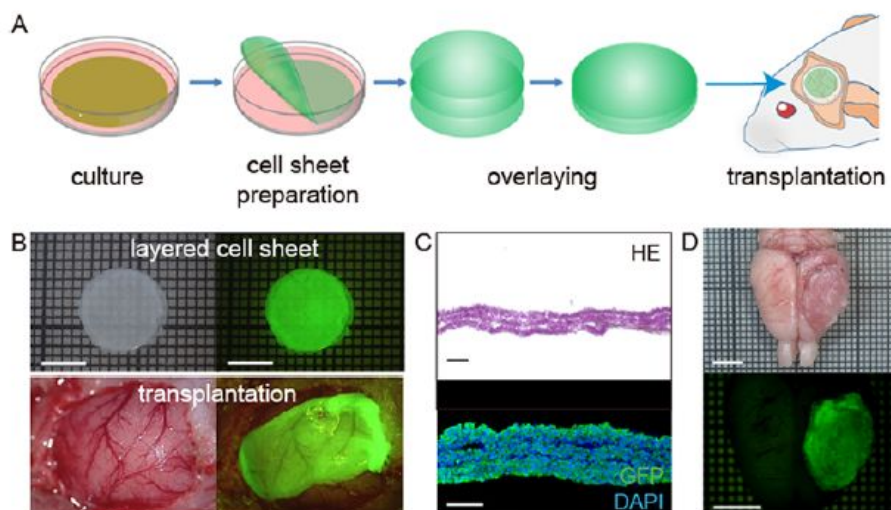
また、作成した細胞シート自体の組織学的特性を理解するため、作成した他家間葉系幹細胞シートを組織学的に解析し、フローサイトメトリーや免疫染色により移植前の細胞シート特性を把握した。

4. 研究成果

本研究では脳梗塞モデルに対する他家脂肪由来間葉系幹細胞シート移植の有効性を科学的に証明することができ、血管新生能と神経再生能をもつ細胞シート移植によってモデル動物の運動障害が改善することを示した。下記にその詳細を記す。

(1) 積層化間葉系幹細胞シートの作成

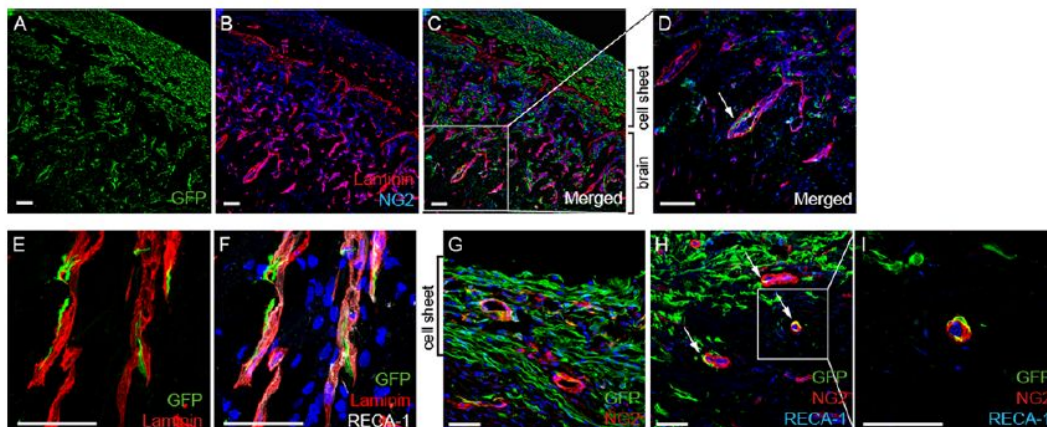
他家ラット脂肪組織由来の間葉系幹細胞を温度応答性培養皿上で培養した。2日後、酵素処理を行わずに温度を下げるだけで培養皿から細胞シートを作成することができた。その後、3枚の細胞シートを重ね合わせ、3層構造の細胞シートを作製した。



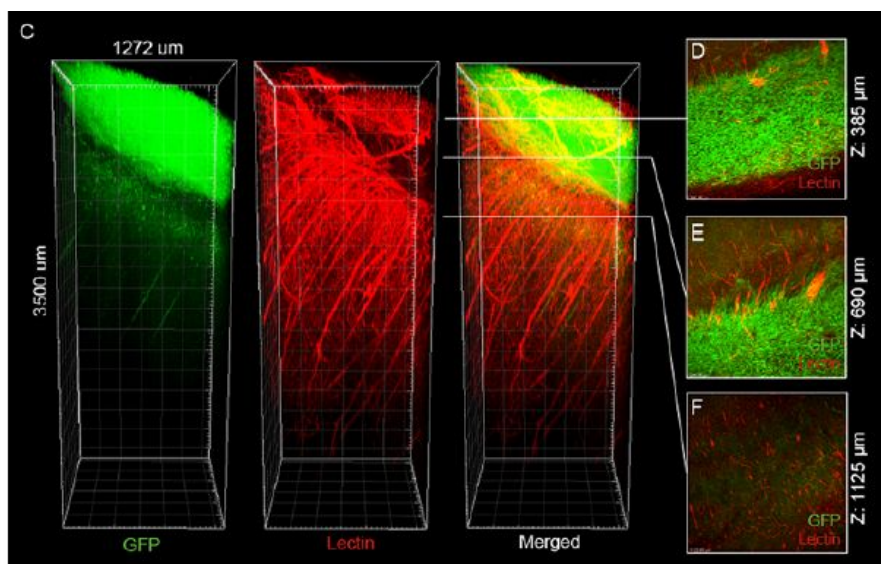
(2) 細胞シート移植による脳梗塞後の運動障害への有効性

細胞シート移植群では、非移植群と比較して優れた運動障害の改善が得られた。また、移植群では非移植群と比較して平均梗塞面積が有意に減少した。

(3)細胞シート移植は、虚血巣近傍において血管新生を優位に誘発した。また、移植した間葉系幹細胞は新生血管に沿って虚血巣へ脳表から遊走した。更に、遊走した細胞は、新生血管壁周囲でペリサイトの特徴を持って生着していた。



組織透明化処理を行うことで、脳表に移植した細胞シート内と罹患側脳表において血管新生が誘導されることを三次元的に観察した。また、移植した細胞シート内の新生血管とホスト脳血管に吻合を認めた。これにより、機能的な血管新生が誘導できる可能性が示唆された。



(4) 細胞シート移植群では、Subgranular zone と Subventricular zone で内因性の神経幹細胞が優位に認められ、細胞シート移植による神経再生が誘発されることが示された。

本研究で得られた結果から、移植細胞が多臓器にトラップされることなく、非侵襲的に効率良く、罹患部局所に移植可能であることを示すことができた。次世代の細胞移植法として、人工物を用いない温度応答性培養皿を用いた細胞シート移植は注目に値する。臨床応用へ向けた前段階の基礎研究として、新規治療開発の第一歩となる可能性が期待される。一方で、本研究の臨床応用へ向けた課題は少なく無く、より詳細な治療メカニズムの解明や、移植の安全性など、更なる研究結果の積み重ねが今後も必要である。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryu Bikei, Sekine Hidekazu, Homma Jun, Kobayashi Tomonori, Kobayashi Eiji, Kawamata Takakazu, Shimizu Tatsuya	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell sheet that produces neurological improvement with angiogenesis and neurogenesis in a rat stroke model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2018.11.JNS182331	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 Ryu Bikei, Sekine Hidekazu, Kawamata Takakazu, Shimizu Tatsuya	4. 巻 328
2. 論文標題 Sticker method for preparation of frozen section using adhesive film	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 108436 - 108436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2019.108436	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Bikei Ryu
2. 発表標題 Brain ArterioVenous Malformation: Eloquent, Significance and Assessment
3. 学会等名 9th European - Japanese Cerebrovascular Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bikei Ryu
2. 発表標題 Adipose Derived Mesenchymal Stromal Cell Sheet Transplantation Induces Functional Angiogenesis and Enhances Endogenous Neurogenesis in a Rat Stroke Model
3. 学会等名 International Stroke Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 美憬
2. 発表標題 ペリサイト含有間葉系幹細胞シートを用いた脳梗塞モデルに対する細胞療法研究
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bikei Ryu
2. 発表標題 Extremely rare persistent primitive artery passing through the jugular foramen with symptomatic ipsilateral carotid artery stenosis
3. 学会等名 14th Congress of the World Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology (国際学会)
4. 発表年 2017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