

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18432

研究課題名（和文）脳梗塞に対する脂肪細胞由来幹細胞移植投与方法の確立と健側の役割の解明

研究課題名（英文）Establishment of Adipose Driven Stem Cell transplant administration method for cerebral infarction and elucidation of the role of the healthy side

研究代表者

定方 英作（Sadakata, Eisaku）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・研究協力員

研究者番号：10772139

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）：SDラットに対して、80分の一過性中大脳動脈閉塞モデルを作成した。24時間後に経動脈的に脂肪細胞由来幹細胞（ADSC）、またはPBSを投与した。ラットはlow dose群とhigh dose群、コントロール群の3群にわけて評価した。投与後からmodified Neurological Severity Score(mNSS)や体重測定を行い機能回復を評価し、投与後28日後に脳組織を採取した。Cresyl Violet染色を行い脳梗塞巣の面積を評価した。コントロール群と細胞投与群では細胞投与群の方が有意に機能回復が認められた。脳梗塞巣も細胞投与群で有意に脳梗塞巣の縮小がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

厚生労働省の国民生活基礎調査では脳血管疾患は脂肪率は第4位、要介護の直接原因は第1位となっている。このため脳梗塞患者に対して幹細胞投与による再生医療が進むことで寝たきりなどを予防し医療費の削減につながると考えられる。

本症例では細胞投与群で有意に脳梗塞層の縮小と機能予後の改善につながった。特に細胞投与群ではlow dose群でもhigh dose群と比較しても有意差なく機能予後改善が得られたため少量の自己脂肪細胞由来幹細胞投与で改善が得られることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：An 80-minute transient middle cerebral artery occlusion model was created for SD rats. 24 hours later, ADSC or PBS was administered intraarterially. Rats were divided into three groups and evaluated: low dose group, high dose group, and control group. After administration, mNSS and body weight were measured to evaluate functional recovery, and brain tissue was collected 28 days after administration. Cresyl Violet staining was performed to evaluate the area of cerebral infarction.

Between the control group and the cell-administered group, significant functional recovery was observed in the cell-administered group. A significant reduction in the size of cerebral infarction nests was also observed in the cell-administered group.

研究分野：再生医療

キーワード：ADSC cell therapy Ischemic stroke

1. 研究開始当初の背景

少子高齢化は加速度的に進行し、脳卒中による機能障害は高齢者の寝たきりの最大要因となっている。これは脳卒中による機能障害に対する画期的な治療方法が確立されておらず、長期のリハビリテーションに依存せざるを得ないことが原因である。近年、再生医療が脚光を浴びており、脳梗塞に対しても様々な研究成果が報告されている。現在様々なアプローチ（定位的、脳室内、静脈内、動脈内）による試みが行われている。我々の研究グループでも動脈内投与での骨髄間葉系幹細胞投与による研究を行い、細胞の至適投与時期や至適細胞数について検討している。しかし、経動脈的投与で骨髄間葉系幹細胞以外の幹細胞移植による効果や投与された細胞数の役割についての報告はない。また、細胞投与により脳梗塞巣と反対側も活性化されるとされているが、脳梗塞機能回復における健側の役割は不明である。今回は異なる幹細胞に着目し、最適な投与方法を確立することとともに健側の役割を明らかにすることを目標としている。

2. 研究の目的

脳卒中による機能障害は高齢者の寝たきりの最大要因となっている。近年再生医療が脚光を浴びており、脳梗塞に対しても様々な臨床研究が行われている。投与方法としても経動脈的、経静脈的、定位的、脳室内投与の方法があり、投与細胞も骨髄、脂肪、臍帯組織、歯髄から採取することができる。皮下脂肪組織は比較的低侵襲で大量に採取することができ、脂肪細胞由来幹細胞(ADSC)を経動脈的投与し、投与細胞量などを検討した。

3. 研究の方法

(1) 一過性中大脳動脈閉塞モデルの作成

Male Sprague-Dawley rat (8週齢：240-280g)を使用し、ナイロン糸を中大脳動脈分岐部まで挿入する局所脳虚血モデルである。イソフルレンによる吸入麻酔後に呼吸は自発呼吸にて維持させ、温度自動調節のパッドを使用し、直腸温を 37 に維持する。ラットの腹側頸部を正中切開し、総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を露出させ、総頸動脈より 4-0 本のフィラメント糸を用いて中大脳動脈閉塞する。その後 80 分経過後にフィラメントを除去し再開通させる。

(2) ヒト ADSCs の投与

脳梗塞発症 24 時間後に商業ベースで購入したヒト ADSCs 投与を行った。ヒト ADSCs 投与において細胞数を 100 万個、1000 個に振り分けて投与する。コントロールとして PBS を投与した。投与はポリエチレンカテーテルを用いて梗塞と同側の頸動脈から緩徐に行う。免疫抑制剤 (cyclosporine-A, 10mg/kg) を経腹腔的に投与する。

(3) Functional recovery の評価

投与後から modified neurological severity score (mNSS) や体重測定を行い機能回復の評価を行った。

(4) 慢性期脳梗塞の評価

投与後 28 日後に 4%PFA 還流固定を行い、脳組織を摘出した。脳組織は cryostat を用いて 40 μ m slice を作成。等間隔に 5 切片をセレクトし、20% cresyl Violet 溶液を用いて染色を行い、ventricle size や cortical atrophy の定量を Image J を用いて行った。

4. 研究成果

コントロール群 13 匹、High dose 群 13 匹、Low dose 群 14 匹となった。死亡率に関しては細胞投与群とコントロール群では差はみられなかった(表 1)。

投与群	死亡率
Control 群	0.47(8/17)
High dose(1x10 ⁶)	0.35(6/17)
Low dose(1x10 ³)	0.47(7/15)

表 1 各群における死亡率

脳梗塞発症後は体重減少が起こり、細胞投与後も一定期間は体重減少がみられたが、細胞投与 7 日後で high-dose 群-control 群で有意に増加していた(P=0.02) (図 1)。細胞投与群間では差はみられなかった。

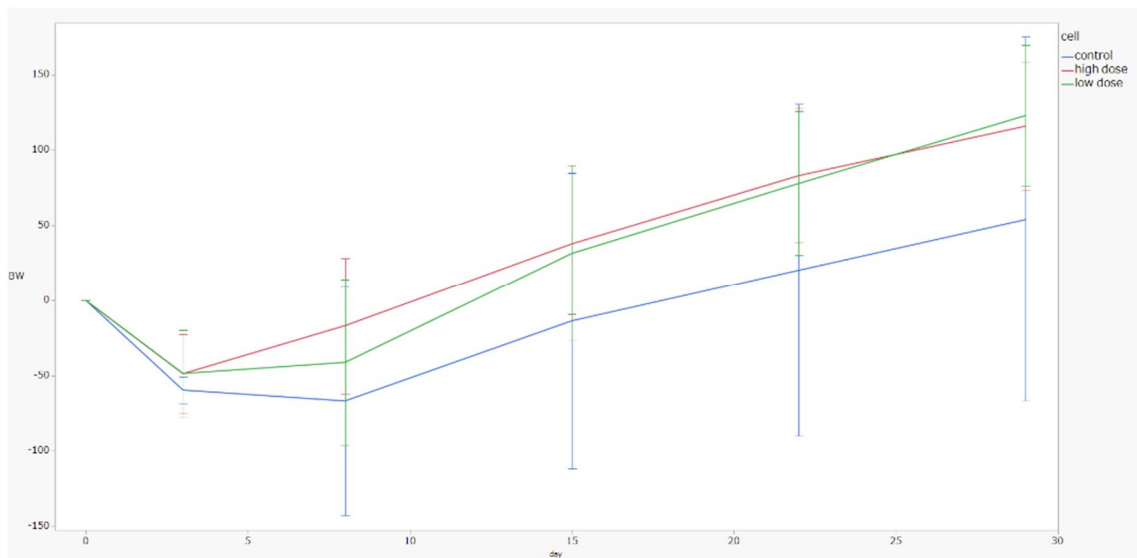


図 1 体重の増加率

細胞投与後は両群間で機能回復はみられたが、特に細胞投与群では機能改善につながった(図 2)。特に細胞投与 4 日から High dose 群で有意に機能改善が得られた(P=0.02)。細胞投与 14 日目から low dose 群で有意に機能改善が得られた(P=0.02)。細胞投与に関しては細胞数が多い方がより機能改善につながったと考えられる。

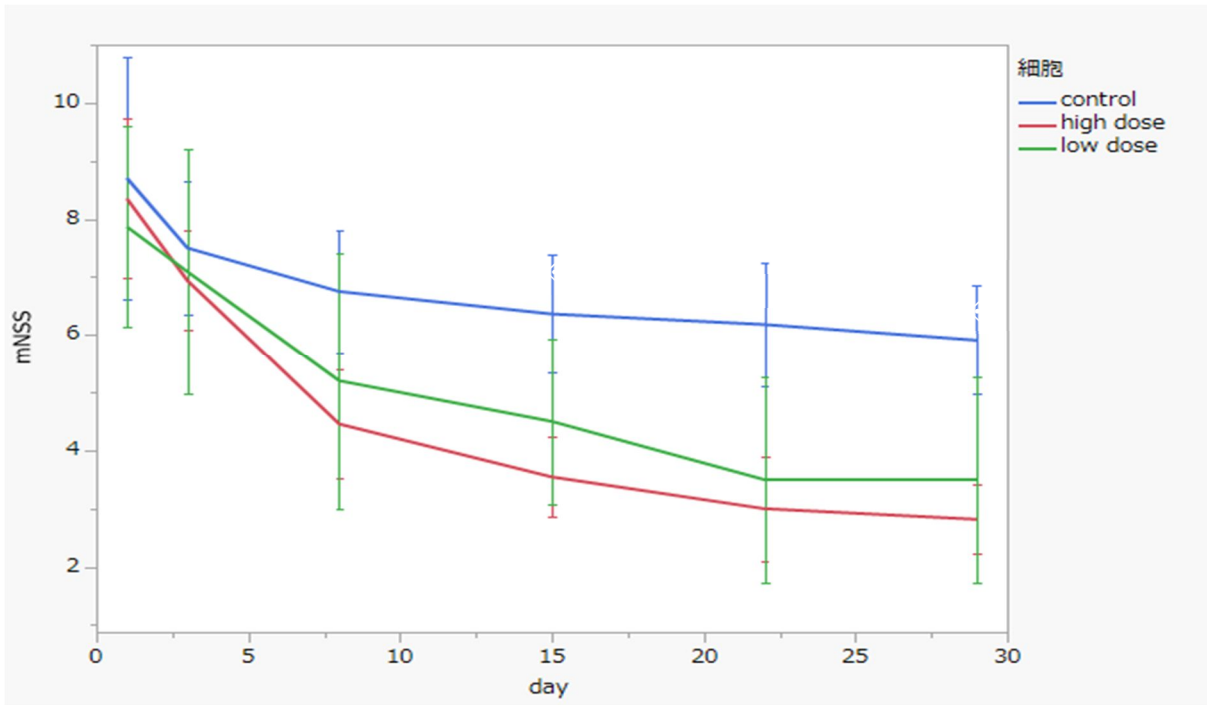


図 2 神経機能評価(mNSS)

細胞投与 28 日目に脳組織を摘出し、Cresyl Violet 染色を行った。脳梗塞巣で脳梗塞巣の評価を行った。細胞投与群で有意に脳梗塞巣の縮小がみられた(図 3)。

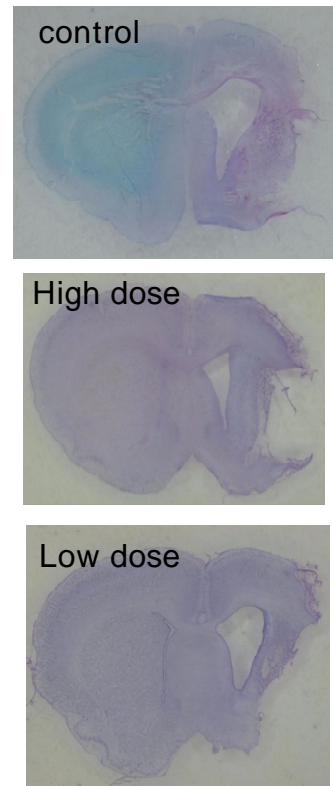
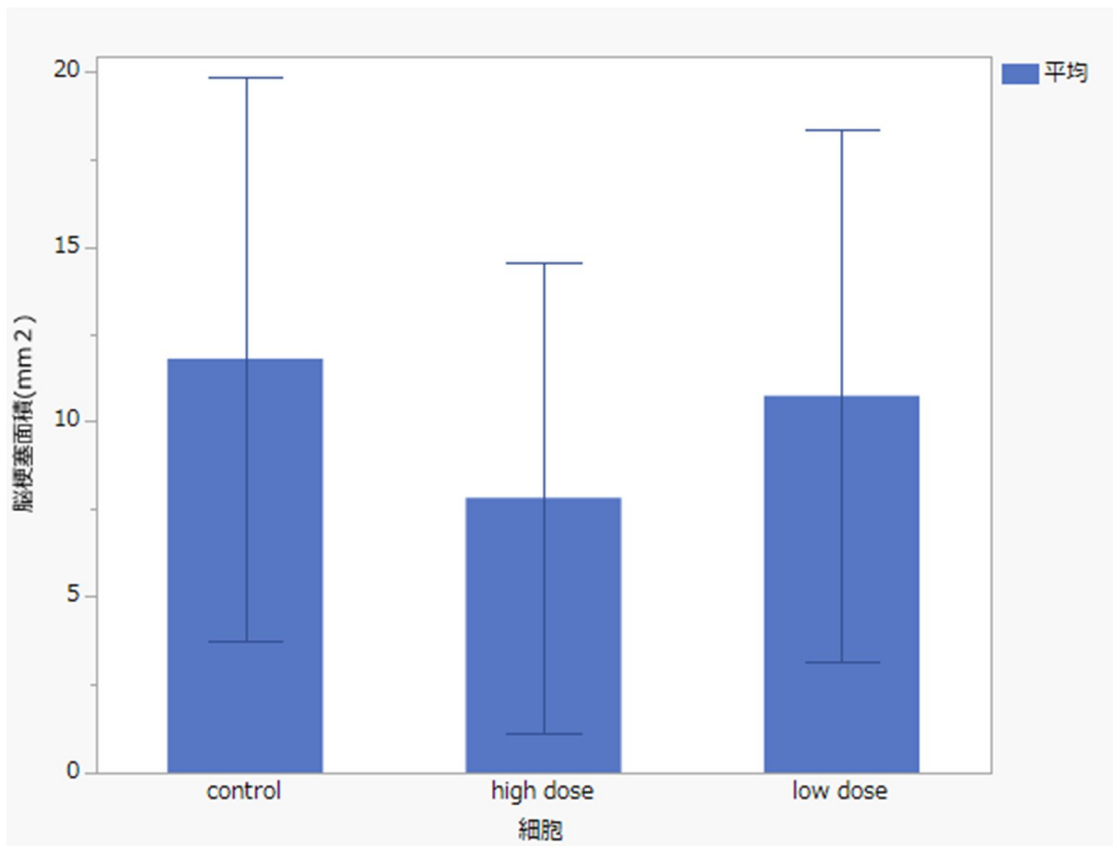


図 3 脳梗塞巣 (対側との面積比) Cresyl Violet 染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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