

平成23年 5月 19日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390386

研究課題名(和文) カプセル化神経幹細胞移植を用いた新しい脳卒中治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for cerebral ischemia using encapsulated neural stem cells

研究代表者

伊達 勲 (DATE ISAO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70236785

研究成果の概要(和文)：I型コラーゲンによる足場を形成して、神経幹細胞をカプセル化したところ、カプセル内での幹細胞の生存を確認できた。また、腫瘍形成は認めなかった。カプセル化した神経幹細胞を中大脳動脈閉塞モデルへ移植したところ、行動学的改善を認め、組織学的には、脳梗塞体積の縮小を認めた。また、移植操作に伴う、ドナー細胞への虚血負荷を減らすには、Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)による前処置が有効であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We produced encapsulated neural stem cells with the scaffold using collagen type-I. We could find the survival of the neural stem cells in this capsule and could not find any tumor formations. We transplanted encapsulated neural stem cells into the middle cerebral artery occlusion model of rats. The transplanted rats could show better behavioral recovery and had smaller infarct area compared to the control rats. We also found that ischemic damage to the donor cells in transplantation could be reduced by pre-treatment with Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学、脳卒中、カプセル化細胞、細胞移植、栄養因子

## 1. 研究開始当初の背景

日本において脳卒中は死因の第3位であり、患者総数は約150万人と言われている。tPAを用いた血栓溶解療法が脳梗塞に対して保険適応になり、救済される患者も増えたが、発

症から3時間以内という使用制限のため、脳卒中そのものの予後を変えるには至っておらず、新しく効果的な治療法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

脳卒中に対する新しい治療法として、神経幹細胞・ES細胞・骨髄間質細胞などを用いた細胞療法が盛んに研究されている。脳卒中モデル動物に対する脳内移植で、良好な結果が得られたとの報告が多く見られ、臨床応用も近いと期待されている。しかし、幹細胞は未分化な細胞であるため、移植された細胞が腫瘍化あるいは悪性化する可能性がある。

従来、幹細胞を用いた細胞移植療法は、損傷された部位を移植細胞で置き換えることができる可能性を秘めていることから、cell-replacement, cell-restorationを目指して研究が進められてきたが、脳内に幹細胞が移植されても、生体内で長期間生存し、脳内でシナプスを形成して機能する細胞数は、とても少ないことも明らかになってきており、最近の論文によると、移植された幹細胞によるホストの損傷細胞の置換再建効果よりも、幹細胞から分泌される栄養因子による神経保護効果の方が、より重要であると報告されるようになってきている。ただし、治療効果をもたらす具体的な栄養因子が何であるかは、まだ断定できていない。一方で、臨床応用するにあたり重要なことは、優れた治療効果と長期の安全性の証明である。このような背景から、我々はすでに確立しているカプセル化の技術を応用し、神経幹細胞をカプセル化して脳内移植することで、幹細胞の腫瘍化を防ぎながらも幹細胞が分泌する様々な栄養因子を供給することが可能となると考え、カプセル化神経幹細胞移植が、安全性を保ちながら優れた治療効果を発揮するかどうか検討することとした。

## 3. 研究の方法

げっ歯類脳虚血モデルに関しては、全身麻酔下に体温や脳血流量などをモニターしながら中大脳動脈一過性閉塞モデルを作成する。別の個体より脳組織を採取し neurosphere 法を用いて神経幹細胞を増殖させ、カプセル化神経幹細胞を作成する。全身麻酔下に中大脳動脈閉塞モデルに移植して治療効果を評価する。また、霊長類脳梗塞モデルについては、全身麻酔下にレントゲン透視下に血管撮影を行いながら、カテーテルを Bovine arch にまず留置させる。そこからバルーン付きマイクロワイヤーを中大脳動脈の M1 部に向けて送り込みバルーンを拡張させ、一側中大脳動脈を一過性に閉塞させる。再灌流後に行動学的評価を行い、片麻痺症状を認めているものに対して移植を行い治療効果を評価する。

## 4. 研究成果

げっ歯類より採取した組織より神経幹細胞を分離培養し、in vitro で分化・増殖能を

確認した。神経幹細胞からは、ドパミン神経等に分化誘導することができた。神経幹細胞がうまく生着できるよう、I型コラーゲンを用いて足場を形成して、カプセル化したところ、腫瘍形成を見ることなく、カプセル内での幹細胞の生存を in vitro で確認することができた。中大脳動脈閉塞モデルへの移植では、脳梗塞体積の縮小を認め、行動学的改善を認めた。組織学的には、ごく軽度の炎症反応を認めた。また、治療効果の更なる改善には、移植操作に伴い、虚血負荷がドナー細胞に多かれ少なかれかかるといわれていることもあり、幹細胞の生存効率を上げる必要があると考えられた。そのため、GDNF による pre-treatment を行い、oxygen-glucose deprivation 負荷をかけたところ、pre-treatment によって生存細胞数の増加ならびにアポトーシスの減少を確認できた。よって、今後の展望として、栄養因子による pre-treatment を行った幹細胞のカプセル化、もしくは栄養因子を over-expression させた幹細胞のカプセル化が検討されるべきと考えた。霊長類を用いた脳梗塞モデルへの移植については、従来の開頭クリッピング術による方法より、侵襲が低いと思われる、脳血管内治療の手技に基づいた中大脳動脈閉塞モデルへの移植を目指した。しかし、中大脳動脈 M1 部を超えてカテーテルを送り込むことができず、移植までには至らなかった。ただし、内頸動脈終末部を閉塞させ、再灌流を行い、麻酔から覚めた時点で、行動学的評価を行ったところ、片麻痺を合併しており、脳組織においては、尾状核頭を中心に脳梗塞巣を確認することができたので、将来的にはこのモデルへの移植が可能と考えた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

1. 脳梗塞の再生療法 伊達 勲 夢 21 7: 96-97, 2011 (査読無)
2. 脳神経外科医教育における基礎研究の意義 伊達 勲 脳神経外科ジャーナル 20(2): 115-121, 2011 (査読無)
3. Effectiveness of intraoperative near-infrared indocyanine green videoangiography in a case with recurrent spinal perimedullary arteriovenous fistula Miyoshi Y, Yasuhara T, Nishida A, Tokunaga K, Sugi K, Date I Clinical Neurology and Neuroscience 113: 239-242, 2011 (査読有)
4. Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian

- model of rats: Focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  Wang F, Yasuhara T, Shingo T, Kameda M, Tajiri N, Yuan WJ, Kondo A, Kadota T, Baba T, Tayra JT, Kikuchi Y, Miyoshi Y, Date I BMC Neuroscience 11(52): 1-9, 2010 (査読有)
5. Optimal dose of plasmid vascular endothelial growth factor for enhancement of angiogenesis in the rat brain ischemia model Katsumata A, Sugiu K, Tokunaga K, Kusaka N, Watanabe K, Nishida A, Namba K, Hamada H, Nakashim H, Date I Neurologia medico-chirurgica 50(6): 449-455, 2010 (査読有)
  6. Percutaneous balloon angioplasty for acute occlusion of intracranial arteries Tokunaga K, Sugiu K, Yoshino K, Terai Y, Imaoka T, Handa A, Hirotsune N, Kusaka N, Date I Neurosurgery 67[ONS Suppl 1]: ons189-197, 2010 (査読有)
  7. Symptomatic unruptured cerebral aneurysms: Features and surgical outcome Date I Neurologia medico-chirurgica 50(9): 788-799, 2010 (査読無)
  8. Urinary 8-OHdG elevations in a partial lesion rat model of Parkinson's disease correlate with behavioral symptoms and nigrostriatal dopaminergic depletion Kikuchi Y, Yasuhara T, Agari T, Kondo A, Kuramoto S, Kameda M, Kadota T, Baba T, Tajiri N, Wang F, Tayra JT, Liang H, Miyoshi Y, Borlongan CV, Date I Journal of Cellular Physiology Oct 13: Epub, 2010 (査読有)
  9. Paraclinoid 動脈瘤のクリッピング 伊達 勲 脳神経外科速報 20(4): 404-409, 2010(査読無)
  10. 脳梗塞に対する電気刺激療法 安原隆雄、亀田雅博、馬場胤典、森本尊雅、菱川朋人、小野成紀、徳永浩司、三好康之、上利 崇、伊達 勲 脳卒中の外科 32(6): 563-565, 2010 (査読有)
  11. 細胞移植療法 菊池陽一郎、安原隆雄、伊達 勲、杉生憲志 総合臨床 59(12): 2396-2399, 2010 (査読有)
  12. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results Janowski M Walczak P, Date I Stem Cells and Development 19(1): 5-6, 2010 (査読有)
  13. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, Wang F, Baba T, Tayra JT, Morimoto T, Jing M, Kikuchi Y, Kuramoto S, Agari T, Miyoshi Y, Fujino H, Obata F, Takeda I, Furuta T, Date I Brain Research 1310: 200-207, 2010 (査読有)
  14. Effect of vasodilation by milrinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on vasospastic arteries after a subarachnoid hemorrhage in vitro and in vivo: Effectiveness of cisternal injection of milrinone Nishiguchi M, Ono S, Iseda K, Manabe H, Hishikawa T, Date I Neurosurgery 66(1): 158-164, 2010 (査読有)
  15. 頭部外傷を再生医療から考える 安原隆雄、伊達 勲 脳神経外科ジャーナル 19(3): 210-215, 2010 (査読有)
  16. Systemic neurotransplantation--a problem-oriented systematic review Janowski M, Date I Rev Neurosci 20(1): 39-60, 2009 (査読有)
  17. Continuous intraventricular infusion of erythropoietin exerts neuroprotective/rescue effects upon Parkinson's disease model of rats with enhanced neurogenesis. Kadota T, Shingo T, Yasuhara T, Tajiri N, Kondo A, Morimoto T, Yuan WJ, Wang F, Baba T, Tokunaga K, Miyoshi Y, Date I Brain Research 1254: 120-127, 2009 (査読有)
  18. Neurological disorders and neural regeneration, with special reference to Parkinson's disease and cerebral ischemia Date I, Yasuhara T The Japanese Society for Artificial Organs 12: 11-16, 2009 (査読有)
  19. Protein transduction method for cerebrovascular disorders Ogawa T, Ono S, Ichikawa T, Arimitsu S, Onoda K, Tokunaga K, Sugiu K, Tomizawa K, Matusi H, Date I Acta Med Okayama 63(1): 1-7, 2009 (査読有)
  20. Cell transplantation and regenerative therapy for neurological disorders--special reference to cerebral ischemia Yasuhara T and Date I No To Hattatsu 41: 197-202, 2009 (査読有)
  21. The combined therapy of intrahippocampal transplantation of adult neural stem cells and intraventricular

- erythropoietin-infusion ameliorates spontaneous recurrent seizures by suppression of abnormal mossy fiber sprouting. Jing M, Shingo T, Yasuhara T, Kondo A, Morimoto T, Wang F, Baba T, Yuan WJ, Tajiri N, Uozumi T, Murakami M, Tanabe M, Miyoshi Y, Zhao S, Date I Brain Res 1295: 203-217, 2009 (査読有)
22. Electrical stimulation of the cerebral cortex exerts antiapoptotic, angiogenic, and anti-inflammatory effects in ischemic stroke rats through phosphoinositide 3-kinase/akt signaling pathway Baba T, Kameda M, Yasuhara T, Morimoto T, Kondo A, Shingo T, Tajiri N, Wang F, Miyoshi Y, Borlongan CV, Matumae M, Date I Stroke published online Sep 17: , 2009 (査読有)
23. Rebleeding from a vertebral artery dissecting aneurysm after endovascular internal trapping: adverse effect of intrathecal urokinase injection or incomplete occlusion?: Case report Sugiu K, Tokunaga K, Ono S, Nishida A, Date I Neurologia medico-chirurgica 49(12): 597-600, 2009 (査読有)
24. 神経疾患に対する細胞移植・再生療法—脳虚血を中心に—(シンポジウム) 安原隆雄、伊達 勲 脳と発達 41(3): 197-202, 2009 (査読有)
25. GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) 安原隆雄、伊達 勲 日本臨床 67(Suppl 4): 452-455, 2009(査読有)
26. Suction decompression 法を併用した巨大・大型 paraclinoid 動脈瘤のクリッピング術—そのセッティングとクリッピング時の留意点— 伊達 勲、徳永浩司 脳神経外科 37(2): 135-146, 2009 (査読有)
27. 内頸動脈海綿静脈洞部巨大・大型動脈瘤に対する複合治療 伊達 勲、徳永浩司、杉生憲志 脳卒中の外科 36: 12-18, 2008 (査読有)
28. 脳内細胞移植 安原隆雄、伊達 勲 再生医療 7: 85-89, 2008 (査読有)
29. 脳内細胞移植—基礎講座: 再生医療研究に必要なラボテクニク— 安原隆雄、伊達 勲 再生医療 7(3): 301-305, 2008 (査読有)
30. パーキンソン病 安原隆雄、伊達 勲 Journal of Clinical Rehabilitation 17(10): 979-984, 2008 (査読有)
31. 中枢神経疾患に対する成体由来神経幹細胞移植 亀田雅博、新郷哲郎、村岡賢一郎、高橋和也、安原隆雄、伊達 勲 岡山医学会雑誌 120: 153-157, 2008 (査読有)
32. Comparison of the therapeutic potential of adult and embryonic neural precursor cells in a rat model of Parkinson disease Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, Kameda M, Yuen WJ, Uozumi T, Matsui T, Miyoshi Y, Date I Journal of Neurosurgery 108(1): 149-159, 2008 (査読有)
33. Neuroprotective effects of edaravone-administration on 6-OHDA-treated dopaminergic neurons. Yuan WJ, Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Agari T, Kameda M, Uozumi T, Tajiri N, Morimoto T, Jing M, Baba T, Wang F, Leung H, Matsui T, Miyoshi Y, Date I BioMedCentral Neurosciences 9: 75, 2008 (査読有)
34. Embryonic neural stem cells transplanted in middle cerebral artery occlusion model of rats demonstrated potent therapeutic effects, compared to adult neural stem cells Takahashi K, Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kameda M, Takeuchi A, Yano A, Kurozumi K, Agari T, Miyoshi Y, Kinugasa K, Date I. Brain Res 1234: 172-82, 2008 (査読有)
- [学会発表] (計 41 件)
- 第 10 回日本再生医療学会総会: 東京, 2011.03.01-02 電気刺激が内因性の神経幹細胞に与える影響 亀田雅博
  - ART-ITP International Symposium in Korakuen: Advanced Research Training-International Training Program: 岡山, 2011.01.29 臨床医教育になぜ基礎研究が重要か—脳神経外科の場合—(特別講演) 伊達 勲
  - 第 16 回日本脳神経外科救急学会: 名古屋, 2011.01.29-30 Neuroprotection in animal models of cerebral ischemia and traumatic brain injury (Symposium) 伊達 勲
  - 第 16 回日本脳神経外科救急学会: 名古屋, 2011.01.29-30 脳梗塞に対する再生医療 安原隆雄
  - 第 50 回定位・機能神経外科学会: 広島, 2011.01.21-22 脳卒中後の感覚障害に対する脊髄刺激療法の効果 高杉祐二
  - Myanmar 医学会総会—Symposium: Advances in Surgical Medicine in Japan—: Yangon, Myanmar, 2011.01.11

- Recent technology and technique in neurosurgery: suction decompression procedure for giant cerebral aneurysm clipping Date I
7. 38th Annual Meeting of the International Society for Pediatric Neurosurgery : Jeju Island, Korea, 2010.10.30-11.04 Enhancer of revascularization, gene, stem cell: Experimental approach for moyamoya disease Date I
  8. (社)日本脳神経外科学会第69回学術総会:福岡, 2010.10.27-29 頭部外傷モデルラットに対してエリスロポイエチンの神経保護効果はPI3K-pathwayを介して発揮される 門田知倫
  9. (社)日本脳神経外科学会第69回学術総会:福岡, 2010.10.27-29 パーキンソン病モデルラットにおける尿中8-OHdGの変化 菊池陽一郎
  10. The 10th Korean and Japanese Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke : Sasebo, Japan, 2010.10.08-09 Clip selection for large and giant paraclinoid aneurysm surgery Date I
  11. 第33回日本神経科学大会 (Neuro 2010 : 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会 合同大会) : 神戸, 2010.09.02-04 パーキンソン病モデルラットにおいてGDNF前投与は移植後神経幹細胞の生存率を向上させる—Q-dotイメージを用いた移植細胞の評価— 王 飛霏
  12. 第11回日本分子脳神経外科学会:仙台, 2010.08.27-28 The effects of carbamylated fusion protein erythropoietin on Parkinson's disease model of rats 平ジュディッチ
  13. 第44回ともしび会総会:岡山, 2010.06.12 パーキンソン病に対する脳深部刺激療法 (特別講演) 伊達 勲
  14. 第30回日本脳神経外科コンgres総会:横浜, 2010.05.06 脳神経外科医教育における基礎研究の意義 伊達 勲
  15. 第39回日本脳卒中の外科科学会:STROKE 2010:盛岡, 2010.04.15-17 脳卒中外科領域の手術支援を統合する周術期画像情報管理システム (PICS) の有用性 伊達 勲
  16. 第35回日本脳卒中学会総会:STROKE 2010:盛岡, 2010.04.15-17 脳梗塞に対する電気刺激療法 安原隆雄
  17. 市民公開講座 脳卒中を考える:岡山, 2010.03.22 脳卒中の外科治療 伊達 勲
  18. WJEMA Spring Conference 2010:岡山 (臨床第一講義室), 2010.03.22-24 新しいテクノロジーを用いた脳神経外科治療 (特別講演) 伊達 勲
  19. Joint Neurosurgical Convention 2010: 5th International Mt. BANDAI Symposium for Neuroscience joint with 6th Pan-Pacific Neurosurgery Congress : 第5回国際Mt.磐梯神経科学シンポジウム・第6回汎太平洋国際脳神経外科学会合同開催: Hawaii, U.S.A., 2010.01.24-30 Surgical treatment of symptomatic unruptured IC aneurysms and improvement of cranial nerve signs (Key Note Lecture)Date I
  20. 第1回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会:名古屋, 2010.01.30 脳虚血に対する再生療法 伊達 勲
  21. 第24回脳神経市民公開講座:名古屋, 2010.01.16 パーキンソン病に対する脳深部刺激療法 (特別講演) 伊達 勲
  22. 第39回小児神経学セミナー:東京, 2009.11.22 手術療法を主体とした脳神経外科疾患—動画を中心に— 伊達 勲
  23. 第24回熊本脳神経外科懇話会:熊本, 2009.11.20 大きな内頸動脈瘤の外科治療 (特別講演) 伊達 勲
  24. 第47回神奈川脳神経外科懇話会:横浜, 2009.11.06 Paraclinoid aneurysm の clipping 時に考えること (特別講演) 伊達 勲
  25. (社)日本脳神経外科学会第68回学術総会:東京, 2009.10.14-16 suction decompression 法を併用した巨大・大型 paraclinoid 動脈瘤クリッピング術 伊達 勲
  26. 第10回日本分子脳神経外科学会:岡山, 2009.09.19-20 頭部外傷モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞移植と持続的な運動刺激を用いた神経保護・修復効果について 田尻直輝
  27. The 32nd Annual Meeting the Japan Neuroscience Society : 名古屋, 2009.09.16-18 Ex vivo gene therapy for central nervous system disorders Yasuhara T
  28. 平成21年度ブレインズ四国会高知大会:高知, 2009.08.01 最近の症例から学ぶ (特別講演) 伊達 勲
  29. 第37回大阪大学脳神経外科同窓会特別講演:大阪, 2009.07.04 内頸動脈巨大動脈瘤の外科治療 伊達 勲
  30. 3rd Sapporo Medical Conference : 札幌, 2009.06.30 パーキンソン病に対する外

- 科治療—脳深部刺激療法と再生療法—  
(特別講演) 伊達 勲
31. 神経組織の成長・再生・移植研究会第24回学術集会：伊香保，2009.06.21 中枢神経系疾患に対する細胞移植と神経新生 安原隆雄
  32. 第8回山陰パーキンソン病研究会：米子，2009.06.19 パーキンソン病に対する外科治療・脳深部刺激療法と再生療法（特別講演）伊達 勲
  33. 信州大学脳神経外科開講 30周年記念講演会（市民公開講座）：松本，2009.05.23 パーキンソン病に対する脳深部刺激療法と再生療法 伊達 勲
  34. 第34回日本脳卒中学会総会・第38回日本脳卒中の外科学会：松江，2009.03.20-22 脳虚血に対する gene therapy—ex vivo gene therapy を中心に— 安原隆雄
  35. 第34回日本脳卒中学会総会・第38回日本脳卒中の外科学会：松江，2009.03.20-22 症候性未破裂内頸動脈瘤の外科治療と脳神経症状の改善（シンポジウム）伊達 勲
  36. 第8回日本再生医療学会総会：東京，2009.03.05-06 新生ラット脳虚血に対する骨髄由来多能性幹細胞移植 安原隆雄
  37. 第12回山梨脳卒中研究会：中巨摩郡，2009.01.30 再生医学から見た脳卒中—研究と臨床の現状と展望—（特別講演）伊達 勲
  38. 第48回日本定位・機能神経外科学会：東京，2009.01.23-24 パーキンソン病に対する遺伝子治療—ex vivo 遺伝子治療を中心に— 安原隆雄
  39. 第32回日本てんかん外科学会：東京，2009.01.22-23 キンドリングモデルラットにおけるエリスロポエチンの二次性全般化けいれん抑制効果 近藤聡彦
  40. 第67回日本脳神経外科学会総会：盛岡，2008.10.01-03 リハビリテーションの神経新生誘導 安原隆雄
  41. 10th International Conference on Neural Transplantation & Repair：Freiburg, Germany, 2008.09.10-13 Exercise and Neurogenesis Yasuhara T

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊達 勲 (DATE ISAO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70236785

### (2) 研究分担者

三好 康之 (MIYOSHI YASUYUKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：00362997

### (3) 連携研究者

杉生憲志 (SUGIU KENJI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：40325105

徳永浩司 (TOKUNAGA KOJI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：40294467  
小野成紀 (ONO SHIGEKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：40335625

市川智継 (ICHIKAWA TOMOTSUGU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：10362964

亀田雅博 (KAMEDA MASAHIRO)  
岡山大学・岡山大学病院・医員  
研究者番号：50586427

以上