

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390388

研究課題名（和文） 亜急性期の脳梗塞に対する遺伝子組換え骨髄幹細胞移植の検討

研究課題名（英文） Therapeutic benefits of the genetically-engineering mesenchymal stem cells for sub-acute cerebral ischemia

研究代表者 本望 修（HONMOU OSAMU）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90285007

研究成果の概要（和文）：

従来、“脳梗塞亜急性期における梗塞巣の損傷は完成してしまっており、既に不可逆的損傷を負ってしまっている、”と考えられていた梗塞巣が、実は、不可逆的变化に陥っていない脳組織が残存しており、治療の介入の余地が残されていることが推測されていた。

本研究では、亜急性期の脳梗塞巣における病態生理を解析し、細胞治療による治療メカニズムを検討することで、新しい治療戦略を考案することができた。

研究成果の概要（英文）：

We have reported that transplantation of bone marrow stem cells has demonstrated therapeutic efficacy in animal models of acute cerebral ischemia. In the present study, we transplanted bone marrow stem cells into middle cerebral artery occlusion model rats to study their potential therapeutic benefit in the subacute phase. This work demonstrates that highly purified bone marrow stem cells are neuroprotective and angiogenic in subacute cerebral ischemia models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
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：移植・再生医療 再生医学 神経科学 脳・神経 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

我々は、臨床応用に最短位置と予想される骨髄細胞をドナー細胞とした神経再生研究に注目し、基礎的研究成果を数多く報告していた。また、その中でも特に神経再生作用の強い細胞群(骨髄間葉系幹細胞: Mesenchymal stem cell MSC)が、経静脈内投与でも脳梗塞に対して著明な治療効果が認められることを報告していた。

脳梗塞に対するMSCの治療メカニズムは幾つか推測され、大きく分けて、神経栄養因子による神経保護作用、血管新生作用(脳血流の回復)、神経再生、の3つがあった。これらの治療メカニズムは、特に脳梗塞急性期治療で強く期待できるものであるが、一方、MSCは脳梗塞亜急性期に対しても治療効果がある可能性が示唆されていた。

以上より、細胞治療による治療効果のメカニズムを詳細に検討し、亜急性期患者に対する新たな治療方法の研究が必要とされていた。

2. 研究の目的

亜急性期の脳梗塞巣における病態生理を解析し、幹細胞移植の際の治療メカニズムを詳細に解析することで、更なる新しい治療戦略を考案することを主目的とした。

3. 研究の方法

脳梗塞モデルラットは、“ラット中大脳動脈閉塞モデル”を用いた。すなわち、ラットを全身麻酔下に中大脳動脈を遮断することで、脳梗塞モデルとした。モデルは既に報告されている“田村のモデル”を基礎とし、平常体温下で血流遮断を施行した。これにより、大脳皮質、海馬、大脳基底核領域に安定した脳梗塞領域が作成できた。

この脳梗塞モデルに対して、各種MSCを移植し、画像診断学的、生化学的、組織学的、行動学的等、総合的に解析し、病態生理と治療メカニズムについて総合的に検討した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞巣の病態解析:

脳梗塞亜急性期における梗塞巣の病態生理の解明を一から見直し、脳梗塞巣および周囲脳組織について、画像診断学的所見と組織学的所見との比較解析を行った。その結果、脳梗塞の後、MRIのT2WIやDWIで認められるhigh intensity areaは、従来の常識と比べても長期間に渡って不可逆性変化に陥っているのではないことが判明した。さらには、それらの領域は、幹細胞治療することで、ダメージを最小限に軽減することが可能であることが判明した。

また、血液脳関門(BBB)の開閉状態を経時的に解析すると同時に、静脈内に移植された細胞が血管内から脳実質内へ移行するホーミング作用を検討したところ、BBBの損傷程度とホーミング効果との相関関係は少なく、急性期から慢性期に渡って良好に脳梗塞巣に移植細胞が集積することが判明した。これらのことから、脳梗塞亜急性期～慢性期においても、静脈内に細胞を投与することで、移植細胞を高率に病巣へ送り込ませることができると判明した。

(2) 幹細胞治療による作用メカニズムの解析:

移植した幹細胞が治療効果を発揮する機序について、神経栄養作用の観点から解析した結果、脳梗塞の亜急性期であっても、神経栄養作用が働き、尚且つ、ある程度の治療効果が期待できることが判明した。この事実は、

従来、想像すらできなかったもので、今後の脳梗塞治療戦略を根本から覆す知見であると思われる。

この神経栄養作用の作用を更に詳しく解析するために、下記の実験を行った。すなわち、脳虚血負荷につづく2次損傷のメカニズムとして、delayed neural death (apoptosis)がある。一過性脳虚血後に海馬のCA1領域のpyramidal neuronがアポトーシスを起こすことは良く知られているが、このdelayed neural deathが幹細胞を静脈内移植することで抑制されることが判明した。そして、この治療効果発揮のメカニズムとして神経栄養因子であるBDNFが関与していることが判明した。さらに、移植した骨髄幹細胞は、脳虚血領域内のCA1領域で生着しpyramidal neuronへと分化することも判明した。そして、これらの組織学的な知見は、行動学的解析(脳高次機能評価)でも同様に治療効果として確認することができた。これらの結果より、幹細胞による治療は、神経栄養作用と再生作用により、運動機能などの改善のみならず、脳高次機能の改善も促進する作用が期待され、認知症の治療にも有用性が示された。

また、fMRIによる脳機能解析の結果、幹細胞治療メカニズムに、脳梗塞病巣への直接的な治療効果の他に、対側の健常脳の可塑性を向上させることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

[Honmou O](#), Onodera R, Sasaki M, Waxman SG, Kocsis JD. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. Trends Mol Med. 18: 292-297, 2012. 査読有
[Katada R](#), Nishitani Y, [Honmou O](#), Mizuo K, Okazaki S, Tateda K, et al.

Expression of Aquaporin-4 Augments Cytotoxic Brain Edema after Traumatic Brain Injury during Acute Ethanol Exposure. Am J Pathol. 180; 17-23, 2011. 査読有

Sasaki M, [Honmou O](#), Radtke C, Kocsis JD. Development of a middle cerebral artery occlusion model in the nonhuman primate and a safety study of i.v. Infusion of human mesenchymal stem cells. PLoS One; 6: e26577, 2011. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0026577
[Song CH](#), [Honmou O](#), Furuoka H, Horiuchi M.: Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prion. J Virol. 85; 11069-11078, 2011. 査読有

[Matsushita T](#), [Kibayashi T](#), [Katayama T](#), [Yamashita Y](#), [Suzuki S](#), [Kawamata J](#), [Honmou O](#), [Minami M](#), [Shimohama S](#).: Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. Neurosci Lett. 8; 41-5, 2011. 査読有

[Honmou O](#), [Houkin K](#), [Matsunaga T](#), [Niitsu Y](#), [Ishiai S](#), [Onodera R](#), [Waxman SG](#), [Kocsis JD](#): Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells into stroke: Brain, 134: 1790-1807, 2011. 査読有
[Komatsu K](#), [Honmou O](#), [Suzuki J](#), [Houkin K](#), [Hamada H](#), [Kocsis JD](#): Therapeutic time window of mesenchymal stem cells

derived from bone marrow after cerebral ischemia. Brain Res 1334: 84-92, 2010. 査読有

Zheng W, Honmou O, Miyata K, Harada K, Suzuki J, Liu H, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD: Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia. Brain Res 1310: 8-16, 2010. 査読有

Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M: Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. Journal of Virology 83: 5918-5927, 2009. 査読有

Toyama K, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD: Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. Exp Neurol 216: 47-55, 2009. 査読有

Omori Y, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Kocsis JD: Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. Brain Res 1236: 30-38, 2008. 査読有

Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD: Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 28: 329-340, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計14件)

本望 修 脳梗塞の再生医療 第18回日本血液代替物学会 2011.10.28 札幌

本望 修 Intra venous transplantation of auto serum expanded autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow into stroke patients 第73回日本血液学会学術集会 2011.10.14 名古屋

本望 修 脳卒中を治す 細胞治療の現状と将来 第20回日本脳ドック学会総会 2011.7.8 東京

本望 修 自己培養骨髄幹細胞による脳梗塞の再生医療 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会 2011.02.12 名古屋

本望 修 脳神経疾患に対する骨髄幹細胞移植による救急医療 第16回日本脳神経外科救急学会 2011.01.30 名古屋

本望 修 脊髄損傷に対する培養骨髄幹細胞の静脈内投与 社団法人 日本脳神経外科学会 第69回学術集会 2010.10.28 福岡

本望 修 脳梗塞の再生医療 第13回日本栓子検出と治療学会総会 2010.10.19 福岡

本望 修 脳梗塞に対する自己骨髄幹細胞を用いた再生医療 第19回日本意識障害学会 2010.07.24 山口

本望 修 脳梗塞に対する自己骨髄幹細胞の静脈内投与 第13回日本病院脳神経外科学会 2010.07.17 釧路

本望 修 脳梗塞に対する自己培養骨髄幹細胞の静脈内投与 第255回日本内科学会北海道地方会例会: 2010.06.19 札幌

本望 修 脳神経外科学領域における再生医療の臨床応用の現状 第 35 回日本外科系連合学会学術集会 2010.06.18 千葉

本望 修 脳卒中における再生医療の展望 第 30 回 日本脳神経外科コンGRESS 総会 2010.05.09 横浜

Honmou 0: Intravenous transplantation of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow into stroke patients, and application for spinal cord injury. The International Conference of Stem Cells & Regenerative Medicine for Neurodegenerative Diseases 2010.04.23 Taiwan

本望 修 脳梗塞に対する二重遺伝子導入ヒト骨髄幹細胞移植による治療 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会 2009.10.14 東京

〔図書〕(計 12 件)

本望 修: 自己培養骨髄幹細胞の脳梗塞疾患に対する静脈内投与 . 臨床評価 統洋社 112 : 158-166, 2011.

本望 修、佐々木 雄一: 脳梗塞に対する骨髄幹細胞 . 臨床神経外科 Clinical Neuroscience 中外医学社 29 : 602 - 603, 2011.

本望 修, 小野寺 理恵: 脳梗塞に対する自己骨髄幹細胞の静脈内投与 . 臨床評価 統洋社 38-3: 527-531, 2010.

本望 修: 脳血管障害の再生医療 . 神経治療学 公和図書 26: 753-757, 2009.

本望 修: 骨髄幹細胞と神経再生 . 医学のあゆみ 医歯薬出版 231: 1097-1100, 2009.

本望 修, 宝金清博: 神経再生治療 .

総合臨牀 永井書店 58: 217-220, 2009.

本望 修, 宝金清博: 脳梗塞の神経再生医療 . 医学のあゆみ 医歯薬出版 231: 553-556, 2009.

本望 修, 大石美里, 宝金清博: 白質病変-分子レベルからみた病態, 治療の展開-骨髄幹細胞移植による脳虚血障害の治療-. 分子脳血管病 先端医学社 8: 169-172, 2009.

本望 修, 宝金清博: 骨髄幹細胞を用いた脳梗塞の治療 . 脳外誌 医学書院 17: 527-530, 2008.

本望 修, 宝金清博: 脳梗塞急性期の治療(4)再生医療(骨髄移植を中心に). 神経治療学 公和図書 25: 545-548, 2008.

本望 修: 再生医療-脳卒中-. Clinical Rehabilitation 医歯薬出版 17: 673-678, 2008.

本望 修: 骨髄由来中胚葉系幹細胞による脳梗塞の治療 . Drug Delivery System 日本医学社 23: 526-528, 2008.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称 : 細胞懸濁液調製用デバイス

発明者 : 本望 修

権利者 : 札幌医科大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2010-174903

出願年月日 : 2010 年 8 月 3 日

国内外の別 : 国内

名称：血液採取キット
発明者：本望 修 ら
権利者：札幌医科大学、ニプロ株式会社
種類：特許
番号：特願 2010-174902
出願年月日：2010 年 8 月 3 日
国内外の別：国内

名称：細胞増殖方法ならびに組織の修復
および再生のための医薬
発明者：本望 修 ら
権利者：札幌医科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2008/002503
出願年月日：2008 年 9 月 10 日
国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：細胞増殖方法ならびに組織の修復
および再生のための医薬
発明者：本望 修 ら
権利者：札幌医科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2008/002503
取得年月日：2012 年 3 月 2 日
国内外の別：国内

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本望 修 (HONMOU OSAMU)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：90285007

(2)研究分担者

濱田洋文 (HAMADA HIROFUMI)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：00189614

宝金清博 (HOUKIN KIYOHIRO)
北海道大学・大学院・医学研究科・教授
研究者番号：90229146