

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09328

研究課題名(和文) 脳梗塞に対する幹細胞移植後の機能回復に関連する脳可塑性の解明

研究課題名(英文) Brain Plasticity in Functional Recovery Following Stem Cell Transplantation for Stroke

研究代表者

日宇 健 (Hiu, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：00404260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性脳卒中の急性期から亜急性期にかけて、幹細胞移植は血管新生を促進する。梗塞巣(IC)では、発症24時間以内にニューロン、アストロサイト、ミクログリアがVEGFを分泌し、3日目にピークを迎える。周辺梗塞領域(PI)では、ペリサイトがVEGFを分泌し、内皮細胞(EC)の増殖を助ける。亜急性期には、VEGFとPDGF-BBが成熟した血管新生を促進する。急性期のIA幹細胞移植では、幹細胞はICとPIに広く分布し、亜急性期にはPIに主に分布する。移植された幹細胞はVEGFやPDGF-BBなどを分泌し、血管新生を促進することで梗塞体積を減少させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性脳卒中に対する幹細胞療法は、神経障害の治療に期待が寄せられており、初期の臨床試験が進行中である。急性期から亜急性期にかけて、幹細胞移植は血管新生を促進する。亜急性期には、VEGFとPDGF-BBが成熟した血管新生を促進する。動脈内移植は安全性が確認されているが、有効性向上には移植細胞の移動促進と長期生存する細胞の開発が必要であり、さらなる研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：Stem cell therapy for ischemic stroke holds promise, particularly intraarterial (IA) transplantation. During the acute to subacute phases, stem cell transplantation promotes angiogenesis. In the infarct core (IC), within 24 hours post-stroke, neurons, astrocytes, and microglia secrete VEGF, peaking on day 3. In the periinfarct area (PI), pericytes secrete VEGF, aiding endothelial cell (EC) proliferation. In the subacute phase, VEGF and PDGF-BB enhance mature angiogenesis. In acute phase IA stem cell transplantation, stem cells are widely distributed in the IC and PI, while in the subacute phase, they are mainly in the PI. Transplanted stem cells secrete various growth factors, including VEGF and PDGF-BB, promoting angiogenesis and reducing infarct volume. IA transplantation has shown safety but improving efficacy requires enhanced migration and long-term survival of transplanted cells. Further research is needed to achieve these advancements.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Stem cell Stroke

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

少子高齢化が加速する中、脳卒中による機能障害は高齢者の寝たきりの主要な要因となっている。これは、脳卒中後の機能障害に対する画期的な治療法が未だ確立されておらず、長期のリハビリテーションに依存せざるを得ないためである。これまで、脳保護療法などの神経細胞死を標的とした研究が多く行われてきたが、近年の再生医学の発展により、機能再建を目指す治療戦略が現実的な課題となっている。特に脳梗塞は、再生医療の恩恵を受けることが期待されている疾患の一つである。

脳梗塞発症急性期における tPA 静注療法は 2005 年に本邦で認可された。われわれは血液脳関門 in vitro モデルを作成し、低酸素/再酸素下にて tPA は時間依存性に経細胞輸送の亢進、タイトジャンクション蛋白障害による細胞間輸送を亢進させることを示した。これは臨床的には tPA 投与に際して発症から投与まで時間短縮が重要であることを示唆し非常に有用な知見が得られた。

しかし急性期治療で tPA 治療の恩恵を受ける患者は一部であり、慢性期患者への治療のアプローチが重要である。そこで axon と dendrite の接続部位で、神経活動にかかわるシナプスに着目した。Array tomography という独自の技法にて 3 次元的にシナプスを可視化し定量を行った。脳梗塞 1 週間後、皮質第 5 層特異的に、GABA (抑制性) シナプスが増加し、錐体細胞の抑制性シナプス後電位の charge が増加していることを明らかとなり 1 か月後には正常化した。つまり一過性に synaptic GABA シグナルが増強することが示された。この GABA シグナルが機能回復に与える影響について GABAAR α 1 アゴニストである zolpidem を使用し、脳の修復に作用することが示された。脳梗塞後に増強する synaptic GABA シグナルが機能回復に有効に作用することが実証され初めての知見として報告した。脳梗塞後の recovery phase で脳の可塑性があることを示した。このシナプス定量化の技術を活かし幹細胞移植に応用することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳梗塞後のシナプス変化の解明と、幹細胞移植がシナプスに与える影響を明らかにすることである。脳機能の回復メカニズムにおいて、特にシナプスをはじめとする脳の可塑性については多くの未解明な点が残されている。神経細胞移植後の脳の可塑性をシナプスレベルまで明らかにすることを目指し、シナプス研究と神経幹細胞移植研究を融合させ、グリアの増殖、シナプス機能や神経細胞突起の侵入など、機能回復の内在性修復機構のメカニズムを解析する。ニューロンを興奮または抑制することで、シナプス機能の促進により幹細胞移植後の機能回復をさらに促進させるかを検討する。

3. 研究の方法

動物モデルの作成

本研究では、脳梗塞の動物モデルとして、ヌードラットを用いる。具体的には、distal MCA occlusion モデルを作成し、脳梗塞後 1 週間にヒト神経幹細胞を患側大脳皮質に定位置植した。ラットおよびマウスを用いて、脳梗塞モデルを作成した。distal MCA occlusion 手法を用いた。ヒト神経幹細胞を脳梗塞後 1 週間に患側大脳皮質に 1×10^5 cells/site の濃度で 4 箇所定位置植する。ヒト神経幹細胞を、脳梗塞後 1 週間に定位置植し、各グループ (実験群、対照群) に分けて実施する。治療効果の評価として移植後の機能回復を評価するために、cylinder test、whisker-paw test、modified neurological severity score test を 1 週毎に実施した。移植後 4 週間で、梗塞周辺部と対側皮質のシナプスの数と機能を高解像度イメージング (array tomography) および qPCR で評価した。

4. 研究成果

われわれは独自に開発した高解像度イメージングである array tomography を用いて、シナプスの定量化を可能とした。Z stack を著明に改善させることで空間分解能に極めて優れており個々のシナプスを三次元的に構築することが可能で、シナプスの定量化を可能とした。前シナプスマーカーと後シナプスマーカーの colocalization のあるものをシナプスと定義しグルタミン酸シナプスと GABA シナプスの定量化を行った。synapsin と PSD の colocalization のあるものをグルタミン酸シナプスと定義した。移植後 4 週間後に梗塞周辺部のシナプスの定量化を行い、グルタミン酸シナプスの増加を認めた。一方で GABA シナプスは増加していなかった。この変化は移植 1 週間後には認めなかった。機能回復が得られる移植 4 週間後にグルタミン酸シナプスの増加を認め、グルタミン酸シナプスが機能回復に寄与していることが示唆された。

以下今回のデータおよび過去の文献から考察する。

幹細胞移植の投与方法

幹細胞移植は、全身投与（静脈内（IV）および動脈内（IA）移植）と局所投与（脳内（IC）および脳室内投与）の2つの投与経路がある。動物モデルでは、頸動脈を介したIA移植が一般的である。IV移植では、大腿静脈や尾部静脈が使用され、IC移植では定位装置が用いられる。全身投与された幹細胞は全身の免疫応答を調節し、局所投与はより多くの細胞を脳内に導入できる。IA移植は標的病変に多くの細胞を分布させるが、IC移植に比べて侵襲性が低い。移植細胞の投与量は重要であり、高用量のIA移植は塞栓症リスクが高い。最適な投与量を決定することが必要である。急性期の幹細胞移植は神経保護を目的とし、慢性期は脳の再構築を目的とする。急性期のIA移植は亜急性期移植よりも機能回復が優れている。

幹細胞の供給源および品質

幹細胞移植において、骨髄単核細胞（BMMCs）、間葉系幹細胞（MSCs）、神経幹細胞（NSCs）、歯髄幹細胞（DPSCs）および誘導多能性幹細胞（iPS細胞）が使用される。BMMCsは収集と分離が簡便で、急性期および亜急性期に使用される。MSCsは多能性効果を持ち、免疫寛容性がある。NSCsは神経細胞のアポトーシス防止や血管新生などの多くの特性を持つ。DPSCsはNSCsとMSCsの特徴を兼ね備えている。iPS細胞は倫理的問題がなく、自家移植に適しているが、腫瘍形成リスクがある。

幹細胞の品質は年齢、性別、喫煙歴、肥満、併存疾患によって影響を受ける。老化は幹細胞の品質を低下させ、高齢者からのMSCsはBDNFおよびPDGF-BBの分泌が減少する。肥満や喫煙も幹細胞の機能を低下させる。

バイスタンダー効果

血管新生

VEGFとPDGF-BBは血管新生に重要な役割を果たす。虚血性脳卒中後、VEGFは内皮細胞の増殖を促進し、血管の透過性を高める。ペリサイトも血管新生を促進し、基底膜を分解して血管透過性を増加させる。急性期や亜急性期に幹細胞移植を行うことで、血管新生が促進される。

神経新生

BDNF、FGF-2、EGFなどがNSCの増殖を促進する。NSCは虚血領域に移動し、血管や星状細胞に沿って移動する。ペリサイト由来のNSCも神経新生に寄与する。急性期のIA MSC移植はNSCの移動を促進する。

抗炎症プロセス

DAMPsは炎症を誘導し、神経炎症を引き起こす。MSC移植はBBBの完全性を改善し、プロ炎症性サイトカインを減少させることで神経保護効果を持つ。急性期の幹細胞移植は、バイスタンダー効果と細胞置換のメカニズムを通じて、治療効果を発揮する。

今後の課題

今後の課題としては、臨床応用における治療法の標準化が重要である。移植細胞のホスト側への生着を時間的、空間的に把握するためには、新たな造影剤や光遺伝学技術を活用することが必要である。さらに、特定の遺伝子を操作することで治療効率を高める研究や、光遺伝学を用いたニューロンの興奮または抑制のメカニズム解明も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yamaguchi Susumu, Yoshida Michiharu, Horie Nobutaka, Satoh Katsuya, Fukuda Yuutaka, Ishizaka Shunsuke, Ogawa Koki, Morofuji Yoichi, Hiu Takeshi, Izumo Tsuyoshi, Kawakami Shigeru, Nishida Noriyuki, Matsuo Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Stem Cell Therapy for Acute/Subacute Ischemic Stroke with a Focus on Intraarterial Stem Cell Transplantation: From Basic Research to Clinical Trials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 33～33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bioengineering10010033	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 Koike Hirofumi, Morikawa Minoru, Ishimaru Hideki, Ideguchi Reiko, Uetani Masataka, Hiu Takeshi, Matsuo Takayuki, Miyoshi Mitsuharu	4. 巻 22
2. 論文標題 Amide proton transfer MRI differentiates between progressive multifocal leukoencephalopathy and malignant brain tumors: a pilot study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Medical Imaging	6. 最初と最後の頁 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12880-022-00959-3	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 Okamura Kazuaki, Higuchi Taro, Izumo Tsuyoshi, Takahira Ryotaro, Sadakata Eisaku, Yoshida Michiharu, Yamaguchi Susumu, Morofuji Yoichi, Baba Shiro, Hiu Takeshi, Matsuo Takayuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Ruptured basilar artery perforator aneurysm: a novel mechanism of pure subarachnoid hemorrhage in moyamoya disease. Illustrative case	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons	6. 最初と最後の頁 CASE22238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/CASE22238	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 Koike Hirofumi, Morikawa Minoru, Ishimaru Hideki, Ideguchi Reiko, Uetani Masataka, Hiu Takeshi, Matsuo Takayuki, Miyoshi Mitsuharu	4. 巻 23
2. 論文標題 Quantitative Chemical Exchange Saturation Transfer Imaging of Amide Proton Transfer Differentiates between Cerebellopontine Angle Schwannoma and Meningioma: Preliminary Results	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10187～10187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231710187	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 Matsuo Ayaka, Hiu Takeshi, Otsuka Hiroaki, Miyazaki Atsushi, Haraguchi Wataru, Kawahara Ichiro, Ono Tomonori, Izumo Tsuyoshi, Matsuo Takayuki, Tsutsumi Keisuke	4. 巻 4
2. 論文標題 Endovascular treatment of an aneurysm arising from the minor limb of an upper basilar artery fenestration: illustrative case	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons	6. 最初と最後の頁 CASE22180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/CASE22180	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 Ogawa Koki, Kato Naoya, Yoshida Michiharu, Hiu Takeshi, Matsuo Takayuki, Mizukami Shusaku, Omata Daiki, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo, Mukai Hidefumi, Kawakami Shigeru	4. 巻 348
2. 論文標題 Focused ultrasound/microbubbles-assisted BBB opening enhances LNP-mediated mRNA delivery to brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 34 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2022.05.042	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 Hiu Takeshi, Morimoto Shimpei, Matsuo Ayaka, Tsujino Akira, Matsuo Takayuki, Tsutsumi Keisuke	4. 巻 16
2. 論文標題 Current status of a helicopter transportation system on remote islands for patients undergoing mechanical thrombectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0245082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245082	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 Yoshida Michiharu, Hiu Takeshi, Baba Shiro, Morikawa Minoru, Horie Nobutaka, Ujifuku Kenta, Yoshida Koichi, Matsunaga Yuki, Niino Daisuke, Xie Ang, Izumo Tsuyoshi, Anda Takeo, Matsuo Takayuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Ruptured aneurysm?induced pituitary apoplexy: illustrative case	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons	6. 最初と最後の頁 CASE21169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/CASE21169	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 FUJIMOTO Takashi、MOROFUJI Yoichi、HIU Takeshi、YOSHIDA Koichi、IZUMIKAWA Koichi、WATANABE Takeshi、MATSUO Takayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 A Case of Invasive Sphenoid Sinus Aspergillosis Presenting as Oculomotor Nerve Palsy in a Healthy Patient	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 343 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmccrj.cr.2020-0189	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 Otsuka Hiroaki、Hiu Takeshi、Ae Ryusuke、Yoshimura Shota、Iwanaga Hiroshi、Nakamichi Chikaaki、Yasaka Takahiro、Tsutsumi Keisuke	4. 巻 43
2. 論文標題 Development of a prehospital stroke hotline system on remote islands	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Stroke	6. 最初と最後の頁 421 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3995/jstroke.10875	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 副島 航介、原口 渉、堤 圭介、日宇 健、塩崎 絵理、小川 由夏、伊藤 健大、本田 和也、諸藤 陽一、川原 一郎、小野 智憲	4. 巻 73
2. 論文標題 症例報告 側副血行路起始部(A1)と前交通動脈に未破裂脳動脈瘤を伴う無症候性aplastic or twig-like middle cerebral artery-動脈硬化性頭蓋内血管多発狭窄を合併した1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 379 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201771	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 Hiu Takeshi、Morimoto Shimpei、Matsuo Ayaka、Horie Nobutaka、Tateishi Yohei、Ono Tomonori、Haraguchi Wataru、Izumo Tsuyoshi、Tsuji no Akira、Matsuo Takayuki、Tsutsumi Keisuke	4. 巻 16
2. 論文標題 Current status of a helicopter transportation system on remote islands for patients undergoing mechanical thrombectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245082	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 松尾 彩香、堤 圭介、日宇 健、川原 一郎、原口 渉、森塚 倫也、本田 和也、伊藤 健大、小野 智恵、牛島 隆二郎	4. 巻 48
2. 論文標題 軽微な頭部外傷を契機とする深部白質の微小梗塞で発症した中大脳動脈M2解離の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 1147 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204338	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 日宇 健、徳田 昌紘、伊藤 健大、森塚 倫也、忽那 史也、上野 未貴、小野 智恵、原口 渉、牛島 隆二郎、堤 圭介、大塚 寛朗、中道 親昭、本田 和也、権 志成、山崎 一美、松尾 彩香、川原 一郎、岩永 洋	4. 巻 48
2. 論文標題 タスクシフティングを目指した救急科初動の脳卒中ホットラインとnurse practitionerによる診療支援	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 781 ~ 792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204274	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 日宇 健、松尾彩香、川原一郎、本田和也、伊藤 健大、森塚 倫也、原口 渉、小野智恵、牛島隆二郎、堤 圭介
2. 発表標題 タスクシフティングを目指した脳卒中診療体制の構築 -本土及び離島発症のdrip/ship/retrieveへの効果-
3. 学会等名 Stroke2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日宇 健、馬場 史郎、平山 航輔、氏福 健太、吉田 光一、松永 祐希、定方 英作、堀江 信貴、出雲 剛、案田 岳夫、松尾 孝之
2. 発表標題 血管芽腫に対する治療戦略 -術前塞栓術の意義について-
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日宇 健、馬場 史郎、平山 航輔、氏福 健太、吉田 光一、松永 祐希、定方 英作、堀江 信貴、出雲 剛、案田 岳夫、松尾 孝之
2. 発表標題 Hemangioblastomaに対する治療戦略 -術前塞栓術の意義について-
3. 学会等名 第25回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	定方 英作 (Eisaku Sadakata) (10772139)	長崎大学・病院(医学系)・医員 (17301)	
研究分担者	堀江 信貴 (Nobutaka Horie) (70380912)	広島大学・大学院医系科学研究科・教授 (17301)	
研究分担者	松尾 孝之 (Takayuki Matsuo) (00274655)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	馬場 史郎 (Shiro Baba) (30530430)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	氏福 健太 (Kenta Ujifuku) (20437867)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	平山 航輔 (Kosuke Hirayama) (00896326)	長崎大学・病院(医学系)・医員 (17301)	
研究分担者	伊木 勇輔 (Yuusuke Iki) (00772154)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・研究協力員 (17301)	

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