

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17941

研究課題名(和文) 虚血脳疾患における細胞シート移植の有効性と安全性の確認

研究課題名(英文) Efficacy and Safety of stem cell sheet transplantation in a rat model of cerebral infarction.

研究代表者

荒井 孝至 (Arai, Takashi)

東京女子医科大学・医学部・医療練士研修生

研究者番号：10840077

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)：我々の施設ではすでに脳梗塞作成モデルラットでの幹細胞から作成した細胞シートの移植による有効性を確認した。有効性のさらなる追求をしていくと共に、安全性の確認も行うこととした。安全性に関しては、細胞シートを移植することによって移植細胞が異常電気回路を作成することによりてんかん発作を誘発するか否かの評価を脳波測定を行うことにより施行することとした。てんかん発作はSDラットよりWisterラットで出現しやすいことがすでに知られているため、今回の実験ではWisterラットを用いることとし、以前のSDラットに対する有効性に加えてWisterラットでも有効性が示せるか確認することとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞に対する治療は現代の標準的治療では回復は非常に困難であり後遺症が残存する可能性が非常に高い。脳梗塞後の後遺症は健康的な被害だけでなく、社会復帰を難しくさせ、さらには介助などが必要なことも珍しくなく家族などの周囲の人の負担も甚大である。脳神経細胞の再生能力は体の他の部位と比べると低いことが主な原因である。そこで我々は再生医療に着目した。再生医療により残存する神経機能的後遺症が少しでも軽減できれば、患者自身はもちろんのこと家族の普段だけでなく医療費なども含め社会全体にとっての負担が軽減すると考える。

研究成果の概要(英文)：At our institution, we have already confirmed the efficacy of transplantation of cell sheets generated from mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral infarction. We decided to further pursue the efficacy and confirm the safety of the transplanted cell sheets. For safety, we decided to evaluate whether transplanted cell sheets induce epileptic seizures by creating abnormal electrical circuits in the transplanted cells by measuring electroencephalography. Since it is already known that epileptic seizures are more likely to occur in Wister rats than in SD rats, we decided to use Wister rats in this experiment to confirm whether the cell sheet would be effective in Wister rats in addition to its previous efficacy in SD rats.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 再生医療 ラット 脳波

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞による治療は現代の医療技術でも効果は限定的であり、重い後遺症を残存する可能性が高い。さらにはその後遺症によって患者自身はもちろんのこと、周囲の家族や援助する社会的負担は非常に重い。そこで我々の施設では再生医療に着目し研究を行ってきた。我々の施設では他の施設では珍しい幹細胞をシート状に増殖させることにより患部に直接移植する技術が発達しており、すでに心臓や眼などを中心に研究や臨床応用化が進められてきた。脳梗塞モデルラットを作成し、患部(脳梗塞を起こした脳表)に幹細胞シートを移植することによる有効性の実験が開始された。2018年より研究が開始され、すでに脳梗塞作成モデルラットに対する幹細胞移植が残存する後遺症の程度を軽減することが示された。さらなる動物実験での評価を進めることが臨床応用化に向けて必要と考えられた。特に有効性だけでなく安全性の確認も重要であると位置付け検証していくこととした。心臓に対する幹細胞移植研究の際、異常電気回路が作成されることにより不整脈が誘発された報告がある。そのことから幹細胞を脳に移植することによって脳神経細胞の電気回路に異常を来し、てんかん発作を誘発しないか評価することが安全性の検討で重要であると考えた。今回我々は脳梗塞作成モデルラットに対して脳波測定を行っててんかん発作につき評価することとした。今までSDラットを使用し有効性を報告してきたが、この実験ではてんかん発作が確認されやすいWisterラットを用いることとした。同時に、SDラットだけでなくWisterラットに対しても有効性があるか確認することとした。

### 2. 研究の目的

すでに多くの施設で脳梗塞後の幹細胞移植実験はされており、すでに臨床応用化されている技術もある。しかしながら幹細胞の注射投与では標的部に移植細胞が定着する率が1%前後と非常に少ないことが知られている。さらに静脈塞栓症などの合併症の報告もあり、課題があるのが現状である。我々の施設では幹細胞をシート状に作成し標的部に直接移植することにより移植細胞の10%前後を定着させることができる。これまでに脳梗塞作成モデルSDラットに対して同種他家脂肪由来幹細胞シートを移植することにより高い有効性を示すことができた。臨床応用化に向けて、有効性だけでなく安全性につき検討することとした。安全性に関しては幹細胞移植によっててんかん波を誘発しないか移植前後の脳波を測定することにより評価することとした。脳疾患モデルに対する幹細胞の移植方法は多種多様であり色々な報告が沢山の施設から報告されているが、安全性についての評価がされた研究はほとんどなく、脳波について評価されたものに関しては今までにない。今回の我々の研究は脳疾患に対する幹細胞移植研究する方々全てに対する有用な情報が得ることを主な目的とした。さらに今回の研究ではてんかん波が確認されやすいWisterラットを用いることにより、すでに我々がSDラットで示した幹細胞シート移植による脳梗塞モデルラットへの有効性をWisterラットでも確認ができるか評価することとした。

### 3. 研究の方法

全例でWisterラットを用いて実験することとした。脳梗塞作成ラット計10匹に対して幹細胞シート移植群と、非移植群(生理食塩水塗布)群の2群、5匹ずつ分けた。8週令で頭部に脳波電極の植え込み手術を行い(両側前頭葉上、あらかじめ解剖学に決めた4点にネジ電極を頭蓋骨に植え込んだ)。その後手術後の回復と環境に慣れさせるために2週間様子観察期間を設けた。10週令のタイミングで脳梗塞は塞栓系を用いて左中大脳動脈領域に広範な脳梗塞を作成した(塞栓時間は75分)。脳梗塞後は2週間に渡りローターテストやmNSS test、Y maze testによる神経学的評価、24時間ビデオ付き脳波(ELG-2脳波口ガー、バイオリサーチセンター社)測定を2度に渡り測定しそれぞれ評価した。全ての調査項目の収集が完了したところでsacrificeし、脳を摘出し脳梗塞範囲を中心とした組織学的評価を行った。

### 4. 研究成果

移植群と非移植群の間で有意なてんかん波の出現率に違いはなかった。そのことから幹細胞移植によって明らかにてんかんを誘発することはないことを確認することができた。さらに、今回我々はWisterラットを用いたが以前のSDラットの時と同等の有効性の確認することができた。さらに今までの研究では主に運動機能を中心とした評価を行ってきたが、今回から追加検討したY maze testでも有意差を持って有効性を確認することができた。そのことから運動機能だけでなく空間員指揮能力や記憶能力など様々な神経学的調査項目にて有効性を示すことができ

た。また、細胞シート移植群の脳梗塞完成範囲が有意さを持って小さいことを確認することができた。ネガティブな発見としては、Wister ラットはSD ラットと比べると脳梗塞に対する耐性がなく脳梗塞を作成することによる致死率が高いことがわかった。塞栓糸を用いた中大脳動脈塞栓時間をSD ラットと比べて15分短縮すると、SD ラットと同様の脳梗塞を作成することが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒井孝至
2. 発表標題 脳梗塞、脳虚血作成モデルラットに対する間葉系幹細胞シート移植 の効果と安全性の評価
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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