

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 30 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591833

研究課題名（和文）機能的血管内皮前駆細胞を用いた新規脳梗塞治療法の確立

研究課題名（英文）New degenerative therapy for cerebral infarction by the functional vascular endothelial progenitor cells

研究代表者

鈴木 謙介（SUZUKI KENSUKE）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20400674

研究成果の概要（和文）：

本研究では、筑波大学で新規に開発した虚血に対する治療効果の高い血管内皮細胞（Alde-Low EPC）を、ラット脳梗塞モデルに投与する実験を行った。その結果明らかになったのは、

- ① Alde-Low EPC の投与は急性期脳梗塞において脳梗塞体積を抑制する。
 - ② 投与した Alde-Low EPC は脳梗塞急性期に虚血巣に集積し治療効果を発揮する。
 - ③ Alde-Low EPC の虚血巣への集積には、SDF-1/CXCR4 系が強く関与する。
- の3点である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the therapeutic effect of EPCs with low aldehyde dehydrogenase activity (Alde-Low EPCs) in rats with acute cerebral infarction, and our results provide insight that may help to identify a therapeutic mechanism of EPCs for acute cerebral infarction. The administration of Alde-Low EPCs into rats with acute cerebral infarction results in the accumulation and migration of the Alde-Low EPCs into the infarct area and the subsequent decrease of infarct volume. Moreover, we found that the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) signaling pathway may regulate the accumulation of Alde-Low EPCs. The transplantation of Alde-Low EPCs may represent a potential treatment strategy for acute cerebral infarction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：再生医療・脳梗塞・脳血管障害・脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

近年の細胞工学や再生医療の発達によ

り、細胞治療(cell therapy)が脚光を浴びる

ようになってきた。現在までに、胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞)、骨髄幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞や、血管内皮前駆細胞などの前駆細胞や組織幹細胞が細胞治療の細胞供給源として研究されており、脳梗塞モデルを使用した基礎研究が数多く報告されている。本邦においても、札幌医科大学において、自己骨髄間葉系幹細胞を発症から 36-113 日目の亜急性期脳梗塞患者 12 例に静注した臨床試験が行われ、症状の改善と MRI での脳梗塞体積の縮小が報告されている。これらの結果は脳梗塞再生医療の可能性を示唆しているが、その反面、いずれの基礎研究・臨床研究の報告でも梗塞巣内に残存する移植細胞は部分的で、どのような機序で神経症状を改善させるのかについて明らかになっていない部分が多く、どの細胞をどのように移植するのが最適かは、未だ明確になっていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 本章では、マウスの虚血性皮膚壊死実験において皮膚壊死の抑制効果のあった血管内皮前駆細胞の特定の細胞群 (Alde-Low EPC) が、脳梗塞においても治療効果を発揮することを確認することを目的として、ラット一過性脳虚血モデルに Alde-Low EPC を投与する実験を行い、脳梗塞抑制効果を検証した。

3. 研究の方法

再灌流から 30 分後 (中大脳動脈閉塞から 90 分後) に、4%のイソフルランで再度全身麻酔を導入し、フェイスマスクを使用して 2%のイソフルランで麻酔維持しつつ再開創した。内頸動脈を動脈瘤用のクリップで一時遮断したのち、総頸動脈に塞栓糸を固定した糸を解き、塞栓糸を抜去した。総頸動脈からコントロールの PBS (phosphate-buffered saline; リン酸緩衝生理食塩水) 0.5 ml と各細胞を投与した (n=10)。細胞は、HUVEC、Alde-High EPC、Alde-Low EPC を各 5×10^5 cells を 0.5 ml の PBS に懸濁させ、1 分以上かけて投与した (各 n=10)。総頸動脈近位部と外頸動脈は結紮閉

塞してあるため、投与した細胞はすべて内頸動脈に流入することとなる。

投与スケジュールと投与細胞:

中大脳動脈を 60 分間閉塞後、再灌流した。再灌流後 30 分で細胞を内頸動脈から投与した。他家移植に対する免疫抑制は、シクロスポリン-A (cyclosporine-A; Wako, Osaka, Japan) の腹腔内投与により施行した (10 mg/kg/BW)。シクロスポリン-A の投与は、細胞投与前日、当日、翌日の 3 回、24 時間おきに脳組織採取日まで継続した。

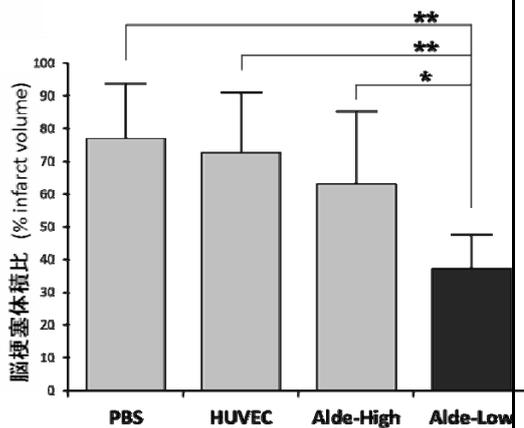
4. 研究成果

(1) 細胞投与後 24 時間における各細胞投与群の代表的な冠状断切片では基底核 (線条体) や中大脳動脈領域の皮質が観察できる。TTC 染色では、脳梗塞領域が未染の白い領域として観察され、中大脳動脈の閉塞により線条体や前頭頭頂葉皮質に広範な脳梗塞が形成されている。

TTC染色 (細胞投与 24 時間後)

TTC 染色では脳梗塞領域が未染の白い領域として観察される。中大脳動脈の閉塞により線条体や前頭頭頂葉皮質に広範な脳梗塞が形成されている。Alde-Low EPC 投与群では、PBS 投与群や他細胞投与群と比較して、梗塞面積が少なく、浮腫性変化も軽度であった。

Alde-Low EPC 投与群では、PBS 投与群や他細胞投与群と比較して、梗塞面積が少なく、浮腫性変化も軽度であった。各群の脳梗塞体積比 (% infarct volume) は、PBS 投与群で $77.0 \pm 16.9\%$ 、HUVEC 投与群; $72.4 \pm 18.2\%$ 、Alde-High EPC 投与群; $63.1 \pm 22.0\%$ 、Alde-Low EPC 投与群; $37.1 \pm 10.4\%$ であった。Alde-Low EPC 投与群では、他群と比較して有意に脳梗塞体積が抑制されていた (PBS、または HUVEC と Alde-Low EPC 投与群間で $P < 0.0005$ 、Alde-High と Alde-Low EPC 投与群間で $P < 0.005$ の有意差あり) [n=10] (図 1)。



(図1) Alde-Low EPCによる脳梗塞抑制効果

各投与群(各 n=10)の脳梗塞体積比 (% infarct volume)を示す。Alde-Low EPC 投与群では脳梗塞体積比が他群と比較して有意に抑制されていた。*P< 0.005、**P< 0.0005。

(2) Alde-Low EPC が急性期の梗塞巣に特異的に集積し、脳梗塞抑制効果を発揮することを確認した。Alde-Low EPC の梗塞巣への集積の機序については、SDF-1/CXCR4 系が強く関与していることが示唆された。集積した Alde-Low EPC の神経保護作用の機序については、液性因子 eNOS に注目して実験を開始したが、今後も解析を継続し、他の液性因子についても検討を行う。集積の機序についても、SDF-1/CXCR4 系以外のパスウェイについても考察する必要があると考えている。

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 7 件)

① Cilostazol suppression of arterial intimal hyperplasia is associated with decreased expression of sialyl Lewis X homing receptors on mononuclear cells and E-selectin in endothelial cells. Takigawa T, Tsurushima H, Suzuki K, Tsuruta W, Nakamura K, Matsumura A. *J Vas Surg.* 2012, 55:506-16 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2011.07.087>

② A subpopulation of endothelial progenitor cells with low aldehyde dehydrogenase activity attenuates acute ischemic brain injury in rats. Nakamura K, Tsurushima H, Marushima A, Nagano M, Yamashita T, Suzuki K, Ohneda O, Matsumura A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 418(1):87-92. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.139>

③ Pilot study of the safety of starting administration of low-dose aspirin and cilostazol in acute ischemic stroke. Fujita K, Komatsu Y, Sato N, Higuchi O, Kujiraoka Y, Kamezaki T, Suzuki K, Matsumura A. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2011;51(12):819-24. 査読有 <http://dx.doi.org/10.2176/nmc.51.819>

④ Newly synthesized radical-containing nanoparticles enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury. Marushima A, Suzuki K, Nagasaki Y, Yoshitomi T, Tou K, Tsurushima H, Hirayama A, Matsumura A. *Neurosurgery.* 2011, 68:1418-25; discussion 1425-6 査読有 <http://journals.lww.com/neurosurgery/pages/articleviewer.aspx?year=2011&issue=05000&article=00030&type=abstract>

⑤ Cilostazol suppression of arterial intimal hyperplasia is associated with decreased expression of sialyl Lewis X homing receptors on mononuclear cells and E-selectin in endothelial cells. Takigawa T, Tsurushima H, Suzuki K, Tsuruta W, Nakamura K, Matsumura A. *J Vas Surg.* Volume 55, Issue 2, February 2012, Pages 506-516 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2011.07.087>,

⑥ 脳虚血再灌流における酸化ストレス障害と脳保護療法 pH 応答性ラジカル含有ナノ粒子(radical-containing nanoparticle: RNP)の可能性, 丸島愛樹, 鈴木謙介, 長崎幸夫, 吉富徹, 藤加珠子, 鶴嶋英夫, 平山暁, 松村明, 脳卒中, 32 巻 6 号 Page552-558(2010.11) 査読有 <http://dx.doi.org/10.3995/jstroke.32.552>

⑦Application of liposomes incorporating doxorubicin with sialyl Lewis X to prevent stenosis after rat carotid artery injury. Tsuruta W, Tsurushima H, Yamamoto T, Suzuki K, Yamazaki N, Matsumura A. Biomaterials. 2009, 30 :118-25
2009 Jan;30(1):118-25 査読有
Doi. 10.1016/j.biomaterials.2008.09.009

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 鈴木謙介
New strategy for cerebrovascular disease ベトナム脳神経外科学会総会
2011年9月16日ダナン（ベトナム）
- ② 中村和弘ら
血管内皮前駆細胞を用いた急性期脳梗塞抑制効果とグリオーマに対する血管新生抑制療法に関する研究
第 10 回日本分子脳神経外科学会 2009年9月20日 岡山

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（なし）

○取得状況（なし）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 謙介 (Suzuki Kensuke)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 20400674

(2) 研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし（ ）

研究者番号：