

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25日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591840

研究課題名（和文）もやもや病に対する VEGF 遺伝子導入と骨髄幹細胞移植のダブル治療

研究課題名（英文）Combined therapy of VEGF plasmid injection and MSC transplantation for Moyamoya disease

研究代表者

徳永 浩司（TOKUNAGA KOJI）

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：40294467

研究成果の概要（和文）：もやもや病モデルラットに対して、血行再建術と骨髄幹細胞移植が行動学的改善をもたらすことを確認した。しかし、血行再建術に加えて VEGF 遺伝子を導入しても、新生血管の有意な増加を認めるのみで、その有無による有意な行動学的改善は認められなかった。そのため血管新生因子導入と骨髄幹細胞移植のダブル治療に関しては、VEGF を超える可能性をもつ血管新生因子を探索した。その過程で apelin-APJ システムが慢性脳虚血によって惹起されることを確認した。加えて、サルを用いた血管内手技による低侵襲な脳虚血モデルの開発を行った。

研究成果の概要（英文）： We confirmed that revascularization and MSC transplantation have therapeutic efficacy in behavioral recovery of Moyamoya model of rats. Because VEGF plasmid injection combined with revascularization did not show better behavioral recovery compared with revascularization only, we looked for more suitable angiogenic factor for combined therapy of angiogenic factor and MSC transplantation, and confirmed apelin-APJ system was activated in chronic cerebral hypoperfusion. Moreover, we developed less invasive monkey ischemia model using an endovascular technique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：実験脳外科学、電気刺激療法

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は内頸動脈終末部から前・中大脳動脈にかけての閉塞性血管障害である。我々はもやもや病患者に対する血行再建術で良好な治療成績を得ているが、時に脳血流の改善が乏しい症例に遭遇する。そのような症例では永続的な麻痺が出現したり高次脳機能が障害されたりして予後が悪く、より強い血流改善が期待できる治療法の開発が望まれている。骨髄幹細胞は現在脳梗塞に対する臨床応用が始まっているが、自家移植が可能な細胞ソースであり、倫理面や免疫拒絶の点からは圧倒的に有利である。これらの点から、特に血管新生が求められるもやもや病に対して血管新生因子と骨髄幹細胞を組み合わせることでより効率の良い治療効果がもたらされるものと考えた。

2. 研究の目的

(1) 基礎研究においては、我々はこれまでに、慢性脳虚血モデルに対して間接バイパス術を加え、さらにその側頭筋に plasmid を vector とした VEGF を筋注することで脳表の VEGF 発現を促進し、側頭筋内および脳表の新生血管が増加することを明らかにしてきた。今回、VEGF だけでなく、angiopoietin など様々な血管新生因子を分泌する骨髄幹細胞移植を間接血行再建術部に行い、血管新生因子と組み合わせることで最も臨床応用に向かうのに妥当性の高い方法を検討することを目標とした。(2) また、将来の臨床応用を考えた時、大動物での検証が必要となるが、ヒトのもやもや病は、徐々に進行する慢性低灌流の経過の中で、血流保全に破綻が生じた時に、脳梗塞を合併するため、動物モデル作成においては、モデル作成に伴う侵襲を極力減らし慢性に進行する病態を再現する必要がある、血管内手技を用いた低侵襲な

サル脳虚血モデルの開発を行うことを目標とした。

3. 研究の方法

(1) もやもや病モデルラットを作成し、対照群として、非血行再建術群、間接血行再建術+生食注入群を作成し、これに血行再建術+VEGF 遺伝子導入群を作成して、3群で行動学的評価と組織学的評価を施行した。

(2) 骨髄幹細胞をもやもや病モデルラットに移植して、非血行再建術+骨髄幹細胞移植群と血行再建術+骨髄幹細胞移植群を作成して、治療効果を検討した。

(3) VEGF を超える可能性がある血管新生因子がないか探索を続け、生理活性ペプチドである apelin に着目した。ラットを両側総頸動脈閉塞群と非閉塞群に分け、1週間後に両群の脳を摘出し、apelin の受容体である APJ 蛋白が慢性脳虚血ラットの脳表血管に発現しているかどうか APJ 抗体を用いた免疫染色により検討した。

(4) 透視下にサル特有の Bovine arch にアプローチ、カテーテルを留置した。そしてそこから PercuSurge GuardWire system (マイクロサイズのバルーン) を内頸動脈まで進め、バルーンを拡張し、2時間片側の内頸動脈を閉塞し、その後バルーンを収縮させ、再灌流を行った。

4. 研究成果

(1) 行動学的評価として Rotarod テストを行い、血行再建術群で有意な行動学的改善を確認した。しかし、VEGF 遺伝子導入の有無による有意な行動学的改善は認められなかった。組織学的には新生血管が遺伝子導入後有意に増加しており、VEGF の強い血管新生作用を確認できた。

(2) 非血行再建術+骨髄幹細胞移植群と血行再建術+骨髄幹細胞移植群を作成して、行

動学的評価を行うと、後者において有意に行動学的改善が得られた。ただ、移植後の慢性期においては、脳全体の委縮程度や海馬神経細胞の神経細胞数には有意差が得られなかった。移植群ではさらに大脳皮質における脳由来神経栄養因子・グリア細胞由来神経栄養因子、さらに血管内皮成長因子の発現が増加していた。

(3) 閉塞群脳内の血管内皮の一部で APJ 蛋白が発現している所見が得られた。一方、非閉塞群においては APJ 蛋白の発現は認められなかった。これにより、apelin-APJ システムが慢性脳虚血によって惹起されると考えた。

(4) 再灌流後、サルを麻酔から覚醒させたところ、片麻痺症状を呈しており、脳組織においては、前大脳動脈領域に脳梗塞巣を確認できた。

以上の結果を踏まえて今後は、血管新生因子として **Aperin** を導入し、**MSC** 移植とのダブル治療を行う実験系をまずはラット慢性低灌流モデルにて検討したい。ラットにて良好な結果が得られた場合は、サルに対しても検討したいと考えている。

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 19 件)

1. Effectiveness of intraoperative near-infrared indocyanine green videoangiography in a case with recurrent spinal perimedullary arteriovenous fistula Miyoshi Y 他 5 名中 3 番目 *Clinical Neurology and Neuroscience* 113: 239-242, 2011 (査読有)
2. Computational fluid dynamics of carotid arteries after carotid endarterectomy or carotid artery stenting based on postoperative patient-specific computed tomography angiography and ultrasound flow data Hayase H 他 8 名中 1 番目 *Neurosurgery* 68(4): 1096-1101, 2011 (査読有)
3. Posterior reversible encephalopathy syndrome Yasuhara T 他 6 名中 1 番目 *J Clin Neurosci* 18: 406-9, 2011 (査読有)

4. Endovascular coil embolization of a ruptured distal anterior choroidal artery aneurysm associated with ipsilateral middle cerebral artery occlusion: Case report Nishida A 他 4 名中 1 番目 *Neurologia medico-chirurgica* 51(10): 716-719, 2011 (査読有)
5. Determinants of poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage when both clipping and coiling are available: Prospective registry of subarachnoid aneurysms treatment (PRESAT) in Japan Sugiu K, Tokunaga K, Nishida A *World Neurosurgery* 76(5): 437-445, 2011 (査読無)
6. 特集・血管腫 頭部に発生する海綿状血管腫および静脈性血管腫の臨床 徳永浩司、伊達 勲 *BRAIN and NERVE* 63: 17-25, 2011 (査読有)
7. 脊髄くも膜下出血後 Adamkiewicz 動脈に生じた血管攣縮 三好康之他 6 名中 4 番目 *Brain and Nerve* 63: 182-183, 2011 (査読有)
8. 経静脈的液体塞栓術にて治療した海綿静脈洞部硬膜動静脈瘻の 2 例 平松匡文、杉生憲志、徳永浩司他 5 名 *脳神経外科* 39(12): 1189-1196, 2011 (査読有)
9. ケアミックス型病院におけるくも膜下出血の診療経験 —地域医療におけるケアミックス型病院を再考する— 中川実 他 5 名中 4 番目 *脳卒中* 33: 313-318, 2011 (査読有)
10. Optimal dose of plasmid vascular endothelial growth factor for enhancement of angiogenesis in the rat brain ischemia model Katsumata A 他 9 名中 2 番目 *Neurologia medico-chirurgica* 50(6): 449-455, 2010 (査読有)
11. Percutaneous balloon angioplasty for acute occlusion of intracranial arteries Tokunaga K, Sugiu K, Date I 他 6 名 *Neurosurgery* 67[ONS Suppl 1]: ons189-197, 2010 (査読有)
12. 脳梗塞に対する電気刺激療法 安原隆雄他 9 名中 6 番目 *脳卒中の外科* 32(6): 563-565, 2010 (査読有)
13. Continuous intraventricular infusion of erythropoietin exerts neuroprotective/rescue effects upon Parkinson's disease model of rats with enhanced neurogenesis Tajiri N 他 8 名中 6 番目 *Brain Research* 1254: 120-127, 2009 (査読有)
14. Usefulness of 3-dimensional CT angiograms obtained by 64-section multidetector row CT scanner for dural arteriovenous fistula Nakagawa M 他 6 名中 2 番目 *Journal of Neuroimaging* 19(2): 179-182, 2009 (査読有)
15. Dural arteriovenous fistula: CT appearance case report and review Parkinsonism Related to Brain Tumors: A Case Report and Review of the literature Nakagawa M 他 3 名中 2 番目 *Neurosurgery Quarterly* 19: 46-49, 2009 (査読有)
16. Protein transduction method for

- cerebrovascular disorders Ogawa T 他 9名中5番目 Acta Med Okayama 63(1): 1-7, 2009 (査読有)
17. Endovascular treatment for bow hunter's syndrome: case report Sugiu K 他4名中2番目 Minim Invas Neurosurg 52: 193-195, 2009 (査読有)
 18. Rebleeding from a vertebral artery dissecting aneurysm after endovascular internal trapping: adverse effect of intrathecal urokinase injection or incomplete occlusion?: Case report Sugiu K 他4名中1番目 Neurologia medico-chirurgica 49(12): 597-600, 2009 (査読有)
 19. Significant differences in the postoperative morphological and hemodynamic conditions of carotid arteries of patients undergoing stenting or endarterectomy with patch angioplasty Tokunaga K, Sugiu K, Hayase H, Nishida A, Date I Neurosurgery 65: 884-888, 2009 (査読有)
- [学会発表] (計 34 件)
1. 2011 年韓国脳神経血管内外科学会学術集会: Seoul, Korea, 2011. 12. 03 Carotid artery stenting: our strategy and results Sugiu K
 2. Korean-Japanese Friendship Conference on Neuroendovascular Treatment : Seoul, Korea, 2011. 12. 02 Endovascular treatment of vertebral artery dissecting aneurysm Sugiu K
 3. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会 : 千葉, 2011. 11. 25 CAS の治療成績向上のために—MRI によるプラーク診断と SPECT による過灌流リスク判定—杉生憲志
 4. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会 : 千葉, 2011. 11. 25 無バルーン時代の high flow CCF の治療—皆さん、どうしています?—杉生憲志
 5. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会 : 千葉, 2011. 11. 25 Onyx を用いた脳動静脈奇形の塞栓術—臨床的および組織学的検討— 徳永浩司
 6. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会 : 千葉, 2011. 11. 24 Adjunctive technique を併用した未破裂脳動脈瘤の血管内治療 徳永浩司
 7. (社) 日本脳神経外科学会第 70 回学術総会 : 横浜, 2011. 10. 14 小児及び成人もやもや病における後大脳動脈病変の比較検討 菱川朋人
 8. (社) 日本脳神経外科学会第 70 回学術総会 : 横浜, 2011. 10. 13 脳底動脈瘤に対する血管内治療 杉生憲志
 9. (社) 日本脳神経外科学会第 70 回学術総会 : 横浜, 2011. 10. 13 頸動脈狭窄症に対する CAS と CEA の選択と治療成績 徳永浩司
 10. 第 25 回中国地方脳神経外科手術研究会 : 松江, 2011. 08. 20 Onyx による術前塞栓術を併用した脳動脈奇形の外科的摘出術 徳永浩司
 11. 第 40 回日本脳卒中の外科学会 (STROKE 2011) : 京都, 2011. 07. 31 血栓化動脈瘤に対する血管内治療 杉生憲志
 12. 第 40 回日本脳卒中の外科学会 (STROKE 2011) : 京都, 2011. 07. 30 Onyx による術前塞栓術を併用した脳動脈奇形の外科的摘出術 徳永浩司
 13. 第 10 回日本頸部脳血管治療学会 : 大阪, 2011. 06. 10 頸動脈狭窄症に対する CEA と CAS の年齢群別治療成績 徳永浩司
 14. Asian Neurosurgical Conference on Moyamoya Disease : Kyoto, Japan, 2011. 06. 02 Fatal outcomes of pediatric patients with moyamoya disease associated with pulmonary arterial hypertension Tokunaga K
 15. Asian Neurosurgical Conference on Moyamoya Disease : Kyoto, Japan, 2011. 06. 02 Clinical and radiographical features in patients with moyamoya disease developing both cerebral ischemia and hemorrhage Hishikawa T
 16. 第 31 回日本脳神経外科コンgres 総会 : 横浜, 2011. 05. 06 CEA の手術手技 徳永浩司
 17. 第 26 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会 : 小倉, 2010. 11. 18 頸動脈狭窄症に対する治療法およびデバイスの選択と治療成績 徳永浩司
 18. (社) 日本脳神経外科学会第 69 回学術総会 : 福岡, 2010. 10. 29 脳底動脈先端部動脈瘤に対するコイル塞栓術 杉生憲志
 19. (社) 日本脳神経外科学会第 69 回学術総会 : 福岡, 2010. 10. 28 頸動脈狭窄症に対する内膜剥離術とステント留置術の適応、手術手技および治療成績の検討 徳永浩司
 20. 第 12 回中国四国脳卒中研究会 : 岡山, 2010. 09. 11 もやもや病における出血・虚血合併発症例の臨床像の検討 菱川朋人
 21. 第 12 回中国四国脳卒中研究会・第 19 回中国四国脳神経血管内手術研究会 : 岡山, 2010. 09. 11 急性期頭蓋内動脈閉塞に対するバルーンカテーテルを用いた再開通療法—岡山大学脳神経外科および関連病院における多施設共同研究の結果から— 徳永浩司
 22. 第 10 回日本頸部脳血管治療学会 : 大阪,

- 2011.06.10 頸動脈狭窄症に対する CEA と CAS の年齢群別治療成績 徳永浩司
23. 第 30 回日本脳神経外科コンgres 総会：横浜，2010.05.16 CEA—基本的手技と我々の工夫— 徳永浩司
24. 第 9 回日本頸部脳血管治療学会学術総会：横浜，2010.04.24 頸動脈狭窄症に対する内膜剥離術とステント留置術の選択と治療成績 徳永浩司
25. 第 9 回日本頸部脳血管治療学会学術総会：横浜，2010.04.23 CAS を安全に行うために—CAS 高危険群への対策— 杉生憲志
26. 第 39 回日本脳卒中の外科学会：STROKE 2010：盛岡，2010.04.16 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
27. 第 39 回日本脳卒中の外科学会：STROKE 2010：盛岡，2010.04.16 もやもや病における出血・虚血合併症例の臨床像の検討 菱川朋人
28. 第 26 回スバズム・シンポジウム：STROKE 2010：盛岡，2010.04.15 クモ膜下出血後脳血管攣縮に対する集学的治療困難症例の検討 小野成紀
29. 第 9 回吉備脳神経外科手術フォーラム：岡山，2010.04.09 当科におけるもやもや病に対する外科手術 菱川朋人
30. 第 14 回関西脳神経外科手術研究会：大阪，2009.12.19 もやもや病に対する我々の複合的血行再建術の手技と工夫 徳永浩司
31. 第 25 回日本脳神経血管内治療学会総会：富山，2009.11.19 Cerecyte coil あるいは Matrix2 coil を用いた脳動脈瘤塞栓術の手術手技と治療成績 徳永浩司
32. (社) 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会：東京，2009.10.16 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
33. (社) 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会：東京，2009.10.16 破裂解離性椎骨動脈瘤に対する急性期治療 杉生憲志
34. (社) 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会：東京，2009.10.15 バイパス術併用による海綿静脈洞部大型・巨大内頸動脈瘤の外科的治療 徳永浩司

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 浩司 (TOKUNAGA KOJI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：40294467

(2) 研究分担者

菱川 朋人 (HISHIKAWA TOMOHIITO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：60509610

亀田 雅博 (KAMEDA MASAHIRO)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：50586427
(H22～H23)

安原 隆雄 (YASUHARA TAKAO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：50457214
(H21～H22)

(3) 連携研究者

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

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

黒住 和彦 (KUROZUMI KAZUHIKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20509608

上利 崇 (AGARI TAKASHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：60423290