

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390342

研究課題名(和文) 脳梗塞に対する自己骨髄間質細胞移植治療の研究 - 標準的な移植治療プロトコルの確立

研究課題名(英文) Autologous Bone Marrow Stromal Cell Transplantation for Stroke: Steps to Standardize the Clinical Protocols

研究代表者

七戸 秀夫 (Shichinohe, Hideo)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80374479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円、(間接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ボランティア由来のBMSC(bone marrow stromal cells)を使用した。血小板濃厚液からPL(platelet lysate)を作成し、基本培地に加えてBMSCを培養した。PLで培養したBMSCは培養速度、栄養因子産生においてFCS(仔ウシ血清)で培養したものとほぼ同等であった。またPLで培養したBMSCは、ラット脳梗塞モデルへの移植後の運動機能回復においてもFCSで培養したものと同等以上であった。また小動物用MRIや18F-FDG PETで、ラット脳梗塞モデルへの移植後の細胞追跡や脳機能回復の画像化を試みた。これらの結果は、次世代の臨床試験プロトコルに取り入れられる。

研究成果の概要(英文)：Human bone marrow stromal cells (BMSCs) were cultured with human platelet lysate (hPL) instead of fetal calf serum (FCS). Their production of growth factors was quantified with ELISA. The BMSCs were labeled with superparamagnetic iron oxide (SP10). Rat permanent focal ischemia models were made and BMSCs were injected into the ipsilateral striatum 7 days post-insult. There was no difference in cell proliferation between the BMSCs cultured with hPL and FCS. The BMSC-hPL produced not less amount of BDNF, HGF, NGF, PDGF-BB and TGF-beta1. Rotarod test showed that the motor function deteriorated after ischemia and BMSC transplantation enhanced the recovery. MRI demonstrated that the SP10-BMSCs migrated towards the lesion. 18F-FDG PET showed that the recovery of glucose utilization was promoted. The hPL may be valuable and safe in expanding BMSCs. The application of bio-imaging techniques are also valuable for BMSC transplantation against stroke.

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 脳神経外科 骨髄間質細胞 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄間質細胞(BMSC)を用いた再生医療

最近の研究成果によって、さまざまな幹細胞を利用した細胞移植療法は脳梗塞に対する新たな治療法として現実のものとなりつつある。なかでも、骨髄間質細胞(bone marrow stromal cells; BMSC)は、1998年に神経系の細胞へも分化しうるということが報告されてから、数多くの注目を集めるようになった細胞と言える(Azizi SA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998)。BMSCは患者自身の骨髄から採取・培養が可能で、他の細胞ソースに比べると生命倫理や腫瘍形成などの問題がほとんどない点も、臨床応用では重要である。数多くの基礎研究の成果をもとに、脳梗塞、脊髄損傷など中枢神経疾患に対するBMSC移植が国内外で小規模な臨床試験として開始されつつあり、いずれの報告でも少なくとも安全性に関しては大きな問題がないことが判明している(Bang OY, et al. *Ann Neurol*. 2005, Saito F, et al. *J Trauma*. 2008)。

(2) 過去のBMSC移植治療の研究成果

申請者らは2001年から、マウス、ラットそしてヒトBMSCを利用した中枢神経再生研究を包括的に実施してきた。そのなかで、BMSCによる治療効果とその機序については、以下の報告を行ってきた。

BMSCの有する表面マーカーを明らかにしてマウス脳梗塞モデルにおける移植実験系を確立した。(Neuropathol. 2003)

BMSCを中枢神経に移植する際には、同種移植よりも自己移植の方が神経系細胞への分化が良好である。(Brain Res Protoc. 2004)

BMSCは遺伝子プロファイリングを変化させることで神経細胞への分化能を発揮するほか、細胞融合や栄養因子の産生により神経細胞を保護する。(Brain Res. 2006, J Neurosci Res. 2008)

BMSCは中枢神経内に移植された後、活発な増殖を繰り返しながら生着する。(Brain

Res. 2005)

BMSCは移植された中枢神経内で病変部に遊走する。その際、SDF-1とその受容体であるCXCR4が必須の役割を果たす。(Brain Res. 2007)

BMSCは損傷された中枢神経に生じるグリア瘢痕を分解して、神経突起の伸長を促進させる。(Neurorehab Neural Repair. 2008)

BMSCは脳梗塞、脊髄損傷、脳挫傷モデルに移植されると、運動機能や高次脳機能の改善を著しく促進する。(J Neurotrauma. 2005, Brain Res. 2007, Neuropathol. 2009)

また、BMSCによる中枢神経再生の臨床応用に必須な点として、BMSCの病変部へのデリバリーシステムの確立、移植後のBMSCの挙動をモニタリングする技術、治療効果の分子細胞レベルでの評価が挙げられる。この点について申請者らは以下の報告を行ってきた。

フィブリンポリマーやメビオールジェル®などのスキャフォールドとともに移植されたBMSCは、脳凍結損傷や脊髄損傷モデルに効率的に生着して神経細胞に分化する。(Neuropathol. 2009, J Neurosurg. 2010, Neurosurg. 2010)

生体光イメージング法により、移植されたBMSCの遊走・増殖の経過を経時的に画像化することが可能である。(Brain Res Protoc. 2004, J Neurotrauma. 2005)

核医学的手法により、移植されたBMSCが病変周囲の神経細胞受容体の機能を改善している様子が画像化できる。(J Nucl Med. 2006, J Neurotrauma. 2006)

(3) BMSC移植治療の残された課題

しかし中枢神経再生を目的とした BMSC 移植を新規の治療法とするには、依然として解決すべき問題が残されている。これらを未解決のまま大規模臨床試験を行うことは、医学や生命倫理学の視点からも慎重であるべきである。最近、米国においても同様の指摘がなされるようになっており、脳卒中に対する

幹細胞治療研究への勧告を公表している (Borlongan CV, et al. Regen Med. 2008)。

現時点で、脳梗塞への自己BMSC移植治療に残る未解決の問題を以下に列挙する。

自己BMSC培養の安全性(動物由来材料、特にウシ胎仔血清の排除)、効率性(現状で細胞培養に数週間を要する)を高める必要がある。

患者本人が概して高齢者であり、自己BMSCの活性が低下している可能性がある。

脳梗塞発症から移植までのtherapeutic time windowや、移植に必要な細胞数が不明である。

細胞のデリバリーシステムに関し、現時点で最適な方法は見つかっていない。

移植後のドナー細胞の生着や増殖などのモニター(cell tracking)ができない。

移植後の治療効果に関し、画像検査などによる客観的な評価が困難である。

2. 研究の目的

本研究では上記の問題点をふまえ、以下のような研究を包括的に行うことにより、BMSC移植治療の標準的なプロトコルを確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 他の動物由来材料を排除した安全で、かつ効率的な BMSC の培養。

臨床応用のために animal-free な培養として、ヒト血小板溶解物(platelet lysate: PL)を使用しヒト BMSC 培養を行った。またこれらの細胞をラット脳梗塞モデルに移植し、組織学的検討と行動学的評価を行った。

(2) BMSC の活性化による、効率的な細胞培養や移植後の治療効果の促進。

高齢ラット(100週齢)から採取した BMSC を顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)添加により活性化できるか検討した。またそれらの細胞をラット脳凍結損傷モデルに対し移植した。

(3) BMSC 移植時期や、移植細胞数などのパラ

メータに関する検討。

ラット脳梗塞モデルに BMSC の定位的脳内移植を行い、移植時期と移植細胞数のパラメータを変えることで、比較検討した。

(4) 異なる細胞移植ルートと比較検討と、組織工学的な新しいテクノロジーによる移植法の開発。

cell sheet 作成技術(UpCell®; CellSeed Inc.)を用いた BMSC 移植研究を検討した。

(5) バイオイメージングをもちいた細胞移植後の cell tracking。

MRI は、現時点で臨床応用に最も近い cell tracking 法と考えられている。ヒト BMSC を超常磁性酸化鉄製剤(SPIO)でラベリングし、ラット脳梗塞モデルに移植して、小動物用 7T-MRI で撮像した。またファントムに SPIO-BMSC を入れ、臨床用 3T-MRI で撮像した。

(6) バイオイメージングをもちいた細胞移植後の脳機能モニタリング。

小動物用 ^{18}F -FDG PET や ^{123}I -iomazenil SPECT を用いて、BMSC 移植が糖代謝や神経細胞レセプター機能に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 他の動物由来材料を排除した安全で、かつ効率的な BMSC の培養。

PL で培養したヒト BMSC は培養速度、栄養因子産生、神経系細胞分化において FCS 培養と同等以上の結果を得た。PL 培養のヒト BMSC をラット脳梗塞モデルに移植すると、細胞生着、機能回復のいずれにおいても FCS 培養と同等以上であることを示した。これらの結果は国際学術誌に報告した。(Shichinohe H et al. Transl. Stroke Res. 2011, Sugiyama T et al. Neurosurg. 2011)

(2) BMSC の活性化による、効率的な細胞培養や移植後の治療効果の促進。

G-CSF を添加すると、高齢ラット BMSC は培養速度、神経栄養因子の分泌、移植後の生着、機能回復のいずれにおいても向上すること

を示した。これらの結果は国際学術誌に報告した。(Chiba Y et al. *Neuropathology*. 2011)

(3) BMSC 移植時期や、移植細胞数などのパラメータに関する検討。

移植時期が虚血後 1 週のラットは、移植細胞数が少数 (1×10^5) でも神経機能回復がみられたが、4 週後の移植では多数の細胞 (1×10^6) を移植された群のみが有意な回復を得た。また、細胞生着は移植時期が虚血後 1 週、4 週ともに、 1×10^6 の BMSC 移植群で良好であった。これらの結果は国際学術誌に報告した。

(Kawabori M, et al. *Neuropathol*. 2012)

(4) 異なる細胞移植ルートと比較検討と、組織工学的な新しいテクノロジーによる移植法の開発。

BMSC を用いて cell sheet を作成し、ラット脳梗塞モデルへ移植した。この結果は現在国際学術誌に投稿中である。

(5) バイオイメージングをもちいた細胞移植後の cell tracking。

小動物用 7T-MRI では移植された BMSC の遊走を、8 週間経時的に観察した。組織学的検討では異常を認めなかった。また 3T-MRI では、SPIO-BMSC が 1000 個から十分描出され、SWI や T2*WI が有用であった。これらの結果は国際学術誌に報告した。(Ito M et al. *Transl. Stroke Res*. 2011, Shichinohe H et al. *Transl. Stroke Res*. 2012)

(6) バイオイメージングをもちいた細胞移植後の脳機能モニタリング。

^{18}F -FDG PET では虚血 6 日後の脳梗塞周辺部で脳局所糖代謝の低下が見られたが、BMSC 移植群では移植 4 週後に vehicle 群に比べ有意に改善が見られた。また、 ^{123}I -IMZ SPECT では虚血 6 日後の虚血側大脳皮質で IMZ 結合能の低下が見られたが、これも BMSC 移植群では移植 4 週後には vehicle 群に比べ有意に改善が見られた。これらの結果は国際学術誌に報告した。(Miyamoto M et al. *J Nucl Med*. 2013, Saito H et al. *Stroke* 2013)。

現在我々は、『新たな培養・移植・イメージング技術を駆使した自己骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生治療 - 治療メカニズムの解明を目的とした臨床試験』(RAINBOW 研究)を準備中である。RAINBOW 研究では、本研究の成果である他家ヒト PL を用いた細胞培養法、MRI による移植細胞の挙動把握を目的とした SPIO 製剤による BMSC ラベリング法など、過去の臨床試験と異なる新規プロトコルを採用する予定である。

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 71 件)

Shichinohe H, Ishihara T, Takahashi K, Tanaka Y, Miyamoto M, Yamauchi T, Saito H, Takemoto H, Houkin K, Kuroda S. Bone Marrow Stromal Cells Rescue Ischemic Brain by Trophic Effects and Phenotypic Change Toward Neural Cells. *Neurorehabil Neural Repair*. 2014 Mar 14. [Epub ahead of print] (査読有)

Shichinohe H, Yamauchi T, Saito H, Houkin K, Kuroda S. Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of motor function after lacunar stroke in rats. *Acta Neurobiol Exp*. 73:354-363, 2013 (査読有)

Saito H, Magota K, Zhao S, Kubo N, Kuge Y, Shichinohe H, Houkin K, Tamaki N, Kuroda S. [123I]-Iomazenil Single Photon Emission Computed Tomography Visualizes Recovery of Neuronal Integrity by Bone Marrow Stromal Cell Therapy in Rat Infarct Brain. *Stroke*.44:2869-2874,2013 (査読有)

Miyamoto M, Kuroda S, Zhao S, Magota K, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N. Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose

metabolism after cerebral infarction in rats: a serial 18F-FDG PET study. J Nucl Med. 54:145-150, 2013(査読有)

Kawabori M, Kuroda S, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N. Timing and cell dose determine therapeutic effects of bone marrow stromal cell transplantation in rat model of cerebral infarct. Neuropathology. 33:140-148,2013 (査読有)

Shichinohe H, Kuroda S, Kudo K, Ito M, Kawabori M, Miyamoto M, Nakanishi M, Terae S, Houkin K. Visualization of the superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled bone marrow stromal cells using a 3.0-T MRI—a pilot study for clinical testing of neurotransplantation. Transl. Stroke Res. 3:99-106,2012 (査読有)

Kawabori M, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N. Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: an optical imaging study. Neuropathology.32:217-26,2012 (査読有)

Chiba Y, Kuroda S, Osanai T, Shichinohe H, Houkin K, Iwasaki Y. Impact of ageing on biological features of bone marrow stromal cells (BMSC) in cell transplantation therapy for CNS disorders: functional enhancement by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). Neuropathol. 32:139-148,2012 (査読有)

Osanai T, Kuroda S, Sugiyama T, Kawabori M, Ito M, Shichinohe H, Kuge Y, Houkin K, Tamaki N, Iwasaki Y. Therapeutic effects of intra-arterial delivery of bone marrow stromal cells in traumatic brain injury of rats--in vivo cell tracking study by near-infrared fluorescence

imaging. Neurosurg. 70:435-444, 2012 (査読有)

Shichinohe H, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Kawabori M, Nishio M, Takeda Y, Koike T, Houkin K. Biological features of human bone marrow stromal cells (hBMSC) cultured with animal protein-free medium—safety and efficacy of clinical use for neurotransplantation. Transl. Stroke Res. 2:307-315,2011 (査読有)

Ito M, Kuroda S, Sugiyama T, Shichinohe H, Takeda Y, Nishio M, Koike T, Houkin K. Validity of bone marrow stromal cell expansion by animal serum-free medium for cell transplantation therapy of cerebral infarct in rats—A serial MRI study. Transl. Stroke Res. 2:294-306,2011 (査読有)

Sugiyama T, Kuroda S, Takeda Y, Nishio M, Ito M, Shichinohe H, Koike T. Therapeutic impact of human bone marrow stromal cells expanded by animal serum-free medium for cerebral infarct in rats. Neurosurg. 68:1733-1742,2011 (査読有)

Sugiyama T, Kuroda S, Osanai T, Shichinohe H, Kuge Y, Ito M, Kawabori M, Iwasaki Y. Near-infrared fluorescence labeling allows noninvasive tracking of bone marrow stromal cells transplanted into rat infarct brain. Neurosurg. 68:1036-1047,2011 (査読有)

[学会発表](計61件)

(1) 国際会議発表(代表者発表分)

Shichinohe H et al. Neuroprotective Effects of Cilostazol through the Multi-mechanisms in Mice Permanent Focal Ischemia. International Stroke Conference 2014, 2014/2/12-14, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

Shichinohe H et al. Bone marrow stromal cell transplantation ameliorates motor deficit in rat lacunar infarct model. Neuroscience 2013 2013/11/9-13, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

Shichinohe H et al. Bone marrow stromal cells serve "nursing effect" to damaged neurons by secreting neurotrophic factors in vitro and in vivo. International Stroke Conference 2013, 2013/2/6-8, Hawaii Convention Center (Honolulu, USA)

Shichinohe H et al. Steps to the Clinical Testing of Cell Transplantation for Stroke - Bone Marrow Stromal Cell Culture with Animal Protein-free Medium and Bio-imaging Using Clinical 3.0-Tesla MRI. International Stroke Conference 2012, 2012/2/1-3, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)

(2) 国内招待講演(代表者発表分)

七戸秀夫、寶金清博：『自家骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生医療をめざして』、第31回日本神経治療学会総会シンポジウム3「進化する脳卒中治療1 -新たなステージへ-」、2013/11/22、東京ドームホテル(東京)

七戸秀夫、寶金清博：『Platelet lysateで培養した骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生医療』、第37回日本血液事業学会総会シンポジウム3「再生医療の進歩」、2013/10/21、札幌コンベンションセンター(札幌市)

七戸秀夫、寶金清博、黒田 敏：『バイオイメージングを駆使した脳梗塞に対する再生医療』、第41回日本磁気共鳴医学会大会シンポジウム3「分子イメージングにおけるBreakthrough」、2013/9/20、アスティとくしま(徳島市)

七戸秀夫、黒田 敏、寶金清博：『自家骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生医療を

めざして』、第16回日本脳低温療法学会リフレッシュシンポジウム4(イブニングセミナー)「再生医療」、2013/7/20、キャッスルプラザ(名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.](http://www.neurosurgery-hokudai.jp/BMSC.html)

[neurosurgery-hokudai.jp/BMSC.html](http://www.neurosurgery-hokudai.jp/BMSC.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

七戸 秀夫 (SHICHINOHE HIDEO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：80374479

(2) 研究分担者

寶金 清博 (HOUKIN KIYOHIRO)

北海道大学・北海道大学病院・教授

研究者番号：90229146

黒田 敏 (KURODA SATOSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：10301904

(3) 連携研究者

なし