

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592090

研究課題名(和文) 分子標的治療薬を用いた脳梗塞に対する遺伝子細胞療法

研究課題名(英文) Molecular-targeted drug therapy for stroke using Cilengitide

研究代表者

小野 成紀(Ono, Shigeki)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40335625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：MSCについての培養方法、ヒト、ラット、マウスのMSCの使用方法を確認した。CilengitideはNCIとメルクとに連絡し、無償で供給されることとなった。中大脳動脈閉塞モデル(MCAOモデル)を定常的に作成することができた。行動評価については、Limb placement testとrotarod testを用いて、MCAOモデルに対するMSC単独治療群の基準値がえられた。ELISAを用いて、MSC細胞におけるBDNF、GDNF、NT3、CNTFの発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：The MCS culturing and the usage of MSC for human, rats, and mice were confirmed. Cilengitide was supplied freely by NCI and Merc. In this study, we were able to create the MCAO animal model. In behavioral assessment, we obtained the standard value of Limb placement test and rotarod test in the MSC single treatment group using this MCAO model. The expression of BDNF, GDNF, NT3 and CNTF was also confirmed in MSC cells by using ELISA.

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：脳血管障害学 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄には造血幹細胞をはじめとして間葉系幹細胞(MSC)、成体多能性幹細胞など様々な幹細胞が存在するといわれている。これらは、成体幹細胞であり、難病や生活習慣病の幹細胞治療において自己細胞を用いることが可能であるためもっとも利用価値の高い幹細胞の一つである。我々は、以前、中大脳閉塞モデルにて脳内直接投与を行い、Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)、glial cell-line derived factor(GDNF)などの神経保護効果を示す遺伝子をアデノウイルスで導入し、神経障害を防ぐことが可能であると証明してきた。その後、静脈投与による、脳梗塞患者を対象とする臨床研究が行われ、安全性および治療効果が検討されている。

近年、脳虚血の治療において、細胞間接着因子の制御による治療が注目を集めている。虚血性脳損傷において、インテグリン  $\alpha_3\beta_1$  の発現が上昇しているといわれている。インテグリン  $\alpha_3\beta_1$  のインヒビターを用いることで、抗浮腫作用があり、細胞障害作用を低下させ、神経学的な悪化を抑制した、との報告がある。応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯われわれは、現在、悪性グリオーマに対する治療としてオンコリティックウイルス(腫瘍溶解性ウイルス, OV)を用いた腫瘍溶解療法についての研究を行っており、悪性グリオーマに対する OV を用いた宿主の間葉系システムにおける反応、腫瘍血管の変化について検討している。これらの研究で、OV 感染後に有意に血管透過性が亢進していることを突き止め、分子標的薬 cRGD ペプチド(Cilengitide)を用いることにより、血管透過性の亢進を防ぐことができた。

## 2. 研究の目的

分子標的薬(Cilengitide)と間葉系幹細胞(MSC)による脳梗塞巣微小環境をターゲットとした脳梗塞に対する遺伝子細胞療法について検討していく。MSC と Cilengitide の相互作用について、in vitro、について検討し、in vitro での毒性試験を行う。脳梗塞モデルを作成し、Cilengitide と MSC を投与するに当たり、投与方法、投与するタイミングについて調べる。アデノウイルスベクターによるサイトカイン遺伝子導入 MSC について検討し、行動試験、MRI、組織学的評価を行う。MSC と分子標的薬(Cilengitide)との併用療法は、脳梗塞治療の新たな展開に必要なであると考える。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度の計画：

MSC や Cilengitide に関して本研究のセッティングを行う。

In vitro において、Cilengitide が MSC に対し、どのような影響を与えるか、について検討する。正常ラットに対し、MSC と Cilengitide を併用投与することで、正常成体に影響するか否かについて検討する。

平成 24 年度の計画：

中大脳動脈閉塞モデル(MCAO モデル)を作成し脳内に MSC と Cilengitide を注入しどのような効果が出るか行動評価、MRI 評価を行う。

治療モデルにおいて組織学的評価、サイトカインについての定量、q-PCR などを検討し、メカニズムについて考察する。

平成 25 年度の計画：

中大脳動脈閉塞モデル(MCAO モデル)を作成し経静脈投与を行い(MSC と Cilengitide) どのような効果が出るか行動評価、MRI 評価、組織学的評価を行う。さらには、アデノウイルスにて、サイトカイン遺伝子を導入し、さらなる効果を検討する。

統計学的データ解析を行い、学会発表・論文投稿する。

## 4. 研究成果

上記を研究目的として、MSC についての培養方法、ヒト、ラット、マウスの MSC の使用方法を確認した。Cilengitide は NCI とメルクとに連絡し、無償で供給されることとなった。中大脳動脈閉塞モデル(MCAO モデル)を定常的に作成することができた。行動評価については、Limb placement test と rotarod test を用いて、MCAO モデルに対する MSC 単独治療群の基準値がえられた。ELISA を用いて、MSC 細胞における BDNF、GDNF、NT3、CNTF の発現を確認した。

MCAO モデルを作成し脳内に MSC と Cilengitide を注入しての行動評価、MRI 評価については現在、検討中である。治療モデルにおいて組織学的評価、サイトカインについての定量、q-PCR などについての手技は確立されており、今後行う予定である。アデノウイルスにてサイトカイン遺伝子を MSC に導入することについてはサイトカインの分泌の量を ELISA で確認することができており、MSC と Cilengitide の併用実験については今後検討していきたい。

## 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 21 件)

菱川朋人, 清水智久, 徳永浩司, 杉生憲志, 小野成紀, 伊達勲, 岡山大学における症候性脳血管攣縮への対策と現状—過去 10 年間の治療成績の検討—、査読有、2013、脳血管攣縮、41(増刊):23-26  
黒住和彦, 小野成紀, 市川智継, 三好康之, 石田穰治, 春間純, 徳永浩司, 伊達勲, 脳幹部海綿状血管腫に対する直達手術 9 例の検討、査読有、2013、脳卒中の外科、41(3):213-218  
早瀬仁志, 徳永浩司, 中山敏男, 杉生憲志, 西田あゆみ, 有光帥二, 菱川朋人, 小野成紀, 太田信, 伊達勲, 頸動脈内膜剥離術あるいは頸動脈ステント留置術施行後の患者固有データに基づく頸動脈血流の流体力学的シミュレーション、査読無、2013、岡山医学会雑誌、125(1):5-7  
徳永浩司, 杉生 憲志, 菱川朋人, 黒住和彦, 大熊佑, 伊丹尚多, 小野成紀, 伊達勲, Onyx による術前塞栓術を併用した脳動脈静脈奇形の外科的摘出術、査読有、2012、脳卒中の外科、40(4):217-222  
小野成紀, 石田穰治, 安原隆雄, 黒住和彦, 市川智継, 伊達勲, 顕微鏡手術における神経内視鏡の役割: 神経内視鏡と顕微鏡の使い分けの現状分析を中心に、査読有、2011、脳神経外科ジャーナル、20(10):716-724  
伊達勲, 小野成紀, 大井静雄, 胎児水頭症に対する神経内視鏡の応用と全国前方視的多施設共同調査、査読有、2011、小児の脳神経、36(3):304-307

〔学会発表〕(計 74 件)

小野成紀, 亀田雅博, 黒住和彦, 市川智継, 伊達勲, 神経内視鏡のさまざまな脳神経外科手術への応用: 現状における機器と手術アプローチの関係、第 20 回日本神経内視鏡学会、2013/11/08、甲府  
小野成紀, 亀田雅博, 黒住和彦, 市川智継, 伊達勲, 様々な頭蓋底腫瘍に対してどのような神経内視鏡をどのように使用するのが最善か?: 現状での機器と腫瘍の関係性、一般社団法人日本脳神経外科学会 第 72 回学術総会、2013/10/16、横浜  
Shigeki Ono, Masahiro Kameda, Kiyoshi Yamada, Yoshihiro Kimata, Michiyasu Suzuki, Myat Thu, Isao Date, Shigeru Okada, Current situation of nasal encephalocele in Myanmar and activity of Japanese medical cooperative team in Myanmar, the 41st Annual ISPN Meeting in Mainz, 2013/09/29, Mainz, Germany(Kurfurstliches Schloss)  
黒住和彦, 亀田雅博, 安原隆雄, 市川智

継, 小野成紀, 伊達勲, 経鼻的神経内視鏡単独手術の現状と画像支援の有用性、第 18 回日本脳腫瘍の外科学会、2013/09/20、滋賀  
黒住和彦, 市川智継, 亀田雅博, 小野成紀, 大西学, 藤井謙太郎, 石田穰治, 島津洋介, 伊達勲, 小児脳室近傍腫瘍に対する神経内視鏡的アプローチの有用性、第 41 回日本小児神経外科学会、2013/06/08、大阪  
市川智継, 黒住和彦, 小野成紀, 木谷尚哉, 伊達勲, 頭蓋咽頭腫摘出術における内視鏡支援の有用性、第 22 回脳神経外科手術と機器学会、2013/04/13、松本  
小野成紀, 亀田雅博, 黒住和彦, 市川智継, 伊達勲, 神経内視鏡を駆使した様々な脳神経外科手術と神経内視鏡の Pitfall、日本脳神経外科学会第 71 回学術総会、2012/10/18、大阪  
小野成紀, 菊池陽一郎, 黒住和彦, 市川智継, 伊達勲, 小児中枢神経疾患に対する神経内視鏡の様々な使用方法、第 40 回日本小児神経外科学会、2012/06/07、岡山  
黒住和彦, 小野成紀, 市川智継, 三好康之, 石田穰治, 春間純, 徳永浩司, 伊達勲, 脳幹部海綿状血管腫出血例における直達手術 9 例の検討、第 41 回日本脳卒中の外科学会: STROKE2012、2012/04/26、福岡  
黒住和彦, 市川智継, 小野成紀, 三好康之, 伊達勲, 鞍上部胚細胞腫に対する集学的治療の成績、第 72 回(社)日本脳神経外科学会中国四国支部学術集会、2011/12/3、高知  
豊嶋敦彦, 黒住和彦, 市川智継, 小野成紀, 伊達勲, 当院における脳幹部 glioma の治療戦略および長期成績の検討、第 70 回日本脳神経外科学会学術総会、2011/10/14、横浜  
小野成紀, 黒住和彦, 市川智継, 伊達勲, 脳室内・近傍腫瘍に対する神経内視鏡的の意義、(社)日本脳神経外科学会第 70 回学術総会、2011/10/13、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 成紀 (ONO, Shigeki)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40335625

(2) 研究分担者

黒住 和彦 (KUROZMI, Kazuhiko)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師  
研究者番号: 20509608

(3) 連携研究者

伊達 勲 (DATE, Isao)

岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・教授  
研究者番号： 70236785