

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791611

研究課題名(和文) 脳梗塞における幹細胞移植療法の効率効果向上を目指した時期特異性、領域特異性の解明

研究課題名(英文) Stem cell transplantation for ischemic stroke focusing on timing and lesion specificity

研究代表者

堀江 信貴 (Horie, Nobutaka)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：70380912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：移植細胞は多く脳内へmigrationしており、静脈内投与の約40倍の効率であった。また、虚血部位への細胞のhomingは炎症性サイトカインと相関性が強く、より急性期の投与においてhomingする細胞が多かった。梗塞後7日を経過すると脳内へのmigrationはほとんど見られなかった。また、動脈内投与で危惧されるembolic strokeについては血流を維持した状態であれば影響が少ないことが判明した。移植タイミングによる検討では、急性期投与は主に脳保護作用を、亜急性期投与は神経再構築を主な作用点として行動学的改善が得られた。

研究成果の概要(英文)：Human mesenchymal stem cells were widely distributed both in the peri-infarct and core in D1, and dominantly in the peri-infarct in D4. Very few cells were observed on D7. At day 7 poststroke, microglia activation was significantly suppressed in both the peri-infarct and core in D1, and predominantly in the peri-infarct in D4. At day 21 poststroke, brain-derived neurotrophic factor was widely distributed throughout the peri-infarct in D1 and D4, along with many reactive astrocytes and considerable angiogenesis. Motor function improved earlier in D1 and later in D4, but no recovery was obtained in D7. Our results indicate that intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and poststroke functional recovery via a combination of neuroprotection, reactive astrocyte enhancement, and angiogenesis.

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

キーワード：脳梗塞 幹細胞 移植 再生医療

1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患への治療法として、神経細胞死などを標的として機能脱落を予防する研究が多くなされてきたが、近年の再生医学の発展により機能再建を目標とした治療戦略が現実的課題となってきた。脳卒中とくに脳梗塞も再生医療が期待されている疾患の一つであるが、これまでに動物モデルにおいて脳梗塞後に様々な細胞を移植することで脳虚血による認知機能、行動の改善が得られたと報告され、脳梗塞に対する治療法の新たな側面としての期待は大きい(Steinberg et al, Stroke, 2007: 817-26)。

現在、脳梗塞においては高血圧、糖尿病をはじめとしたリスクファクターの管理などによる予防治療、また発症急性期における t-PA 静注による再開通療法、脳保護治療に focus が置かれており、いったん脳梗塞に陥ったあとの慢性期治療はリハビリテーション以外にない。再生医療は慢性期治療のプレイクスルとして非常に期待されているが、より病変選択性の高い投与方法の比較、また時期による比較(時期特異性、領域特異性)は国内外で報告がない。

2. 研究の目的

移植方法としては脳内投与、静脈内投与が主であるが移植細胞にとっての至適条件は全く解明されていない。申請者のグループは移植細胞を病側の総頸動脈より注入することで脳内に高い生着率を得ることを報告した(Guzmann et al, Stroke. 2008; 39 (4): 1300-6)。そこで申請者は動脈内投与による梗塞部への first pass が機能回復に更に寄与しているという仮説を立て、移植後のホストの環境変化を他の投与方法と比較検証する。更に、これまで検討されていない投与時期についても検証する。この仮説が実証されると、脳梗塞に対し低侵襲かつ効率的な細胞投与が確立されることとなり、将来的に臨床応用につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

1. 脳梗塞モデルの確立

適切な梗塞巣をもつモデルを確立する。申請者が米国でこれまで作成していた梗塞モデルとして distal MCA occlusion model は MCA 凝固切断+両側総頸動脈 30 分閉塞する (J. Neurochem. 2003; 85: 1026-1036)。Rodent の梗塞サイズは vendor や strain で異なるため、日本において同じ strain でも梗塞サイズが同じとは限らない。従ってまずは同様の手術を行い、梗塞サイズに再現性があるか? そうでなければ閉塞時間を調整して脳梗塞モデルを確立する。

2. Selective injection 法の確立

Microcatheter を用い患側総頸動脈から穿刺し、内頸動脈末梢まで挿入する(Stroke. 2008; 39: 1300-6)。挿入後 Evans Blue を注入して正確に注入が行われているかにつき

確認を行う。薬剤は注入後 1 時間で中大脳動脈領域に浸透するため、sacrifice し脳表を観察することで容易に評価可能である。使用する細胞ソースとしてはヒト骨髄間葉系細胞、ヒト脂肪幹細胞、神経幹細胞を用い、移植後にホスト内でどのような動態をしているか可視できるようにする。

3. Functional recovery、脳梗塞サイズの変化の検討

・Functional recovery: Rodent はかなりの頻度で spontaneous recovery を呈するため、未治療群において評価時に十分な neurological deficit を呈していることが前提である。Motor deficit の評価としてより感度の高い cylinder test (30 hits を count する)を、また sensory barrel cortex の機能評価に有用な whisker-paw test および corner test を追加して評価する。評価時期は移植前、移植後 2 日、1 週、2 週、3 週、4 週と行う。

・急性期脳梗塞の評価: 治療後 2 日目に脳組織を摘出。Matrix を用いて 2mm 間隔で coronal slice を作成。2% TTC solution に slice を 10-15 分浸透させてミトコンドリアの dysfunction を評価する。組織は scanner で取り込み Image J を用いてサイズの評価を行う。

・慢性期脳梗塞の評価: 治療後 1 か月目に 4% PFA 還流固定を行い、脳組織を摘出。脳組織は cryostat を用いて 40 μm slice を作成。等間隔 (200 μm) に 5 切片をセレクトし 20% Cresyl Violet 溶液を用いて染色を行う。ventricle size や cortical atrophy の定量を Image J を用いて行う。

4. ホストの梗塞部周囲の環境変化について検討

・炎症反応の変化: 機能予後に炎症反応は大きく関与している。monocyte marker である Iba 1 (Wako) を蛍光免疫染色し、peri-infarct area における positive cell を count する。また activated microglia marker である ED1 を用いて炎症の活性化についても検討を加える。

・新生血管: ホストの血管新生における脳血流増加も機能予後に寄与している。Lectin (Vector Lab) を用いて sacrifice 直前に投与しあらかじめラベリングしておき、蛍光免疫染色を行った後、peri-infarct area の vascular density を Image J を用いて定量する。治療群と未治療群で顕著な差が確認されれば、Blood brain barrier の評価も行う。BBB integrity について、ピオチン(あるいはエバンスブルー)を用い還流固定を行い、組織学的に leakage area を測定する。BBB は梗塞後 30 日後にても permeability が亢進していることが報告されているが、急性期以外での検討は非常に少なく、我々の実験系では視認性の高いエバンスブルーよりも分子量の小さいピオチンがより適していると考えられる。また電子顕微鏡を用いて

endothelial cell, tight junction の構造変化を検討する。Tight junction protein については組織サンプルから microvessel isolation (Maier, Ann Neurol 59:929-938) を行いより purify した endothelial cell sample を用いて Occludin, Claudin 5, Zo-1 のタンパク発現を測定する。Microvessel isolation が不均一である場合は、通常の whole brain lysate を用いる。

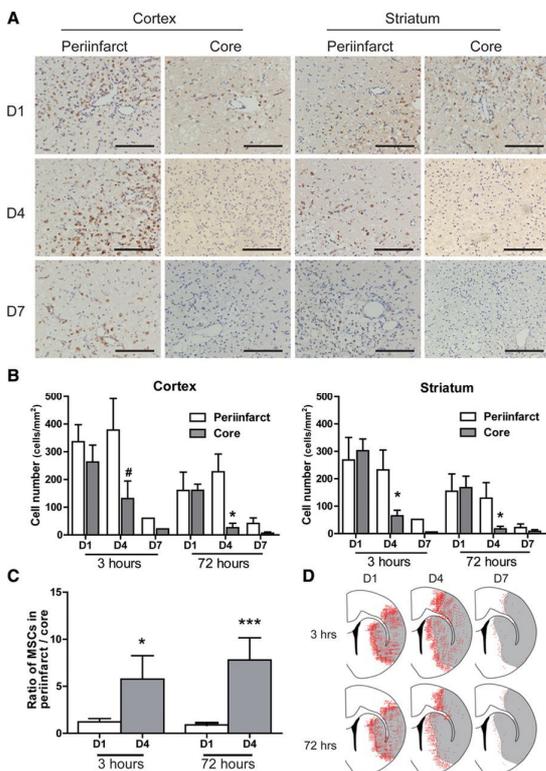
・内在性神経幹細胞の評価：神経幹細胞については Nestin (Invitrogen) を、また neuronal marker Tuj 1, DCX や astrocytic marker GFAP で二重染色し、paraventricle から梗塞巣までの遊走を含めて評価する。内在性修復機構を評価する上で、血管新生や炎症細胞の動態だけでなく内在する神経幹細胞の動態も評価する必要がある (Steinberg: Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101; 11839-11844)。

5. 投与時期の検討 (梗塞直後、1日後、1週間後)

投与時期を急性期、亜急性期、慢性期にわけることによって前述の評価 (特に有意な所見があったもの) を行い、至適時期を模索する。

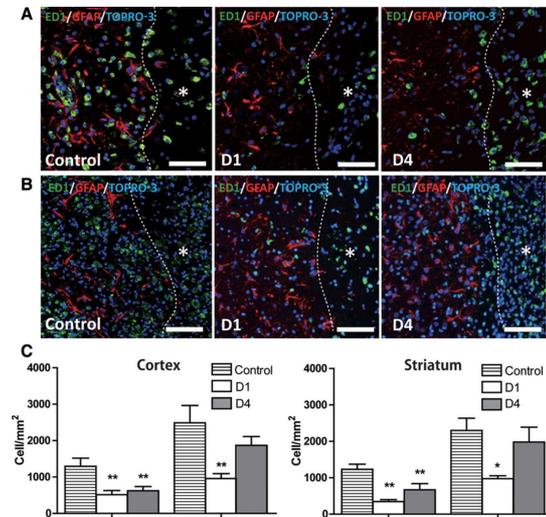
4. 研究成果

1. 移植細胞の分布について



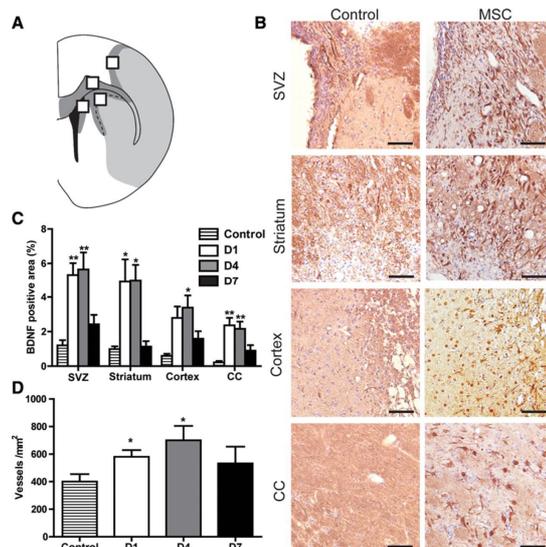
移植細胞は広く虚血部位 core 及び虚血周囲 periinfarct に郵送していることが確認された。移植時期では1日目投与(D1)は core 及び periinfarct に広範囲に遊走し、4日目投与(D4)は periinfarct のみに、7日目投与(D7)はいずれも遊走が見られなかった。これは大脳皮質 cortex、基底核 striatum いずれも同様の傾向であった。

2. 移植細胞による抗炎症効果



炎症反応については活性化マクロファグのマーカーである ED1 を用いて蛍光免疫染色で評価した。非移植群 control では大脳皮質 cortex(A)、基底核 striatum (B)において、虚血部 core (*), 梗塞周囲 periinfarct どちらも ED1 陽性細胞が多数見られたが、D1 では periinfarct, core それぞれでの ED1 陽性細胞の減少、D4 では periinfarct のみでの現象が確認された(C)。

3. 移植細胞による栄養因子、新生血管



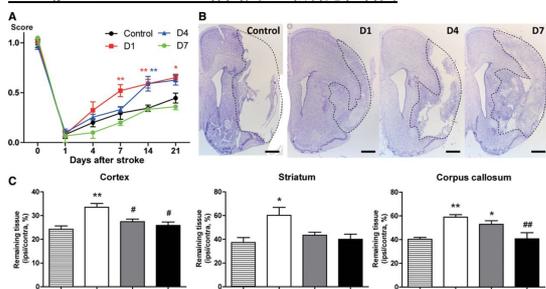
細胞移植後の栄養因子分泌につき、脳室周囲 SVZ、基底核 striatum、大脳皮質 cortex、脳梁 cc において BDNF 陽性細胞を定量したところ、D1, D4 いずれにおいても非移植群 control と比較し著明な陽性細胞の増加が見られた (A-C)。また、cortex における新生血管については BDNF 陽性細胞がみられた部位に一致して新生血管の増勢が見られた(D)。

4. 移植後の死亡率 mortality

	Intra-arterial Injection-Related Mortality (Within 48 h of Injection)	Overall Mortality at 21 Days Poststroke
Stroke only (n=16), %		31.3
Control (n=10), %	20.0	40.0
Day 1 (n=28), %	10.1	14.2
Day 4 (n=26), %	19.2	26.9
Day 7 (n=13), %	30.8	30.1

脳梗塞後における 3week 後の死亡率は 31.3% であり、移植後で 40.0%であった。細胞移植群においては D1, D4 の順に死亡率が低減していた。一方、D7 では死亡率に変化が得られなかった。

5. 梗塞サイズの評価と機能回復



行動学的評価は cylinder test (A) で行った。非移植群 control に比べて D1, D4 では梗塞 7 日後、14 日後、21 日後において有意な行動学的改善が得られた。また、その回復については D1 が早期に、D4 では晩期の回復であった。組織学的には cresyl violet 染色を行い、D1 においてのみ梗塞サイズの縮小を確認した(B, C)。

これらの研究結果より、移植タイミングによる検討では、急性期投与は主に脳保護作用を、亜急性期投与は神経再構築を主な作用点として行動学的改善が得られた。脳梗塞に対する動脈投与による幹細胞移植は、少ない細胞数で障害部位に selective に投与が可能であり、特に自己骨髄移植を行う際に有用性が高いと考えられる。静脈内投与では必ずしも移植細胞が脳内に migrate していない、との報告もあり、動脈内投与とは移植細胞の作用点が異なる可能性が示唆された。

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 5 件)

Intra-Arterial Cell Transplantation Provides Timing-Dependent Cell Distribution and Functional Recovery After Stroke. Shunsuke Ishizaka, Nobutaka Horie【Corresponding Author】, Katsuya Satoh, Yuhtaka Fukuda, Noriyuki Nishida, Izumi Nagata Stroke 44. 720-726, 2013, 査読あり doi: 10.1161/STROKEAHA.112.677328 Assessment of carotid plaque

stability based on the dynamic enhancement pattern in plaque components with multidetector CT angiography. Horie N, Morikawa M, Ishizaka S, Takeshita T, So G, Hayashi K, Suyama K, Nagata I. Stroke, 43(2):393-8, 2012, 査読あり

doi: 10.1161/STROKEAHA.111.635953

Direct arteriovenous fistula at the inferolateral trunk mimicking carotid cavernous fistula without involving the cavernous sinus: a case report. Horie N, Morikawa M, So G, Hayashi K, Suyama K, Nagata I. Acta Neurochir (Wien). 154(3):465-9. 2012, 査読あり doi: 10.1007/s00701-011-1226-8

New variant of persistent primitive olfactory artery associated with a ruptured aneurysm. Horie N, Morikawa M, Fukuda S, Hayashi K, Suyama K, Nagata I. J Neurosurg. 117(1):26-8, 2012, 査読あり, doi: 10.3171/2012.3.JNS111932

Selective coil embolization through flow-directed microcatheter for intracranial arteriovenous malformations. Horie N, Hayashi K, Morikawa M, Nagata I. Acta Neurochir (Wien). 154(6):989-91, 2012, 査読あり doi: 10.1007/s00701-012-1287-3

[学会発表](計 4 件)

脳梗塞に対する脳血管内治療を用いた細胞移植療法の現状と課題

堀江信豊、石坂俊輔、福田雄高、佐藤克也、西田教行、永田 泉、ラファエル・グズマン、トニア・プリス、ゲイリー・スタインバーグ

2013 年 3 月 21-23 日、東京、Stroke 2013 Stroke に対するヒト神経幹細胞移植後の内在性修復機構活性化

堀江信豊、日宇 健、永田 泉、Tonya Bliss, Gary K. Steinberg【シンポジウム 脳再生療法の進化：現状と展望】

2013 年 3 月 21-23 日、東京、Stroke 2013 脳梗塞に対する脳血管内治療を用いた幹細胞移植の可能性【シンポジウム “脳血管内治療のワークショップ”】

堀江信豊、石坂俊輔、福田雄高、佐藤克也、西田教行、永田 泉、Raphael Guzman, Tonya Bliss, Gary K Steinberg

2012 年 11 月 15-17 日、仙台、第 28 回日本脳神経血管内治療学会総会

脳梗塞に対する脳血管内治療を用いた幹細胞移植の可能性 経静脈的投与との相違 Endovascular stem cell transplantation for Stroke-difference between IV and IA-【シンポジウム “幹細胞と再生医療”】

堀江信豊、石坂俊輔、福田雄高、佐藤克也、西田教行、永田 泉、Raphael Guzman, Tonya Bliss, Gary K Steinberg

2012年10月17-19日、大阪、第71回
日本脳神経外科学会総会
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江信貴 (Horie Nobutaka)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70380912