

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462223

研究課題名(和文) 必要十分細胞数に着目した脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞移植投与方法の確立

研究課題名(英文) Intra-arterial transplantation of low-dose stem cells provides functional recovery without adverse effects after stroke.

研究代表者

福田 雄高 (FUKUDA, Yutaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：20646575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット中大脳動脈閉塞モデルを作成し、24時間後に human mesenchymal stem cells (MSCs) を低用量 1×10^4 cells、高用量： 1×10^6 cellsの2群に分けて投与を行った。梗塞8日目の運動解析では両群ともコントロールに比較して良好な改善を認め、炎症性サイトカインであるinterleukin (IL)-1、IL-12p70の低下を認めた。高用量群においては多くの細胞が広く脳内に分布していたが、血管内の細胞凝集も多く見られた。脳梗塞に対して細胞移植を動脈内投与する際は、低用量においても十分に十分な治療効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：At 24 hours after middle cerebral artery occlusion and reperfusion, we administered human mesenchymal stem cells (MSCs) (low dose: 1×10^4 cells; high dose: 1×10^6 cells) and then assessed functional recovery, inflammatory responses, cell distribution, and mortality. Rats treated with high- or low-dose MSCs showed behavioral recovery. At day 8 post-stroke, microglia activation was suppressed significantly, and interleukin (IL)-1 and IL-12p70 were reduced in both groups. Although high-dose MSCs were more widely distributed in the cortex and striatum of rats, the degree of intravascular cell aggregation and mortality was significantly higher in the high-dose group. In conclusion, selective intra-arterial transplantation of low-dose MSCs has anti-inflammatory effects and reduces the adverse effects of embolic complication, resulting in sufficient functional recovery of the affected brain.

研究分野：脳梗塞

キーワード：脳梗塞 再生医療 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の国民生活基礎調査（平成 23 年度版）による、65 歳以上の要介護の直接原因は、1 位脳卒中 24.1%と高い割合を示しており、その莫大な医療費は国民に対する過大な負担になっている。脳卒中の治療としては、血圧コントロール、脂質異常の是正、糖尿病の管理、抗血小板剤等による発症予防、あるいは発症時の治療としては急性期薬剤加療があり、最近では r-tPA 等を用いた血栓溶解療法、あるいは血管内治療による血栓破砕療法等が発展して新しい治療として効果をあげてきている。一方で、急性期加療を過ぎ慢性期になると、脳神経系の著明な改善は認められず、リハビリテーションを長期続けざるを得ないのが現状である。

2. 研究の目的

少子高齢化は加速度的に進行し、脳卒中による機能障害は高齢者の寝たきりの最大要因となっている。これは脳卒中により機能障害に対する画期的な治療法が確立されておらず、長期のリハビリテーションに依存せざるを得ないことが原因である。近年、再生医療が脚光を浴びており、脳梗塞に対しても様々な研究成果が報告されている。現在、様々なアプローチ（定位的、脳室内、静脈内、動脈内）による試みがなされているが、投与細胞数が過剰でありトランスレーショナルな見地からは非現実的と思われる。本研究はこれまで全く検討されていない、細胞移植の必要十分条件に着目し、最適な投与方法を模索することで一般的な治療方法としての確立を目指す。

3. 研究の方法

a. ラットモデルの作成

250~350g の Sparague-Dawley 種のラットを使用し、ナイロン糸を中大脳動脈分岐部まで挿入する局所脳虚血モデルを作成する。イソフルレンによる吸入麻酔後に呼吸は自発呼吸にて維持させ、温度自動調節のパットを使用し、直腸温を 37℃に維持する。ラットの腹側頸部正中切開し、総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を露出させ、総頸動脈より 4.0 モノフィラメントナイロン糸を用い中大脳動脈閉塞とする。

b. 脳梗塞に対するヒト骨髄間葉系細胞 (MSC) 経動脈的投与の異なる細胞数による評価モデルの確立

これまでの研究により頸動脈的投与に適した再灌流モデル、安全な細胞の頸動脈的投与方法、効果的な投与タイミングに関する知見を得た。これまでは約 100 万個のヒト骨髄間葉系幹細胞を各タイミングで投与しその効果、メカニズムを解析してきた。ヒト MSC 投与において細胞数を 10 万、100 万に振り分け投与する。投与はポリエチレンカテーテルを用いて梗塞と同側のラット内頸動脈より、緩

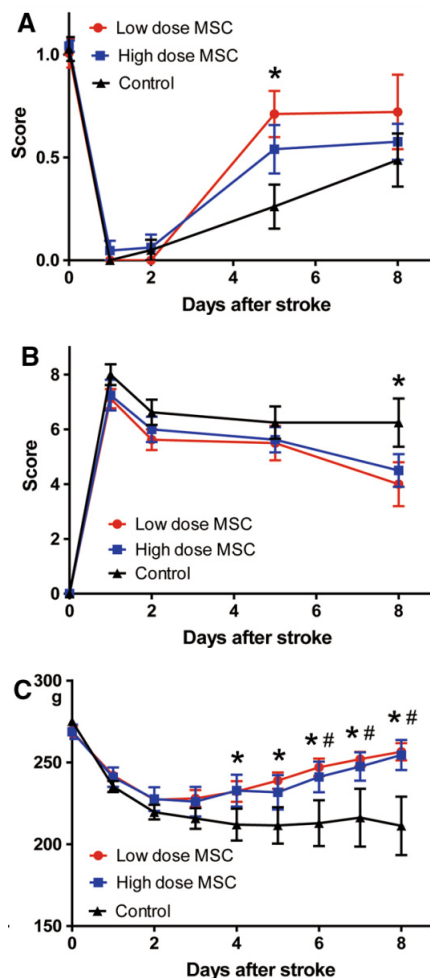
徐に行う。免疫抑制剤 (cyclosporine-A, 10mg/kg) を経腹腔的に用いる。

c. 梗塞後の炎症評価

機能予後に関与する炎症反応を評価する為に、monocyte marker である Iba1 (Wako) の蛍光免疫染色、及び炎症活性化を示す ED1 の評価を行う。また炎症系サイトカインについては LUMINEX assay を用いて網羅的に検索する。

4. 研究成果

a. 行動学的評価



(A) cylinder test

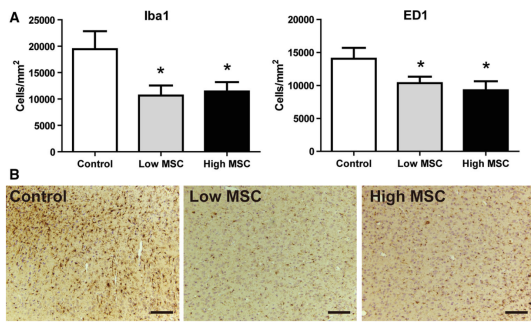
(B) modified neurological severity score

(C) 体重変化

梗塞作成後の経時変化をみると、コントロール群と比較して、細胞移植群は低用量 low dose、高用量 high dose とともに有意な改善を認めた。

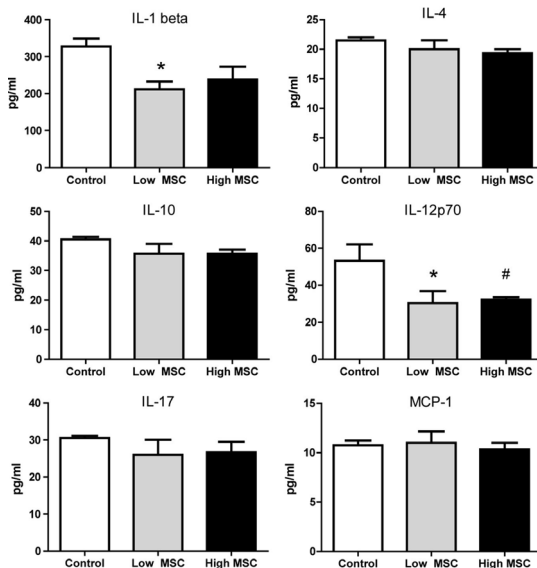
N= 8; one-way analysis of variance (ANOVA), Tukey-Kramer multiple comparison test, *P<0.05 low-dose MSCs vs. control, #P<0.05 high-dose MSCs vs. control

b. 梗塞後の炎症反応



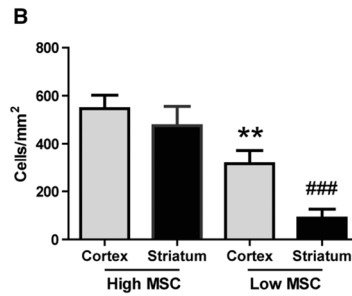
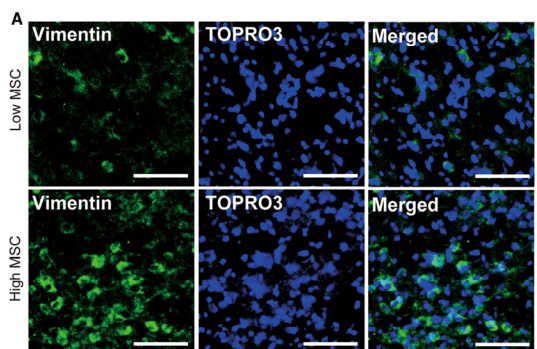
脳梗塞 8 日後にはマクログリア (Iba-1 陽性細胞) と活性型マクログリア (ED-1 陽性細胞) の浸潤は細胞移植により有意に抑制されている (A)。脳梗塞周囲の peri-infarct area における免疫染色 (B)。
N = 8; one-way ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparison test, *P<0.05 vs. control

c. 炎症性サイトカイン



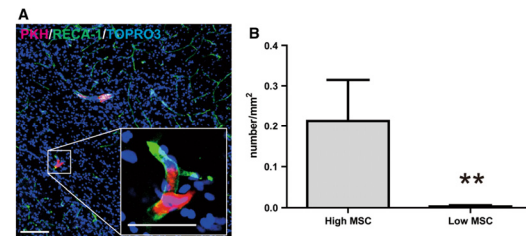
LUMINEX assay では細胞移植にて IL-1b, IL-12p70 が有意に抑制されていた。
N=3; one-way ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparison test, *P<0.05, #P<0.09 vs. control

d. 移植細胞の分布



脳梗塞に対する細胞移植 24 時間後には高用量群 (High MSC) において多くの移植細胞 (Vimentin 陽性細胞) が脳梗塞周囲に分布していたが、低用量群 (Low MSC) においては分布が少なかった (A)。皮質 cortex、白質 striatum における定量解析 (B)。
N= 6; **P<0.01, ###P<0.001, unpaired t test with two-tailed value; scale bar=100 um

e. 細胞凝集について



細胞移植後 24 時間後には多くの PKH でラベルされた移植細胞が血管内皮 (RECA-1 陽性細胞) 内に存在している (A)。定量を行うと、このような細胞凝集は有意に高用量 high dose 群に多く見られた。
N= 6; **P < 0.01, unpaired t test with two-tailed value; scale bars = 100 and 50 μm in the magnified image

f. 脳梗塞後の死亡率

	Overall mortality
Control	33.3 % (n = 12)
Low-dose MSC (1 × 10 ⁴ cells)	27.3 % (n = 11)
High-dose MSC (1 × 10 ⁶ cells)	38.5 % (n = 13)

脳梗塞後の死亡率は高用量 high dose MSC 群に高かった。

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 1 件)

- ① Fukuda Y, Horie N, Satoh K, Yamaguchi S, Morofuji Y, Hiu T, Izumo T, Hayashi K, Nishida N, Nagata I. Intra-arterial transplantation of low-dose stem cells provides functional recovery without adverse effects after stroke. Cell Mol Neurobiol. 2015

Apr:35(3):399-406 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 福田雄高、堀江信貴、佐藤克也、西田 教行、永田 泉、ラット脳梗塞モデルに対する経動脈的細胞移植 -臨床応用を見据えた至適細胞量の検討- 第 72 回日本脳神経外科学会総会、2013 年 10 月 16 日～2013 年 10 月 18 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- ② 福田雄高、堀江信貴、佐藤克也、西田 教行、永田 泉、ラット脳梗塞モデルに対する経動脈的細胞移植 -臨床応用を見据えた至適細胞量の検討- 第 25 回日本脳循環代謝学会、2013 年 11 月 01 日～2013 年 11 月 02 日、京王プラザホテル札幌 (札幌)
- ③ Fukuda Y, Horie N, Satoh K, Yamaguchi S, Morofuji Y, Hiu T, Izumo T, Hayashi K, Nishida N, Nagata I. Assessment of the Optimal Cell Number for the Trans-arterial Transplantation after Stroke in Rat. International Stroke conference 2014. 2014 年 02 月 12 日～2014 年 02 月 14 日. San Diego Convention Center (San Diego, USA)
- ④ 福田雄高、堀江信貴、佐藤克也、西田 教行、永田 泉、Assessment of the Optimal Cell Number for the Trans-arterial Transplantation after Stroke in Rat. Stroke 2014. 2014 年 03 月 13 日～2014 年 03 月 15 日. 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑤ Yamaguchi.S, Fukuda Y, Horie N, Morofuji Y, Hiu T, Izumo T, Nishida N, Nagata I. Intra-arterial transplantation of low-dose stem cells provides functional recovery without adverse effects after stroke. International Stroke Conference 2016. 2016 年 02 月 17 日～2016 年 02 月 19 日. 米国 ロサンゼルス

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 雄高 (FUKUDA, Yutaka)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員
研究者番号：20646575

(2) 研究分担者

堀江 信貴 (HORIE, Nobutaka)
長崎大学・病院(医学系)・助教
研究者番号：70380912

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授
研究者番号：70398147