

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462234

研究課題名(和文) 機能的血管内皮細胞を用いた脳梗塞に対する細胞治療の評価

研究課題名(英文) Evaluation of the regenerative cell therapy for cerebral infarction with our functional endothelial progenitor cells

研究代表者

鈴木 謙介 (suzuki, kensuke)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20400674

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)：虚血に対する治療効果の高い血管内皮細胞(Alde-Low EPC)を、ラット脳梗塞モデルに投与する実験を行った。Alde-Low EPCの投与は急性期脳梗塞において脳梗塞体積を抑制する。投与したAlde-Low EPCは脳梗塞急性期に虚血巣に集積し治療効果を発揮する。脳梗塞作成後14日後の評価を追加し、Alde-Low EPCの脳梗塞縮小効果が確認できた。の3点が明らかとなった。投与した細胞が投与後24時間という短期間に梗塞巣に集積して脳梗塞を縮小させ、さらにこの効果が2週間後にも確認できたことは、今後の脳梗塞に対する再生医療の研究の一端に寄与できたのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：Regenerative therapy has been prospected for new treatment also for cerebral infarction. In this study, we researched the effect of our original endothelial progenitor cells with low aldehyde dehydrogenase (Alde-Low EPC) for cerebral infarction in the rat models. The results was follow; 1. Injection of Alde-Low EPC made the volume of cerebral infarction smaller. 2. Alde-Low EPC accumulated in infarction area and showed their effect. 3. Also after 14 days of infarction, we confirmed the effect of Alde-Low EPC for cerebral infarction. More studies which reveal the mechanism of Alde-Low EPC function in cerebral infarction is needed. However, we confirmed that Alde-Low EPC accumulated and effected within 24 hours and their effects continued also after 2 weeks. But we could not find the optimal way for clinical use of these cells. In the next step, we will investigate about mesenchymal stem cells which can be extracted from patients' fat tissue in the same way in this study.

研究分野：脳神経外科学 脳卒中

キーワード：脳梗塞 動物実験 血管内皮前駆細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

ES細胞やiPS細胞研究の発展により、再生医療への期待は高まるばかりである。しかしながら、感染・癌化などクリアすべき問題は少なくない。いち早く再生医療を臨床応用することは、日本のみならず世界中が熱望しているであろう。一方、脳卒中は日本における死因第3位を占め、また有病率はさらに高く、社会問題の一つとなっている。神経細胞は再生不可能といわれており、そのため発症後の後遺症が解決すべき大きな課題である。細胞移植による再生医療は虚血性疾患に対する新規治療法として注目されており、ES細胞、iPS細胞、骨髄幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞などの前駆細胞や組織幹細胞が細胞治療の細胞供給源として研究されているが、どの細胞が治療に適しているかは現在も不明である。我々は前回の科研費を用いて血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell: EPC) の虚血部位における血管新生能力や神経細胞保護作用に着目し、動物実験にて具体的な効果を報告した。特に神経に関する細胞治療は、再生というよりも各サイトカインによる神経保護効果がメインであると考えている。脳梗塞に対する再生医療の臨床応用を目指した研究が今後も必須であることは言うまでもない。

2. 研究の目的

我々は、2007年にヒトEPCを臍帯血から単離し、Aldehyde dehydrogenase (ALDH)活性をマーカーとして、活性の高い群 (Alde-high) と低い群 (Alde-low) に分けて培養を行った。Alde-Low EPCにおいて有意に細胞増殖能が高いことを明らかとし、この細胞をラット過性脳虚血モデルに投与しての効果を確認した。この結果をふまえ、臨床応用に近づくために細胞の抽出・培養方法の検討、多面的な効果の検証、さらに観察期間を細胞投与後14日後まで延長し効果継続の確認を計画した。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮前駆細胞 (EPC) の単離

ヒト臍帯血より血球細胞を除き、単核細胞を単離し、高栄養培地 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen, Carlsbad, CA) に10%ウシ胎児血清 (Fatal bovine serum; FBS; Hyclone, South Logan, UT) および繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; b-FGF; Peprotech, London, United Kingdom) 10 ng/ml を添

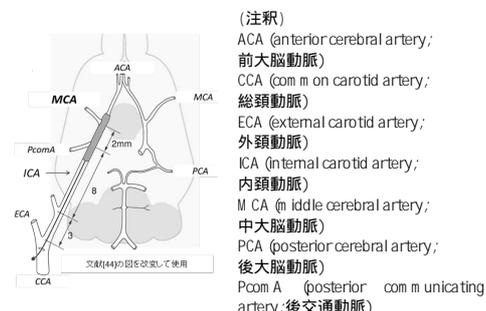
加した培地を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>の培養条件下で培養した。蛍光励起細胞分取装置 (FACS Vantage; BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて、CD45(-)/CD31(+)の細胞をフローサイトメトリー (flow cytometry) で分離し、アセチル化 LDL (PE-conjugated low-density lipoprotein from human plasma acetylated, Dil complex: Dil-Ac-LDL: Molecular Probes, Eugene, OR) の取り込みがあり、増殖能が高く (培養すると敷石上構造 (cobble stone appearance) あり)、マトリゲルアッセイで管腔構造 (tube formation) を認めるものをEPCと同定した。

(2) Alde-Low EPC の分取

EPCの細胞集団を、細胞内のアルデヒドを酸化してカルボン酸やアシル基に変換するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aldehyde dehydrogenase; ALDH) の活性によって分離した。細胞内のアルデヒドデヒドロゲナーゼと反応することにより細胞内に留まる形態を呈する光学的に検出可能なBAAA (BODIPY®-aminoacetaldehyde) を基質とする Aldefluor 試薬 (StemCell technologies, Vancouver, BC) を用い、EPCを染色した後、蛍光励起細胞分取装置にかけ、前方散乱光 (FSC) を横軸にして側方散乱光 (SSC) を縦軸にしたスキャッタグラムを作成し、EPCの細胞集団領域に対するゲート設定を行い、細胞の蛍光強度と細胞数の関係をヒストグラムに展開して細胞集団の蛍光強度の分布を調べ、蛍光強度を横軸 (Aldefluor) にして細胞数を縦軸 (Relative cell number) にした凸状の分布からアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の高い細胞群 (Alde-High EPC) と低い細胞群 (Alde-Low EPC) を分取した。

(3) ラット過性脳虚血モデルの作成

280-320 gの雄性SDラットをCharles River (Yokohama, Japan) から購入し使用した。中大脳動脈の閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAo) は、下記の方法で行った (図1)。



(図1) ナイロン糸による中大脳動脈閉塞モデルの作成法 (模式図):

4%のイソフルランで全身麻酔を導入し、フェイスマスクを使用して2%のイソフルランで維持した。ラットの体温は、ヒーティングパッド上で37 から38 に維持した。ラットを仰臥位にし、頸部正中切開を行い、右の総頸動脈(common carotid artery; CCA)を露出して近位部でこれを結紮閉塞した。外頸動脈(external carotid artery; ECA)を露出して結紮閉塞した後、先端をシリコンコーティングした4-0ナイロン糸を総頸動脈から前大脳動脈(anterior cerebral artery; ACA)に挿入することで中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)を選択的に閉塞した。側副血行の発達により、一側総頸動脈の結紮や内頸動脈の閉塞のみでは脳梗塞を発症しないことが以前より知られており、この方法で中大脳動脈を選択的に閉塞した。挿入部で塞栓糸を結紮固定して閉塞した。60分間の閉塞ののちに挿入した糸を数センチ引き戻すことにより中大脳動脈を再灌流した。同側総頸動脈は結紮されているため、梗塞巣へは対側内頸動脈や椎骨動脈からの側副血行により灌流される。塞栓糸は総頸動脈の刺入部で結紮固定してあるため、シリコンコーティング部が引っ掛かり、総頸動脈内に塞栓糸は残る形となり、再灌流時に出血は起こさない。

#### (4) 細胞投与

再灌流から30分後(中大脳動脈閉塞から90分後)に、4%のイソフルランで再度全身麻酔を導入し、フェイスマスクを使用して2%のイソフルランで麻酔維持しつつ再開した。内頸動脈を動脈瘤用のクリップで一時的に遮断したのち、総頸動脈に塞栓糸を固定した糸を解き、塞栓糸を抜去した。総頸動脈からコントロールのPBS(phosphate-buffered saline;リン酸緩衝生理食塩水)0.5 mlと各細胞を投与した(n=10)。細胞は、HUVEC、Alde-High EPC、Alde-Low EPCを各 $5 \times 10^5$  cellsを0.5 mlのPBSに懸濁させ、1分以上かけて投与した(各n=10)(図2)。総頸動脈近位部と外頸動脈は結紮閉塞してあるため、投与した細胞はすべて内頸動脈に流入することとなる。



Cells ( $5 \times 10^5$  cells in 0.5 ml PBS)

- Alde-Low EPC
- Alde-High EPC
- HUVEC

Control (0.5 ml)

PBS

(図2) 投与スケジュールと投与細胞:  
中大脳動脈を60分間閉塞後、再灌流した。再灌流後30分で細胞を内頸動脈から投与した。

他家移植に対する免疫抑制は、シクロスポリン-A(cyclosporine-A; Wako, Osaka, Japan)の腹腔内投与により施行した(10 mg/kg/BW)。シクロスポリン-Aの投与は、細胞投与前日、当日、翌日の3回、24時間おきに脳組織採取日まで継続した。

#### (5) 脳梗塞の評価

##### 神経症状の評価

左片麻痺やホルネル徴候を含む神経学的症状はmodified Neurological Examination Grading System(表1)を使用して評価した。中大脳動脈閉塞直後、再灌流後、細胞投与後1日、7日、14日に評価した。

(表1) Modified Neurological Examination Grading System:

grade	Symptom
0	Both forelimbs are extended, no deficit
1	Left forelimb is attached to the breast and right forelimb is extended
2	Resistance is decreased to lateral push in addition to the grade 1 without circling
3	Circling in addition to the grade 2
4	Upper half of the Body is twisted in addition to the grade 3
5	Dead

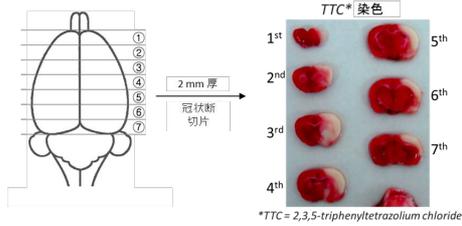
##### 局所脳血流の測定

局所脳血流(regional cerebral cortical blood flow; rCoBF)は、Ohtaraの方法を改変して測定した。頭皮を切開後、帽状腱膜と骨膜を剥離し、矢状縫合と冠状縫合の合流点(bregma)の2 mm外側, 2 mm後方で、レーザードップラー血流計(Laser Doppler flowmeter; ADVANCE, Kyoto, Japan)のプロベを頭蓋骨に対して垂直にあてて経頭蓋的に測定した。この部分の測定により、中大脳動脈閉塞による梗塞周囲の血流が評価できるとされている。細胞投与前(再灌流後)、細胞投与後1日、7日、14日に局所脳血流の測定を行った。各細胞投与群において、梗塞側の脳血流値(ml/100g/ml)と、梗塞側脳血流比(梗塞側脳血流/正常側脳血流)で梗塞側局所脳血流の評価を行った。

##### 脳梗塞体積の測定

細胞投与から1日、7日、14日に、致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し、上行大動脈経路でPBSによる灌流を行った。ラット脳を摘出後、前頭葉先端から連続7スライスの2 mm厚冠状断切片を作成し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)で染

色し(37、20分)、デジタルカメラで撮影した。SCION image (SCION Corporation, Frederick, MD)を使用して各断面の脳梗塞面積を計測した。7スライスの脳梗塞面積の和を脳梗塞体積とし、正常側半球体積との比を脳梗塞体積比(% infarct volume)として算出することで、脳浮腫による影響を補正した(図3)。



(図3) 脳梗塞体積の測定:

前頭葉先端から連続7スライスの脳梗塞面積の和を脳梗塞体積とし、対側の大脳半球面積の和を正常側半球体積として、その比を脳梗塞体積比(% infarct volume)として算出した。

#### 4. 研究成果

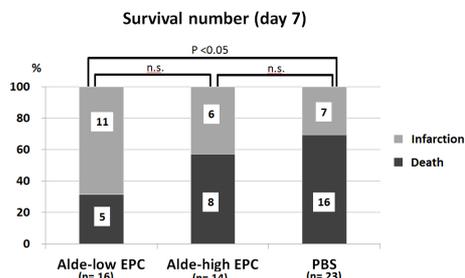
図4:

##### Background

	PBS	Alde-high EPC	Alde-low EPC	P value
Number	3	3	3	
Body weight(g)	298.7±8.5	308.2±2.3	300.7±17.8	N.S.
Body Temperature(°C)	34.8±0.6	34.8±0.5	34.2±0.4	N.S.
Heart rate (bpm)				
Pre	316±13.5	323±15.2	265±5.5	N.S.
Post	313±40.0	336±20.1	2923±6.6	N.S.
Systolic blood pressure(Hg)				
Pre	109±19.0	86±2.0	87±21.5	N.S.
Post	94±18.6	92±12.7	82±8.1	N.S.
Blood gas analysis				
pH	7.37±0.03	7.41±0.03	7.40±0.03	N.S.
PCO2	52.0±5.5	47.3±6.8	46.5±1.3	N.S.
PO2	73.0±7.2	77.0±5.4	87.3±4.2	N.S.
BE	5.0±1.0	5.0±1.6	4.7±1.5	N.S.
HCO3	30.17±1.5	29.9±2.1	29.2±1.6	N.S.
TCO2	31.67±1.5	31.3±2.1	30.7±1.5	N.S.
sO2	93.3±2.1	95.0±1.4	96.7±0.6	N.S.

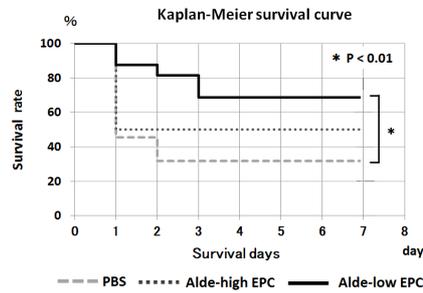
ラット一過性脳虚血モデル(一過性中大脳動脈閉塞モデル)に対し、PBS、Alde-high EPC、Alde-low EPCをそれぞれ経静脈投与を行った実験プロトコルにおいて、各群の体重変化、体温、心拍数、収縮期血圧、血液ガス分析の背景の比較において、各群間に有意差は認めなかった。よって、各薬剤を経静脈投与する動物モデルにおいて、モデル作製時に関連した各群間の差はなく、再現性の高いモデルが作製可能であることが示された。

図5:



Alde-low EPC、Alde-High EPC、PBS投与群の生存率に関する群間比較では、Alde-low EPCはPBS群に比べて有意に生存率が高かった。

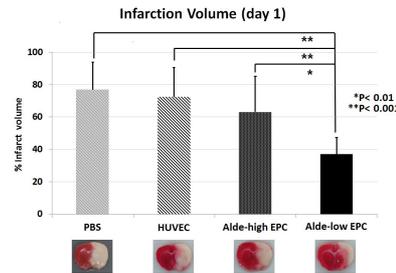
図6:



Wilcoxon検定 (high/Low) P=0.065  
 Wilcoxon検定 (PBS/Low) P=0.051  
 Wilcoxon検定 (PBS/High) P=0.57  
 Log rank test (high/Low) P=0.11  
 Log rank test (PBS/Low) P=0.01  
 Log rank test (PBS/high) P=0.48

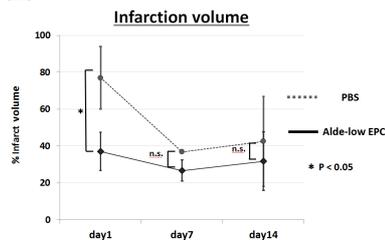
各群の生存率をKaplan-Meierで示す。Alde-low EPCはPBSに比べて有意に生存率が高かった。

図7:



PBS、HUVEC、Alde-high EPC、Alde-low EPCを投与したラット一過性脳虚血モデルにおける24時間後の脳梗塞体積の比較では、Alde-low EPCが有意に、PBS、HUVEC、Alde-high EPCよりも脳梗塞体積が小さかった。

図8:



Day1、Day7、Day14まで生存したラットにおける、PBS群とAlde-low EPC群の脳梗塞体積の比較では、Day1では有意にAlde-low EPC群で脳梗塞体積がPBS群に比べて小さかった。Day7、Day14においては、有意差を認めなかったが、その理由はPBS群ではDay7、Day14において有意に死亡率が高かったためと考えられる。

図9:



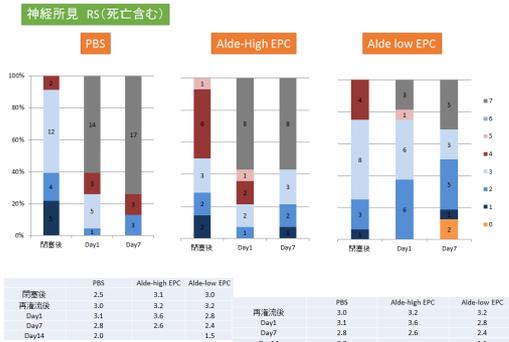
群別	PBS	Alde-high EPC	Alde-low EPC
Day1	100	100	100
Day7	89.8	95.7	118.9
Day14	105.8	128.3	128.1

群別	PBS	Alde-high EPC	Alde-low EPC
Day1	100	100	100
Day7	103.6	128.3	129.1
Day14	127.3	127.3	131.1

(表1)に示したグレーディングによる神経所見の評価では、Alde-low EPC 群は、Day1,7,14において、PBS 群、Alde-High EPC 群において、神経症状が軽度であった。

図 10:



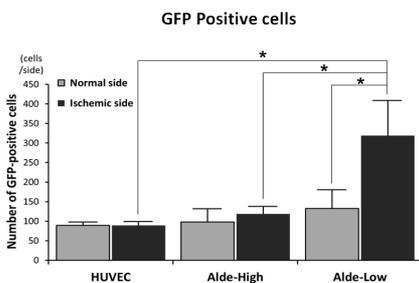
PBS, Alde-High EPC, Alde-Low EPC 投与群での day1, day7 における modified Rankin Scale (mRS)を比較すると、Alde-low EPC 群は、PBS, Alde-high EPC 群に比べて、予後良好の mRS0-2 が多く、死亡の mRS7 が有意に少なかった。

図 11:



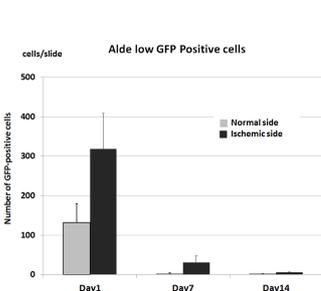
各群間の脳血流の比較では、day7, day14 において各群間に有意差は認めなかった。

図 12:



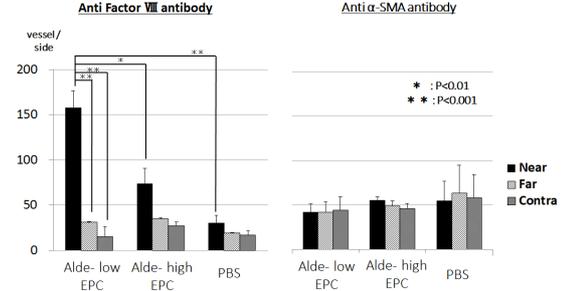
Day1 における、脳梗塞病巣における GFP 陽性の各細胞 (HUVEC, Alde-high EPC, Alde-low EPC)の分布では、Alde-low EPC は脳梗塞病巣において有意に多くの細胞の分布を認めた。

図 13:



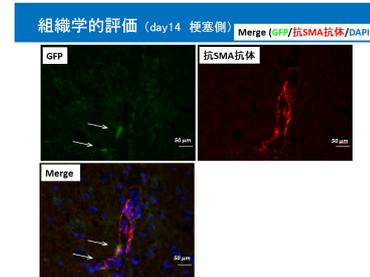
Alde-low EPC の脳梗塞病巣における分布を測定したところ、Day1 において 300cells/slide 以上認められたが、Day7,14 では、確認できる細胞数は減少していた。

図 14:



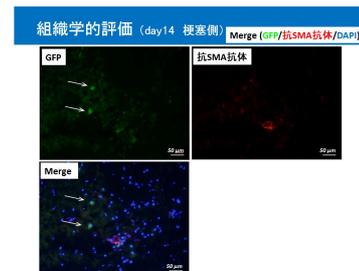
Day14 における各群間の毛細血管数と中膜平滑筋を有する細動脈の数を測定すると、Alde-low EPC 群では、他の群に比べて有意に毛細血管の増勢を認めた。

図 15:



Day14 における、投与した Alde-low EPC の脳梗塞病巣への遊走を抗 GFP 抗体で確認したところ、Alde-low EPC は血管壁上に認められた。

図 16:



また、一部の Alde-low EPC は、血管外スペースに認められた。

### 考察およびまとめ

本研究では、Alde-Low EPC 投与群でのみ脳梗塞体積抑制効果が認められ、ALDH 活性により分取した EPC の特定の細胞群が、急性期脳梗塞に対して 14 日後まで治療効果を発揮することが確認された。前回の研究では確認できなかった神経学的所見の違いも明らかにすることができた。しかし、局所脳血流において、Alde-Low EPC の治療効果を確認することはできなかった。加えて、細胞投与後 14 日には Alde-Low EPC 自体の数は減少していた。しかしながら、Alde-Low EPC は脳梗塞巣に集積し、血管壁から血管外へと遊走してい

ることからも、脳梗塞抑制に関わっていることが強く示唆される。このことはAlde-Low EPC が神経細胞の再生そのものを促しているというよりも、サイトカイン系などを介した間接的な神経保護作用を持っていることを示唆するものと考えている。

本研究で使用したAlde-Low EPCはヒト臍帯血より培養・分離したものである。臨床にて使用するには、倫理的・体制的問題を解決する必要がある。この種の研究により、他の細胞の脳梗塞抑制能力の可能性をも調査することができると考えており、研究を継続する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

清水信行、鈴木謙介、(8人中2番目)、大動脈炎症候群による総頸動脈狭窄に頭蓋内内頸動脈塞栓症を併発し急性期血行再建術と頸動脈ステント留置術を施行した1例、Journal of Neuroendovascular Therapy, 査読有、Vol.9、No.3、2015、pp.156-162、

<http://doi.org/10.5797/jnet.cr.2015-0005>

Inoue T, Murakami N, Sakadume S (9人中7番目)、Differing phenotypes of Moyamoya disease in a familial case involving heterozygous c.14429G > A variant in RNF213.、Pediatrics international、査読有、Vol.57、No.4、2015、pp. 798-801、doi: 10.1111/ped.12689.

Takigawa T, Suzuki K、(8人中2番目)、Thromboembolic events associated with single balloon-, double balloon-, and stent-assisted coil embolization of asymptomatic unruptured cerebral aneurysms: evaluation with diffusion-weighted MR imaging.、査読有、Vol.56、No.12、2014、pp.1079-1086、doi: 10.1007/s00234-014-1421-4.

[学会発表](計10件)

Kensuke Suzuki、Acute revascularization for stroke、The 16th Annual Congress of neurosurgical Society of VietNam、2015/12/05、NhaTrangCity(ベトナム)  
Kensuke Suzuki、The result of treatments by japanese hybrid neurosurgeons, open surgery and endovascular treatment、15th Interim Meeting of the World Federation of Neurosurgical Societies、2015/09/08-12、ローマ(イタリア)  
Kensuke Suzuki、Direct bypass led immediately and transient effect, after that, indirect bypass

kept long-term outcome in moyamoya disease、4th International Moyamoya Meeting、2015/07/04、ベルリン(ドイツ)

[図書](計2件)

鈴木謙介、兵頭明夫、南江堂、脳血管内治療の進歩、2014、4

鈴木謙介、兵頭明夫、中外医学社、Clinical Neuroscience、2014、04、401-403

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 謙介 (SUZUKI, Kensuke)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20400674

(2)研究分担者

兵頭 明夫 (HYODO, Akio)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40167606

(3)研究分担者

田中 喜展 (TANAKA, Yoshihiro)  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90316571

(4)研究分担者

永石 雅也 (NAGAISHI, Masaya)  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40364632

(5)研究分担者

清水 信行 (SHIMIZU, Nobuyuki)  
獨協医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70636654

(6)研究分担者

高野 一成 (TAKANO, Issei)  
獨協医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20364630

(7)研究分担者

鈴木 亮太郎 (SUZUKI, Ryotaro)  
獨協医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 1055230

(8)研究分担者

杉浦 嘉樹 (SUGIURA, Yoshiaki)  
獨協医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90636648

(9)研究分担者

滝川 知司 (TAKIGAWA, Tomoji)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 60450227

(10)研究分担者

丸島 愛樹 (MARUSHIMA, Aiki)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 40722525