

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462165

研究課題名(和文) 脳梗塞治療効果の飛躍的向上への戦略～急性期薬物治療と幹細胞移植の融合～

研究課題名(英文) Synergic effect of medical and stem cell therapy for stroke

研究代表者

堀江 信貴 (HORIE, Nobutaka)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：70380912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：・投与時期の検討：脳梗塞後1, 4, 7日目にhMSC 106個を投与。D1群で優位な神経学的改善、投与細胞の生着とそれによる抗炎症効果を認めた。投与量の検討：脳梗塞後1日目にhMSC104個、106個を投与。両群間では神経学的改善に有意差は認めないものの、106個投与群では細胞による塞栓が多く、死亡率も高い結果であった。投与細胞の検討：脳梗塞作成後1日目に64歳男性由来(Old)hMSCと24歳男性由来(Young) hMSC106個投与。Young群で優位に神経学的改善を認め、抗炎症、血管新生、神経新生において優れた治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and post-stroke functional recovery via a combination of neuroprotection, reactive astrocyte enhancement and angiogenesis. 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. Aging of hMSC may be a critical factor that affects cell therapy outcomes, and transplantation of young hMSC appears to provide better functional recovery through anti-inflammation effects, vessel maturation, and neurogenesis potentially due to the dominance of trophic factor secretion.

研究分野：脳卒中学

キーワード：脳梗塞 幹細胞 移植

1. 研究開始当初の背景

近年の厚生労働省の報告によると、65歳以上の高齢者における要介護の直接原因は脳卒中が24.1%と最も高い割合を維持しており、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、また発症時の治療としてはフリーラジカル療法、脳浮腫治療などの急性期薬剤治療があり、最近ではt-PAを用いた血栓溶解療法、あるいは血管内治療が発展し、新しい治療として効果をあげてきている。しかしながら、その効果には限界があることも明らかとなり、慢性期に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。このような現状において、脳血管障害に対する細胞移植治療は、脳卒中治療の新たなブレイクスルーとしての期待を浴びており、国内外で臨床応用が試みられているが、こちらにおいても劇的な神経症状の改善は期待しがたい現状が続いている。

2. 研究の目的

近年、脳梗塞に対して再生医療、特に幹細胞移植治療が脚光を浴びており、様々な基礎研究の結果をもとに臨床研究が進んでいるが、現在の標準的治療となっている薬物療法と幹細胞移植の相互作用については全く解明されていない。脳梗塞に対する再生医療の効果を最大限生かすためには、細胞移植単独の効果を検証するだけでなく従来の治療法にどのようなメリットをもたらすか、あるいはデメリットがあるのかを明らかにする必要がある。本研究の目的は「脳梗塞に対する新たな治療として期待されている幹細胞移植が、脳梗塞に対する標準薬物治療(スタチン療法、フリーラジカル療法、脳浮腫治療)にどのような相互作用をもたらすか?」という疑問を明らかにし、トランスレーショナルの見地から脳梗塞に対する質の高い再生医療の確立を目指すことにある。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデル作成、細胞移植投与方法、薬剤投与方法の確立

再現性のある脳梗塞モデルの確立(皮質梗塞モデル、皮質線条体梗塞モデル)

幹細胞移植方法の確立(静脈内投与、動脈内投与)、急性期薬剤投与方法の確立(静脈内)

(2) 幹細胞移植後の移植細胞の挙動に対する評価(急性期)

組織学的解析による移植細胞の定量的評価、細胞分布の評価

炎症細胞浸潤の定量、包括的プロテインアッセイ

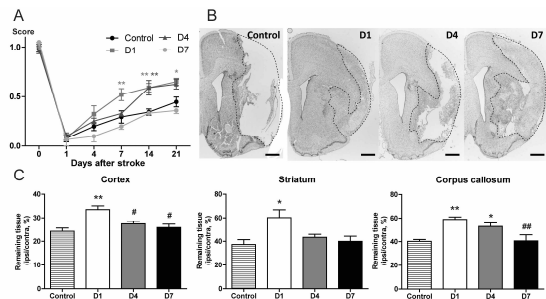
(3) 幹細胞移植後の内在性修復機構、行動学的改善に対する評価(慢性期)

組織学的評価(新生血管、樹状突起、軸索)及び経時的な運動麻痺評価

4. 研究成果

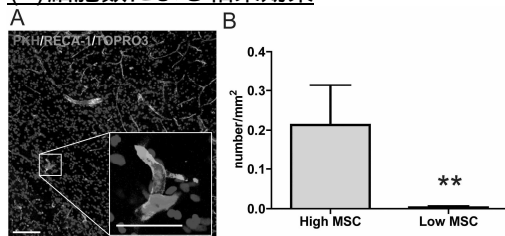
(1) 移植タイミングによる相乗効果

ラット中大脳動脈モデルに対して、骨髄間葉系細胞を1日後、4日後、7日後に分けて移植を行い、機能評価、組織学的評価を行った。

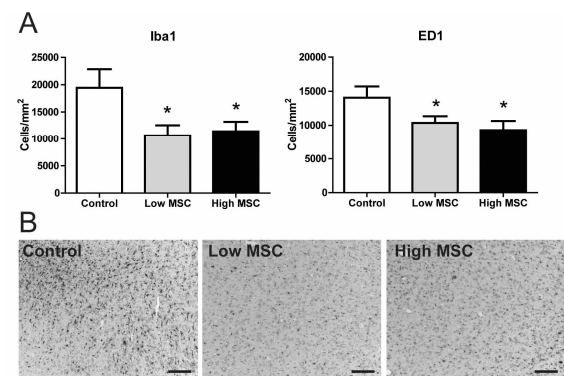


1日後、4日後移植は行動学的改善がコントロールと比較し、有意に認められた(A)。1日後は早期回復であり、幹細胞によるいわゆる nursing effect を反映しているものと考えられる。一方、4日後移植は遅発性回復であった。組織学的にも梗塞サイズの縮小は得られなかった(B,C)。これは neurogenesis, angiogenesis などの神経再構築を幹細胞が手助けしており、相乗効果となっていることが示唆される。

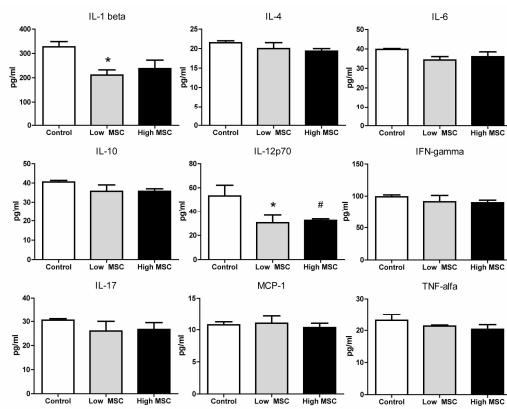
(2) 細胞数による相乗効果



細胞数については一般的に用いられている細胞数の1/100の量(Low MSC: 1×10^4 cells)でも梗塞サイズの縮小及び、行動学的改善が得られ、更には周術期の mortality も低かった。



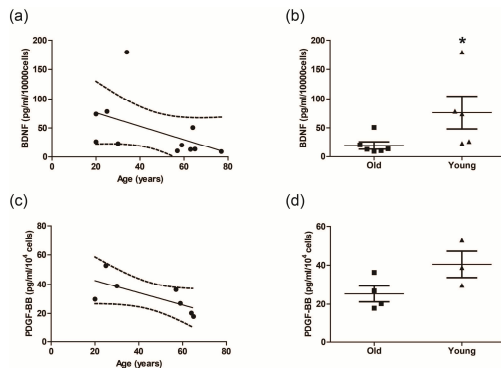
この細胞数の違いによる炎症細胞抑制の影響はなく、マイクログリア数(Iba1)、活性化マイクログリア数(ED1)ともにコントロールと比べ、有意に細胞浸潤を抑えていた。



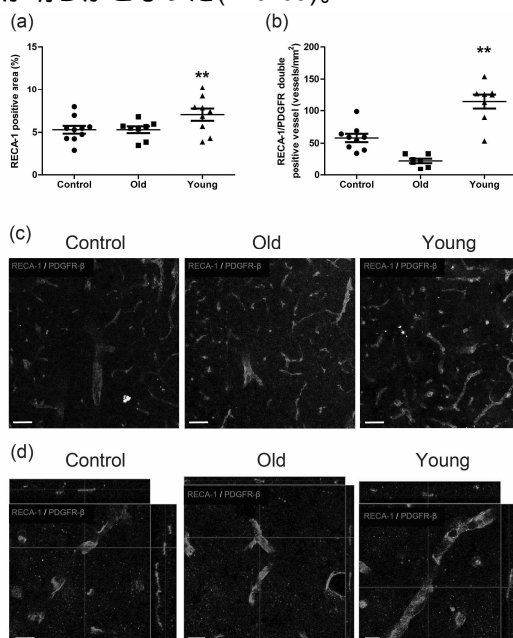
Luminex assay によるサイトカイン定量においては、Low dose, High dose ともに IL-1beta, IL-12p70 の抑制が得られた。

(3)細胞の quality による相乗効果

In vitro での conditioned medium の評価を行った。



栄養因子として広く認識されている BDNF, PDGF-BB については年齢依存性にその値が低いことが明らかとなり、old(50 歳以上)にくらべて young (30 歳以下)が有意に多いことが明らかとなった($P < 0.05$)。



Angiogenesis においても同様の結果であった。血管内皮マーカーである RECA-1, ペリサイトマーカーである PDGFR はいずれも young に多く、これらの結果は単純に血管新生ではなく、より matured な血管新生を促進している相乗効果であることが明らかとなった。

脳梗塞に対する再生医療を現実的なものにするためにはその効果を最大限引き出す手法を確立することが必要である。また、必要移植細胞数、対象病型など医療経済的側面からも検討しなければならない。血管内治療を用いた経動脈的投与は、必要細胞数が少なく済み、大量に静脈内投与を行う手法と同等の効果をもたらす可能性が示唆された。また、幹細胞の Host の年齢は治療効果に影響を及ぼすため、幹細胞の選択も必要になると考えられる。

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 4 件)

Horie N, Tateishi Y, Morikawa M, Morofuji Y, Hayashi K, Izumo T, Tsujino A, Nagata I, Matsuo T. Acute stroke with major intracranial vessel occlusion: Characteristics of cardioembolism and atherosclerosis related in situ stenosis/occlusion. J Clin Neurosci.32. 24-29. 2016 (査読あり)

Horie N, Hiu T, Nagata I. Stem cell transplantation enhances endogenous brain repair after experimental stroke. Neurol Med Chir (Tokyo)55, 107-112, 2015 (査読あり)

Horie N, Morofuji Y, Morikawa M, Tateishi Y, Izumo T, Hayashi K, Tsujino A, Nagata I. Communication of inwardly projecting neovessels with the lumen contributes to symptomatic intraplaque hemorrhage in carotid artery stenosis. J Neurosurg.123, 1125-1232, 2015 (査読あり)

Horie N, Kaminogo M, Izumo T, Hayashi K, Tsujino A, Nagata I. Cilostazol may prevent cardioembolic stroke in patients undergoing antiplatelet therapy. Neurol Res.37. 619-623, 2015 (査読あり)

(学会発表)(計 3 件)

虚血性脳疾患(脳梗塞)の間葉系幹細胞移植治療. 堀江信貴、西田教行、佐藤克也、松尾孝之. 第 122 回日本解剖学会総会(招待講演). 2017 年 03 月 29 日~31 日. 長崎大学医学部(長崎県・長崎市) ラット脳梗塞モデルにおける多能性幹

細胞由来血管内皮細胞とペリサイト細胞移植の効果. 巽 理恵、前田 肇、中川 慎介、堀江信貴、有賀 純. 第90回日本薬理学会. 2017年03月15日~17日. ブリックホール(長崎県・長崎市) 脳梗塞に対する細部移植療法. 堀江信貴 第45回新潟脳研夏期セミナー(招待講演). 2015年07月24日. 新潟大学医学部(新潟県・新潟市)

〔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

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

(2) 研究分担者

日宇 健 (HIU, Takeshi)
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：00404260

西田 教行 (NISHIDA, Noriyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号：40333520

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・

教授

研究者番号：70398147

山口 将 (YAMAGUCHI, Susumu)

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：70712131