

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462214

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞移植によって誘導される虚血脳の可塑性の基礎的解析

研究課題名(英文) Fundamental analysis of ischemic brain plasticity induced by bone marrow mesenchymal stem cell transplantation

研究代表者

鈴木 淳平 (Suzuki, Junpei)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00572596

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)：我々はこれまで、ラット脳梗塞モデル(MCAO)への骨髄間葉系幹細胞(MSC)移植実験を行い、良好な治療効果を報告してきた。

本研究において、ラット脳梗塞モデルにMSCを移植した結果、MSC移植群においては、行動学的解析の結果、運動機能の改善を認めた。さらに、免疫組織学的解析により、脳梗塞周囲の脳組織において、シナプスの新生が生じていることが明らかになり、脳の可塑性亢進が誘導されていることが判明した。これらの結果より、MSC移植によって、脳梗塞により失われた運動・感覚機能が回復する過程には脳の可塑性が大きく関わっているということが判明した。

研究成果の概要(英文)：Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) from adult bone marrow ameliorates functional deficits in rat cerebral infarction models. In this study, we found functional improvements evaluated with behavioral testing following systemic administration of MSCs in stroke. Immunohistochemical analysis demonstrated that synaptogenesis was induced around the ischemic lesion in the MSC treated group. Collectively, neural plasticity might contribute to the functional recovery following intravenous infusion of MSCs in a rat model of stroke.

研究分野：脳神経外科、再生医学

キーワード：脳梗塞

1 . 研究開始当初の背景

脳梗塞の新しい治療法として骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 移植が注目されている . 我々はこれまで , ラット脳梗塞モデル (MCAO) へ骨髄間葉系幹細胞を静脈内投与すると , 治療効果が得られることを報告してきた . これまでの基礎研究の知見より , 骨髄間葉系幹細胞移植による治療効果のメカニズムは , サイトカインによる神経栄養作用 , 血管新生 , 脱髄軸索の再有髄化 , 神経再生による脳の可塑性の調節 , と多段階的に発揮することによることが判明している .

骨髄間葉系幹細胞移植により運動・感覚機能が回復する過程における脳の可塑性の変化を , 動物実験用 MRI 装置 (7T) による functional MRI (fMRI) を用いて研究した結果 , 骨髄間葉系幹細胞非移植群で検出された左前肢刺激による fMRI の賦活信号は右体性感覚野皮質内に限局していたのに対し , 骨髄間葉系幹細胞移植群では fMRI 賦活信号パターンが右体性感覚野皮質内に限局していた群 (片側賦活化群) と両側皮質に信号が検出された群 (両側賦活化群) の 2 パターンに分かれることが判明した . 運動機能の回復は , 移植後次第に , 両群ともに有意に回復していたが , 両側賦活化群と片側賦活化群を比較すると , MRI T2 強調画像より算出した梗塞巣体積の経時的変化には有意差が無いにも関わらず , 健常側を含む両側の皮質に fMRI 信号が検出される群のトレッドミルを用いた運動機能の改善度は , 病側皮質に fMRI 信号が検出される群 , および非移植群よりも高い傾向にあった .

このメカニズムは , ラット脳梗塞モデルに

対して骨髄間葉系幹細胞を移植した後に , 脳の可塑性が変化することによって , 脳梁を介する皮質-皮質間 , 皮質-線条体間 , 皮質-視床間 , 皮質-脊髄間の軸索が構築する神経回路の rewiring の増加が生じた結果 , 神経機能の回復に寄与した可能性があると考えられた .

この研究より , 骨髄間葉系幹細胞移植による脳梗塞の運動機能の回復過程で , 脳の可塑性の変化が重要な役割を果たしていることが示唆されたが , 詳細な解明はなされていない .

2 . 研究の目的

脳梗塞の新しい治療法として注目されている骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 移植において , ラットを用いた研究では MSC 移植によって脳梗塞巣の縮小や運動能力の回復が確認されており , 移植によって , 脳梗塞により失われた運動・感覚機能が回復する過程には , 脳の可塑性が大きく関わっていることが判明した . さらに , 我々の functional MRI (fMRI) を用いた研究から , MSC 移植は , 病側脳における治療効果のみならず健常脳の可塑性を賦活化することでより強い治療効果をもたらすことが示唆された . 本申請では脳梗塞に対する MSC 移植後の , 脳の可塑性の変化 (特に健常側の脳) を fMRI , 組織学的 , 行動学的に評価し , 脳の可塑性のメカニズムを多角的解析方法で詳細に検討した .

3 . 研究の方法

実験的脳梗塞モデルは , SD ラットに対して Intraluminal thread method を用い , 中

大脳動脈永久閉塞 (MCAO) モデルを作成した。作成後に GFP トランスジェニックラットより採集・培養した MSC を経静脈的に投与し、下記の実験群を設定して治療効果の検討を行った。

Group 1: コントロール群; 培養液 (DMEM) 静脈内投与

Group 2: 細胞移植群; 骨髄間葉系幹細胞静脈内投与 (脳梗塞発症 6 時間後)

3-1. 行動学的評価:

経時的にトレッドミルを用いてラットの最大走行速度を測定し、運動機能を評価した。

3-2. 免疫組織学的解析:

観察期間の終了したラットより組織を採集し、作成した凍結切片に免疫染色を行って超解像共焦点顕微鏡 (ZeissLSM780, ELYRAS.1) を用いて解析を行った。

3-3. 生化学的解析:

観察期間の終了したラットより、組織および血漿、血清を採集し、ELISA 法によって BDNF 量の定量解析を行った。

3-4. Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)

動物用 MRI (7T) を用いた Ex vivo MRI Diffusion Tensor 法により、MSC 移植後の脳梗塞によって損傷を受けた神経回路の修復の程度などを評価した。

4. 研究成果

4-1. 行動学的解析:

トレッドミル試験によって、ラットの最大走行速度を測定した結果、細胞移植群において、運動機能が回復し、非移植群と統計学的に有意な差を認めた。

4-2. 免疫組織学的解析:

免疫組織学的解析によって、MSC 移植群において、脳梗塞周囲の組織で、pre-synaptic マーカーであるシナプトフィジンの発現の上昇を認め、脳の可塑性の亢進が誘導されていることが明らかになった。

4-3. 生化学的解析:

実験的脳梗塞モデルの損傷側の脳実質および血漿、血清から、ELISA 法を用いて、BDNF 量の定量解析を行った結果、MSC 移植群において、脳実質および血漿において BDNF が増加していることが明らかとなった。

4-4. Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)

観察期間終了後に、ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳および脊髄組織を dissect した。組織は、4%パラホルムアルデヒドで後固定を行なって、動物用 MRI (7T) を用いて Ex vivo MRI による Diffusion Tensor Imaging を行なった。Ex vivo 法は撮像時間の制限・体動がないために、極限まで空間分解能を向上させており、作成した高精度の DTI 画像は、MSC 移植後の神経回路および損傷軸索の修復過程に対する有効な評価法となると思われた。

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3件)

Elevated Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Plasma but not Serum Reflect in vivo Functional Viability of Infused Mesenchymal Stem Cells after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rat. Nakamura H, Sasaki Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Suzuki J, Nagahama H, Mikami T, Wanibuchi M, Kocsis JD, Honmou O, J Neurosurg Sci, 査読有, Feb 8(in press), 2017.

Intravenous infusion of mesenchymal stem cells inhibits intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator therapy for transient middle cerebral artery occlusion in rats. Nakazaki M, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Suzuki J, Sasaki Y, Nagahama H, Mikami T, Wanibuchi M, Kocsis JD, Honmou O, J neurosurg, 査読有. Jan 6:1-10, 2017

Synergic Effects of Rehabilitation and Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells After Stroke in Rats. Sasaki Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Nagahama H, Suzuki J, Tateyama D, Oka S, Namioka M, Namioka A, Onodera R, Mikami T, Wanibuchi M, Kakizawa M, Ishiai S, Kocsis JD, Honmou O, Physical Therapy, 査読有. 96: 1791-1798, 2016.

〔学会発表〕(計3件)

脳梗塞・脊髄損傷に対する再生医療-医師主導治験による実用化-, 佐々木 祐典, 第28回代用臓器・再生医学研究会(2016年2月27日), 北海道大学 鈴木章記念ホール(北海道札幌市)

rt-PA 静注後の出血性梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞の抑制効果, 中崎 公仁, 第41回日本脳卒中学会総会(2016年4月4日-16日), ロイトン札幌他(北海道札幌市)

rt-PA 静注後の出血性梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞の抑制効果, 中崎 公仁, 第59回日本脳循環代謝学会学術集会(2016年11月11日-12日), あわぎんホール(徳島県徳島市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 淳平 (Junpei Suzuki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 00572596

(2)研究分担者

佐々木 祐典 (Masanori Sasaki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20538136

鰐淵 昌彦 (Masahiko Wanibuchi)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30343388

三上 毅 (Takeshi Mikami)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30372816

中崎 公仁 (Masahito Nakazaki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70722461

長濱 宏史 (Hiroshi Nagahama)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20725676

浪岡 愛 (Ai Namioka)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60748995

浪岡 隆洋 (Takahiro Namioka)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70748996

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ()

研究者番号：