

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：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861155

研究課題名(和文) 投与細胞の違いに着目した脳梗塞に対する幹細胞移植投与方法の確立

研究課題名(英文) Functional Recovery Depends on Donor Age after Stem Cell Transplantation for Stroke

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Platelet derived growth factor BBは年齢と負の相関を認め、young群でold群と比較して有意に高値であった。mNSSでは21日目では他の2群と比較してyoung群で改善が見られた。21日目の脳梗塞周囲の病理組織学的評価では小膠細胞は他の2群と比較して有意にyoung群で少なかった。血管周囲細胞に覆われた新生血管の数は他の2群と比較してyoung群で優位に増加していた。神経幹細胞は他2群に比べyoung群が多かった。脳梗塞に対する細胞移植の効果はドナーの年齢に依存し、若年ドナーでは脳梗塞周囲での抗炎症効果、血管新生が強く、内在性の前駆細胞の活性化に影響していた。

研究成果の概要(英文)：The value of PDGF-BB was significantly higher in young hMSC in vitro, as well as the value of monocyte chemotactic protein-1 in vivo at day 7. Rats treated with young hMSC showed better behavior recovery with a prevention of brain atrophy than that with old hMSCs. The number of inflammatory cells was significantly lower and the number of endothelial cells covered with pericytes was higher in young hMSCs. Interestingly, migration of neural stem/progenitor cells expressing Musashi-1 positively correlated with astrocyte process alignment, which was more pronounced in young hMSCs. Donor age affects outcome after cell therapy following stroke, and transplantation of young hMSC could provide better functional recovery by anti-inflammation, vessel maturation and endogenous cell migration potentially due to dominance of trophic factor secretion.

研究分野：脳梗塞

キーワード：脳梗塞 再生医療 幹細胞 年齢

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞に対する超急性期の治療として tPA 静注や血管内治療による急性期再開通療法は脳梗塞患者の予後を改善し、標準治療として確立されてきている。しかしながら、一旦脳梗塞を発症し、麻痺や失語、嚥下障害などを来した場合、治療法としてはリハビリテーションが主体となり十分な機能予後の改善が得られない。細胞移植療法は脳梗塞による後遺障害を改善する可能性を秘めた治療である。現在、日本でも骨髄間葉系幹細胞を用いた脳梗塞に対する治験が進行中であり(Honmou et al. *Brain*. 134 1790-807 2011)、全世界で多くの Clinical study が進行中である(*Stem cells and development*. 2013;22:2095-2111)。最大限の治療効果を得るために至適条件(投与方法、投与時期、投与量、最適なドナーなど)を決定する必要がある。我々は経頸動脈的投与において至適投与時期、投与量の検討を行ってきた(Iahizaka et al. *Stroke*. 2013 Mar;44(3):720-6, Fukuda et al. *Cell Mol Neurobiol*. 2015 Apr;35(3):399-406)。今回我々は至適ドナーについて検討を行った。

2. 研究の目的

幹細胞の老化により様々な機能障害の報告がある(Oh J et al. *Nat Med*. 2014 Aug;20(8):870-80.)。脳梗塞の多くは高齢者に発症する。自家移植を考える場合、投与細胞も高齢化し、十分な治療効果が得られるかは不明である。そこで我々は脳梗塞に対する細胞治療において、ドナーの加齢が治療効果に及ぼす影響(治療効果とその影響したメカニズム)について検討した。

3. 研究の方法

骨髄間葉系幹細胞(MSC)における加齢の液性因子に与える影響(*in vitro*): 年齢の異なるヒト MSC を購入。MSC の分泌する液性因子について、Luminex assay を用いてその Conditioned Medium を解析し、2 群(Young 群、Old 群)において比較した。

Functional recovery の評価。SD Rat を用いて中大脳動脈再灌流モデルを作成。脳梗塞作成翌日に Young (24 歳男性由来 MSC 100 万個)、Old (64 歳男性由来 MSC 100 万個)、Control (PBS)のいずれかを経頸動脈的に投与。21 日目まで modified Neurological severity score (mNSS)を用いて評価した。

Rat brain homogenate (発症 7 日後)を作成し、液性因子を Luminex assay と ELISA を用いて評価。

組織学的解析。発症後 21 日で Rat を Sacrifice し、Rat brain を摘出。Anti-inflammation, angiogenesis,

neurogenesis について検討。

4. 研究成果

MSC の分泌する液性因子の解析では Platelet derived growth factor (PDGF)-BB は Young 群で有意に分泌が増加しており、PDGF-BB の値は年齢と負の相関が得られた。

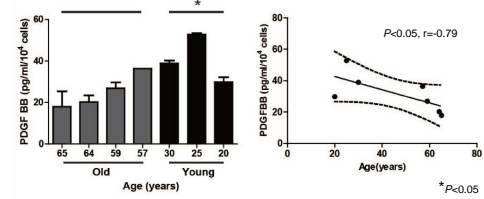


Figure 1

Functional recovery の検討では Young 群は D7 から Control 群と比較し有意な functional recovery を示し、D14 からは Old 群と比較し有意に functional recovery を認めた。

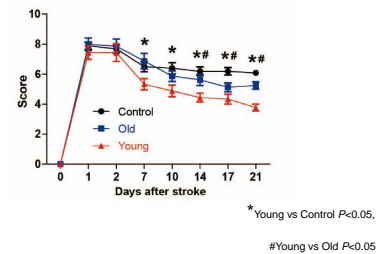


Figure 2

Rat brain homogenate による液性因子の検討では Brain derived neurotrophic factor (BDNF) の値は細胞投与群で control 群に比べ有意に高値であったが、Young 群と Old 群では差がなかった。Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) の値は Young 群で Old 群に比べ有意に高値であった。

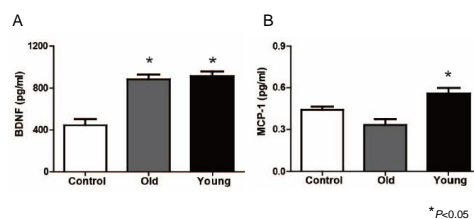


Figure 3

組織学的解析(D21)

脳梗塞範囲に 3 群間で有意差はないものの、Young 群において他の 2 群に比べ有意に脳委縮は抑制されていた (Figure 4A)。Peri-infarct cortex における免疫組織学的解析で、Anti-inflammation 効果に関しては Young 群において他の 2 群に比べ有意に炎症は抑制されていた (Figure 4B)。Angiogenesis においては Young 群において他の 2 群に比べ有意な Pericyte を伴った血管新生 (matured angiogenesis) を認めた (Figure 4C)。Neurogenesis においては Young 群におい

て他の2群に比べ有意に多い神経幹細胞の遊走を認めた(Figure 4D)。

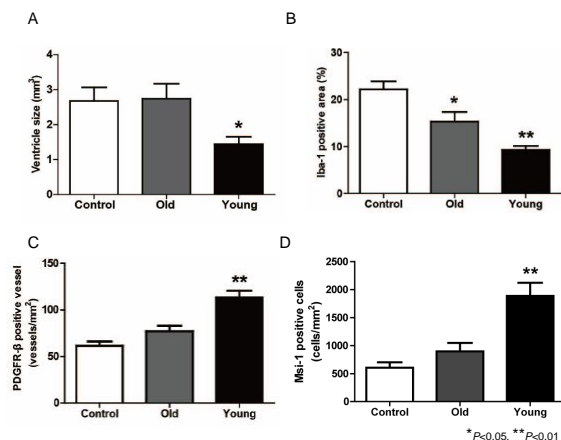


Figure 4

結論

脳梗塞後の MSC の投与において、若年者の MSC は高齢者の MSC に比べて神経学的改善を認めた。そのメカニズムは MSC の分泌する液性因子の違いにより、抗炎症効果、血管新生効果、神経再生効果に違いが出ることが考えられた。

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)

・ A case of emergent carotid artery stenting and thrombectomy with penumbra system for tandem internal carotid artery occlusion: case report. Susumu Yamaguchi, Nobutaka Horie, Kentaro Hayashi, Ayumi Debata, Shuji Fukuda, Yoichi Morofuji, Takeshi Hiu, Tsuyoshi Izumo, Takayuki Matsuo, Izumi Nagata. JNET 8:231-237, 2014 (査読あり)

・ Bow Hunter's stroke due to stretching of the vertebral artery fenestration: A case report. Susumu Yamaguchi, Nobutaka Horie, Keishi Tsunoda, Yohei Tateishi, Tsuyoshi Izumo, Kentaro Hayashi, Akira Tsujino, Izumi Nagata. NMC Case Report Journal 2015;1:9-11(査読あり)

・ The stent placement for acute basilar artery occlusion in Japan. Susumu Yamaguchi, Kentaro Hayashi, Nobutaka Horie, Yohei Tateishi, Shuji Fukuda, Tsuyoshi Izumo, Akira Tsujino, Izumi Nagata. J Neurol Disord Stroke. 2014;2(2): 1049. (査読あり)

{ 学会発表 } (計 7 件)

・ Donor age drastically affects structural and functional recovery after cell therapy following ischemic stroke. Susumu Yamaguchi, Nobutaka Horie, Katsuya Satoh, Takeshi Ishikawa, Tsuyoshi Mori,

Yoichi Morofuji, Tsuyoshi Izumo, Noriyuki Nishida, Takayuki Matsuo. International Stroke Conference.2016年2月17-19日 Los Angeles (U.S.A)

・ Intra-arterial cell transplantation therapy with bone marrow mesenchymal stem cell following ischemic stroke

~Exploring optimal administration condition~. 【シンポジウム「脳梗塞細胞療法 - 現在と展望」】山口将, 堀江信貴, 佐藤克也, 石川岳志, 森剛志, 前田肇, 諸藤陽一, 出雲剛, 西田教行, 松尾孝之. Stroke 2016年4月14~16日 ロイトン札幌(札幌)

・ 脳梗塞に対する間葉系幹細胞移植の効果はドナーの年齢に依存する ~ 内在性神経幹細胞遊走の違い ~ 山口将, 堀江信貴, 佐藤克也, 石川岳志, 森剛志, 前田肇, 諸藤陽一, 出雲剛, 西田教行, 松尾孝之. 脳神経外科学会 2015年10月14~16日 ロイトン札幌(札幌)

・ 脳梗塞に対する間葉系幹細胞移植の効果はドナーの年齢に依存する ~ 内在性神経幹細胞遊走の違い ~ 山口将, 堀江信貴, 佐藤克也, 石川岳志, 森剛志, 前田肇, 諸藤陽一, 出雲剛, 西田教行, 松尾孝之. 脳循環代謝学会 2015年10月30~31日 富山国際会議場(富山)

・ Functional Recovery Depends on Donor Age after Stem Cell Transplantation for Stroke. Susumu Yamaguchi, Nobutaka Horie, Katsuya Sato, Takeshi Ishikawa, Hajime Maeda, Yoichi Morofuji, Tsuyoshi Izumo, Kentaro Hayashi, Noriyuki Nishida, Takayuki Matsuo. International Stroke Conference.2015年2月11-13日 Nashville (U.S.A)

・ 脳梗塞に対する間葉系幹細胞移植の効果はドナーの年齢に依存する ~agingによる影響 ~ 山口将, 堀江信貴, 佐藤克也, 石川岳志, 森剛志, 前田肇, 諸藤陽一, 出雲剛, 林健太郎, 西田教行, 松尾孝之. Stroke 2015年3月26~29日 リーガロイヤルホテル広島(広島)

・ 脳梗塞に対する間葉系幹細胞移植の効果はドナーの年齢に依存する ~agingによる影響 ~ 山口将, 堀江信貴, 佐藤克也, 石川岳志, 森剛志, 前田肇, 諸藤陽一, 出雲剛, 林健太郎, 西田教行, 松尾孝之. 脳循環代謝学会 2014年11月20日~22日岡山コンベンションセンター(岡山)(最優秀ポスター賞受賞)

{ 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
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