

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861163

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた脳梗塞再生医療の臨床実用化に関する研究

研究課題名(英文) Basic research for clinical application of iPS cells in regenerative therapy for stroke

研究代表者

大木 宏一(Oki, Koichi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10348633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞の新規治療法として神経幹細胞移植が考えられているが、適切な移植時期の検討は行われていない。従来は脳梗塞後急性期での移植の検討が多く行われていたが、本研究ではマウス脳梗塞モデルで亜急性期に細胞を移植し、効果と機序を検討した。

脳梗塞3週後の亜急性期においても、iPS細胞由来神経幹細胞の移植により機能回復が促進された。しかし非移植群においても徐々に機能障害は回復し、梗塞14週後の時点では両群に大きな差異は認められなくなった。また機能回復の促進は移植細胞の生存とは関連がなく、この効果は移植細胞が新規神経回路を構築するneural replacement効果によるものではないと推測された。

研究成果の概要(英文)：Recently, transplantation of neural stem cells has been considered as a novel treatment for stroke. However, the optimal time for transplantation has not been investigated. In the previous basic research, transplantation was usually done in the acute phase of stroke. In this study, we transplanted cells in the subacute phase of stroke in mice, and evaluated the effects and its mechanism. Transplantation of neural stem cells derived from iPS cells at 3 weeks post stroke accelerated functional recovery compared to the group without cells, which indicates transplantation at subacute phase was effective for functional recovery. However, mice without cell transplantation also showed gradual recovery and the difference between group with cells and without cells was diminished at 14 weeks post stroke. Accelerated function recovery was observed in the mice where grafted cells were not survived. This indicates accelerated function recovery was caused by mechanisms other than neural replacement.

研究分野：脳卒中

キーワード：脳梗塞 神経幹細胞 iPS細胞 細胞移植 機能障害 行動解析 亜急性期

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、主要な死因であるとともに機能障害を来す最大の原因疾患であり、急激な高齢化社会の進行中、新たな治療法の開発は急務である。現在脳梗塞に対する根本的な治療は、発症後 4.5 時間以内の rt-PA を用いた血栓溶解療法のみであり、後遺症による機能障害への治療はリハビリテーションがメインである。一方近年の神経科学や幹細胞研究の発展により、幹細胞移植による脳梗塞治療が革新的な治療として研究されている。現在細胞移植療法としては、骨髄間葉系幹細胞や造血幹細胞といった非神経系の細胞移植と、induced pluripotent stem cells (iPS 細胞:人工多能性幹細胞)や embryonic stem cell (ES 細胞: 胚性幹細胞)由来の神経幹細胞の移植の二つが主に研究されている。動物を用いた基礎実験では、非神経系細胞の移植においては、抗炎症効果、内在性神経新生・血管新生作用、神経保護効果等を介して機能回復が得られていると考えられているが、移植細胞による損傷脳の細胞置換による効果は乏しい。一方 iPS 細胞由来の神経幹細胞移植に関しては、上述の非神経系細胞移植におけるさまざまな機序の他に、移植細胞が機能的な神経細胞に分化することが確認されており、「失われた神経組織を再生する」効果において、神経幹細胞移植は重要なツールと考えられている。しかし一方で、臨床応用への過程を考えると、非神経系細胞の移植療法に関しては既にいくつかの臨床研究が行われているが、iPS 細胞由来神経幹細胞の移植療法の臨床応用に関しては、

- ・適切な投与時期の確定
- ・適切な投与ルート(定位的注射(開頭手術)、経動脈的、経静脈的)
- ・iPS 細胞の特性である「腫瘍化」を抑える方法の確立
- ・基礎実験で使用されている動物由来の製剤を除いた、ヒトに使用できる good manufacturing practice (GMP) 基準の細胞培養方法の確立

等の克服しなければならないさまざまな課題が残されており、臨床応用へのハードルは高い。従って iPS 細胞を脳梗塞の治療として臨床応用するには、その過程を埋める橋渡し研究が必要となってくる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS 細胞由来神経幹細胞の移植療法の臨床応用に際して必要な基礎データを確立することである。具体的には、腫瘍化の観点から適切な神経幹細胞培養法の比較、細胞移植時期の比較(脳梗塞後急性期、亜急性期、慢性期)、細胞移植経路の選定(定位的脳内移植と経動脈的投与)について検討を行うことが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、成体マウスに脳梗塞を作成した 3 週間後に、iPS 細胞由来神経幹細胞または vehicle (対照群)を脳内に定位的に移植し、各種行動解析を繰り返し行った。その後移植 11 週後の段階で脳を摘出し、組織学的検討を行った(図 1)。

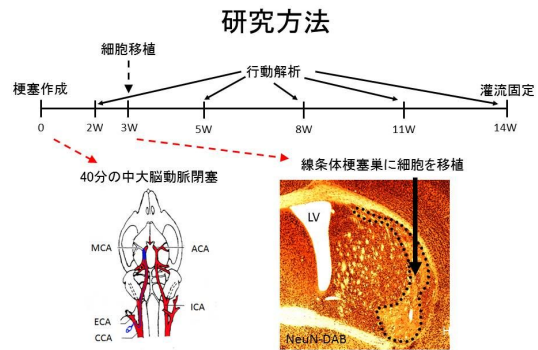


図 1 研究方法

詳細は以下のとおりである。

(1) 脳梗塞の作成

雄性 C57BL6 マウス(梗塞作成時 11 週齢)を用いて、suture 法による 40 分間一過性中大脳動脈閉塞(MCAO)により線条体梗塞を作成した。(梗塞群 n=11, sham 群 n=5)

(2) iPS 細胞由来神経幹細胞の調整と移植

脳梗塞を作成した 11 匹は、細胞移植を行った cell 群(n=6)と、vehicle を投与した vehicle 群(n=5)の 2 群に振り分けた。脳梗塞作成 3 週間後に、cell 群は neurosphere 法にて神経幹細胞に分化させた iPS 細胞(100,000 個)を脳線条体に移植し、vehicle 群は、cell 群と同量の細胞培養液を同部位に投与した。sham 手術を施行した群では vehicle を投与した。(sham 群(n=5))。これ以降すべての動物に対して、脳を摘出するまで免疫抑制剤(シクロスポリン)の投与を行った。

(3) 行動解析

脳梗塞作成後、2 週間(移植 1 週前)、5 週間(移植 2 週間後)、8 週間(移植 5 週間後)、11 週間(移植 8 週間後)、14 週間(移植 11 週間後)の時点において、2 つの行動解析(staircase test, cylinder test)を行った。

(4) 脳切片組織学的検討

脳梗塞作成 14 週間(移植 11 週間後)の時点で灌流固定を行い、脳を摘出した。摘出脳は 30 μ m 厚の切片として薄切し、cresyl violet 染色で梗塞巣+脳萎縮を測定、また HuNu, SC121, Nestin, Ki67 等の各種抗体を用いて免疫組織学染色を行い、移植細胞の生存・増殖・分化を検討した。

4. 研究成果

(1) 移植細胞の生存と分化

梗塞 14 週後の摘出脳における免疫組織学的検討により、脳梗塞作成後に iPS 細胞由来神経幹細胞を移植した 6 匹のうち、4 匹では移植細胞の生存は認められず、1 匹では僅かに線条体部に生存、もう 1 匹では梗塞線条体の多くの領域を占めるような多数の移植細胞が確認された。(移植細胞の染色についてはヒト特異的タンパクを認識する抗 HuNu 抗体及び抗 SC121 抗体を使用し、移植細胞の生存に関して二重に確認を行った。) 移植細胞の分化については現在追加染色中である。多数の移植細胞が残存した個体での移植細胞は Ki67 が一部で陽性であり、移植 11 週後の段階でも増殖能が残っていると解釈される。

(2) 移植細胞による機能回復効果 (行動解析)

左右肢の運動能力の非対称性を測定する Cylinder test においては、脳梗塞による機能障害をうまく検出することが不可能であった。

前肢の巧緻運動の機能を測定する staircase test(図 2)においては、MCAO による梗塞作成の 2 週間後において機能障害が確認された(青線 vehicle 群と赤線 cell 群)。梗塞 5 週後(移植 2 週後)の段階では、両群とも機能回復を示した。その後細胞移植を行った cell 群は機能回復が継続しほぼ正常レベルまで改善したが(赤線)、移植を行っていない vehicle 群ではその回復が緩徐であり(梗塞 8 週後の時点で $p = 0.029$)梗塞 14 週後(移植 11 週後)の時点において初めて、cell 群と有意差のないレベルまで回復した(青線)。この結果から、両群において最終的な機能回復が認められたが、細胞移植群においてはその機能回復が促進される可能性が示された。

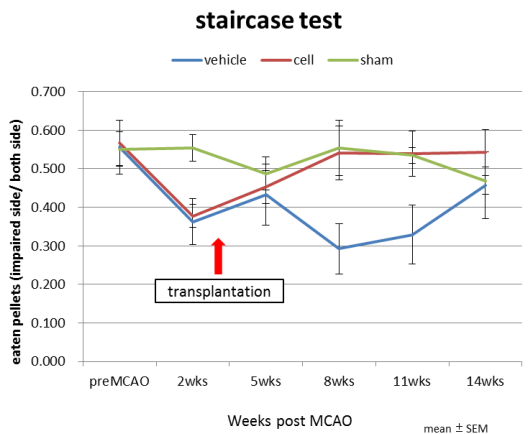


図 2 行動解析 (staircase test)

(3) 梗塞及び脳萎縮体積の算出

Cresyl violet 染色によって梗塞巣及び脳萎縮の体積を計算し、非梗塞半球体積との比として表した(図 3)。細胞移植群と非移植群では有意な差を認めなかった。

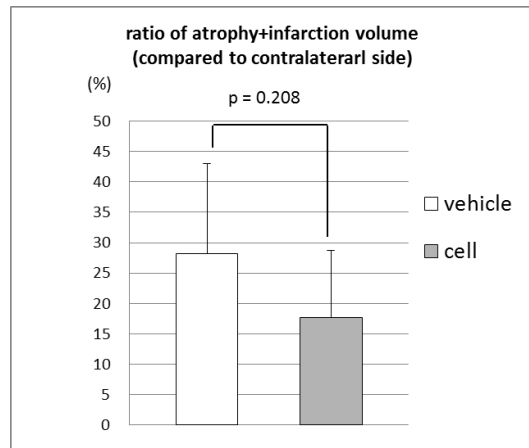


図 3 脳梗塞 + 脳萎縮体積比率

(4) 上記結果のまとめと今後の展望

行動解析の結果より、iPS 細胞由来神経幹細胞の移植によって脳梗塞後の機能回復が促進される可能性が示されたが、最終的には非移植群でも機能回復が認められた。またその機能回復は必ずしも細胞の生存は必須ではなく、また梗塞体積の縮小を介したのではないことが類推された。

臨床の場合においても早期の機能回復は社会復帰の面からも重要な点であるので、iPS 細胞由来神経幹細胞の移植に一定の効果があると考えられるが、移植療法の最終目標はいかなる治療を行っても残存した機能障害を回復することであり、機能障害が長期にわたり残存するような脳梗塞モデル自体の改良が急務であると考えられた。本研究の 2 年目においては、脳梗塞モデル動物作成法の改良やその機能障害を評価するための新たな行動解析の開発に時間を費やした。今後この方法を用いてさらなる研究を進展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 大木宏一, iPS 細胞を用いた脳梗塞の幹細胞治療 神経治療学 査読無 32 2015, 93-97

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 大木宏一. iPS 細胞を用いた脳梗塞に対する神経組織再生治療の展望. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会 シンポジウム. 2015 年 10 月 30 日. 富山国際会議場 (富山県富山市)

2. 大木宏一 . 脳梗塞の幹細胞治療 . 第 14 回日本再生医療学会総会 . 2015 年 3 月 21 日 . パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
3. 大木宏一 . iPS 細胞を用いた脳梗塞の幹細胞治療 . 第 32 回神経治療学会総会 . 2014 年 11 月 21 日 . 東京ドームホテル . (東京都文京区)

〔図書〕(計 2 件)

1. 大木宏一 . 日本臨床社 , 日本臨床 増刊 5 再生医療 , 2015 , 261-269
2. 大木宏一 , 岡野栄之 . 日本臨床社 . 日本臨床 増刊 5 最新臨床脳卒中学(上) , 2014 , 453-458

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大木 宏一 (Koichi Oki)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 10348633

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし