

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861165

研究課題名(和文) 霊長類(マーモセット)脳梗塞に対するヒトiPS細胞由来神経幹細胞を用いた移植治療

研究課題名(英文) Transplantation therapy using Neural stem / progenitor cells derived from human iPSCs for the cerebral infarction of primates(marmosets)

研究代表者

井上 賢 (Inoue, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：70445378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞の再生医療は、霊長類の実験なしに、齧歯類の実験のみで臨床試験が開始され、多くが頓挫している。そこで、霊長類の脳梗塞モデルを作成し、神経幹細胞(NS/PC)移植を行って一連の評価系を確立する。これまでの研究で、マーモセットに対する低侵襲の一過性右中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを確立し、小動物用MRIと小動物用PETを用いてペナブラを推定し、移植治療のターゲットを決定できるようになった。細胞移植では、マーモセット胎児由来のNS/PCを2匹に移植し、コントロール1匹と比べ機能回復が促進するかどうかが行動評価および画像評価にて調べた。現在、脳切片の組織学的評価を行っており、論文作成中である。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine for cerebral infarction has started clinical trials only with rodent experiments without primate experiments, and many are abandoned. Therefore, a cerebral infarction model of primates is prepared and a series of evaluation systems are established by transplanting neural stem cells (NS / PC). We have established a less invasive and stable transient right middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for marmosets, and succeeded in estimating the penumbra using small animal MRI and PET for small animal and determining the target for transplantation treatment. In cell transplantation, NS / PC derived from marmoset embryo was transplanted into 2 animals, and whether or not functional recovery was promoted was examined in comparison with the control by behavioral evaluation and image evaluation. Now, histological evaluation of brain slices is underway, and papers are being prepared.

研究分野：脳梗塞

キーワード：霊長類 マーモセット 脳梗塞モデル 移植治療 神経幹細胞 MRI PET 中大脳動脈閉塞

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中は日本人死因の第3位で、そのうち60%は脳梗塞とされる。また多くの場合後遺症を伴うなど非常に重要な疾患であるが、現在梗塞巣に対する有効な治療法は存在しない。また後遺症に対する根本的治療法は皆無であり、抜本的な治療法開発が待たれる。

これまで様々な研究が行われており、マウス脳梗塞に対するマウス及びヒトiPS細胞由来神経幹細胞(iPSC-NS/PC)移植により機能回復が促進することが明らかになり、また中枢神経系の疾患として脊髄損傷では、サルに対するヒトiPSC-NS/PC移植により、その安全性および有効性が確認され、脳梗塞も脊髄損傷も臨床試験が行われ始めている。しかし脊髄損傷と違い脳梗塞では、霊長類を用いた実験の報告がないまま臨床試験が開始され、多くが頓挫している。げっ歯類はヒトと比べ遺伝的、解剖学的、生理学的、薬理学的に多くの相違点があるためと考えられる。

治療効果の解明のため霊長類モデルが必要だが、一般的な方法が依然として開発されておらず、これまで報告されたいくつかの脳梗塞モデルでは開頭、眼球摘出を要するなど高侵襲であり、術後の予後、行動学的評価の観点から問題があった。また霊長類は非常に高価かつ数に限りがあり、倫理的にも低侵襲で安全にモデルを作成する必要がある。近年、コモンマーモセット(*Callithrix jacchus*, 以下マーモセット)は体型が小さく比較的飼育が容易、多産などの理由で、日本国内の研究対象として普及してきた。さらに最近、研究代表者の所属する研究室にてtransgenic marmoset が確立され(Sasaki et al., Nature 2009)、実験動物としての有用性が非常に注目されている。

こうした背景のなか、我々はマーモセットを用いた脳梗塞モデルの作成に取り組んでいた。本モデルが確立できれば、人により近い脳梗

塞を実験的に作り出し、その病態生理、治療法などを検討することが可能であるからだ。

## 2. 研究の目的

我々はコモンマーモセットの脳梗塞モデルを用い、病態解析と治療法開発を行いたいと考えている。しかしコモンマーモセットでの低侵襲脳梗塞作成法は確立されていない。そこで本研究の目的は、以下の2項目とする。

1) コモンマーモセットを用いた低侵襲脳梗塞モデルの確立。2) 開発された脳梗塞モデルを用いた、幹細胞(胎生幹細胞、iPS細胞など)移植治療の評価。

これらの目的を達成するために、我々はマーモセットを用いた一過性中大脳動脈閉塞モデル(transient middle cerebral artery occlusion, MCAO モデル)の作成を試みた。同モデルは、右中大脳動脈を閉塞し局所脳梗塞を作る、ヒト脳梗塞に近い病態の観察が可能なモデルである。これまでの報告と異なり、我々は開頭不要な低侵襲モデルの作成を試みた。げっ歯類モデルと同様に、塞栓糸を頸部動脈より挿入し、中大脳動脈を閉塞する方法をマーモセットにも採用できないか、検討を繰り返してきた。しかしげっ歯類と異なり、マーモセットにおいては頭蓋内内頸動脈の屈曲が複雑化し塞栓糸の挿入が極めて困難で、これがこれまで同モデルが確立できなかった原因と考えられた。本問題点を克服すべく、我々は至適塞栓糸の条件を検討し、ついにヒト用マイクロガイドワイヤーを用いることでMCAOモデル作成を可能とした。本モデルの行動学的解析と組織学的解析とともに、MCAOモデルの確立を目指す。また霊長類における虚血時の神経新生についても観察を行い治療の可能性について検討する。さらにモデル確立が達成できた後に、細胞療法、特に脳への細胞移植による脳梗塞治療の可能性についても検討を行う。

## 3. 研究の方法

## (1) MCAOモデル作成手術

### 手術

手術は実験動物中央研究所内の動物用手術室にて行う。コモンマーモセットを全身麻酔下にて右頸部、胸鎖乳突筋前縁におよそ1.5cmの皮切をおく。手術用顕微鏡下にて右総頸動脈を確保する。これを遠位側に追跡し内頸動脈、外頸動脈を剖出。外頸動脈は塞栓糸が挿入可能な長さを確保し、その遠位を結紮切断する。総頸動脈、内頸動脈を血管クリップにて遮断する。外頸動脈に切開を加え、塞栓糸を内頸動脈に向かって挿入する。これまでの検討で、塞栓糸の先端径0.4-0.5mm、挿入長28mm以上が至適と判明した。現時点ではヒト血管内手術用マイクロガイドワイヤーを用い、継続して梗塞モデル作成が可能となってきた。全身麻酔を継続したまま実験動物中央研究所内のMRI室に移動させ頭部MRIを施行する。術中MRアンギオにて中大脳動脈の閉塞を確認する。右中大脳動脈の閉塞を確認できたら、計3時間の遮断を行う。その後塞栓糸を抜き、クリップを解除し縫合閉創する。

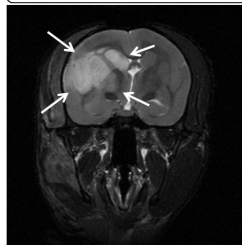
### 術後モデル行動学的評価

術後モデル動物は左不全片麻痺を認める。術後経時的に、Kitoらの方法(Kito Get al., J Neurosci Methods 2001)、あるいはMIKY scoringを用い行動学的評価を行う。更なる巧緻運動については、慶應義塾大学理工学部、牛場潤先生のご協力のもと、ハイスピードカメラを用いた前肢の動きの評価も行った。

### 術後モデルの頭部MRI撮像

脳虚血後の神経新生を評価するために、BrdUの腹腔内投与を2週間行う。術後1週間後、4週間後に頭部MRIを全身麻酔下にて施行し梗塞巣の画像評価を行う。1週間後T2強調画像にて高信号域(白色)として明瞭に梗塞巣を観察することができる(下図)。

図 脳梗塞モデル頭部MRI



マーモセット脳梗塞モデル術後一週間後のMRI T2強調画像。梗塞巣が高信号域(矢印)として描出されている。

### 術後モデル組織学的評価

術後6週間後に全身麻酔下にて灌流固定を行う。抗NeuN抗体を用いた免疫染色にて、モデル脳の組織学的評価を行う。さらにBrdU免疫染色により、神経新生を観察する。梗塞側大脳半球において神経新生が促進される可能性がすでに示唆されている。手術が不成功に終わった場合にはコントロールとして組織学的検討を進める。組織学的検討には名古屋市立大学生理学教室の澤本和延先生、金子奈穂子先生のご協力をいただいた。

### (2)PET(positron emission topography)を用いた脳梗塞巣評価法の確立

PETは脳代謝、血流の評価が可能な検査として臨床上也非常に有用な検査である。しかし動物モデルにおいてPETを施行する場合、全身麻酔下にて撮像する必要がある。全身麻酔下では脳代謝は著明に低下するために、脳梗塞巣と健常脳の相違の評価に支障をきたす可能性がある。したがってヒトでよく用いられる核種、例えばFDGでは炎症性細胞にも集積するなどマーモセット脳梗塞を正確に評価できない可能性が大きい。そこでまずはマーモセット脳梗塞モデルに適切な核種の選定をしなくてはならない。しかしこれまで霊長類脳梗塞モデルでのPET撮像の報告がないため、FDG、中枢性ベンゾジアゼピンレセプターリガンド、末梢性ベンゾジアゼピンレセプターリガンド、ミトコンドリアのComplex1に対するリガンドであるBCPP-EF(浜松ホトニクス作成)などを用いて脳梗塞を評価する。頭部MRI画像と比してもっとも

梗塞巣を正確に描出できる核種を選定した。同核種を用い、脳梗塞モデル作成前、作成 2、4 週間後に PET の撮影を全身麻酔下にて施行し、脳梗塞後の脳代謝について評価を行った。

### (3) 細胞移植

作成したモデルに対し、移植治療を行い、評価モデルとして有効かどうかを検討する。本モデルでは主として右基底核を中心に皮質を含む梗塞巣が形成される。梗塞巣近傍に正確に細胞を移植するために、定位的細胞移植手術を試みた。マーモセット脳梗塞モデル作成後 15 日目の亜急性期脳梗塞モデルを、全身麻酔下にマーモセット用頭部固定器に装着する。移植部位は、理想的には梗塞巣の中心部分を避け、その周囲に存在しているペナンプラ領域であると考えた。実際には PET 画像で代謝が低下している梗塞巣周囲部分をターゲットとするが、MRI 画像上の評価で、脳梗塞になっている基底核および、MRI では脳梗塞になっていない皮質の 2 カ所とした。移植に用いる細胞は、共同研究を行っている岡野研究室よりご供与いただいた、マーモセット胎児前脳由来の神経幹細胞を用いた。同細胞をニューロスフェア法で培養し、tertiary スフェアを移植に用いた。移植細胞数は、モデル 1 匹に対し 120 万個 (60 万個を 2 カ所)、別モデル 1 匹に対し 160 万個 (80 万個を 2 カ所) の細胞を移植した。具体的には上記移植部位の座標を頭部 MRI の所見より算出し、マーモセット用頭部固定器の座標を設定する。マーモセットモデル頭部にドリルで小窓を作成し、ハミルトンシリンジ針を座標まで挿入する。上記細胞をゆっくり注入し、針をゆっくり抜去した後に閉創した。移植後の免疫抑制は、FK506 を低用量で連日投与した。移植前後の脳代謝を比較するためにモデルの PET 撮影を、移植前、移植 2 週間後、移植 4 週間後に施行した。術後は 4 週間後に灌流固定後、脳を摘出し組織学的検討を行った。術後 MRI 撮影も施行した。

## 4 . 研究成果

### (1) MCAO モデルの確立

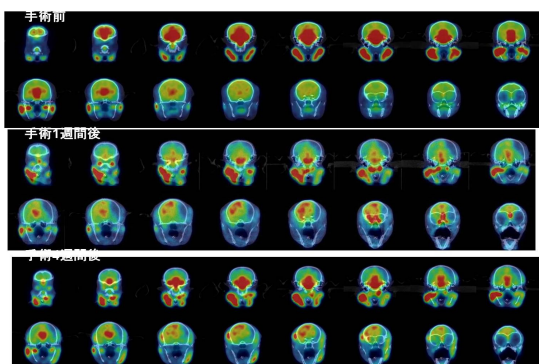
霊長類 (コモンマーモセット) を用い、継続的に安定した脳梗塞モデルを作成できるようになった。当初は塞栓糸の挿入が非常に困難で、脳梗塞が得られないことがあったが、ヒト血管内手術用ガイドワイヤーを用いることで、ほぼ連続して右中大脳動脈が閉塞できるようになった。手術における技術的な向上も理由の 1 つと考えられた。梗塞巣の大きさに若干むらがあったが、術中の酸素投与量を減量する (100% → 20%) ことで、継続して皮質を含み、大脳基底核を網羅し得る広範囲な脳梗塞作成が可能となった。

脳梗塞モデルの行動学的解析を行った。従来報告してきた、Kito's scoring、MIKY scoring において、術後 4 日から 7 日目まで、特に活動性の低下、右前肢、後肢の動きの低下、バランスの悪さなどが増悪したが、術後 7 日目を過ぎると改善傾向が認められた。しかしながら術後 6 週間までの観察では完全な回復は認められなかった。行動学的評価を繰り返すうちに、従来の行動学的評価では数値化できない運動低下をきたしていることに気づいた。そこで、さらに詳細な行動学的評価を加えるために、高速ビデオ撮影を用いた観察を行った。その結果、歩行路上での麻痺側の前後肢の引き摺りや、ハシゴの昇降時の患側の踏み外しなど、肉眼では確認できなかったより詳細な検討が可能となった。

術後の組織学的検討では、NeuN 抗体を用いた免疫染色において梗塞巣に一致して広範囲な神経細胞の脱落が認められた。梗塞を来たした患側脳において BrdU 陽性細胞が多く観察され、細胞分裂が盛んに行われていることが示唆された。BrdU 陽性細胞を同定するために各種抗体を用いた多重免疫染色を施行したが、神経細胞の新生はごくわずかしが認められず、ほとんどがグリアの新生であった。

### (2) 脳梗塞モデルにおける PET 撮像

前述したとおり、マーモセット脳梗塞における PET 撮像の報告が無い中、多く使用されている核種の FDG では評価困難であることが判明した。様々な検討の結果、心筋の評価で使われている特殊な核種、BCPP-EF が脳にも使用できることが分かった。同核種を用い脳梗塞前後での PET 撮像を行った。脳梗塞巣が MRI T2 強調画像上の梗塞巣とほぼ一致する範囲で核種の集積低下が認められた。正常側に比して 40%集積低下した部位が、MRI 上の T2 高信号域に一致。さらに 60%集積低下した部位が、最終的な脳梗塞に陥ることが示唆された。このように、梗塞巣の代謝を中心とした生理学的検討も可能となった（下図）。



### (3) 細胞移植

細胞移植は可能であった。現在移植モデルについての放射線学的、また組織学的解析を行っている最中である。

### (4) まとめ

本研究の目的であった、マーモセットを用いた低侵襲脳梗塞モデル作成は確立され、統一した手技によって信頼度の高い確率で作成が可能となった。また同モデルは行動学的解析、放射線学的解析が可能であり、げっ歯類に比べ、よりヒトに近い脳梗塞モデルと考えられる。同モデルに対し細胞移植も可能であり、今後の脳梗塞治療研究に十分役立つモデルであると考えられる。現在確立されたモデルについての論文を執筆中である。

## 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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

Satoshi Inoue, Development of less invasive and transient middle cerebral artery occlusion model on Common Marmoset, Neuro2015, 2015年7月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Satoshi Inoue, Development of less invasive transient middle cerebral artery occlusion model on Common Marmoset and transplantation of NS/PCs, International Society for Stem Cell Research, 2015年6月26日、Stockholm(Sweden)

井上賢、マーモセット一過性中大脳動脈閉塞モデルに対する PET 評価と神経幹細胞移植、再生医療学会、2015年3月19日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

井上賢、マーモセット一過性中大脳動脈閉塞モデルの改良と神経幹細胞の移植治療、脳神経外科学会総会、2014年10月9日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)

Satoshi Inoue, Development of less invasive transient middle cerebral artery occlusion model on Common Marmoset and transplantation of NS/PCs, Neuro2014, 2014年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書](計 0 件)

[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

井上 賢(INOUE, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70445378

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

岡野 栄之(OKANO, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60160694

原 晃一(HARA, Koichi)

日野市立病院・脳神経外科・部長

研究者番号：60255479

峯 裕(MINE, Yutaka)

慶應義塾大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：10306730