

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16601

研究課題名（和文）羊膜由来幹細胞を用いた脳梗塞治療の基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research of amnion derived stem cells for cerebral infarction

研究代表者

白川 学（Shirakawa, Manabu）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50425112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞死を誘発する脳梗塞後の組織障害性炎症の抑制効果に注目して、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞（hAMSC）の点滴注射が脳梗塞後の症状改善に効果があるかをマウス脳梗塞モデルで検討した。脳梗塞モデル作成翌日にhAMSCを点滴投与し、1から2ヶ月後の脳梗塞に由来する神経症状を行動テストで評価したところ、hAMSC投与群では対照群に対して有意に神経症状の改善を認めた。また、そのメカニズムとして、TNF α 、MMP9、iNOSといった炎症促進性タンパク質の遺伝子発現はhAMSC投与群で有意に抑制され、顕微鏡下にも脳梗塞の病巣周囲に集積する炎症促進型の免疫細胞の数はhAMSC投与群で減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は、寝たきりにつながる後遺症と死亡の主要な原因の1つである。現在本邦での主要な脳梗塞治療は、アルテプラゼの点滴投与およびカテーテル治療による血栓回収術であるが、それらは治療可能な時間の制約が非常に大きく、治療が成功したとしても、良好な転帰を示す患者は限定されている。細胞療法は脳梗塞においては亜急性期・慢性期を対象とすること可能で、羊膜由来幹細胞は、出生後に破棄される羊膜から容易かつ低侵襲で得られる、2. 胚性幹細胞と異なり倫理的障壁がない、3. 免疫原性が低く異種移植が可能で、同種移植においても免疫抑制剤の必要性が低い、4. 腫瘍原性を示唆する報告がない、点で有利である。

研究成果の概要（英文）：Using mice brain infarction model, we evaluated the effect of intravenous administration of human amnion derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) on the neurological deficit after ischemic brain infarction in terms of their immunomodulative effect. We intravenously administered hAMSCs to the mice 1 days after induction of brain infarction. In 1-2 months, neurological deficits showed statistically significant amelioration in hAMSCs administered group compared with vehicle control. As concerns the mechanisms, mRNA expression levels of TNF α , MMP9, and iNOS, which mediates augmentation of inflammatory tissue damage, were significantly suppressed by hAMSCs administration and under fluorescent staining, cell counts of pro-inflammatory immune cells infiltrating in the peri-infarct area decreased by hAMSCs administration.

研究分野：脳血管障害

キーワード：細胞治療 羊膜由来幹細胞 脳梗塞 神経炎症 静脈内投与 マウス 行動試験

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、寝たきりにつながる後遺症と死亡の主要な原因の1つである。脳梗塞後に発生する炎症は、虚血性脳卒中の病態生理の主要な要素として近年注目されている。虚血に晒された脳では、低酸素、活性酸素種の生成、補体活性化、血液脳関門 (BBB) 透過性の亢進、セレクチンなどの接着分子の発現、および細胞内接着分子 1 (ICAM-1) の発現に続き、好中球・単球の接着と遊走、これらの免疫細胞による MMP9、TNF、NO、IL1 などの神経毒性分子の分泌が引き起こされる。これらの現象により BBB の破綻が促進され、白血球浸潤が増幅されニューロンの細胞死を招く。このプロセスは壊死した組織の除去と神経再生を促進するが、過度の炎症はしばしば組織の修復を妨害し、組織損傷を拡大する。現在本邦での主要な脳梗塞治療は、アルテプラゼの静脈内投与および機械的血栓回収術であるが、それらは治療可能な時間の制約が非常に大きく、これらの治療が成功裏に行われたとしても、良好な転帰を示す患者は限定されている。一方、ICAM1、IL1 受容体、好中球などの単一の分子経路を target として阻害する分子は、脳梗塞に対する新しい治療薬の候補として期待されているが、その効果はごく限定的であり、新しい治療法の確立が急務である。

細胞療法は近年、さまざまな神経障害の新しい治療法として期待されており、脳梗塞においては亜急性期・慢性期を対象とすること可能である。幹細胞の由来は様々なものが提唱されているが、その中でも、間葉系幹細胞には神経再生、血管新生、サイトカインの産生および免疫調節といった特徴的な生物学的効果が期待されており、その中でも羊膜由来幹細胞は、以下の点で細胞治療に際して有利な特徴を持つと考えられる。すなわち、1. 羊膜由来幹細胞は通常は出生後に破棄されることになる羊膜から容易かつ低侵襲で得られること、2. 胚性幹細胞と異なり、それらの使用に対する倫理的障壁がないこと、3. 免疫原性が低く、異種移植後の宿主反応がなく、同種移植においても免疫抑制剤の必要性が低いこと、4. 腫瘍原性を示唆する報告がないこと、である。

2. 研究の目的

我々は、ヒト羊膜からヒト羊膜由来間葉系幹細胞 (hAMSC) の分離生成、培養、治療薬としての製剤化に成功し、現在、その静脈内投与における安全性と免疫調整効果に基づく有効性の検証のため、治療抵抗性のクローン病と急性移植片対宿主病に対する第 1 相の臨床試験が行われている。これらの知見に基づいて、本研究では脳梗塞モデルマウスにおける神経脱落症状に対する hAMSC の治療効果を評価することを目的とする。さらに、その背景にあるメカニズムを明らかにするために hAMSC の脳梗塞後の神経炎症に対する免疫調節効果を評価した。

3. 研究の方法

7~9 週齢のオスの CB-17 / lcr-+ / + Jcl マウス (日本、クレアジャパン) を用い、全身麻酔下に開頭術を行って顕微鏡下に直接中大脳動脈の結紮を行って中大脳動脈永久閉塞 (MCAO) を作成した。このモデルは、1. 非常に再現性の高い皮質領域に永久虚血モデルを安定して生成できること、2. 長期生存率が高いこと、が特徴である。続いて、MCAO を作成後 24 時間後に、直視下で頸静脈から 100 μ l の hAMSC 細胞懸濁液 (4.0x10⁶ 細胞/kg) あるいは細胞培養液のみを無作為に投与し、Y 迷路テスト、ワイヤーハングテスト、水迷路学習などの行動試験を 1~2 か月後に実施し神経脱落症状に対する hAMSC 投与の有効性を検討した。

一方、その背景にあるメカニズムの解明のため、MCAO 作成 7 日目 (hAMSC 投与 6 日目) の脳の梗塞半球のサンプルを用いて、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH および TNF- α 、MMP2、MMP9、iNOS の相対的発現量を測定した。続いて、同様に MCAO 作成 7 日目 (hAMSC 投与 6 日目) の脳の梗塞半球のサンプルの凍結切片を用いて、炎症細胞浸潤の組織学的評価を免疫蛍光染色によって行った。1 次抗体は抗 iNOS 抗体 (1:500; Funakoshi, 日本)、抗 CD11b / c 抗体 (1:100; Bioss, 米国) を用い、核は 4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI; Kirkegaard & Perry Laboratories) で対比染色した。画像は、蛍光顕微鏡 BZ-X (キーエンス株式会社) を使用して撮影し、細胞計数は細胞計数ソフトウェア BZ-H3C (キーエンス社) を用いて自動計測した。組織像は、iNOS または CD11b / c 陽性細胞をカウントするために 200 倍の倍率で撮影され、AMSC 投与群と対照群の両方で、梗塞周辺領域の各 18 視野 (各群 n=3、各個体につき 2 つの冠状断面、1 つの冠状断ごとに重複しない 3 視野) において細胞数をカウントした。すべてのデータは平均 \pm 標準誤差で表現し、JMP ver. 13 (SAS Institute Inc. NC) を使用してデータ分析を行った。2 群間の比較は t 検定で、3 群間の比較は Dunnett 検定を用いた。時系列の変化は paired-t 検定を用い、有意水準は p<0.05 とした。

4. 研究成果

MCAO 作成マウス (n = 41) をランダムに高用量 hAMSC (M-high; n = 10; 4.0x10⁶ 細胞/kg) 投与群、低用量 hAMSC (M-low; n = 10; 2.0x10⁶ 細胞/kg) 投与群、対照群 (M-vehi; n = 11)、偽手術群 (S-vehi; n = 11) に分け 1-2 ヶ月後に行動試験を行った。

空間学習と記憶を評価する Y 迷路テストでは、M-vehi と比較して、M-high で改善が見られた (p < 0.05) (図 1)。さらに、水迷路テストは、M-vehi と比較して、M-high において、空間学習と記憶の回復が示唆された (p < 0.05) (図 1)。学習と記憶機能に関して受動回避テストでは M-vehi

グループよりも M-high で改善された ($p < 0.05$) (図 1)。さらに、ワイヤーハングテストは、M-vehi と比較して、M-high で有意な潜時延長を示し、M-high での運動機能の回復が示唆された ($p < 0.05$) (図 1)。最後に、これらの行動試験のスコアはすべて、M-vehi が S-vehi よりも有意に悪く、M-low では統計学的な有意差は示さないものの、M-vehi と比較して改善を認める傾向にあった (図 1)。以上の結果より、記憶障害や運動機能低下などの神経脱落症状が MCAO マウスモデルの脳梗塞によって引き起こされ、hAMSC の急性期投与により用量依存性に改善されたことが示唆された。

次に、MCAO 作成の翌日に高用量 hAMSC をマウスに静脈内投与し、MCAO 作成 7 日目の脳梗塞巣サンプルで炎症性サイトカインの mRNA 発現状況を検討した (図 2)。

iNOS、MMP2、MMP9、および TNF の mRNA 相対的発現量は、偽手術群と比較して対照群で有意に高く ($p < 0.01$)、hAMSC 投与群では有意に抑制されていた ($p < 0.01$) (図 2)。以上の知見より、hAMSC の投与により、脳梗塞の病態形成の初期段階で梗塞巣周囲の炎症性サイトカインの mRNA 発現量が抑制することが示唆された。

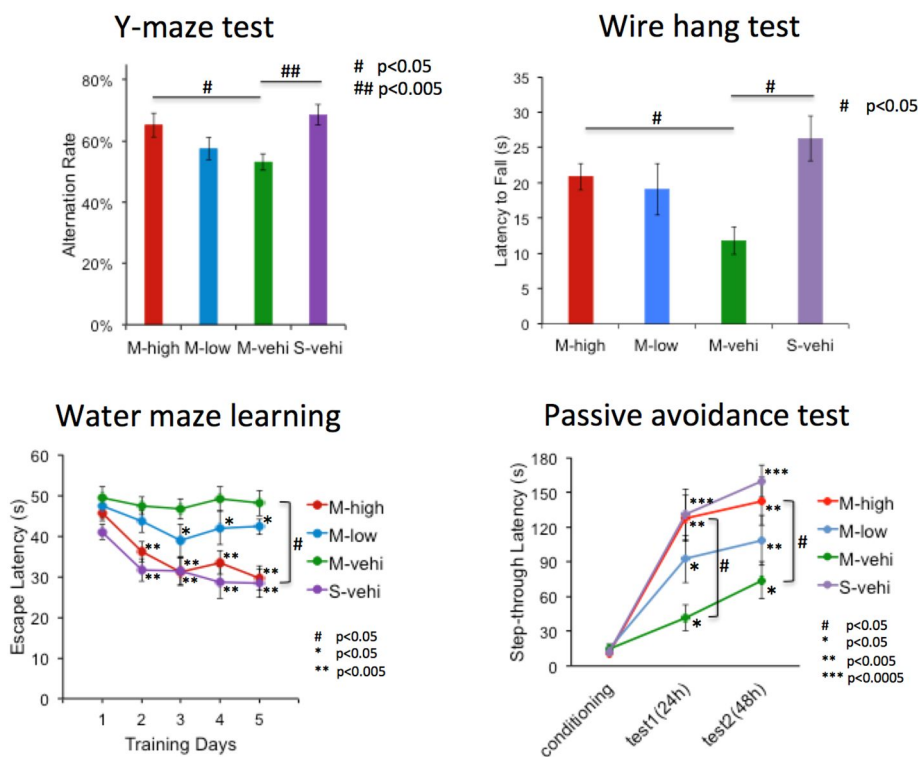
最後に、神経毒性を有する炎症惹起型の形質を持つ免疫担当細胞の病理学的な分布と細胞数を検討するために、MCAO 作成 7 日後 (高容量 hAMSC 投与 6 日目) に梗塞巣の凍結切片の蛍光免疫染色を行った。

その結果、脳梗塞辺縁領域で CD11b/c 陽性免疫細胞の集積を認め、iNOS 陽性細胞の分布は、CD11b/c 陽性細胞の分布と同様の傾向を示した (図 3)。また、CD11b/c 陽性免疫細胞の数に対して、対照群と比較したところ、hAMSC 投与群の梗塞辺縁領域では、iNOS 陽性細胞と iNOS および CD11b/c の共陽性細胞の数が有意に増加していた ($p < 0.01$) (図 3)。CD11b/c 陽性細胞の細胞数は 2 群間で明らかな差はなかった (図 3)。

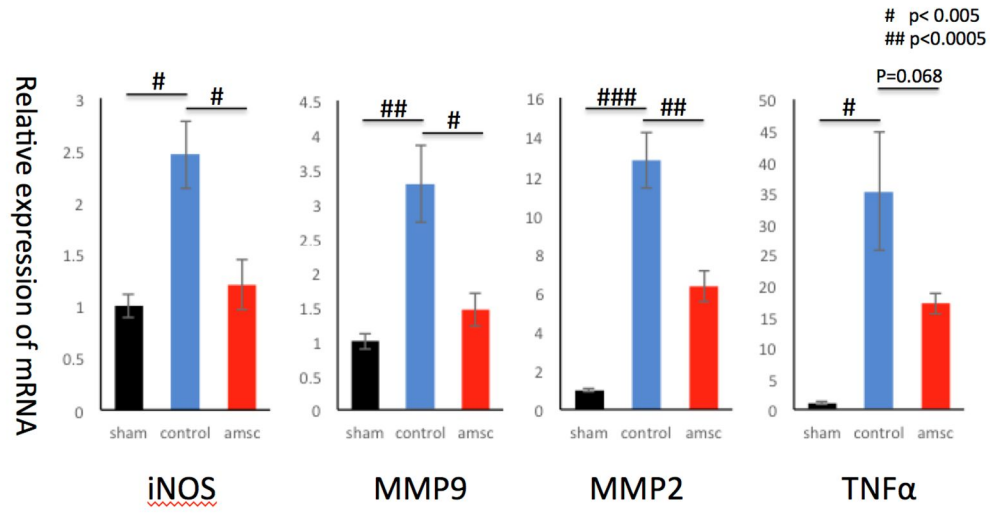
これらの知見から、免疫細胞の総数は変わらないものの、マクロファージおよび炎症惹起型の神経毒性を伴うマイクログリアを含む免疫担当細胞の数が静脈内 hAMSCs 投与により抑制されていることが示唆される。

これらの知見を総合して、hAMSC は急性期の経静脈内投与により、脳梗塞後の神経炎症における免疫担当細胞の表現形質の経時的变化 (M2-M1 shift) を抑制し、神経障害性の高い炎症惹起性の免疫担当細胞 (M1 phenotype) の集積を抑制することで神経保護作用を有しているものと考えられた。

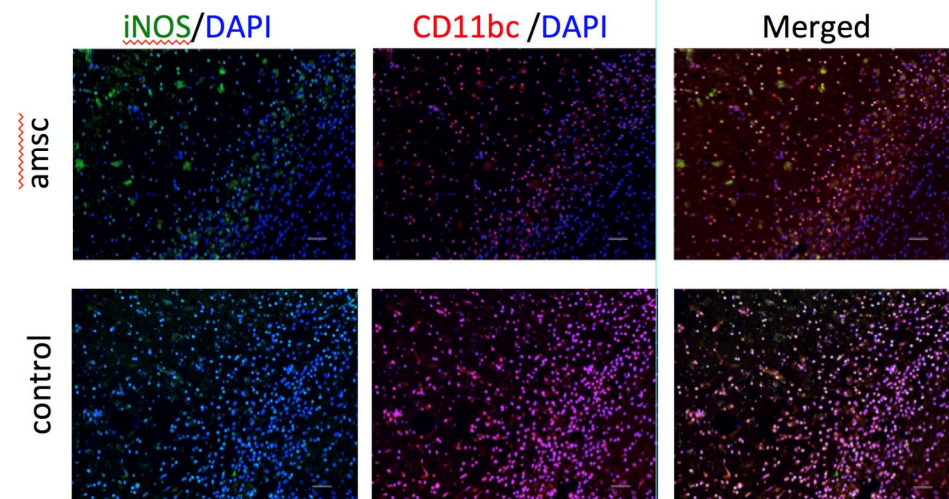
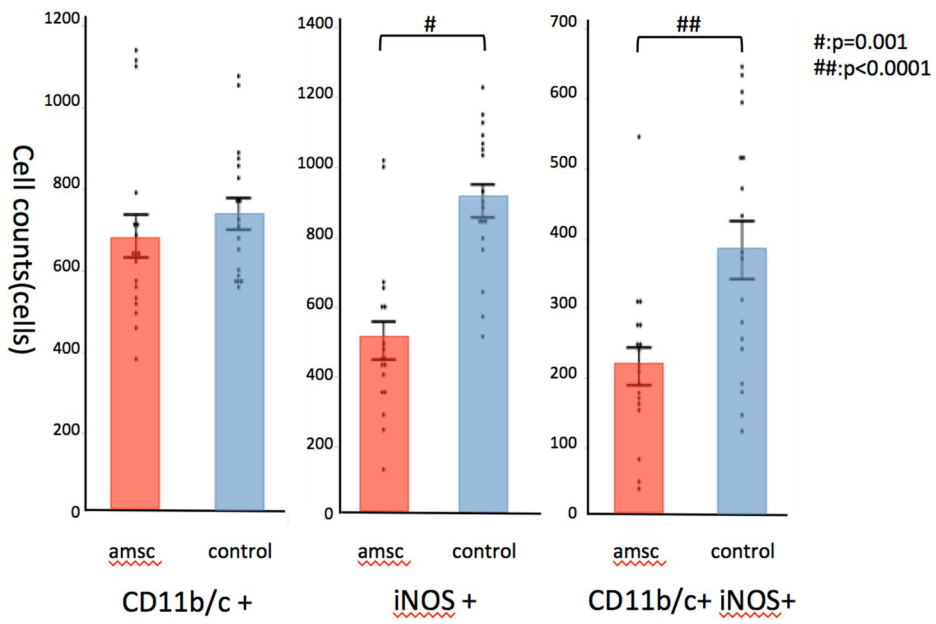
図 1



2



3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----