

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09539

研究課題名(和文) 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた脳出血治療の開発

研究課題名(英文) Novel treatment for intracranial hemorrhage using amnion derived mesenchymal stem cells

研究代表者

吉村 紳一 (Yoshimura, Shinichi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40240353

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)：マウス脳出血モデルに羊膜由来MSC(間葉系幹細胞)を静脈投与し、設定した2つの容量と時期ではより早い時期により多くのMSCを投与するほうが神経機能改善効果が高かった。先行開発した脂肪由来MSCの10分の1の細胞数でも同等以上の改善効果を確認できた。脳出血部位では腫瘍壊死因子(TNF)や誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)が細胞投与により減少し、細胞死を反映するTUNEL陽性細胞の減少を認めた。追加実験で羊膜由来MSC投与時にTNFを同時投与すると、羊膜由来MSCのTUNEL陽性細胞の減少効果が減弱していた。以上より羊膜由来MSCのTNF抑制効果が機序の一つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳出血に対して、現在有効な機能改善の治療法は継続的なりハビリテーションしかなく、今回羊膜由来MSCをマウス脳出血モデルへ静脈投与をすることで機能改善効果が確認できた。この細胞はすでに、他の疾患で人の臨床試験で用いる細胞治療剤として品質管理されており、解凍することですぐに使用できるよう冷凍保存されている。よって、今後、脳出血患者への臨床試験を準備する段階である。このことは学術的ならび社会的意義が非常に大きい成果である。

研究成果の概要(英文)：Amnion-derived mesenchymal stem cells(MSCs) were administered intravenously in a mouse model of cerebral hemorrhage, with the earlier administration of more MSCs improving neurological function at two different volumes and times. The results also showed that MSCs with one-tenth the number of cells of adipose-derived MSCs, which were developed earlier, were equally or more effective. Tumor necrosis factor (TNF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were decreased in brain hemorrhage sites after cell administration, and TUNEL-positive cells, which reflect cell death, were reduced. In an additional experiment, simultaneous administration of TNF during administration of amnion-derived MSCs attenuated the effect of amnion-derived MSCs on the reduction of TUNEL-positive cells. This suggests that the inhibitory effect of amnion-derived MSCs on TNF may be one of the possible mechanisms.

研究分野：脳神経外科、脳血管障害の外科治療、神経再生の基礎研究

キーワード：脳出血 羊膜由来間葉系幹細胞 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

脳出血は突然発症し、機能的・生命的予後不良な疾患である。脳出血の外科的治療は基本救命目的となり、機能改善は慢性期のリハビリテーションしかなく、その効果は限定的である。このため新たな治療が望まれる。我々は、継続的に間葉系幹細胞 (MSC) を用いた脳出血の治療法を研究しており、ヒト脂肪由来 MSC (hAMSC) をコラゲナーゼによる脳出血モデルマウスに投与し、症状の改善効果ならび脳内のマクロファージ関与することを報告した (Kuramoto Y. Brain Res. 1711:58, 2019)。脂肪を採取することは骨髄由来 MSC の骨髄穿刺より低侵襲であるが、小切開が必要であり、ドナーの侵襲はゼロでない。この問題を解決するため、我々は出産に伴う胎児付属器から分離される MSC を用いることとした。胎児付属器は本来、出産後は医療廃棄物と破棄されるものであり、ドナーへ新たな侵襲を必要としない。この点、細胞治療の供給源として、理想的である。我々は胎児付属器のうち、羊膜由来 MSC (hAMSC) を用いて、脳出血への治療ができないかと考え、研究を開始した。

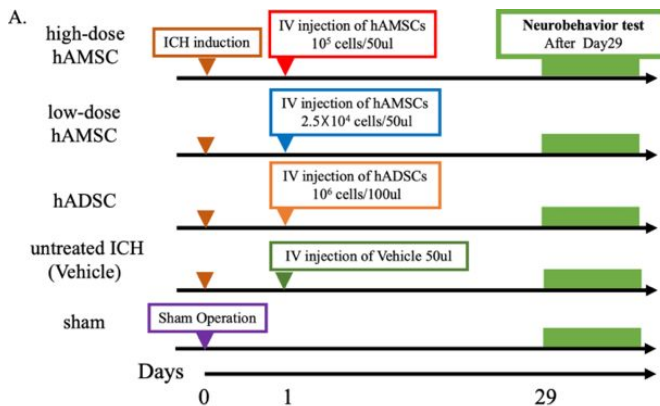


図1 用量試験フローチャート

2. 研究の目的

本研究の目的は、hAMSC を用いた脳出血モデルに対する神経機能改善を確認し、そのメカニズムを明らかにすることである。本研究では MSC による神経機能改善メカニズムを免疫反応に着目して検討することにある。

3. 研究の方法

マウス脳出血モデルを作成し、投与量ならび投与時期について検討した。具体的には脳出血誘導 24 時間後に、 10^5 個 hAMSC を投与する高用量群 (high-dose hAMSC 群) とその 4 分の 1 量の低用量群 (low-dose hAMSC 群) との 2 つの投与量を設定した。この用量最適目的の試験に先行研究である、脳出血誘導 24 時間後に脂肪由来 MSC 10^6 個を投与した群 (hADSC 群) と比較検討した (図 1)。次に投与時期最適化を目的に、 10^5 個の hAMSC を 24 時間後 (D1-hAMSC 群) と 72 時間後 (D3-hAMSC 群) に投与する試験を行った (図 2)。神経機能評価は脳出血誘導 29 日以降に約 1 ヶ月多角的神経行動試験を行い評価した。

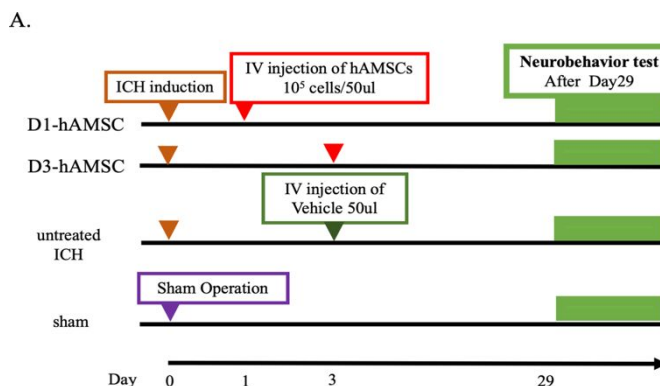


図2 投与時期試験フローチャート

作用機序解析には、hAMSC 投与した群と溶媒のみ投与する群からサンプルを採取し、免疫染色や TUNEL 染色、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーでその違いを検討した。

4. 研究成果

行動実験において、オープン水泳テスト、受動回避テスト、水迷路試験で hAMSC 高用量かつ 24 時間投与が脳出血で認めた障害の改善を認めた (図 3)。

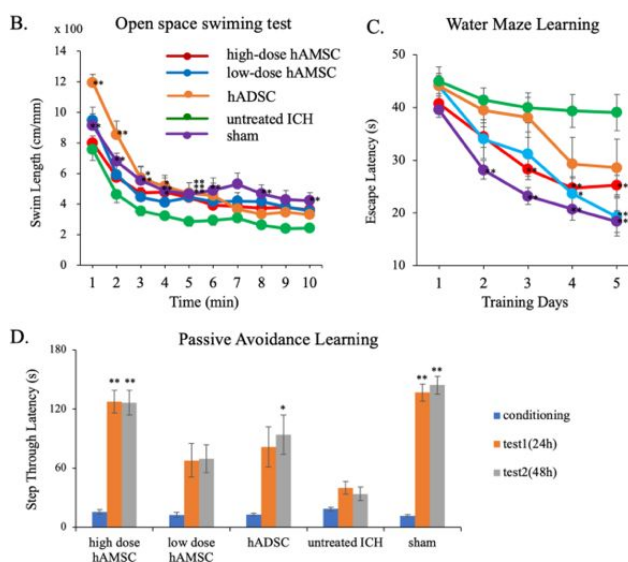


図3 用量試験結果

神経機能改善メカニズムの解析として、フローサイトメトリーを用いた解析では脳内 CD11 陽性かつ CD45 陽性細胞つまりマクロファージやミクログリアと考えられる細胞数が hAMSC を投与により減少していた。一方、この反応は脾臓では確認されず、hAMSC による投与、マクロファージ系の反応は脳出血周囲に限局していることが示唆された。血液脳関門があるため hAMSC が脳内に入っているか、マウスが持っていないヒト核抗体をみてみると、投与 3 日後に脳出血周囲の血管周囲を中心に存在した(図 4)。このことは hAMSC が障害された脳出血部で働くフローサイトメトリーの結果を支持した。hAMSC 投与により TUNEL 染色陽性細胞の減少が確認された。Western blotting による脳出血部位の蛋白解析では腫瘍壊死因子(TNF)や誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)が細胞投与により減少していることがわかった(図 5)。

以上から hAMSC 投与は脳出血による障害を改善させ、その機序はマクロファージを抑制することで、TNF や iNOS の発現を抑制させ、細胞死も抑制すると考えられた。

本研究で得られた成果は”Journal of Neuroinflammation”に採択され、Open access であるため閲覧可能である。

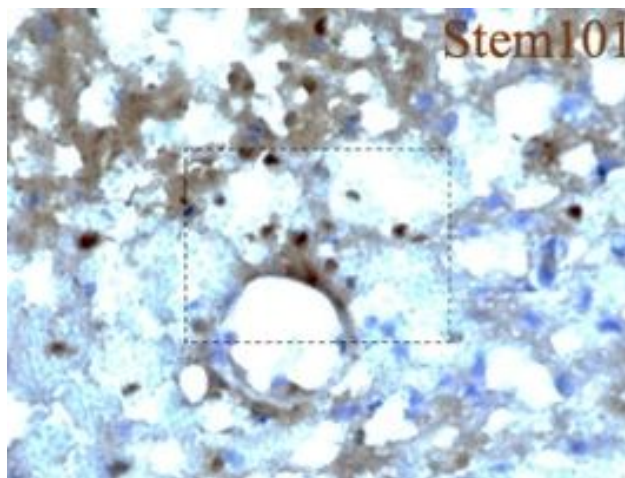


図 4 投与 3 日後 脳出血部 DAB 染色

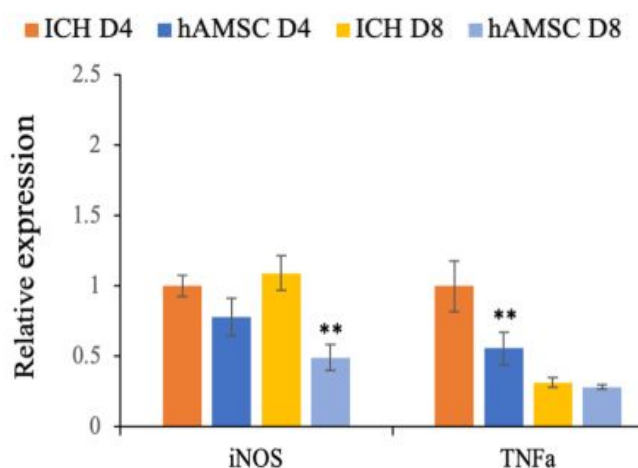


図 5 脳出血部のウエスタンブロット

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuramoto Yoji, Fujita Mitsugu, Takagi Toshinori, Takeda Yuki, Doe Nobutaka, Yamahara Kenichi, Yoshimura Shinichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Early-phase administration of human amnion-derived stem cells ameliorates neurobehavioral deficits of intracerebral hemorrhage by suppressing local inflammation and apoptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-022-02411-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究分担者	蔵本 要二 (YOJI KURAMOTO) (10604275)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	高木 俊範 (TOSHINORI TAKAGI) (00452152)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	山原 研一 (KENICHI YAMAHARA) (50450888)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	中込 隆之 (TAKAYUKI NAKAGOME) (80434950)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	内田 和孝 (KAZUTAKA UCHIDA) (10570674)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	
研究分担者	白川 学 (MANABU SHIRAKAWA) (50425112)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関