

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32666
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K09274
研究課題名（和文）心停止後意識障害における低侵襲的細胞医薬治療の有効性評価：患者社会復帰を目指して

研究課題名（英文）Evaluation of the Effectiveness of Minimally Invasive Cell Therapy in Post-Cardiac Arrest Consciousness Disorders: Aiming for Patient Social Reintegration

研究代表者
横堀 将司（Yokobori, Shoji）
日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：70449271
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において心停止後ラットモデルを作成し安定化させることができた。すなわち、麻酔科にラットの尾動脈にカニューレを行い、気管挿管をしたうえで、筋弛緩薬を用いて自発呼吸を消し、チューブをクランプして窒息させ、5分後に換気を再開させたうえで、胸骨圧迫を行うことで心拍再開後モデルを作成することに成功した。また神経幹細胞を脳室内にステレオ下に移植し、その神経機能の回復を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はラット蘇生後脳症モデルを作成し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（SB623）を経鼻的に投与する。in vivoによる電気生理学的評価、行動実験および組織学的評価を行うことで、細胞医薬による神経組織再生・保護が蘇生後脳症に対する機能転帰の改善に貢献するかを検討する。本研究は蘇生後脳症の治療において低侵襲的な細胞治療を応用する初めての試みとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we were able to establish and stabilize a rat model of post-cardiac arrest. Specifically, we conducted cannulation of the rat's tail artery under anesthesia, followed by endotracheal intubation. We then administered muscle relaxants to suppress spontaneous breathing, clamped the tube to induce asphyxia, and resumed ventilation after 5 minutes. Subsequently, we successfully created a post-cardiac arrest model by performing chest compressions to restore cardiac activity.

Furthermore, we are in the stage of considering therapeutic approaches such as neural stem cells and neurotrophic factors. For example, we are currently transplanting neural stem cells (San-bio SB-623) stereotactically into the brain ventricle and observing the recovery of neural function. Additionally, we aim to further establish precise behavioral assessment experiments and refine techniques for cell transplantation.

研究分野：救急医学

キーワード：心停止後症候群

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景、研究課題の核心をなす学術的「問い」

我が国の高齢化社会の膨化に伴い、心肺停止(以下CPA)患者搬送数は急激に増加している(1991年院外心肺停止患者搬送数: 31,216人 2018年177,018人)。心肺蘇生の普及により、CPA患者の生命転帰は10年前に比して改善を示しているものの社会復帰し得る症例は依然1割に満たない。

心停止後症候群(Post Cardiac Arrest Syndrome: PCAS)は循環停止再灌流後に起こる各種病態を含み、低酸素性虚血性脳損傷・心停止後心筋不全・全身性虚血再灌流障害(多臓器不全)を併せ持つ症候群である。PCAS患者の多くは、心拍再開後の体温管理療法や心肺補助デバイスなどによる重厚な集中治療を施行されるにも関わらず、その多くが重度意識障害に陥り介護介助を要する結果

となっている。PCAS患者を支える生産年齢人口への経済的・人的負担も大きく、我が国の高齢化問題を更に助長する由々しき問題となっている。

PCAS患者の蘇生後脳症治療は従来、体温管理療法(脳低温療法)が中心となってきた。しかし近年、脳低温療法と平温治療ではその有効性に差異が無いとの報告もあり、治療のブレークスルーが喫緊に求められている。

多くの研究で有効性を示せない要因として、二次性脳損傷予防を中心とした従来の治療には限界があるためであるといえる。即ち、従来の神経集中治療は、心停止による低酸素性脳損傷である「一次脳損傷」自体の治療は理論上治療のターゲットにはならず、その後の付加的増悪因子により進行する「二次脳損傷」の予防・軽減を図ることを目的としていた。しかし長い脳虚血時間により一次脳損傷自体が重篤になると、二次脳損傷を最小限に抑制し得たとしても良好な転帰には繋がらない(図2)。一次的脳損傷による脳組織破壊自体を修復すべく、脳障害治療における再生医療の応用が期待されている所以であるが、PCASにおける虚血低酸素脳症に対し再生医療を応用した研究は皆無である。

再生医療を応用した神経損傷治療戦略の確立を目指し、我々の研究チームも日米共同で基礎研究を続けている。我々は急性硬膜下血腫(ASDH)ラットモデルを作成し、米国FDAで認可されたヒト神経幹細胞NSI-566を投与し、その生着および、行動実験での神経学的機能改善を確認している。[次頁 図3G:ラットASDHモデルにおけるヒト神経幹細胞の生着(8W): GFP導入移植細胞(HNSC:点線上)が脳挫傷表面にRobustに生着している。Scale bar 20µm。 図4:Rotarodによる歩行持続時間の比較。移植群(Transplant)はControl群に比して有意に空間認知・運動機能が改善している]

上記の如く、我々の複数の研究では、確固とした細胞の生着を見ているものの、開頭術を用いて脳表面に移植細胞を生着させる手法であり、患者個体への侵襲は大きいものであった。特にPCAS患者に対して、実臨床において開頭術を行うことはなく、新規の細胞治療方略が求められている。

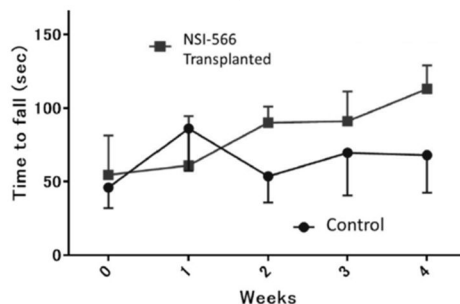
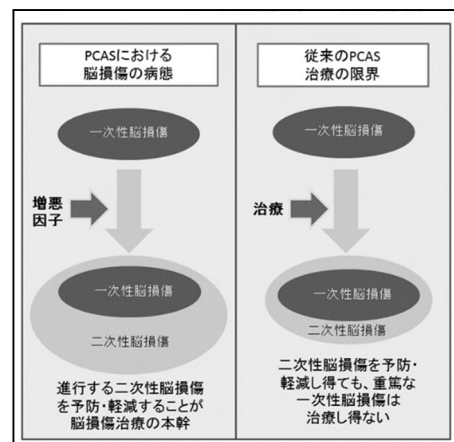
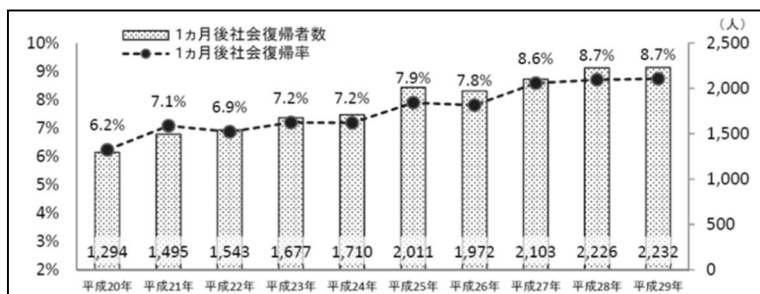
・本研究はラット蘇生後脳症モデルに神経幹細胞を経鼻的に移植し、その神経学的評価を行う初めての試みである。我々の渉猟した限りでは経鼻的神経幹細胞投与を蘇生後脳症治療に応用した取組はない。

・神経幹細胞(NSI-566)を移植ののち、新規神経栄養物質(NSI-198)をBoost Therapyとしてラットに投与することで生着率向上と神経細胞への迅速な分化誘導が得られるか検討するものである。

・NSI-566は米国FDAにて認可をうけたヒト胎児由来神経幹細胞である。すでに霊長類脊髄損傷の運動機能回復が実証され、脳卒中および慢性脊髄損傷での臨床治験が開始されている。商業化されつつある細胞種を使用することで、基礎から臨床応用までの橋渡しも短縮される。

・NSI-189は神経栄養因子(SCF、BDNF、VEGF、GDNF)をUpregulateする作用をもつ小分子であり、米国ではうつ病の治療薬として臨床治験が開始されている。すでにPhaseで人体への安全性は確認されており、本研究の成果により、頭部外傷診療における新規治療開発がさらに推進される。

・本研究では成体ラット脳に電極を埋め込み、自由行動中の神経細胞の活動を記録する。これは麻酔の影響を受けずに大脳の電気生理学的評価が可能となる。幹細胞移植後の高次機能の回復を純粋に電気生理学的に可視化することで、神経再生医療の臨床応用を推進させる。



2. 研究の目的

本研究の具体的目標は以下の二つである

- ・ 蘇生後脳症モデルにおいて神経幹細胞 (NSI-566) 移植の有効性を検討する
- ・ 蘇生後脳症における神経幹細胞移植後の神経栄養因子 (NSI-189) の Boost Therapy の有効性を明確にする。

これにより PCAS 患者における再生医療を効率化・適正化し、実臨床への応用を目指す。また、我が国が世界に先駆けて主導している再生医療の恩恵を、治療が立ち遅れ重篤な後遺症に苦しむ蘇生後脳症の患者にも享受させ、広く国民の健康に資することを最終目標とする。

【研究計画】

3. 研究の方法

【フェーズ】

研究チームでプロトコルを最終確認し、倫理委員会および日本医大 IACUC に申請する。

ラット蘇生後脳症モデル作成

Sprague-Dawley ラット (8 週齢 雄 300 - 350g) を用い、麻酔科に気管挿管および人工呼吸管理 (0.65ml/100g Weight) を行う。左大腿動脈より連続動脈圧モニタリング用カテーテル、同静脈より投薬ラインを挿入する。また、針電極による心電図モニタリングを行う。

第 4 肋間胸骨左縁より電気刺激リードを

経皮的に穿刺し、経胸壁に心外膜に留置した電極を用い単発複数回電位刺激 (Isostim, WPI Inc, USA, Delay 100ms, 50Hz, intensity 1mA)、心室細動 (VF) を惹起する。

VF 導入 6 分後、200 回/分の用手的胸部圧迫と人工呼吸を開始、CPR 開始と同時にアドレナリン (2 µg/100 g) と 0.1 mL の 8.4% 重炭酸ナトリウムを経静脈的に投与する。胸部圧迫より 3 分後に VF が継続している場合、直流単相 2J の強度にて除細動を行う。除細動に失敗した場合、蘇生術を継続し、1 分後に除細動を再試行する。

心拍再開を平均動脈圧 > 50 mmHg 以上、5 分以上継続するものと定義し、6 分以上の蘇生術で改善しない場合は蘇生不可と判断する。コントロール群のラットは以降を行わないものとする。期間内に、蘇生後脳症ラットモデル作成に加え幹細胞調整トレーニング、行動実験トレーニング、免疫組織染色トレーニングを行い、実験が滞りなく進むことを確認する。

【NSI-566 Transplantation】

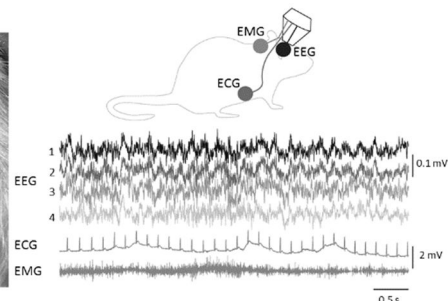
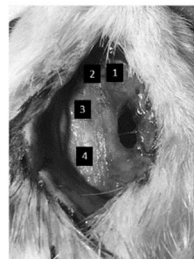
蘇生後脳症作成一週間後、麻酔下に頭皮を正中切開し、頭蓋骨表面を露出しデンタルドリルにて穿頭する。ヒト神経幹細胞 NSI-566 を 400,000 /µl に調整ののち、Stereotactic frame を用いて両側海馬に 0.5ml ずつマイクロインジェクタを用いて注入する。海馬の局在は Rat brain atlas を参考とし、Bregma より 3.3mm 後方かつ正中より 2mm 両側方、深さは 3mm とする。また神経細胞移植後より 1 週間毎 8 週間、神経栄養因子 NSI-189 を 30 mg/kg 経口投与する。

【行動実験トレーニング (Rotarod・Y-maze)】

モデル作成 1 週間前よりトレーニングさせ、安定した行動評価を可能とする。移植後 8 週までの Rotarod、Y-maze による運動機能、空間認知機能について評価する。

【脳波測定】 研究協力者 佐々木拓哉助教の指導のもと、麻酔下に開創し、移植部位を含む大脳

皮質領域に電極を埋め込む。またアーチファクトの除外のため心電図計 (ECG)、筋電図計 (EMG) も留置したのち覚醒させる [4] (図 6: ラット ASDH モデルにおける Pilot data)。留置したプローブより皮質領域間を流れる神経信号の時空間パターンを解析し、細胞移植による脳損傷に対する回復効果を検討する。



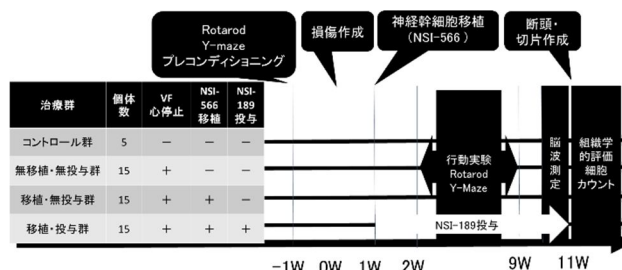
【免疫組織染色および評価トレーニング (担当: 研究分担者 山田 海外研究協力者 Gajavelli)】

20 µm で切片作成し、GFP の発光と NeuN, DCX 染色を確認することで、移植神経幹細胞 NSI-566 の成熟神経への分化を確認する。また GFAP 染色および Olig-2 染色を併用することで、グリア細胞系への非分化を確認する。海外研究協力者 Gajavelli の指導を受け、Stereology method (StereoInvestigator 7.50.1 software) にて、全スライス GFP + FJB の発光細胞をカウントすることで移植細胞の生着を定量化する。

以上、フェーズ で 5 匹のパイロットモデルを作成し、組織学的評価にて細胞の生着を確認の後、以下フェーズ に移行する。

研究フェーズ	達成目標	2019年度		2020年度		2021年度	
		前半	後半	前半	後半	前半	後半
フェーズ① 急性硬膜下血腫 ラットモデル作成 準備と評価 トレーニング	プロトコル最終確認	←					
	審査委員会・IACUC申請	←					
	頭部外傷・幹細胞移植 作成準備	←	←				
	行動実験トレーニング	←	←				
	脳波測定トレーニング	←	←				
フェーズ② 本試験 各種評価	免疫組織染色トレーニング			←	←		
	ラットモデル作成 幹細胞NSI-566移植			←	←		
	NSI-189神経栄養因子投与			←	←		
	行動実験・脳波測定			←	←		
	プレパラート作成 組織学的検討					←	←
フェーズ③ 研究総括 研究成果発信 研究継続準備	小括					←	←
	総括 研究者合同会議 国内・国際学会における発表					←	←
	科学研究費・AMED申請準備					←	←

【フェーズ Ⅰ：本試験と各種評価（2019年度後半 2021年度前半）】
 上記フェーズ Ⅰのトレーニングにて安定した実験系を確立したのち本試験に移る。下記4実験群×15匹（Controlは5匹）の実験群を作成する（以前の基礎研究を勘案し個体数を算出）（図6）。



コントロール群：蘇生後脳症を作成せず、NSI-566のHibernate mediaのみを両側海馬に移植、NSI-189の溶解液（生食）のみをプラセボとし経口摂取させる。

無移植・無投与群：蘇生後脳症を作成後、NSI-566のHibernate mediaのみを両側海馬に移植、NSI-189の溶解液（生食）のみをプラセボとし経口摂取させる。

移植・無投与群：蘇生後脳症を作成後、NSI-566を両側海馬に移植し、NSI-189の溶解液（生食）のみをプラセボとし経口摂取させる。

移植・投与群：蘇生後脳症を作成後、NSI-566を両側海馬に移植し、NSI-189溶液を経口摂取させる。

以上4群において行動実験、脳波測定、組織学的評価を行い、群間比較する。データ記述をMean±SEMあるいはMedian(IQR)とし、群間比較にKruskal-Wallis testを用いる。post-hocテストとしp<0.05を有意とする。

【フェーズ Ⅱ：研究総括および研究成果発信】上記フェーズ Ⅰまで得られたデータを解析する。米国脳損傷研究のKey Opinion Leaderである米国マイアミ大学Ross Bullock教授を招き、外部からの評価も加えたうえでの厳正な評価を加える。国内、海外での論文発表、および国際誌への投稿を行う。また、本データをもとに米国Neuralstem社との連携のもと、更なる前臨床試験を遂行すべく、グラント申請への基礎データを集約する。

4. 研究成果

本研究はラット蘇生後脳症モデルを作成し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（SB623）を経鼻的に投与する予定であった。しかし心室細動を電氣的に惹起させ心停止を起こすモデルは安定せず、実験動物に気管挿管を行い、クランプしたうえで心停止を誘導するモデルを作成した。細胞医薬は計画していた細胞種類が入手不可能であったため、サンバイオ社製の神経幹細胞を用いた。本研究は蘇生後脳症の治療において低侵襲的な細胞治療を応用する初めての試みとなった。

現在、神経幹細胞（サンバイオSB-623）を脳室内にステレオ下に移植し、その神経機能の回復を観察し、これを継続している。また、さらに正確な行動実験の評価、および細胞移植に向け更なる手技確立を目標としている。これについては安全性を確立させることができ、ラットの生存を増加させることができた。とくにY-MazeやRotarodでは、あまり脳室内投与の有無による行動実験の成績の変化が見られず、行動実験のみではない、異なる評価法や、更なる個体数の増加が必要と考えている。

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
研究分担者	須田 智 (Suda Satoshi) (00366733)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究分担者	佐々木 和馬 (Sasaki Kaduma) (30832266)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究分担者	山田 真史奈 (Yamada Marina) (70508621)	日本体育大学・保健医療学部・准教授 (32672)	
研究分担者	阪本 太吾 (Sakamoto Taigo) (90587073)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	

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
---------	---------