

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09382

研究課題名（和文）脳出血慢性期モデルに対する幹細胞とScaffold合剤の有効性評価

研究課題名（英文）Stem cell combined with scaffold for treating chronic cerebral hemorrhage

研究代表者

川堀 真人（Kawabori, Masahito）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：50399870

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）：脳出血慢性期モデルラットに対して幹細胞・足場材合剤の出血腔内への投与は幹細胞単独に比して有意に効果が高い事を運動機能・作用機序の観点から証明した。合剤化する事で幹細胞は非常に強い栄養因子分泌能を発揮し、生存率も向上した。動物モデルでは神経シナプスの改善が得られた事、分泌するBDNFが効果の一部であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療法の無い脳出血慢性期に対して幹細胞治療が有効である事を示すことが出来た。単に運動機能の改善を見るだけでなく、作用機序や製造方法に至るまでの詳細な検討を行う事が出来た。本成果を基礎として、我々は臨床研究（治験）に進むことを目指し、AMED事業を用いて非臨床安全性試験や品質規格試験等を施行し、PMDA対面助言も完了した。2024年の臨床研究を予定しており、科研から臨床への重要な橋渡し研究を行う事が出来たと考えている。

研究成果の概要（英文）：We were able to prove that stem cell attached with scaffold showed better neurological recovery in chronic intracerebral hemorrhagic model animal.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳出血 幹細胞 足場材合剤

1. 研究開始当初の背景

A) 脳出血(慢性期)に対する細胞治療の背景

脳出血と現状の治療法の限界：本邦における脳出血の年間新規発症患者数は約 6 万人、慢性期における後遺症患者(要介護 3-5)は約 10 万人と非常に多くの患者が後遺症に苦しんでいる(厚生労働省平成 29 年患者調査の概況、Takashima, et. al., Circ J, 2017)。しかし運動機能の自然回復が見込まれなくなった慢性期以降の治療法は、機能維持のためのリハビリ以外に有効なものはないと確立しておらず(Hemphill et al. Stroke 2015)、神経機能を直接回復させる可能性を持つ幹細胞移植に大きな期待が寄せられている。

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC)の中枢神経損傷に対する回復機序：多くの研究が先行する「脳梗塞」に対する間葉系幹細胞の回復機序は、「間接効果である保護効果(下記左)」と「直接効果である分化(下記右)」の 2 つに分けることができる。保護効果はさらに「ダメージ軽減」と「回復支援」に分けることができるが、「脳梗塞急性期」に細胞を投与する(多くは静脈投与)手法は「ダメージ軽減」を目指しており、栄養因子による炎症制御や過剰な免疫応答の抑制が主たる目的である。また「脳梗塞亜急性期」に細胞を投与する(静脈・局所の両方が存在)場合は「回復支援」つまり、損傷細胞の貪食亢進や血管新生などがメインのターゲットとなる。一方、既に炎症もほぼ収束した「慢性期」においては投与細胞の神経系もしくは血管系への分化による新たな神経機能の回復が主たるターゲットとなり、この際は「局所投与」が望ましいと考えられている(Vu et al. Neurology 2014)。



B) 未解決の重要な課題：幹細胞生存率の向上

「脳出血後慢性期」の細胞治療を考えた場合、出血した「局所における神経損傷」がその障害の中心であると考えられる。そのため治療ターゲットはこの損傷を受けた「出血後の空隙周囲」となり、この「空隙内に多くの細胞を高い生存率で投与させる」ことが望ましい。しかし空隙内部は「グリア細胞による癒痕」である「グリオーシス」の殻に囲まれていて、このグリオーシスが神経軸索の再生を阻害するほか、内部の十分な血流や栄養がない環境を作り出している。この解決には同部位へより高い細胞生存率を達成させる細胞製剤の投与方法が必要であると考えられる。

C) これまでの当研究室での研究成果

当科では、過去に脳梗塞、頭部外傷および脊髄損傷に対して精力的に間葉系幹細胞を用いた基礎的研究(約 40 編の original article)を行ってきた。その中で、脳梗塞の亜急性期以降は「静脈投与」に比して「局所投与」の方がより運動機能回復の効果が高い事や(Kawabori et al. Neuropathology, 2012) 幹細胞が分泌する栄養因子(NGF、BDNF、HGF)などが損傷した神経に保護的に作用することを証明している(Hokari et. al., J Neurosci Res, 2008)

2. 研究の目的

D) Scaffold の使用による細胞性能向上

近年の細胞工学の発展により、間葉系幹細胞の増殖・分化・栄養因子分泌等に幹細胞と「細胞外マトリクス」との「接着」が深く関与していることが報告された(Ho et al. Stem Cells Transl Med. 2016)。幹細胞は細胞表面に発現しているインテグリンを介して、コラーゲンやラミニンなど細胞外マトリクス上に存在する Arg-Gly-Asp (RGD 構造)と結合することが知られており、幹細胞はインテグリン結合に引き続く細胞内シグナル伝達を通じて増殖・分化・栄養因子分泌亢進等を果たしていることが証明されている。そこで間葉系幹細胞と RGD 構造を持つ細胞足場材(Scaffold)を組み合わせた合剤(CellSaic)を用いることで脳出血後の慢性期の空隙内に投与しても高い細胞生存率を保持した状態で、栄養因子の分泌および細胞分化を可能にし、機能回復を来たしうる細胞製剤の開発が可能になると考えた。

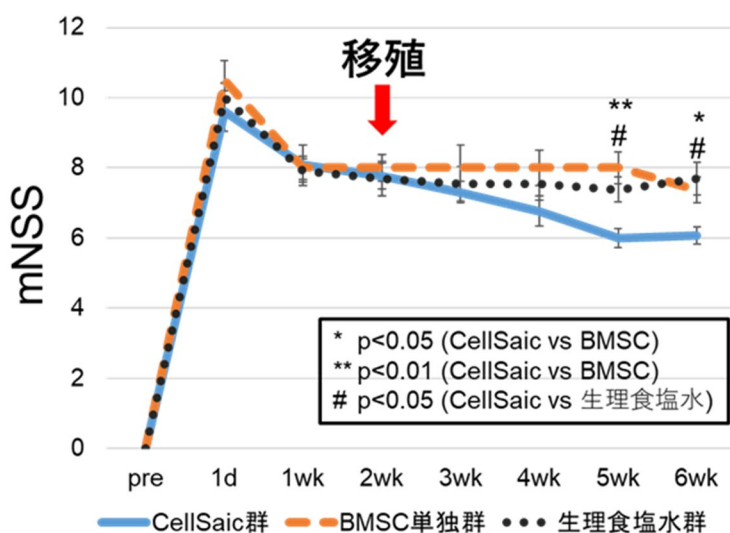
3. 研究の方法

CellSaic は、ラット/ヒト BMSC と、細胞接着作用を有するアミノ酸配列(RGD 配列)を複数含むペプチドと共培養することで作成した。In vitro 実験として、低酸素低栄養負荷(oxygen-glucose deprivation: OGD)環境で BMSC 単独および CellSaic を培養し、栄養因子分泌能および細胞増殖

能を検討した。In vivo 実験として、Sprague Dawley ラット/免疫不全ラットに、コラゲナーゼ/ウアバインを用いて脳出血モデルを作成し、1 または 2 週間後に血腫が吸収され空隙が形成された段階で、空隙内に CellSaic、BMSC 単独、生理食塩水いずれかを投与した。Modified Neurological Severity Score (mNSS) で神経機能評価を行い、組織学的評価から脳萎縮の程度を評価した。また作用機序を明らかにするために、特定の栄養因子の分泌を抑制した CellSaic の神経機能改善効果を検討し、加えて血腫腔周囲の栄養因子量を測定した。さらに、123I-iodoamphetamine (123I-IMZ) SPECT で神経細胞量を比較した。

4. 研究成果

OGD 環境下では、CellSaic の方が BMSC 単独よりも、栄養因子分泌能および細胞増殖能が有意に高かった。慢性期脳出血モデルにおいても、CellSaic の方が BMSC 単独および生理食塩水よりも神経機能改善効果が有意に高く (Figure) 脳萎縮率も CellSaic 投与群で低い傾向であった。また、CellSaic 投与群での血腫腔周囲の脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF) 量は生理食塩水投与群と比べて有意に多く、BDNF の分泌を抑制した CellSaic は通常の CellSaic よりも神経機能改善の程度が小さかった。さらに、123I-IMZ SPECT では CellSaic 投与群で血腫腔辺縁部の集積が保たれる傾向があった。



中枢神経疾患に対する亜急性期以降の細胞治療において、多くの細胞を障害局所に分布させるためには直接投与が理想的であるが (Hess DC. Int J Stroke. 2008;8(8):1193-1201) 細胞数が増えると移植そのものによる 2 次損傷のリスクが高くなる。慢性期脳出血の血腫腔内投与では、移植による 2 次損傷の懸念は少ないものの、細胞の生存には不適切な環境と考えられる。本研究では BMSC を CellSaic として血腫腔内に投与することにより、より多くの生細胞を安全に移植できることを示し、BMSC 単独よりも良好な治療効果が得られることを解明した。基礎研究/臨床試験がほとんどない慢性期脳出血の領域で、新たな治療戦略となり得る重要な研究と考えている。また、本研究の複数の実験結果から、BDNF が CellSaic の治療効果に重要な役割を果たしていると考えられ、今後の治療ターゲットになることが期待される。本研究の限界点として、脳出血 2 週間後を慢性期脳出血としている点が挙げられる。本研究では血腫吸収後に空洞を形成した状態を以て慢性期脳出血モデルと定義したが、時間的な慢性期にも治療効果が得られるかを検証することが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Takamiya Soichiro, Kawabori Masahito, Kitahashi Tsukasa, Nakamura Kentaro, Mizuno Yuki, Yasui Hironobu, Kuge Yuji, Tanimori Aki, Takamatsu Yasuyuki, Yuyama Kohei, Shichinohe Hideo, Fujimura Miki | 4. 巻 2022 |
| 2. 論文標題 Intracerebral Transplantation of Mesenchymal Stromal Cell Compounded with Recombinant Peptide Scaffold against Chronic Intracerebral Hemorrhage Model | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells International | 6. 最初と最後の頁 1~10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/8521922 | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Takamiya Soichiro, Kawabori Masahito, Fujimura Miki | 4. 巻 32 |
| 2. 論文標題 Stem Cell Therapies for Intracerebral Hemorrhage: Review of Preclinical and Clinical Studies | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cell Transplantation | 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） 10.1177/09636897231158153 | 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 | 七戸 秀夫 (Shichinohe Hideo) (80374479) | 北海道大学・大学病院・教授 (10101) | |

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 |
|---------|---------|