

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K11212
研究課題名(和文) 脳梗塞に対する骨髄幹細胞治療における分子メカニズムに基づく至適リハビリ条件の探索

研究課題名(英文) Optimal rehabilitation conditions for cerebral infarction following intravenous infusion of mesenchymal stem cells

研究代表者
佐々木 雄一 (Sasaki, Yuichi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00570136
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)：実験的脳梗塞に対するリハビリテーション(リハビリ)と骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)の経静脈内投与(MSC治療)の併用療法による治療メカニズムを検討した。MSC治療に併用するリハビリの条件設定を細分化し、各条件下での治療効果を検討した。各運動量において治療効果に違いが見られる結果が得られた。今後は、リハビリ併用による神経可塑性の検討を継続し、治療効果を最大限に引き出すリハビリプロトコルの確立に向けた研究を進める必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
再生医療におけるリハビリの重要性は高く、治療効果を最大限に引き出すリハビリプロトコルの確立は非常に重要である。2019年より、脊髄損傷の後遺症に対する再生医療等製品として自己骨髄間葉系幹細胞(ステミラック注)の期限・条件付き承認を受け、実用化が開始された。今後、ステミラック注を用いた再生医療の対象疾患は、脊髄損傷だけではなく脳梗塞などの疾患にも拡大していくことが推測される。MSC療法の治療効果を最大限に引き出すため、リハビリプロトコルの確立は、大きな役割を果たすものと推測される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of treatment of experimental cerebral infarction by the combination of rehabilitation and intravenous administration of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). The effect of the treatment under each condition was examined. The results showed that there were differences in the therapeutic effects at each exercise level. In the future, it will be necessary to continue to examine the neuroplasticity of combined rehabilitation, and to conduct further research to establish a rehabilitation protocol that maximizes the therapeutic effect.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨髄間葉系幹細胞 リハビリテーション 可塑性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、現在までに骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)の経静脈的投与(MSC 治療)が、脳梗塞動物モデルに対して、喪失した運動機能を改善し、著明な治療効果があると報告してきた。これまでの研究の知見を総合すると、MSC 治療の治療メカニズムは、サイトカインによる神経栄養作用、血液脳関門機能の修復、血管新生、脱髄軸索の再有髓化、神経再生による神経系の plasticity の調節など、と多段階・協奏的に作用すると考えている。

さらに、これまでの良好な基礎研究の結果を基盤として、MSC を脳梗塞患者 12 例に対して経静脈的に投与する臨床研究を行い、安全性の確認および良好な結果を得た。上記を踏まえ、札幌医科大学では、脳梗塞に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた医師主導治験を実施している。

このように MSC 治療は、再生医療の分野で脳梗塞や脊髄損傷の後遺症に対する治療方法として注目されている。このような状況を予測し、我々は世界に先駆け、MSC 治療にリハビリテーション(リハビリ)を併用する有効性を報告した(Sasaki Y. et al., PTJ, 2016)。有効性を発揮するメカニズムとして、リハビリ併用群では、脳梗塞周囲領域のシナプス新生が促進され、脳の plasticity が賦活化されることが明らかとなった。

一方、実臨床におけるリハビリの動向として、早期リハビリや高負荷・高頻度のリハビリの有効性、さらに、日常生活における適切な環境因子に注目が集まっていた。しかし、超早期からの高負荷リハビリには、通常のリハビリと比較し、死亡率が高く、良好な結果が得られないとの報告すらあった(Bernhardt J, et al., Lancet 2015)。脳梗塞に対する効果的なリハビリの確立には、様々な議論が絶えない状況であるにも関わらず、設定の根拠となる基礎研究は少ない状況であった。ましてや、MSC 治療などの再生医療においては、併用するリハビリの確立に有益となる基礎研究は皆無であり、急いで対応すべき課題であった。

2. 研究の目的

ラット脳梗塞モデルに対する MSC 治療に併用するリハビリの条件設定を細分化し、各条件下での行動学的効果や脳の plasticity のパターンを、複数の行動学的解析手法、MRI による画像解析法などを用いて多角的に解析し、治療効果を検討した。また、これらの解析により、臨床での MSC 治療の治療効果を最大限に引き出すリハビリの条件設定と新しいリハビリ方法を確立することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) MSC の培養

SD ラットに対してケタミン 90mg/kg、塩酸キシラジン 10mg/kg を腹腔内投与し、麻酔を行い、大腿骨から骨髄を採取・培養を行なった。3 継代目の MSC を投与に使用した。

(2) 脳梗塞モデル

脳梗塞モデルは中大脳動脈永久閉塞（Middle Cerebral Artery Occlusion : MCAO）モデルを使用した。麻酔法追加 ナイロン製の糸を、深麻酔下にした SD ラット（メス、250g-300g）の外頸動脈から内頸動脈へと侵入させて、中大脳動脈を閉塞した。

作製した MCAO ラットをランダム化し、以下の 4 群を設定した。

vehicle 投与群

リハビリテーション群

MSC 投与群

MSC+リハビリテーション群

（ 3 ）リハビリテーション

リハビリテーションを行う 2 群（ リハビリテーション群、 MSC+リハビリテーション群 ）には、MCAO 作製 1 日後より毎日 20 分間、40 分間または 60 分間のトレッドミル走行を 6 週間行った。運動強度は 3 m/min から開始し、1 週ごとに速度を 3 m/min 上げ、6 週間には 18 m/min になるように設定した。

（ 4 ）MSC の投与方法

MSC を投与する 2 群（ MSC 投与群、 MSC+リハビリテーション群 ）には、MCAO 作製 6 時間後に、大腿静脈から MSC を投与した。また、vehicle 投与を行う 2 群（ vehicle 投与群、リハビリテーション群 ）には、MCAO 作製 6 時間後に、DMEM を 1 ml 大腿静脈より投与した。

（ 5 ）MRI の撮影方法

動物用 7T MRI（70/16 PharmaScan; Bruker Biospin MRI GmbH）を使用して、深麻酔下（麻酔）にしたラットの脳の T2 強調画像を撮影した。緩和促進パルスシーケンスによる高速取得で、取得マトリックス 256 × 128、視野 30 × 30mm、TR/TE3000/30msec で 0.5mm のギャップで 1.0mm 厚の冠状断面を取得した。評価日は MCAO 作製 1 日、4 日、7 日、14 日、28 日、35 日、42 日後とした。

（ 6 ）行動学解析：

6 種類のテストから構成される Limb Placement Test（LPT）を用いて、損傷半球の対側四肢の機能レベルを計測した。前肢は 6 種類すべてのテストにおいて評価され、後肢は 6 種類中 2 種類のテストで評価される。前肢・後肢を合わせた最高点は 16 点、最低点は 0 点である。

また、トレッドミル試験によって、ラットの最大走行速度を計測した。評価日は MCAO 作製 1 日、4 日、7 日、14 日、28 日、35 日、42 日後とした。

4 . 研究成果

(1) 運動機能の継時的変化

LPT においては、MSC 投与 + リハビリテーション群、MSC 投与群、リハビリテーション群、vehicle 投与群の順に運動機能の改善を認めた。また、MSC 投与 + リハビリテーション群では、運動時間が多くなるにつれて、運動機能の改善を認めた。

トレッドミル試験においても、MSC 投与 + リハビリテーション群、MSC 投与群、リハビリテーション群、vehicle 投与群の順に運動機能の改善を認めた。また、MSC 投与 + リハビリテーション群では、運動時間が多くなるにつれて、運動機能の改善を認めた。

(2) 脳梗塞体積の継時的変化

脳梗塞の体積では、MSC 投与 + リハビリテーション群、MSC 投与群、リハビリテーション群、vehicle 投与群の順に体積の減少を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木雄一
2. 発表標題 理学療法の新たな可能性
3. 学会等名 第55回日本理学療法学会学術研修大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木雄一
2. 発表標題 実験的脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞移植と運動負荷の相乗効果
3. 学会等名 第57回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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	佐々木 祐典 (Sasaki Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	岡 真一 (Oka Shinichi) (70789453)	札幌医科大学・その他部局等・講師 (20101)	

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	佐々木 優子 (Sasaki Yuko) (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	本望 修 (Honmou Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	山下 達郎 (Yamashita Tatsuro) (60815439)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	鷓飼 亮 (Ukai Ryou) (30896113)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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