

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10312

研究課題名(和文)脳血管性認知症に対する骨髄間葉系幹細胞移植による治療効果の検討

研究課題名(英文)Restoration of cognitive impairment following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral small vessel disease

研究代表者

中崎 公仁(Nakazaki, Masahito)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70722461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、骨髄間葉系幹細胞(MSC)静注療法の臨床応用が進んでいる。本研究では、MSC静注療法が脳血管性認知症に対する治療効果を有するのかを検証した。Spontaneously hypertensive rats stroke-proneラット(SHRSP)を用いて、Vehicle群と比較検証した。認知機能が低下しているSHRSPに対して、21週にMSCを静脈投与した。介入後5週まで解析した結果、MSC群は、Vehicle群と比較して、有意に認知機能が高かった。また、MSC群において、大脳皮質と海馬の萎縮が抑制されていた。MSC静注療法は脳血管性認知症に対して、治療効果を有する可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Recently, intravenous mesenchymal stem cells (MSC) transplantation has been reported that greater therapeutic efficacy can be achieved via multiple mechanisms for various disorders. In this study, we aimed to investigate the effect of MSC transplantation in a rat model of vascular dementia by histological, MRI, and behavioral analysis. We used the Spontaneously hypertensive rats stroke-prone (SHRSP) with cognitive impairment. At week 21 of age, transplantation of MSC was performed by intravenous injection. Compared with the vehicle group, the MSC infused group showed a significant improvement in cognitive function. The MRI demonstrated that the MSC infused group showed a significant reduction of brain atrophy compared to the vehicle group. The histological analysis also showed the volume of cerebral cortex and hippocampus were higher in MSC group than vehicle group. Collectively, intravenous infusion of MSCs might provide therapeutic efficacy in a rat model of vascular dementia.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 脳小血管病 血管性認知症

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、脳梗塞などの動物実験モデルを用いた研究より、MSC の静脈からの全身投与が治療効果を有することを報告してきた。さらに、脳梗塞患者に対する臨床試験 (12 症例へ自己 MSC の静脈内移植) を行い、良好な結果が得られている。

低下した脳の認知機能を改善させるためには、脳血管性認知症の原因として提唱されている脳小血管病 (Cerebral small vessel disease; CSVD) を治療ターゲットとする必要がある。CSVD においては、ペリサイト、血管内皮細胞、アストロサイトと構成する neurovascular unit (NVU) が破綻することによって血液脳関門の機能が低下し、脳認知機能の障害が生じると考えられているが、移植された MSC は、血管新生やリモデリング、微小血管系の構造的安定化、血流調節に関わっているために、治療効果を発揮する可能性が高い。

さらに、我々の最近の研究で、実験的局所脳虚血モデル作成 6 時間後に経静脈的に、MSC を移植後、対側前肢を刺激して、fMRI で大脳皮質の活動を測定したところ、細胞移植群では、病側皮質における活動性の増加と運動機能の回復があり、さらに運動機能の著しい改善を示した群では、健側を含む、両側の皮質の活動性の上昇があった。以上より、虚血性神経疾患に対する、MSC 移植は、病側のみならず、反対側の健常脳の活動性を上昇させることが示唆された。

また、既に我々は、移植された MSC が脳虚血に対して治療効果をもたらす他のメカニズムとして、移植細胞による神経栄養因子を介した神経栄養・保護作用、抗炎症作用、脱髄軸索の再有髄化、損傷軸索の再生、軸索の Sprouting、血管新生、神経系細胞への分化、免疫調節作用などが多段階に作用することであることを明らかにしてきた。

以上のことから、MSC 治療による多段階の

作用機序カスケードによって脳の活動性を賦活化することにより、特に CSVD により低下した脳の認知機能も改善出来る可能性があると考えられる。

脳卒中易発症ラット (Stroke-prone SHR; SHRSP) は、全例が脳卒中を自然に発症する唯一のモデル動物として知られる。本モデルは症状の発現が緩徐であり、中大脳動脈閉塞モデルとは異なり、慢性期脳血流不全、多発性脳梗塞あるいは多発性脳内微小出血を呈するため、脳血管性認知症モデル動物としての使用が可能である。

本申請では、同ラットに対して、MSC の静脈内投与を行い、生理学的、行動学的、神経放射線学的 (MRI) および組織学的に解析し、同細胞移植による脳血管性認知症に対する治療効果の検討を行った。

## 2. 研究の目的

脳血管性認知症に対する新しい治療法の開発が望まれている。我々は、既に脳虚血に対する骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) の移植が多段階的な効果を発揮する作用メカニズムによって治療効果を有することを報告してきた。特に、脳血管性認知症の原因とされる脳小血管病に対しては、移植された MSC によって、破綻した血液脳関門に対する修復作用および神経可塑性の賦活化が認知機能回復に大きく貢献すると考えられる。

本研究では、脳血管性認知症動物モデルを用いて、同モデルに MSC 移植を行い、治療効果を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験群の設定

Group 1: Vehicle (対照) 群; 培養液 (DMEM) 静脈内投与

Group 2: 細胞移植群; 骨髄間葉系幹細胞静脈内投与

## (2) 移植の方法

週齢 20 週のラットにおいて、認知機能検査を施行。認知機能低下が疑われたラットに対して、無作為に vehicle(対照) 群、細胞移植 (MSC) 群に分け、全身麻酔下の上で大腿静脈より前者には培養液(DMEM)のみを、後者には MSC  $1.0 \times 10^6$  個を静脈内投与した。

## (3) 行動学的評価

認知機能を評価するために、介入直前、介入後 1 週目と 4 週目に Novel Object Recognition 試験、Novel Object Placement 試験を行った。また、介入後 5 週目に Morris water maze 試験を行った。

## (4) MRI

経時的に動物用 MRI (7T) を用いて撮影を行った。撮影時は、ラットは全身麻酔下であり、その上でラットの頭部画像解析を行った。

## (5) 組織学的解析

観察期間の終了後にラットを深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定し、脳組織の採取を行った。4%パラホルムアルデヒドで後固定を行って、凍結切片の作成を行った。作成した切片の組織染色、免疫染色を各種行った。

各観察ポイント (移植前、移植後 1 週、5 週) で、ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、神経細胞 (NeuN) を免疫染色した。

超解像共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM780, ELYRAS.1) を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 認知機能解析

介入直前の認知機能は、MSC 群と Vehicle 群には差は無かった。しかし、介入後 1 週間後の認知機能においては、MSC 群は Vehicle

群と比較して、有意に認知機能が良好だった。4 週目においても、同様の結果だった。5 週目に行った、Morris water maze 試験においても、MSC 群が Vehicle 群と比較して、統計学的有意差をもって、認知機能が改善していた。

### (2) MRI

経時的に MRI 撮影を行い、画像評価を行った結果、Vehicle 群において、経時的に側脳室が拡大していくことが判明した。しかし、MSC 群においては、側脳室の拡大が抑制されていることが明らかとなった。定量的に側脳室の体積を解析すると、介入後 1 週間後より、MSC 群において、Vehicle 群と比較して、側脳室の体積が有意に小さいことが判明した。

### (3) 組織学的解析

#### 3-1 大脳萎縮の評価

介入後 5 週間後の組織を用いて、形態学的解析を行った結果、MSC 群において、Vehicle 群と比較して、大脳皮質と海馬の萎縮が抑制されていることが判明した。さらに、大脳皮質、脳梁、海馬交連の厚さを各々測定し、統計学的に解析した結果、MSC 群において、大脳皮質、脳梁、海馬交連の萎縮が有意に抑制されていることが明らかとなった。

次に、免疫染色法を用いて、大脳皮質と海馬の神経細胞の総数を定量評価した。その結果、MSC 群において、神経細胞 (NeuN 陽性細胞) の総数が、大脳皮質、海馬ともに、Vehicle 群と比較して、有意に増加していることが判明した。

#### 3-2 移植後 MSC の集積

MSC の治療メカニズムを解析するために、GFP-MSC を用いて、静注投与された MSC の動態について解析した。

MSC (GFP-MSC) を静脈投与し、解析した結果、移植した MSC は、大脳皮質、及び、海馬の脳

小血管周囲に集積していることが判明した。

以上のように、補助金は有効に使用された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

学会等名:第43回日本脳卒中学会学術集会  
演題名; 骨髄幹細胞移植による血管性認知障害の治療 (Restoration of cognitive impairment following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral small vessel disease)

発表者名: 中崎公仁、佐々木祐典、佐々木優子、岡真一、端和夫、本望修

年月日:2018.3.21-24

出願状況(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中崎 公仁 (NAKAZAKI, Masahito)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 70722461

### (2)研究分担者

佐々木 祐典 (SASAKI, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20538136

小野寺 理恵 (ONODERA, Rie)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60393328

鰐淵 昌彦(WANIBUCHI, Masahiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30343388

三上 毅(MIKAMI, Tsuyoshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30372816

浪岡 隆洋(NAMIOKA, Takahiro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 70748996

浪岡 愛(NAMIOKA, Ai)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 60748995

### (3)連携研究者

本望 修 (HONMOU, Osamu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90285007