

平成 30 年 5 月 24 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：15K10365

研究課題名(和文) 実験的脳梗塞に対する骨髄幹細胞移植によって誘導される神経可塑性の解析

研究課題名(英文) Analysis of neural plasticity induced by intravenous infusion of mesenchymal stem cells in experimental model of cerebral infarction

研究代表者

長濱 宏史 (Hiroshi, Nagahama)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20725676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脳梗塞モデルに対し、骨髄間葉系幹細胞(MSC)を移植した結果、運動機能の改善を認めた。このラットに対し、MRI Diffusion tensor imagingによるTractographyを用いて、神経線維を描出したところ、神経線維数が非MSC移植群に比べて有意に多いことが判明した。また、健側の大脳皮質におけるシナプス数はMSC移植群で有意に多く、脳梁厚はMSC移植群で有意に厚かった。これらの結果より、脳梗塞後のMSC移植は脳の可塑性を亢進させることが明らかとなった。この作用により、運動機能の改善に寄与していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) improves behavioral function in rat stroke models. MRI Diffusion tensor imaging tractography demonstrated that increased number of "number of tracks" was observed in the MSC-treated group compared to the non-treated group. The number of synaptic puncta in non-infarcted the cortex in the MSC-treated group was higher than the non-treated group. Corpus callosum thickness was greater in the MSC-treated group than the non-treated group. These results suggested enhanced plasticity was occurred following intravenous infusion of MSCs in cerebral infarction. It is conceivable that these process mechanisms might contribute to functional improvement by the infused MSCs in stroke from cerebral infarction.

研究分野：神経再生

キーワード：神経再生 骨髄間葉系幹細胞 可塑性 diffusion MRI

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) の経静脈的移植が治療効果を有することを数多く報告してきた。

これまでの基礎研究の知見より、骨髄間葉系幹細胞移植による治療効果のメカニズムは、サイトカインによる神経栄養作用、血管新生、脱髄軸索の再有髓化、神経再生による脳の可塑性の調節、と多段階的に進むことが分かっており、臨床研究の結果より、臨床上的神経症状の回復も、ほぼこれと平行して進むことが判明した。

MSC 移植によって運動・感覚機能が回復する過程における脳の可塑性の変化を解析するために、実験的脳梗塞モデル作成後 6 時間後に経静脈的に MSC を移植し、病側感覚運動野を賦活化させる前肢刺激によって functional MRI (fMRI) で大脳皮質の活動を測定した。その結果、非 MSC 移植群と比べて運動機能が有意に改善した MSC 移植群では、病側感覚運動野の賦活化の増大が認められた。さらに、MSC 移植群では、病側の大脳皮質のみが賦活化されるグループと、病側とともに健側の大脳皮質が賦活化されるグループに分けられ、両側の大脳皮質が賦活されるグループでは、さらなる運動機能の改善を認めることを報告した。

以上より、実験的脳梗塞に対する MSC 移植は、病側皮質の治療効果のみならず健側皮質の可塑性を亢進させることが示唆された。この機能回復のメカニズムは健側からの脳梁を介する皮質-皮質間の神経回路における rewiring などが、MSC 移植によって亢進し、脳梗塞後の運動機能回復に寄与すると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでに実験的脳梗塞モデルに対する MSC の経静脈的移植により、運動機

能が改善することを報告してきた。MSC 移植による治療効果のメカニズムには、神経栄養因子を介した神経保護作用、血液脳関門の安定化、損傷軸索の再生、再有髓化、神経可塑性の亢進などがあることが判明している。

本研究では、脳梗塞に対する MSC 移植後の、脳の可塑性の変化(特に健常側の脳)を行動学的、画像診断学的、組織学的に評価し、脳の可塑性のメカニズムを多角的解析方法で詳細に検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) MSC の培養・移植

SD ラットの大腿骨から骨髄を採取・培養を行った。3 継代目の MSC を下記の 2 群に対して、脳梗塞発症 6 時間後に大腿静脈から移植した。

非 MSC 移植群: 新鮮な培養液(1ml)静脈内投与

MSC 移植群: MSCs( $1.0 \times 10^6$  個)を新鮮な培養液 1ml に懸濁させ静脈内投与

### (2) 脳梗塞モデル

深麻酔下にて SD ラット(雄、250g-300g)の外頸動脈から内頸動脈ヘナイロン製の糸を侵入させて、中大脳動脈を閉塞し、中大脳動脈永久閉塞 (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCAO) モデルを作製した。作製した MCAO ラットをランダム化し、非 MSC 移植群、MSC 移植群の 2 群に分けた。

### (3) 解析項目

#### (3-1) 行動学的評価

経時的にトレッドミル(Muromachi Inc, Tokyo, Japan)を用いてラットの最大走行速度を測定し、運動機能を評価した。

#### (3-2) 画像診断学的解析

動物用 7.0T MRI (Oxford Instruments, UK, and Agilent Technologies, CA, USA) を用いて経時的に T2 強調画像を撮影した。評価日は MCAO 作成後 1 日、4 日、7 日、

14日、21日、28日、42日後とした。MCAO作成42日後のT2強調画像から、脳梁の厚さを測定した。また、観察期間終了後に、ラットを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳組織をdissectした。組織は、4%パラホルムアルデヒドで後固定を行なって、Ex vivo Diffusion Tensor Imaging (DTI)を撮像し、Tractography解析によって神経線維を描出することで、脳梗塞によって損傷を受けた神経回路の、MSC移植後の修復の程度などを解析した。

#### (3-3) 免疫組織学的解析

MCAO作成42日後に、ラットの大脳皮質組織を採集し、シナプスの抗体であるSynaptophysinを用いて免疫染色を行い、超解像共焦点顕微鏡(ZeissLSM780, ELYRAS.1)を用いて解析を行った。

#### (3-4) 組織学的解析

MCAO作成42日後に、ラットの大脳皮質組織を採集し、Nissl染色を行い、組織標本より、脳梁厚を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 行動学的評価

最大走行速度を測定した結果、MSC移植群において、運動機能が著明に改善し、非MSC移植群と統計学的に有意差を認めた。

#### (2) 画像診断学的解析

T2強調画像で計測した脳梁厚はMSC移植群が非MSC移植群に比べて有意に厚かった。

行動学的評価に有意差のあるMSC移植群と非MSC移植群の神経線維を描出すると、Tractographyによる神経線維数に有意差を認めた。DTIはMSC移植後の神経回路および損傷軸索の修復過程に対する有効な評価法となる可能性があると考えられた。

#### (3) 免疫組織学的解析

非MSC移植群と比べてMSC移植群において、健側脳の大脳皮質組織で、pre-synapticマーカーであるシナプトフィジンの発現が

有意に多く、脳の可塑性の亢進が誘導されている可能性があると考えられた。

#### (4) 組織学的解析

組織標本より計測した脳梁厚はMSC移植群が非MSC移植群に比べて有意に厚かった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Functional Recovery After the Systemic Administration of Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia.

Sakai T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Fukumura S, Kobayashi M, Tsutsumi H, Kocsis JD, Honmou O.

J Neurosurg Pediatr, 2018, in press 査読有

Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in a Rat Model of Chronic Cerebral Infarction.

Namioka T, Namioka A, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Onodera R, Suzuki J, Sasaki Y, Nagahama H, Kocsis JD, Honmou O.

J Neurosurg, 2018, in press 査読有

Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Protects against Brainstem Infarction in a Persistent Basilar Artery Occlusion Model in the Adult Rat.

Namioka A, Namioka T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Onodera R, Suzuki J, Sasaki Y, Nagahama H, Kocsis JD, Honmou O.

J Neurosurg, 2018, in press, 査読有

Intravenous infusion of mesenchymal

stem cells reduces epileptogenesis in a rat model of status epilepticus.

Fukumura S, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Nagahama H, Morita T, Sakai T, Tsutsumi H, Kocsis JD, Honmou O.

Epilepsy Res. 2018 Mar; 141:56-63. 査読有

Elevated Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Plasma but not Serum Reflect in vivo Functional Viability of Infused Mesenchymal Stem Cells after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rat.

Nakamura H, Sasaki Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Suzuki J, Nagahama H, Mikami T, Wanibuchi M, Kocsis JD, Honmou O.

J Neurosurg Sci, Feb 8, 2017. 査読有

Synergic Effects of Rehabilitation and Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells After Stroke in Rats.

Sasaki Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Nagahama H, Suzuki J, Tateyama D, Oka S, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Mikami T, Wanibuchi M, Kakizawa M, Ishiai S, Kocsis JD, Honmou O.

Phys Ther. 2016, 96: 1791-1798. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

脳梗塞・脊髄損傷に対する再生医療-医師主導治験による実用化-, 佐々木 祐典, 第 28 回代用臓器・再生医学研究会(2016 年 2 月 27 日), 北海道大学 鈴木章記念ホール(北海道札幌市)

rt-PA 静注後の出血性梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞の抑制効果, 中崎 公仁, 第 41

回日本脳卒中学会総会(2016 年 4 月 4 日-16 日), ロイトン札幌他(北海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長濱 宏史 (NAGAHAMA, Hiroshi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 20725676

### (2) 研究分担者

鈴木 淳平 (SUZUKI, Junpei)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 00572596

佐々木 祐典 (SASAKI, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20538136

中崎 公仁 (NAKAZAKI, Masahito)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70722461

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, Takeshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30372816

小野寺 理恵 (ONODERA, Rie)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60393328

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

なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ( )