

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19478

研究課題名(和文)慢性期脳梗塞治療戦略としてのミクログリア細胞移植療法の確立

研究課題名(英文)The establishment of therapeutic strategies of microglial transplantation against chronic ischemic stroke

研究代表者

金澤 雅人(Kanazawa, Masato)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80645101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリアを脳梗塞に類似した低酸素低糖刺激(OGD)にて、保護的M2ミクログリアに変化させることができることを明らかにした。さらに、この保護的ミクログリアを脳虚血後のラットに動脈投与することで、運動機能が改善促進させることを明らかにした。
保護的ミクログリア細胞を投与した群では、コントロール群と比べて、虚血辺縁の神経軸策進展、虚血中心の辺縁部の血管新生を有意に認めた。
さらに、成体脳梗塞ラットからミクログリアを分離できること、OGD刺激は、低酸素刺激、低糖刺激のみよりも相乗効果を有することも示した。M2ミクログリア投与は、脳梗塞に対する新しい治療戦略であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We confirmed primary microglia under oxygen-glucose deprivation (OGD) conditions like mild ischemia polar to protective M2 microglia. We found that intraarterial administration of OGD microglia promoted functional recovery via angiogenesis in the border area within the ischemic core as well as axonal outgrowth in the ischemic penumbra by remodeling factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor at 28 days after ischemia. Furthermore, we could isolated primary microglia from adult rats under cerebral ischemia. We also demonstrated that OGD condition prompted more secretion of VEGF than hypoxia or glucose-deprivation stimulus only. In conclusion, intravascular administration of M2 microglia preconditioned by optimal OGD might be a novel therapeutic strategy against ischemic stroke.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳梗塞 ミクログリア 細胞療法 血管新生 神経軸策伸展 M2

1. 研究開始当初の背景

(1). 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

脳梗塞に対する治療として発症超急性期の組織型プラスミノゲン・アクチベーター (tissue-plasminogen activator; tPA) 投与による血栓溶解と機械的血栓除去術による血栓除去による再灌流療法がある。しかし、発症数週間以後の**慢性期をターゲットとした内科的治療は再発予防しかこれまでにない。脳梗塞後の慢性期に成長因子投与の治験が行われてきたが(エリスロポイエチン, 顆粒球コロニー刺激因子, FGF-2)第三相では有効性は確認されていない**(Ehrenreich, Stroke 2009, Ringelstein, Stroke 2013, Bogousslavsky, Cerebrovasc Dis 2002)。最も重要なこととして、**中枢神経には薬剤を到達させない血液脳関門BBBが存在する**。そのため、薬剤が有効に脳内に到達しにくい。また、他の成長因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) の全身投与は、心不全を起こすため安全性に乏しい (Yang, J Cardiovasc Pharmacol 1996)。単純な**成長因子投与による脳梗塞治療は極めて困難**である。

本研究で、脳梗塞後の機能回復を示すことができれば、**組織移行の望める細胞による局所の治療が、新規の慢性期脳梗塞治療として有効であり、他の研究の道筋ともなる**。

(2). これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

応募者は、2007年から'10年まで新潟大学にて、脳梗塞の急性期新規治療法の開発 (脳梗塞後の BBB 破綻を抑制する研究) に従事し、tPA 投与と同時に、VEGF 抑制 (抗 VEGF 中和抗体, VEGF 受容体阻害薬) で tPA の治療可能時間を延長させ、予後を改善することを示した (JCBFM2011, 日本脳卒中学会・心臓財団**草野賞受賞**, 米国神経学会動物実験賞受賞, **国内外特許取得, 新聞報道**)。また、'10年から2年間、ワシントン大学 (del Zoppo

ラボ)において、脳血管障害における BBB 破綻、特に神経細胞に加え血管内皮細胞を含む neuro-vascular unit を、虚血から守る neuro-vascular protection の分子機序の解明を明らかにする検討を行った。脳虚血後の接着分子修飾 (JCBFM2011) や蛋白分解酵素マトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) による BBB 破綻の機序を検討し、MMP が治療候補分子となることを明らかにした (JCBFM 2012)。

これまでは急性期を標的とした研究を遂行してきたが、tPA の治療可能時間の延長が 2012年9月から治療ガイドラインでも受け入れられ、新世代の tPA も開発されており、適応患者が増える見通しがある。その一方、慢性期脳梗塞に対する治療やその病態はあまり検討されていない。

脳梗塞後、グリア細胞 (ミクログリアやアストロサイト) は、急性期に悪玉に働く VEGF, BDNF などの成長因子, TNF, IL-1, IL-6 などのサイトカイン, MMP-2/9 を分泌するが、これらの knockout を行うことで、**慢性期に血管新生などの組織修復が生じず、慢性期に機能回復が生じなくなる。すわち、これらは組織修復に関わる**と考えられている (Sun JCI2003, Rosell JCBFM2009, Zhao Nat Med2006)。これらの複数の因子の分泌源は、慢性期に虚血域に集簇するミクログリアが主体である。亜急性期から慢性期にかけて、**成長因子, サイトカインを大量に分泌するミクログリア由来の細胞療法は、組織修復を行える可能性**がある。

2. 研究の目的

ミクログリア投与による機能回復の機序として、ミクログリアの脳実質内移行を考えている。今回、以下の点について明らかにする。

(a) ミクログリアによる細胞療法が慢性期の修復を促進するかを明らかにする。

(b) oxygen-glucose deprivation (OGD) 刺激したミクログリアによ

る細胞療法が慢性期の修復を促進するかを明らかにする。

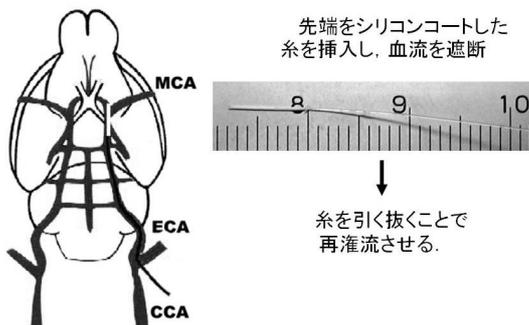
3. 研究の方法

すでに確立した「ラット局所脳塞栓モデル」(tPA 再灌流モデル)と初代培養グリア細胞を用いて、亜急性期から慢性期にかけての組織リモデリングの病態を検討する。

具体的には in vivo で経時的に脳梗塞後に、細胞外マトリックスが分解され、血管新生や伸展が生じるのかを明らかにし、さらに MMP と細胞増殖因子分泌源のグリア細胞を脳梗塞後に移植することで、リモデリングが促進され、機能回復に関与するかを明らかにする。

- ラット塞栓系再灌流モデルを使用する (我々はすでにこの動物モデルを修得し、安定した実験が可能になっている, J Neurochem 2011)。

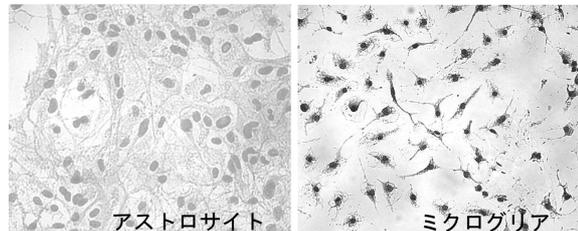
また、tPA 併用のラット脳塞栓梗塞再灌流モデルも使用する (我々はすでにこの動物モデルを修得し、安定した実験が可能になっている, JCBFM 2011)。



- 脳虚血の慢性期のリモデリングの評価を行うため、虚血後 1,3,7, 14 日後の新生血管数を定量化するため、新生血管内皮のマーカー CD31 で免疫染色し、Imaris による 3D 解析を行う。さらに、新生細胞の増殖マーカー Ki67 と血管内皮細胞、神経細胞、アストロサイト、周皮細胞、

ミクログリアマーカーでの二重染色を行い、局在を明らかにする。

- 初代培養グリア細胞 (ミクログリアとアストロサイト) を準備し、in vitro の虚血実験 OGD 実験を実施し、OGD18 時間後の培養上清を回収し、血管新生に関わる各種成長因子、炎症性サイトカインの定量を行う。
- 初代培養グリア細胞 (ミクログリアとアストロサイト) を虚血 7 日後に経動脈投与による移植を行い、脳梗塞後 28 日後まで、運動機能 (corner test) を評価する。ミクログリアとアストロサイトの慢性虚血期の効果の比較をする。



4. 研究成果

- ラット脳塞栓 tPA モデルと塞栓系モデルにおいて、虚血中心部でも分裂能を有する (Ki67 陽性) 細胞が増加し、虚血 1 週間をピークとして Ki67 陽性血管内皮細胞、Ki67 陽性周皮細胞と Ki67 陽性ミクログリアを認めることを示した。
- 塞栓系モデルにおいて、CD31 の免疫染色で、虚血中心部の辺縁部において、虚血 3 日目まで染色性は低下するが、その後 7, 14 日後に血管の新生を認める。虚血辺縁部は経時的には有意な変化を認めなかった。これまで回復の可能性がないと考えられていた虚血中心部でもその辺縁は回復する可能性があることが示唆された。
- 初代細胞培養のミクログリアやアストロサイトで、脳虚血に類似した OGD を行うと、VEGF が誘導分泌されること。BDNF に関しては、OGD 前後では有意な違いはなかった。ミクログリアは、OGD

刺激で炎症性サイトカイン TNF- α , IL-1 β が増加し, 抗炎症性サイトカイン TGF- β は, 著増, 分泌することを明らかにした.

- 神経細胞, ミクログリアの培養上清に progranulin が分泌されていること, 特に OGD 後に増加していることを明らかにした.
- 虚血後1週間の時点でOGD刺激後のミクログリアを動脈から虚血側に投与することで, 運動機能を対照のアストロサイト, 無細胞群と比べて, 改善させることを示した.
- これまで, 仔マウス脳からミクログリアを分離していたが, 今後の臨床応用も念頭にし, 成体脳梗塞ラットから, ミクログリアを分離できるかを検討した. 脳梗塞後, 梗塞巣周辺に, ミクログリアが集簇していることも明らかにしており (Brain 2015), 脳虚血3日後に8週令ラット脳から分離した. 結果, 成体脳梗塞ラットからミクログリアを分離できることを明らかにした.
- さらに, OGD刺激が, 低酸素刺激, 低糖刺激のみよりも相乗効果を有することも検討した. 保護的サイトカインVEGF量を培地のELISAにて測定したところ, OGD刺激は, 他の群より, 有意にVEGFを分泌していることも明らかにした.

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 10 件)

1. Monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke.

Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. *Int J Mol Sci*. 2017; 18. pii: E2135. (査読あり)

2. Izawa Y, Gu YH, Osada T, Kanazawa M, Hawkins BT, Koziol JA, Papayannopoulou T, Spatz M, Del Zoppo GJ. β 1-integrin-matrix interactions modulate cerebral microvessel endothelial cell tight junction expression and permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018; 38: 641-658. (査読あり)

3. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. *Sci Rep*. 2017; 7: 42582. (査読あり)

4. 脳梗塞後の機能回復を目指したミクログリアによる細胞療法. 金澤雅人, 高橋哲哉, 小野寺理, 下畑享良. 脳循環代謝. 2017; 28: 315-20. (査読なし)

5. Methylmercury causes blood-brain barrier damage in rats via upregulation of vascular endothelial growth factor expression. Takahashi T, Fujimura M, Koyama M, Kanazawa M, Usuki F, Nishizawa M, Shimohata T. *PLoS One*. 2017; 12: e0170623. (査読あり)

6. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke. Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24: 240-253. (査読あり)

7. プログラニュリン. 金澤雅人, 川村邦雄, 高橋哲哉, 西澤正豊, 下畑享良. 日本臨床. 2016; 74: 579-82. (査読なし)

8. 脳梗塞の病態と新規治療開発の将来像 成長因子プログラニュリンによる脳保護療法.

下畑享良, **金澤雅人**, 鳥谷部 真史, 小山 美咲, 川村邦雄, 高橋哲哉, 西澤正豊. 脳循環代謝. 2016; 27: 265-9. (査読なし)

9. プログラニューリンによる新規脳保護脳梗塞治療薬の開発. **金澤雅人**. 上原記念生命科学財団研究報告集. 2016; 30:1-8. (査読なし)

10. Cathepsin L acutely alters microvessel integrity within the neurovascular unit during focal cerebral ischemia. Gu YH, **Kanazawa M**, Hung SY, Wang X, Fukuda S, Koziol JA, Del Zoppo GJ. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35: 1888-900. (査読あり)

[学会発表](計 14 件)

1. 脳梗塞後遺症の機能回復を目指した低酸素低糖刺激保護的ミクログリア細胞療法. **金澤雅人**, 三浦南, 鳥谷部真史, 小山美咲, 畠山公大, 石川正典, 中島孝, 小野寺理, 高橋哲哉, 西澤正豊, 下畑享良. 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会「千里ライフサイエンスセンター(大阪府, 豊中市)」2017 年 11 月 3 日

2. Preconditioned microglia by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. **Masato Kanazawa**, Minami Miura, Masafumi Toriyabe, Masahiro Hatakeyama, Masanori Ishikawa, Takashi Nakajima, Osamu Onodera, **Tetsuya Takahashi**, Masatoyo Nishizawa, **Takayoshi Shimohata**. 8th Korea/Japan Stroke Conference, 「Niigata (Japan)」2017 年 10 月 21 日

3. Preconditioned protective microglia by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. **Masato Kanazawa**, Minami Miura,

Masafumi Toriyabe, Masahiro Hatakeyama, Masanori Ishikawa, Takashi Nakajima, Osamu Onodera, **Tetsuya Takahashi**, Masatoyo Nishizawa, **Takayoshi Shimohata**. World Congress of Neurology, 「Kyoto (Japan)」2017 年 9 月 18 日

4. Preconditioned M2 microglia by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. **Masato Kanazawa**, Minami Miura, Masafumi Toriyabe, Masahiro Hatakeyama, Masanori Ishikawa, Takashi Nakajima, Osamu Onodera, **Tetsuya Takahashi**, Masatoyo Nishizawa, **Takayoshi Shimohata**. Annual Meeting of American Academy of Neurology, 「Boston (USA)」2017 年 4 月 23 日

5. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. **Masato Kanazawa**, Minami Miura, Masafumi Toriyabe, Masahiro Hatakeyama, Masanori Ishikawa, Takashi Nakajima, Osamu Onodera, **Tetsuya Takahashi**, Masatoyo Nishizawa, **Takayoshi Shimohata**. Brain & Brain PET 2017, 「Berlin (Germany)」2017 年 4 月 3 日

6. 脳梗塞後の機能回復を目指したミクログリアによる細胞療法. **金澤雅人**, 生理学研究所・京都大学霊長類研究所との合同シンポジウム「新潟大学(新潟県, 新潟市)」2017 年 3 月 9 日

7. M2 microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promotes functional recovery in ischemic rats. **Masato Kanazawa**, Minami Miura, Masafumi Toriyabe, Masahiro Hatakeyama, Masanori Ishikawa, Takashi Nakajima, Osamu Onodera, **Tetsuya Takahashi**, Masatoyo Nishizawa, **Takayoshi Shimohata**. International Stroke Conference 2017, 「Houston (USA)」2017 年 2 月 2 日

8. Progranulin might protect neuronal cells

against focal cerebral ischemia by suppression of the activation of caspase-3. Masafumi Toriyabe, **Masato Kanazawa**, Misaki Koyama, Minami Miura, Tetsuya Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata. 第 57 回日本神経学会学術大会 「神戸国際会議場 (兵庫県, 神戸市)」2016 年 5 月 19 日

9. Neuroprotection of progranulin against focal cerebral ischemia via inhibiting proteolysis of TDP-43 by caspase-3. **Masato Kanazawa**, Masafumi Toriyabe, Misaki Koyama, Minami Miura, Tetsuya Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata. Annual Meeting of American Academy of Neurology, 「Vancouver (Canada)」2016 年 4 月 17 日

10. PGRN は TDP-43 の細胞内異常局在の抑制により, 脳虚血に対する神経細胞保護効果をもたらす. 鳥谷部真史, **金澤雅人**, 小山美咲, 高橋哲哉, 西澤正豊, 下畑享良. 第 41 回日本脳卒中学会総会 「ロイトン札幌 (北海道, 札幌市)」2016 年 4 月 14 日

11. Progranulin might protect neuronal cells against focal cerebral ischemia by suppression of the activation of caspase-3. Masafumi Toriyabe, **Masato Kanazawa**, Misaki Koyama, Minami Miura, Tetsuya Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata. International Stroke Conference 2016, 「Los Angeles (USA)」2016 年 2 月 17 日

12. プログラニューリンは, 脳虚血後の caspase-3 活性化の抑制により神経細胞を保護する. 鳥谷部真史, **金澤雅人**, 小山美咲, 高橋哲哉, 西澤正豊, 下畑享良. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会 「富山国際会議場 (富山県, 富山市)」2015 年 10 月 30 日

13. Therapeutic strategies against hemorrhagic transformation after t-PA treatment. **Masato Kanazawa**, Tetsuya

Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata. 第 56 回日本神経学会学術大会 「朱鷺メッセ (新潟県, 新潟市)」2015 年 5 月 23 日

14. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental ischemic stroke. **Masato Kanazawa**, Kunio Kawamura, Tetsuya Takahashi, Yoshinori Tanaka, Minami Miura, Misaki Koyama, Masafumi Toriyabe, Hironaka Igarashi, Tsutomu Nakada, Masugi Nishihara, Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata. 第 56 回日本神経学会学術大会 「朱鷺メッセ (新潟県, 新潟市)」2015 年 5 月 21 日

〔図書〕(計 2 件)

1. “【脳卒中病態学のススム】” 血管保護療法. **金澤雅人**, 高橋哲哉, 下畑享良. 南山堂 2018 年 2 月
2. “Annual Review 神経(2018)” 脳梗塞に対する低酸素・低糖刺激ミクログリアを用いた新規細胞療法. **金澤雅人**, 高橋哲哉, 下畑享良. 中外医学社, 2018 年 4 月

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 1 件)
細胞製剤および細胞製剤の製造方法 (PCT/JP2017/031246)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

以下のホームページ成果を公表している.
<https://ja-jp.facebook.com/NiigataCBFM>
<http://neuroweb.sblog.jp/page/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 金澤 雅人 (Kanazawa, Masato) 新潟大学・脳研究所・講師
研究者番号: 80645101
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 下畑 享良 (Shimohata, Takayoshi) 岐阜大学・医学部・教授
研究者番号: 60361911
連携研究者 高橋 哲哉 (Takahashi, Tetsuya) 新潟大学・歯学総合病院・助教
研究者番号: 20515663