

令和元年5月21日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10730

研究課題名(和文)再開通療法後の虚血脳再灌流障害に対する骨髄幹細胞による新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy with mesenchymal stem cell for reperfusion injury following reperfusion therapy

研究代表者

本望 修 (Honmou, Osamu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90285007

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)：再灌流療法においては出血性合併症への注意が必要である。本研究では、MSCによってrtPAによる出血性合併症を抑制することを示した。中大脳動脈閉塞による一過性閉塞モデル(tMCAO)ラットを作製し、生食+vehicle、rtPA+vehicle、生食+MSC、rtPA+MSCの4群に分けた。群において、出血性合併症は抑制された。群は、行動学的機能を改善したが、群のほうがより改善していた。群の脳血流は、再灌流直後ではほぼ同じであったが、群よりも高かった。MSC投与により、血管内皮機能の破綻が抑制により出血性合併症を減少させ、運動機能の改善に貢献することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性脳血管障害に対する近年の血栓溶解療法や脳血管内治療の急速な進歩により、再灌流障害への対応は、急いで対応すべき課題となっている。本研究では、MSC治療により、血管内皮機能の破綻が抑制により出血性合併症を減少させ、運動機能の改善に貢献することを明らかにした。さらに、本研究では、MSC療法とリハビリテーションの併用、新しい治療メカニズムの解明のほかに、慢性期脳梗塞、脳幹梗塞、脳小血管病、低酸素性虚血性脳症に対するMSC療法の展開に関しても研究を行い、良好な結果を報告している。以上より、MSC治療の今後の臨床における有用性を考慮した際の社会的意義は高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Reperfusion therapy with rtPA is the standard therapy for stroke. However, hemorrhagic complications can result. Intravenous infusion of MSCs provides therapeutic efficacy. One suggested mechanism is inhibition of endothelial dysfunction. Four groups were studied: 1) NS+vehicle, 2) rtPA+vehicle, 3) NS+MSCs, 4) rtPA+MSCs. The MSC-treated groups (3,4) experienced a greater reduction in the incidence rate of intracerebral hemorrhage and hemorrhagic volume after tMCAO even if rtPA was received. Behavioral testing indicated that MSC-infused groups had greater improvement, but rtPA+MSCs provided greater improvement than MSCs alone. The rCBF ratio of rtPA groups (2,4) was similar at 2 hours after reperfusion of tMCAO, but both were greater than that in non-rtPA groups. Infused MSCs may inhibit endothelial dysfunction to suppress hemorrhagic events and facilitate functional outcome. Combined therapy MSCs and rtPA facilitated early behavioral recovery.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳梗塞 骨髄幹細胞 再灌流障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳主幹動脈閉塞による急性期脳梗塞においては、閉塞血管の灌流領域の脳代謝および機能は低下し、脳実質や脳血管は脆弱化している。一方、近年、血栓溶解療法や脳血管内治療の急速な進歩により、閉塞血管の再開通率は 80-90%に至っている。このため、脆弱化した脳実質組織や毛細血管に対して、急速に血流が再開されることによって、脳細胞障害や出血性合併症等を引き起こす再灌流障害は、極めて重要な病態となっており、急いで対応すべき課題となっている。

我々はこれまで、脳梗塞動物モデル(完全閉塞モデル)を用いた基礎研究で、骨髄幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)の静脈からの全身投与が治療効果を有することを多数報告してきた(業績参照)。さらに、ヒトを対象として臨床試験を行った結果(業績参照)良好な結果が得られたため、現在、札幌医科大学では、医師主導治験を行っている。これまでの臨床試験から、神経症候、ADL 障害、機能障害の改善に関して、強い治療効果が期待されている(業績参照)。

治療効果のメカニズムとして、神経栄養因子を介した神経栄養・保護作用、サイトカインによる抗炎症作用、脱髄軸索の再有髄化、損傷軸索の再生、軸索の Sprouting、血管新生による血流増加、神経系細胞への分化による脳細胞の再生、免疫調節作用などが、多段階に作用することが判明している(業績参照)。更に近年、これらの作用メカニズムに加え、血管内皮細胞やペリサイトを再生させ、血液脳関門(blood brain barrier: BBB)を修復する治療メカニズムも報告している(業績参照)。

2. 研究の目的

これらの背景から、本申請では、一過性中大脳動脈閉塞モデル(tMCAO)ラットを用いて、脳局所に再灌流障害を誘導し、MSC を移植することで、再灌流障害の抑制効果の有無と作用メカニズムを更に詳細に科学的に解明することを主目的とした。

さらに、MSC 療法とリハビリテーションの併用、新しい治療メカニズムの解明のほかに、慢性期脳梗塞、脳幹梗塞、脳小血管病、低酸素性虚血性脳症に対する MSC 療法の展開に関しても研究を行った。

3. 研究の方法

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。先端を炙り丸くしたナイロン製の糸を、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。

4. 研究成果

(1) t-PA との併用

脳梗塞に対する再灌流療法はすでにスタンダードな治療法として確立してきたが、出血性合併症への注意が必要である。本研究では、MSC 治療によって rtPA による出血性合併症を抑制することを示した。方法は、中大脳動脈 90 分閉塞による一過性閉塞モデル(transient middle cerebral artery occlusion: tMCAO)ラットを作製し、動物用 MRI(DWI)で一定の脳梗塞巣を確認した後に、生理食塩水+vehicle 投与群、rtPA+vehicle 投与群、生理食塩水+MSC 投与群、rtPA+MSC 投与群の 4 群に分け、90 分の再灌流直後に rtPA (または生理食塩水)を投与し、その 30 分後に MSC (または vehicle)を大腿静脈から投与した。MSC の投与群において、rtPA の有無に関わらず出血性合併症は抑制された。rtPA の投与は、MMP-9 活性を賦活化したが、MSC は MMP-9 の活性を抑制した。MSC 投与群は、非 MSC 投与群に比べて、行動学的機能を改善したが、rtPA+MSC 群のほうがより改善していた。rtPA 投与群の脳血流は、再灌流直後ではほぼ同じであったが、非 rtPA 投与群よりも高かった。以上のことから、脳梗塞に対する rtPA による再灌流療法においては、MSC 投与により、血管内皮機能の破綻が抑制されることで、出血性合併症を減少させ、運動機能の改善に貢献することが示唆された。

(2) 慢性期脳梗塞～

これまでに行われた MSC の治療効果を検証する研究は、実験的脳梗塞作製後、比較的急性期に行われている。しかし、実臨床においては、急性期治療を終えて後遺症の残存した慢性期脳梗塞の患者が圧倒的に多く、リハビリテーション以外の治療法が限られているのが現状である。我々は、中大脳動脈永久閉塞による脳梗塞モデル(MCAO)作製後 8 週目の脳梗塞慢性期に MSC を経静脈的に投与し、治療効果を検証した結果、MSC 投与群は、vehicle 群に比べて、動物用 MRI による脳梗塞巣の体積は双方に違いはないものの運動機能の改善が得られることが判明した。この治療効果を生じるメカニズムとして、血液脳関門機能の改善があることを、エバンスブルーの血管外漏出、免疫組織学染色による血管内皮細胞、周細胞の解析により明らかにしている。したがって、MSC の経静脈的投与は、慢性期脳梗塞に対しても治療効果を発揮する可能性があることがわかった。

(3) リハビリテーションとの併用

MSC とリハビリテーションの相乗効果について検討した研究は少なく、また、臨床においてもリハビリテーションの有無を検討することは倫理的に困難である。しかし、今後の細胞療法の進歩にはリハビリテーションとの関与は不可欠と考えられる。我々は脳梗塞モデルラットを使用し、相乗効果の検討を行った。方法は、MCAO ラットを、コントロール群、リハビリテーション群、MSC 投与群、併用群の4群に分け、MSC は脳梗塞作成6時間後に大腿静脈から投与した。リハビリテーションとして運動を付加する群には、MCAO 作成1日後よりトレッドミル走行を毎日行った。運動強度は毎分3mから開始し、1週ごとに毎分3m増加するプロトコルで進めた。治療効果の検討は、四肢機能評価としてLimb placement testを継時的に行った。また、画像診断学的評価として脳梗塞体積の継時的定量と脳梁の厚さの定量、組織学的評価として脳梗塞周辺領域のシナプス数の定量を行った。運動機能では、併用群において最大の改善を認めた。その改善は、MCAO 作成35日後においてMSC投与群と比較し、優位な改善を示す結果が得られた。脳梗塞体積においても、併用群において最も脳梗塞体積の減少を認め、MCAO 作成35日後にはMSC投与群よりも優位に減少していることが判明した。また、脳梗塞周辺領域のシナプスを免疫組織学的に検討した結果、MCAO 作成50日後におけるシナプスが併用群において増加していることを認めた。さらに、興味深いことに、脳梁の厚さも増加していることを認められ、シナプス数や脳梁の厚さは、運動機能の改善と高い相関を示していた。MSCの経静脈的投与にリハビリテーションを併用することで、運動機能をさらに改善させる相乗効果があることが判明した。この運動機能の改善には、脳梗塞体積の減少とシナプス新生による神経可塑性の亢進が関与していることが推測され、新たな治療方法におけるリハビリの重要性が示唆された。これらの結果からも、MSC治療は、再生医療においてリハビリテーションは益々重要な役割を担ってくると考えられた。

(4) 脳幹梗塞

過去にげっ歯類を用いた脳梗塞モデルによって検証された多くの脳梗塞治療薬が臨床で良い結果が得られなかった原因として、脳における白質/灰白質の割合の違いが挙げられる。ヒトの脳には白質部分が多く含まれるが、げっ歯類の脳は灰白質が多いため、げっ歯類での治療効果をヒトにトランスレーションした際に、治療効果に差異が生じた可能性があった。我々は、脳幹には白質が多く含まれていることに注目し、脳底動脈の近位側を4点結紮閉塞することで、脳幹梗塞モデルを作製した。これまでに、再現性の高いラットの脳幹梗塞モデルはほとんどなかったが、この脳幹梗塞モデルは、再現性が高く、同モデルに対するMSCの経静脈的投与を行った結果、MSC投与群では、脳梗塞巣の体積の縮小、運動機能の改善を認めた。以上より、MSCの経静脈的投与により、脳幹梗塞に対しても治療効果を得られる可能性があり、MSCの経静脈投与がヒトにおいても治療効果をもたらすメカニズムに白質に対する治療効果があることが示唆された。

(5) 脳小血管病

脳小血管病は脳卒中の原因として近年注目を集めている病態であるのみならず、認知症の原因としても知られるようになってきている。脳小血管病により血管内皮細胞や周細胞にダメージが加わった結果、血液脳関門の機能不全が生じ、神経の損傷が生じる。さらに、血液脳関門は、血液脳関門のトランスポートシステムによるアミロイドタンパクのクリアランスにも関与しているため、血液脳関門の機能低下により、脳内のアミロイドタンパクの沈着が誘導されることも明らかになっている。我々は、認知機能が低下する脳小血管病モデル動物に対して、MSCを経静脈的投与した結果、認知機能の低下が抑制されることを見出した。その治療メカニズムとして、MSCは、血液脳関門の機能の安定化に寄与し、その分子基盤としてTGF- β -アンジオポイエチン1シグナル伝達系が、微小血管系の再構築に強く関与することを明らかにした。MSCの静脈的投与により、脳血液関門の機能が回復されることにより、アミロイドタンパクの沈着・神経細胞死・脳の萎縮を抑制し、認知機能の低下が抑制されることを示した。したがって、MSCは、脳小血管病を基盤とした血管性認知症のみならずアルツハイマー病に対しても新しい治療法となりうることを示唆された。

(6) 低酸素性虚血性脳症

新生児期における低酸素性虚血性脳症は脳性麻痺の原因となりうる。これまでも、低酸素性虚血性脳症に対するさまざまな治療法が試みられてきたが、有効な治療法は限られており、効果も限定的である。我々は、生後7日目のラットに対し、左総頸動脈の結紮後、低酸素に暴露し、低酸素性虚血性脳症モデルラットを作製した。同モデルに対して、MSCを経静脈的に投与し、治療効果を検証した結果、MSC投与群は、vehicle群に比べて、運動機能の改善が得られることを見出した。興味深いことに、動物用MRIで全脳体積、健側脳の体積、残存脳の体積を測定した結果、全脳体積、健側脳の体積、残存脳の体積の増大を認めた。さらに、組織学的解析により、健側脳

の NeuN 陽性細胞の増加やシナプス数の増加が観察されたことから、神経可塑性の亢進が関与していることが推測された。また、脳梁の厚さの増大も観察されたことから、運動機能の改善には、健側脳の代償による神経回路の再構築が多分に貢献していると推測された。

(7) 新しい治療メカニズムと実用化におけるモニタリングの問題

脳梗塞においては、脳梁を介した大脳半球間の繊維連絡が機能回復に重要な役割を果たすことが知られている。MSC は、神経保護効果、血液脳関門機能の回復、抗炎症効果、神経回路の再構築、再有髄化、神経系細胞への分化、神経可塑性の亢進などの多彩な治療メカニズムにより、喪失した神経機能の回復に貢献することが明らかになっているが、特に本研究において、MSC の経静脈的投与は、脳梁を介した大脳半球間の繊維連絡による神経回路の再構築に強く関与し、治療効果の発現に寄与することを、MRI の Diffusion Tensor Imaging (DTI) と神経トレーサーを用いて示した。また、静脈内に投与された MSC の活性をモニタリングするためには、血漿中の BDNF 濃度が有効である可能性を見出しており、実臨床における検証が待たれる。

以上より、補助金は適切に使用された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Nakazaki M, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Suzuki J, Sasaki Y, Nagahama H, Hashi K, Kocsis JD, Honmou O: Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Improves Impaired Cognitive Function in a Cerebral Small Vessel Disease Model. *Neuroscience*, 査読有, 2019, 408:361-377.

Preservation of interhemispheric cortical connections through corpus callosum following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral infarction. Nagahama H, Nakazaki M, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Namioka T, Namioka A, Oka S, Onodera R, Suzuki J, Sasaki Y, Kocsis JD, Honmou O. *Brain Res*. 査読有, 1695:37-44. 2018.

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. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells protects against brainstem infarction in a persistent basilar artery occlusion model in the adult rat. *J Neurosurg*, 査読有, 2018. doi: 10.3171/2018.4.JNS173121

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. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of chronic cerebral infarction, *J Neurosurg*, 査読有, 2018. doi: 10.3171/2018.5.JNS18140

Sakai T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Fukumura S, Kobayashi M, Tsutsumi H, Kocsis JD, Honmou O. Functional recovery after the systemic administration of mesenchymal stem cells in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosurg Pediatr*. 査読有, 1-10. 2018.

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. 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. *J Neurosurg Sci*. 査読有. 2017, [Epub ahead of print]

Nakazaki M, Kataoka-Sasaki Y, Sasaki M, Oka S, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Suzuki J, Sasaki Y, Nagahama H, Mikami T, Wanibuchi M, Kocsis JD, Honmou O. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells inhibits intracranial hemorrhage after rt-PA therapy for transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg*. 査読有. 1-10. 2016.

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. Synergic Effects of Rehabilitation and Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells After Stroke in Rats., *Phys Ther*. 査読有. 96: 1791-1798. 2016.

〔学会発表〕(計 18 件)

本望 修 脳梗塞に対する再生治療、第 41 回日本高血圧学会総会、星野リポート 0M07 旭川 (北海道旭川市) 2018.9.14

本望 修 再生医療の現状、第 25 回日本義肢装具士協会学術大会、札幌コンベンションセ

ンター（北海道札幌市）2018.7.21

本望 修 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療、第 68 回日本病院学会、ホテル日航金沢（石川県金沢市）2018.6.29

本望 修 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療－医師主導治験による実用化、日本麻酔科学会第 65 回学術集会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2018.5.18

本望 修 脊髄損傷の再生医療－医師主導治験による実用化－、第 47 回日本脊椎脊髄病学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）2018.4.13

本望 修 中枢神経再生とリハビリテーション、第 17 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2018.3.22

本望 修 脳卒中と細胞治療：臨床への諸問題、第 43 回日本脳卒中学会学術集会 STROKE 2018、福岡国際会議場（福岡県福岡市）2018.3.17

本望 修 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療 医師主導治験による実用化、第 23 回 日本脳神経外科救急学会、ホテル日航奈良（奈良県奈良市）2018.2.3

本望 修 老年医学領域の再生医療の現状と課題、第 59 回 日本老年医学会学術集会、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）2017.6.19

本望 修 脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞治療 - 医師主導治験による実用化と認知症への展開 -、第 35 回 日本認知症学会学術集会、東京国際フォーラム（東京都千代田区）2016.12.4

本望 修 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 -、第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会、あわぎんホール（徳島県徳島市）、2016.11.11

本望 修 細胞治療の「いま」 自己骨髄間葉系幹細胞の静脈投与による脳梗塞と脊髄損傷の再生医療-医師主導治験による実用化、日本脳神経外科学会第 75 回学術総会、マリンメッセ福岡（福岡県福岡市）2016.9.29

本望 修 「脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞移植 - 医師主導治験による実用化」 “Intravenous transplantation of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow into stroke patient”、第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、東京の虎ノ門ヒルズフォーラム（東京都港区）2016.7.31

本望 修 再生医療における理学療法への期待 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療、第 51 回日本理学療法学術大会、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）2016.5.29

本望 修 再生医療の最前線 神経再生医療の現状と未来、日本麻酔科学会第 63 回学術集会、福岡国際会議場（福岡県福岡市）2016.5.28

本望 修 脳神経疾患に対する細胞治療の実際、第 36 回日本脳神経外科コンgres総会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2016.5.21

本望 修 脳梗塞と脊髄損傷の再生医療 医師主導治験による実用化、第 57 回日本神経学会学術大会、神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市）2016.5.21

本望 修 ここまできた脳梗塞・脊髄損傷の再生医療 医師主導治験による実用化、第 119 回 日本小児科学会学術集会、ニトリ文化ホール（北海道札幌市）2016.5.14

〔図書〕(計 1 件)

Masanori Sasaki and Osamu Honmou, Springer, Mesenchymal Stem Cells, Cell Therapy Against Cerebral Stroke, 2017, 147-156

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 祐典

ローマ字氏名：Masanori Sasaki

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：20538136

研究分担者氏名：浪岡 愛

ローマ字氏名：Ai Namioka

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号(8桁): 60748995

研究分担者氏名：浪岡 隆洋

ローマ字氏名：Takahiro Namioka

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号(8桁): 70748996

研究分担者氏名：中崎 公仁

ローマ字氏名：Masahito Nakazaki

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号(8桁): 70722461

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。