

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10847

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞による脳梗塞に対する細胞治療

研究課題名(英文) Cell therapy for cerebral infarction by the mesenchymal stem cell

研究代表者

鈴木 謙介 (Suzuki, Kensuke)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：20400674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪は細胞の採取が容易であることから再生医療に用いる脂肪由来間葉系幹細胞の供給源として有望である。その中でも我々は微小胞を再生医療に利用することを発案し、研究を進めた。マウス一過性脳虚血モデルに、乳幼児の血管内皮前駆細胞から採取した微小胞(EMV)を投与し、脂肪由来間葉系幹細胞の機能を向上させる効果を検証した。これらの細胞は脳梗塞と脳浮腫を抑制し、さらに神経症状改善効果が高かった。脳梗塞中心部と周辺部では、細胞保護型Microgliaが動員され、脳梗塞を抑制し、神経症状を改善させ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

細胞移植による再生医療は虚血性疾患に対する新規治療法として注目されており、ES細胞、iPS細胞、骨髄幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞などの前駆細胞や組織幹細胞が細胞治療の細胞供給源として研究されているが、どの細胞が治療に適しているかは現在も不明である。今回我々は脂肪から採取培養した間葉系幹細胞(AT-MSC)の効果を検証したが、現在トピックとして注目されている微小胞の効果、マイクログリアの関与も確認することができたことで、脳梗塞治療としての再生医療の可能性をまた一歩進めることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Because fat is easy to take from human, adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (AT-MSC) is one of good resources for the regenerative medicine. Among them, we pay attention to “microvesicle (EMV)” as a strong factor for the regenerative medicine. Mice TIA (transient ischemic attack) model was used to show the effect of EMV from aldehyde-low endothelial progenitor cell (EPC) for adult AT-MSC function in the cerebral infarction. EMV Adult AT-MSC was more effective than Adult AT-MSC in the protection of the infarction and edema. EMV-baby AT-MSC improved the neurological function better than Baby AT-MSC. Microglia was mobilized into the area of the ischemic core and penumbra. EMV-Adult AT-MSC made the cytoprotection microglia migrate to the cerebral infarction area and protected the infarction and neurological dysfunction.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 再生医療 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞研究の発展により、再生医療への期待は高まるばかりである。しかしながら、感染・癌化などクリアすべき問題は少なくない。いち早く再生医療を臨床応用することは、日本のみならず世界中が熱望しているであろう。一方、脳卒中は日本における死因第 4 位を占め、また有病率はさらに高く、社会問題の一つとなっている。神経細胞は再生不可能といわれており、そのため発症後の後遺症は解決できないと考えられている。細胞移植による再生医療は虚血性疾患に対する新規治療法として注目されており、ES 細胞、iPS 細胞、骨髄幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞などの前駆細胞や組織幹細胞が細胞治療の細胞供給源として研究されているが、どの細胞が治療に適しているかは現在も不明である。

そのなかでも脂肪は細胞の採取が容易であることから再生医療に用いる脂肪由来間葉系幹細胞 (adipose tissue-derived mesenchymal stem cell: AT-MSC) の供給源として有望である。しかし、脳梗塞等の疾患は高齢者に多く、高齢や生活習慣因子の低下に伴い細胞の機能が低下している課題がある。再生困難と言われている脳細胞を、脳梗塞モデルを用いた間葉系幹細胞投与で以下に保護できるか、しかも細胞の特殊抽出法や年齢による差異を確認する画期的な研究と考える。

2. 研究の目的

我々は血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell: EPC) の虚血部位における血管新生能力や神経細胞保護作用に着目し、動物実験にて具体的な効果を報告した。特に神経に関する細胞治療は、再生というよりも各サイトカインによる神経保護効果がメインであると考えられる。研究の過程でオリジナルの無血清培養での間葉系幹細胞が強い骨再生能力を示し、それがサイトカインの作用であることを示すことができた。今回は、この細胞治療が脳梗塞に対する治療として成立するかを動物実験にて確認する。

自家体性幹細胞の老化に伴う細胞の遊走能や生着能の低下、及びサイトカインなどの栄養因子の分泌能の低下の課題を克服するために、我々は Microvesicle を再生医療に利用することを発案し、研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、乳幼児の Aldehyde endothelial progenitor cell (EPC) から採取した microvesicle (EMV) を用いて、EMV が成人の AT-MSC の機能を向上させる効果を検証した。

まず、マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルの作成を以下のように行い、その完成度を確認した。マウス一過性脳虚血モデルの作成はイソフルレンの吸入下に行った。右鼠径部に切開をおき、大腿動脈、静脈にそれぞれ PE10 カテーテルを挿入し、術中の動脈血モニタリングライン、および薬剤投与ルートとした。マウス頭蓋骨に骨窓を作成し、レーザードップラー血流計で脳血流を測定した。次に、前頸部正中切開をおき、右総頸動脈と外頸動脈を結紮し、先端をシリコンコーティングしたナイロン糸を総頸動脈から頭蓋内内頸動脈へと誘導し、中大脳動脈を閉塞させた。1

時間の虚血の後、ナイロン糸を頸部まで引き抜くことで再還流させた。最終的に 20 匹の実験で、脳梗塞発現率は 15 匹 75%と想定内であった。

さらにヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (AT-MSC) の単離培養を以下のように施行した。

術前に患者の同意を得て手術時に摘出された正常脂肪組織から AT-MSC を単離培養した。脂肪組織をコラゲナーゼ溶液内で可能な限り細かく裁断する。Fliter を通して遠心し、液面の脂肪と上澄を除去し、ペレットを懸濁後、再度遠心し、上清を除去した。その後培養液 (IMDM, FBS, bFGFm L-Gln) へペレットを播種して培養した。単離された細胞を脂肪、骨、軟骨へ分化させ、多能性を確認した。アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の違いにより、分化能が異なることが証明された。

マウス一過性中大脳動脈閉塞を達成し、術翌日に中等度の神経症状である Longa スコア 3-4-5 の動物を無作為に分けた。これらのグループに、成人および乳児組織のヒト脂肪組織由来の MSC (Baby AT-MSC、Adult AT-MSC)、EMV を導入した成人と乳児の MSC (EMV Baby AT-MSC、EMV Adult AT-MSC) そして、EPC のみとコントロールの PBS のいずれかを、総頸動脈に留置したカテーテルより動脈投与した。

	Total injected animals	Dead after injection	Longa score n=6	Infarct volume n=6	Cell counting n=4
A-AM	6	1	6	5	4
A-AM-MV	4	1	4	3	1
B-AM	6	0	6	6	4
B-AM-MV	6	0	6	6	2
EPCs	4	0	4	4	4
PBS	6	3	6	3	1

- B-AM-MV: Baby Adipose tissue derived Mesenchymal stem cells transfected with alde-low EPCs MicroVesicles
- A-AM-MV: Adult Adipose tissue derived Mesenchymal stem cells transfected with alde-low EPCs MicroVesicles
- B-AM: Baby Adipose tissue derived Mesenchymal stem cells
- A-AM: Adult Adipose tissue derived Mesenchymal stem cells
- EPC: Endothelial Progenitor Cells
- PBS: Phosphate Buffer Saline

細胞投与 24 時間後に致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し、上行大動脈経路で PBS による灌流を行った。マウス脳を摘出後、前頭葉先端から連続 7 スライス (2 mm 厚) の冠状断片を作成し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) で染色し (37 °C、20 分)、デジタルカメラで撮影した。SCION image (SCION Corporation, Frederick, MD) を使用して各断面の脳梗塞面積を計測した。7 スライス (2 mm 厚) の脳梗塞面積の和を脳梗塞体積とし、正常側半球体積との比を脳梗塞体積比 (% infarct volume) として算出することで、脳浮腫による影響を補正した。さらに細胞投与後の血流評価および神経症状、Cresylviolet 染色による脳梗塞領域の判定、移植細胞の分化

と Neurovascular network の再構築の確認でその関与有無を解析した。具体的には摘出した脳を Cresylviolet 染色で脳梗塞領域を判定し、その面積を NIH image analysis software で計測した。移植細胞の毛細血管 (CD31, Desmin)、アストロサイト (GFAP)、ミクログリア (Iba1)、神経細胞 (NeuN) への分化を評価し、Neurovascular network の再構築を評価した。

具体的には、血管内皮細胞のマーカー染色による血管密度の評価を、血管新生関連因子 (VEGF, VEGFR, CXCR4) の発現解析と低酸素応答転写因子の発現解析により分析した。投与する細胞を GFP (緑色蛍光タンパク質) にて標識し、血管新生への寄与を、(1) GFP 陽性細胞の分布および頻度の解析 (2) 血管および関連因子と GFP の二重染色による評価、で確認した。

低酸素応答転写因子 (Hypoxia inducible factor: HIF) の標的因子 (VEGF、VEGFR など) や血管新生関連因子 (CXCR4 など) の発現を免疫組織化学染色で同定することで、脳梗塞における間葉系幹細胞の脳保護効果と血管新生効果等を確認した。

4 . 研究成果

EMV Adult AT-MSC は Adult AT-MSC に比べて、脳梗塞と脳浮腫を抑制した。EMV-baby AT-MSC は Baby AT-MSC と比べて、脳梗塞と脳浮腫抑制効果が高く、神経症状改善効果が高かった。脳梗塞中心部と周辺部では、Microglia の動員を認め、細胞障害型 Microglia (M1) と細胞保護型 Microglia (M2) をの評価では、EMV-Adult AT-MSC では M2 microglia を遊走させて、脳梗塞病変部周囲に動員し、脳梗塞を抑制し、神経症状を改善させることが示唆された。若年細胞の神経保護作用が強いことが確認され、加えて Microglia の神経保護作用への関与もほぼ確実であり、今後の脳梗塞に対する再生医療の進歩に期待が高まる結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木謙介
2. 発表標題 脳梗塞に対する再生医療の可能性について
3. 学会等名 ホーチミン医科薬科大学 再生医療研究会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018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	兵頭 明夫 (Hyodo Akio) (40167606)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	田中 喜展 (Tanaka Yoshihiro) (90316571)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	
研究分担者	永石 雅也 (Nagaishi Masaya) (40364632)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	中江 竜太 (Nakae Ryuta) (20786975)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 亮太郎 (Suzuki Ryotarou) (10552309)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究 分担者	河村 洋介 (Kawamura Yousuke) (00740333)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究 分担者	平田 浩二 (Hirata Kouji) (80785931)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究 分担者	丸島 愛樹 (Marushima Aiki) (40722525)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究 分担者	滝川 知司 (Takigawa Tomoji) (60450227)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	