

令和元年6月9日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16654

研究課題名(和文) 投与細胞の若返りを目指した脳梗塞に対する幹細胞移植投与方法の確立

研究課題名(英文) Cell therapy using rejuvenated aged donor derived mesenchymal stem cell

研究代表者

山口 将 (YAMAGUCHI, Susumu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：70712131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素刺激による幹細胞の若返り効果は認めなかった。脂肪由来幹細胞を用いて頸動脈的投与を行い、至適細胞数の検討を行った。SDラットを用いて一過性中大脳動脈閉塞モデルを作成し、脳梗塞発症翌日に経内頸動脈的にPBS(Control)、脂肪由来間葉系幹細胞(1万個;Low dose)、脂肪由来間葉系幹細胞(100万個;High dose)を投与。脳梗塞29日後にmNSSの中央値はControl群は6、High dose群は3、Low dose群は3.5であり、細胞投与群はControl群に比べ有意に神経学的改善を認めしたが、High dose群はLow dose群に比べ有意な神経学的改善を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞に対する幹細胞の自家移植を考慮した場合は幹細胞の老化による機能低下は問題となる。低酸素刺激による幹細胞の若返りは認めなかったが、今後NACやラバマイシンなどを使用し、若返りを行う研究は必要となる。また、脂肪由来間葉系幹細胞は骨髄間葉系幹細胞に比べ容易に採取可能であり、細胞の増加速度も速いといわれている。そのために今後、cell sourceとしては期待される。脂肪由来の幹細胞においても脳梗塞による幹細胞移植の効果は十分に認められた。至適投与と条件の検討を行い、臨床応用へつなげていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Hypooxygenation did not induce rejuvenated aged donor derived mesenchymal stem cell in evaluation of cell proliferation and expression of HIF-1. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cell for ischemic stroke enhanced the functional recovery. However there was no significant differences in the functional recovery between high dose administration group and low dose administration group.

研究分野：脳神経外科

キーワード：若返り 脳梗塞 幹細胞移植

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

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は要介護を要する患者の原因の第一位を占めており、多くの医療費が積み込まれている。脳卒中の治療としては1次予防として血圧、脂質代謝異常症、血糖のコントロール、抗血栓薬投与がある。ひとたび脳梗塞となれば、tPA 静注療法（血栓溶解療法）や血栓回収療法（血管内治療）が発展し効果を上げてきている。しかし、急性期血行再建療法は一部の患者でのみ適応となり、すべての患者がこの超急性期療法を受けることは困難である。超急性期療法を受けても後遺症を残しうる現状があり、その後遺症に対してリハビリテーションを長期行い、機能改善に努めざるを得ないのが現状である。脳梗塞並びに他の脳血管障害に対する細胞移植治療は、脳卒中治療の画期的な治療として期待されており、わが国でも臨床治験が始まっている。わが国では自家移植が行われることが多いが、脳梗塞は高齢者に発症することが多く、高齢者由来の幹細胞は老化をきたし、機能低下している可能性が示唆され、我々は高齢者由来の骨髄間葉系幹細胞では若年者由来の骨髄間葉系幹細胞と比べ、platelet derived growth factor -BB (PDGF-BB)と Brain derived neurotrophic factor (BDNF)は分泌量が低下しており、脳梗塞ラットに対して投与することにより治療効果に差があることを報告した (Yamaguchi S et al. J Cereb Blood Flow Metab 2018)。

また、脂肪由来間葉系幹細胞は骨髄間葉系幹細胞に比べ容易に採取可能であり、細胞の増加速度も速いといわれている。そのために今後、cell sourceとしては期待される。

2. 研究の目的

自家移植において効果を上昇させるために、高齢者由来の間葉系幹細胞の若返りによる機能改善により治療効果の向上が得られるかを検討。

また、今後 cell source として期待される脂肪由来幹細胞の頸動脈的投与による至適細胞数の検討は行われていないため、脂肪由来間葉系幹細胞を用いた至適投与細胞数の検討を行った。

3. 研究の方法

低酸素刺激により幹細胞の機能向上が得られるかを検討した。低酸素チャンバー（37度、O₂ 1%、CO₂ 5%）を用いて、normoxia と hypoxia で比較し、細胞の増加率、HIF-1の発現などを検討した。さらに High glucose 群と Low glucose 群での細胞の機能改善の有無について検討を行った。

また、並行して脂肪由来の間葉系幹細胞を用いて頸動脈的幹細胞投与を行った。SD ラットを用いて一過性中大脳動脈閉塞モデルを作成。脳梗塞発症翌日に経内頸動脈的に PBS(Control)、脂肪由来間葉系幹細胞(1万個;Low dose)、脂肪由来間葉系幹細胞(100万個;High dose)を投与した。

4. 研究成果

低酸素刺激による細胞の若返り:過去の報告では低酸素チャンバーに入れて24時間後くらいから cell viability に差が出始め、48時間で顕著となるとの報告であったが、normoxia 群と hypoxia 群で細胞数や HIF-1 の発現や増加細胞数に差はなかった。また、Medium を High glucose 群と Low glucose 群に振り分け、それらをさらに normoxia 群と hypoxia 群に振り分けて（合計4群）で比較を行うも、増加細胞数や HIF-1 の発現に差はなかった。そのためにラパマイシンや NAC(antioxidant)を培養液に加えて、細胞数や液性因子の検討を行っていく予定としている。

脂肪由来幹細胞の至適投与数の検討:経過中の死亡率は Control 群 35%、High dose 群 35%、

Low dose 群 46.6%であった。脳梗塞 29 日後(D29)に modified Neurological severity score の中央値(IQR、25-75%)は Control 群は 6(5-6)、High dose 群は 3(2.5-3)、Low dose 群は 3.5(2.75-4)であり、細胞投与群は Control 群に比べ有意に神経学的改善を認めた(Control vs High dose; $P<0.0001$ 、Control vs Low dose; $P=0.003$)。しかし、High dose 群は Low dose 群に比べ有意な神経学的改善を認めなかった(High dose vs Low dose; $P=0.4089$)。

幹細胞の動注は塞栓源になるといわれている、そのために、脂肪由来間葉系幹細胞の細胞表面に PKH を付加し、動注を行い、D3 にラットから脳を摘出し、RECA-1(血管内皮細胞)でラット脳血管を染色し、血管内での幹細胞による塞栓数を測定していく予定。また、同時に D29 のラット脳の免疫染色を行い、抗炎症作用、血管新生、神経新生の程度に関して検討を行っていく予定。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. A rare case of floating intimal flap associated with atheromatous carotid plaque: A case report

Yamaguchi S, Hamabe J, Yamashita A, Irie J, Yagi N, Suyama K

World Neurosurg. Feb;122:98-101, 2019. DOI: 10.1016/j.wneu.2018.10.139 (査読あり)

2. A case of rapid malignant brain swelling subacutely after reperfusion therapy for internal carotid arterial occlusion: A case report.

Yamaguchi S, Hamabe J, Horie N, Kishikawa T, Yagi N, Suyama K

World Neurosurg. Oct;118:311-315, 2018. DOI: 10.1016/j.wneu.2018.07.151 (査読あり)

3. Iatrogenic removal of the intima in the middle cerebral artery by a stent retriever: A report of two cases.

Yamaguchi S, Hamabe J, Horie N, Yamashita A, Irie J, Tokuda Y, Mutsukura K, Yagi N, Suyama K

World Neurosurg. Oct;118:203-208, 2018. DOI: 10.1016/j.wneu.2018.07.118 (査読あり)

4. Assessment of veins in T2*-weighted MR angiography predicts infarct growth in hyperacute ischemic stroke.

Yamaguchi S, Horie N, Morikawa M, Tateishi Y, Hiu T, Morofuji Y, Izumo T, Hayashi K, Matsuo T

PLoS One. Apr;4; 13(4), 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195554. (査読あり)

5. Age of Donor of Human Mesenchymal Stem Cells Affects Structural and Functional Recovery after Cell Therapy Following Ischemic Stroke.

Yamaguchi S, Horie N, Satoh K, Ishikawa T, Mori T, Maeda H, Fukuda Y, Ishizaka S, Hiu T, Morofuji Y, Izumo T, Nishida N, Matsuo T

J Cereb Blood Flow Metab. Jul;38(7):1199-1212, 2018. DOI: 10.1177/0271678X17731964. (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

日本脳神経外科学会 第 77 回学術総会

1DP3-DP014-08 脳梗塞に対する脂肪細胞由来幹細胞の有用性

定方英作、堀江信貴、山口将、陶山一彦、佐藤克也、西田教行、松尾孝之

2018 年 10 月 10 日 仙台

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者 なし

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。