

令和 5 年 10 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07380

研究課題名(和文) ヒト由来脳傷害/虚血誘導性神経幹細胞による細胞移植療法の開発

研究課題名(英文) Development of cell therapy using human-derived injury/ischemia-induced stem/progenitor cells

研究代表者

中込 隆之 (Nakagomi, Takayuki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80434950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、外減圧術のみならず、内減圧術が必要となった脳梗塞患者の梗塞巣より単離したヒト由来脳傷害/虚血誘導性幹細胞 (human-derived injury/ischemia-induced stem/progenitor cells; h-iSC) を脳梗塞マウスに移植し、その有効性に関して検討した。その結果、h-iSCは、細胞移植周囲に生着し、その一部は神経マーカーを発現していた。また、h-iSCを移植した群では、コントロール群(細胞非移植群)と比較し、神経機能の改善を認めた。以上の所見より、h-iSCは、将来、脳梗塞患者を対象とした新規細胞治療となり得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

本研究の結果、h-iSCによる細胞移植療法は、これまで有効な治療法が限られていた脳梗塞患者に対する新規治療法になり得ることが示唆された。また、本治療法の確立及び発展は、将来、脳梗塞患者をはじめとし、様々な神経疾患に対して多大なる貢献をもたらし得ることから、本研究成果は意義あるものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using human-derived injury/ischemia-induced stem/progenitor cells (h-iSC), which were isolated from ischemic brain tissues of stroke patients requiring decompressive craniectomy and partial lobectomy for diffuse cerebral infarction, we transplanted h-iSC into post-stroke mouse brains to investigate the efficiency by these cells. We found that some h-iSCs survived around the injected sites and that they expressed a neuronal marker Tuj1 and MAP2. In addition, mice received h-iSC improved neurological functions compared with controls. These results indicate that h-iSC can become a novel cell-based therapy for patients with stroke in the future.

研究分野：再生医療

キーワード：脳梗塞 幹細胞 神経再生

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞などの脳血管疾患は我が国をはじめ、世界中において死亡原因の上位を占めており、脳血管疾患に伴う後遺症は寝たきりの主要な原因になっている。現在のところ、脳血管疾患に有用な治療法は、血栓溶解療法や血管内治療のように脳血管障害発症後急性期の患者を対象とした治療法のみであり、亜急性期以降、特に慢性期における有用な治療法はなく、リハビリ療法などに頼っているのが現状である。しかしながら、脳血管障害に伴う社会的損失は非常に大きく、有効な治療法の早急な開発が必要不可欠である。

現在、脳血管障害に対する新規治療法として、様々な幹細胞を応用した神経再生療法の開発が注目されている。我々の研究グループも、以前よりマウス脳梗塞モデルを用い、脳傷害病態下に生体内で誘導される自己の内在性神経幹細胞の発掘を独自に試み、その活用による神経機能回復を目指してきた。その結果、マウスの脳梗塞巣内には、電気生理学的に機能的な神経細胞に分化可能な内在性幹細胞[脳傷害/虚血誘導性幹細胞 (injury/ischemia-induced stem/progenitor cells; iSC)]が存在することが明らかになった。また、その後の研究により、脳梗塞患者の梗塞巣内にも iSC が存在することが明らかになった。

2. 研究の目的

本課題では脳梗塞患者の梗塞巣より単離したヒト由来 iSC [human-derived injury/ischemia-induced stem/progenitor cells; h-iSC] を、脳梗塞マウスに細胞移植し、その有効性を明らかにすることで、h-iSC による新規細胞治療の可能性を検証した。

3. 研究の方法

h-iSC を脳梗塞マウスに細胞移植し、(1) h-iSC が生体内において神経細胞に分化し得るかどうか [神経置換作用 (neuronal replacement) の有無]、(2) h-iSC 移植が脳梗塞巣周囲の内在性神経幹細胞にいかなる影響を及ぼすか、(3) h-iSC 移植が神経機能の改善に寄与するかどうか、を中心に検討した。

以下にその具体的方法を記載する。マウス脳梗塞モデルの作製は、これまでの報告に準じて、成体マウスに対して、左中大脳動脈の永久閉塞により行った。脳梗塞作製後、慢性期(6週目)に、h-iSC (1×10^5 cells/ μ l) を梗塞周囲に細胞移植した。h-iSC による神経置換作用の有無を評価する目的で、あらかじめ green fluorescent protein (GFP) で標識した h-iSC を使用した。GFP 陽性 h-iSC を細胞移植後、脳切片を作製し、免疫組織化学染色を施行した。次に、h-iSC 移植が内在性の神経幹細胞に対して、及ぼす影響を明らかにする目的で、あらかじめ red fluorescent protein (RFP) で標識した h-iSC を Nestin-GFP 遺伝子改変マウスの梗塞周囲に細胞移植した後、脳切片を作製し、免疫組織化学染色を施行した。最後に、h-iSC 移植による神経機能改善効果の有無を検討する目的で、脳梗塞作製後、慢性期(6週目)に、h-iSC を細胞移植した後、様々なタスクによる行動機能テスト(open field、Y字迷路、ホットプレート、ワイアハング、受動的回避学習など)を行い、h-iSC による細胞移植効果を評価した。

4. 研究成果

(1) GFP で標識した h-iSC を用いた細胞移植実験の結果、GFP 陽性 h-iSC の多くは梗塞巣周囲に生着しており、その一部は神経(ニューロン)マーカーである Tuj1 や MAP2 を発現していることが分かった。また、生着した GFP 陽性細胞数は、細胞移植後の時間経過とともに徐々に減少に転じることが分かった。

(2) RFP で標識した h-iSC を用いた細胞移植実験の結果、細胞移植した RFP 陽性 h-iSC の

周囲に、多くの Nestin (GFP) 陽性細胞の発現を認めた。

(3) h-iSC による細胞移植の結果、細胞移植した群では、コントロール群(細胞非移植群) と比べ、運動機能や認知機能をはじめ、様々なテストにおいて、神経機能の改善を認めた。

以上の結果より、細胞移植によって神経機能が改善したメカニズムの一端として h-iSC 自身による神経分化を介した神経置換作用 (neuronal replacement) や内在性神経幹細胞の活性化機構が考えられた。また、生着した GFP 陽性細胞数は、最終的には、減少に転じるものの、神経機能の改善を認めたことから、移植細胞による脳組織の保護作用 (nursing effect) の関与なども考えられた。

本研究課題の結果、h-iSC を用いた細胞移植は、将来、脳梗塞患者などを対象とした新規幹細胞治療として有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakagomi T, Takagi T, Beppu M, Yoshimura S, Matsuyama T	4. 巻 11
2. 論文標題 Neural regeneration by regionally induced stem cells within post-stroke brains: novel therapy perspectives for stroke patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World journal of stem cells	6. 最初と最後の頁 452-463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4252/wjsc.v11.i8.452.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中込隆之、高木俊範、土居亜紀子、別府幹也、吉村紳一、松山知弘
2. 発表標題 ヒト脳梗塞巣由来、脳傷害/虚血誘導性多能性幹細胞（iSCs）の細胞移植効果に関する基礎研究 iSCsを用いた臨床応用のための基礎研究
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Nakagomi, Akiko Nakano-Doi, Toshinori Takagi, Mikiya Beppu, Hideaki Nishie, Rika Sakuma, Yuki Maeda, Yusuke Minato, Nami Nakagomi, Tomohiro Matsuyama
2. 発表標題 Brain pericytes after ischemic stroke: a possible role as multipotent stem cells to differentiate into functional neurons
3. 学会等名 The 29rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain & Brain PET 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshinori Takagi, Mikiya Beppu, Kotaro Tatebayashi, Yoji Kuramoto, Akiko Nakano-Doi, Rika Sakuma, Takayuki Nakagomi, Tomohiro Matsuyama, Shinichi Yoshimura
2. 発表標題 Injury-induced multipotent stem cells: basic characteristics and future perspective
3. 学会等名 The 29rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain & Brain PET 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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	高木 俊範 (Takagi Toshinori) (00452152)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	松山 知弘 (Matsuyama Tomohiro) (10219529)	兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授 (34519)	
研究分担者	吉村 紳一 (Yoshimura Shinichi) (40240353)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	久保 秀司 (Kubo Shuji) (10441320)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------