

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07493

研究課題名(和文)慢性期脳梗塞の機能回復を促進させる低酸素・低糖刺激末梢血単核球療法の検討

研究課題名(英文) Peripheral blood-derived mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic stroke

研究代表者

金澤 雅人 (Kanazawa, Masato)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：80645101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：外因性末梢血単核球を低酸素低糖刺激(OGD)にて、保護的に極性を変化させ、脳虚血後、後遺症を有するラットに投与したところ、血管新生、神経軸索の進展を確認し、細胞投与21日後(虚血28日後)に、運動感覚機能が有意に改善することを示した。

臨床応用を目指し、閉鎖系でOGD刺激を行えるバッグを開発し、その効果をヒト由来の細胞でも検証した。OGD刺激にて、バッグ内の酸素濃度を目的とする1%未満に低下させ、刺激後に末梢血単核球は、刺激前には認めなかった多能性幹細胞マーカーSSEA3陽性単核球が増加することも確認した。また、このバッグで刺激した細胞でも治療効果を認めることを示し、特許出願を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脳梗塞後の血管新生、組織修復の機序が明らかとなり、慢性期の脳梗塞治療への応用が検討できる。

末梢血を用いることから、細胞確保が容易で、一般病院にも普及する技術になる。さらに発展させることで、脳梗塞患者の機能回復と予後改善が期待され国民医療費の軽減にもつながる。

研究成果の概要(英文)：When exogenous peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen glucose-deprivation (OGD) were administered to rats with post-ischemic sequelae, angiogenesis and neuronal axonal outgrowth were confirmed, and motor-sensory functions were significantly improved 21 days after cell administration (28 days after ischemia).

We developed a bag that can perform OGD stimulation in a closed system for clinical application, and verified the effect of OGD stimulation on human-derived cells. We also confirmed that the number of SSEA3-positive mononuclear cells, a pluripotent stem cell marker, increased after stimulation. We also showed that cells stimulated with this bag also showed therapeutic effects, and we have applied for a patent.

研究分野：脳血管障害

キーワード：末梢血単核球 細胞療法 極性変換 血管新生 神経軸索進展 脳梗塞 機能回復

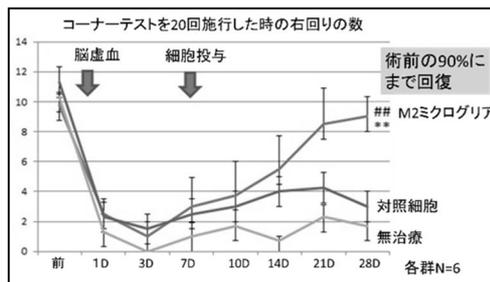
1. 研究開始当初の背景

脳卒中は寝たきりの原因の第1位、医療費の約1割を使用している。脳梗塞は脳卒中の7割を占め、機能回復を促し、予後を改善する治療が社会的に求められている。脳梗塞発症数日以後の**急性期～慢性期の内科的治療は再発予防しかこれまでにない**。機能回復を促進する治療の開発は喫緊の課題である。

脳梗塞慢性期にも効果が期待されるものとして、**成長因子投与の臨床試験が行われてきたが、有効性は示されていない**。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。これまでのほとんどすべての脳梗塞治療の薬剤は、このバリアーのため、脳実質に薬剤が到達しないことも有効性を見いだせなかった理由の一つである。**成長因子や薬剤投与による機能回復を目指す脳梗塞治療は極めて困難**である。

実験レベルで iPS 細胞を含めて、脳梗塞に対する幹細胞療法の検討がされている。骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞療法は有望であるが、その普及を妨げる欠点として、1. 得られる細胞数が少なく、専用の細胞プロセッシングセンター (CPC) で培養に2週間以上が必要であるため、ごく一部の専門病院でしか行うことができないこと、2. iPS 細胞は、癌化の危険性 (Kawai, JCBFM2010)、3. BBB を超えにくいこと (Seto, Ann Neurol 2001) があり、臨床応用の妨げとなっている。つまり、**幹細胞の脳梗塞に対する治療応用は未だに困難である**。その一方、**単核球は BBB を超えて病変部に移行しやすいこと、保護的な成長因子を刺激により分泌することから、細胞療法として有利な性質を有している (総説 Kanazawa, IJMS2017)**。

これまでの研究で、保護的ミクログリアによる脳保護作用に着目し、初代培養ミクログリアを OGD 刺激することで保護的なタイプに修飾する方法を発明した (科学技術振興機構の支援を受けて国内・国際特許を出願。特願 2016-168543, PCT/JP2017/031246)。この細胞の経動脈的投与は、ラット一過性虚血モデルにて、脳虚血後の機能回復を有意に促進することを確認した (右図)。その作用機序として、ミクログリアの脳梗塞巣へ遊走と、成長因子等を介した血管新生と軸索伸長作用を明らかにした。



また、近年、ミクログリアや末梢血単核球は、骨髄・末梢血と脳のあいだで行き来しうることが明らかになっている。そこで、**OGD 刺激をラット末梢血単核球分画に対して行い、前述のモデルにて評価したところ、脳梗塞後 28 日目の機能回復が有意に促進されることを確認し**、上記特許に含めて出願した (日本医師会医学奨励賞)。

2. 研究の目的

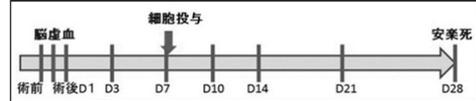
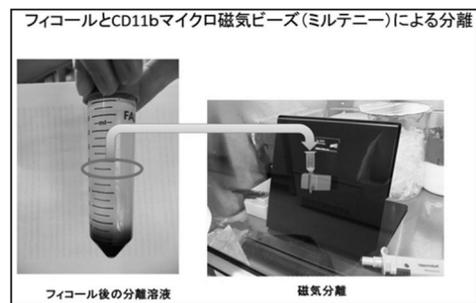
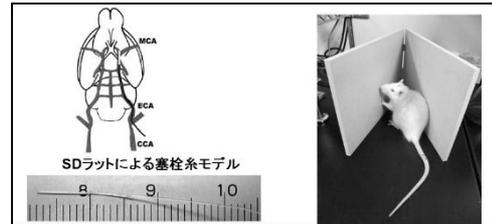
本研究の学術的な「問い」は、“OGD 刺激末梢血単核球 (OGD-OBMC) 投与は、脳梗塞の機能回復を促進する治療法となるか?” である。また、以下のことを明らかにする。

- (a) 末梢血由来血球による細胞療法でどの細胞が慢性期の修復を促進するかを明らかにする。
- (b) OGD 刺激末梢血単核球による細胞療法が慢性期の修復の機序(血管新生, 神経軸索進展, シナプス形成)を明らかにする。

3. 研究の方法

脳虚血後、外因性単核球投与にて脳実質内に移行するか、局在を確認し、血管新生、シナプス形成を明らかにする。

- ラット塞栓系脳梗塞再還流モデルを使用する。
- 慢性期の運動機能として、30度の角にラットを置き、どちらに回るかを評価するコーナーテスト(右図)(運動麻痺および視空間認知障害、感覚障害を反映する)で評価し、虚血前、虚血1日、3日、7日、14日、21日、28日の運動機能の評価する。
- 無刺激、OGD 刺激を加えた単核球細胞を、虚血1週間後に頸動脈に投与し、その後3週間症状の差を検討する。
- 投与単核球の局在を明らかにするため GFP マウス由来の初代細胞を準備し、動脈投与する。その後3日後、1、2、3週間後に免疫染色サンプルを作成し、各種細胞マーカーとの二重染色を行い、脳内の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。
- 治療に用いる血液細胞の調整は、ラットやマウス末梢血をフィコールにて分離する(図左; 楕円部に単核球が分離される)。
- 虚血28日後に、血管新生マーカーCD31を用いて血管新生、軸索マーカーSMI31を用いて神経軸索の伸展を、共焦点レーザー顕微鏡にて評価する(3D解析ソフトIMARISで定量する)血管新生、軸索進展を促進する VEGF, TGF- β の発現を免疫染色で評価する。



機能回復を促進する細胞分画の解明と再生機序の解明、臨床応用を目指す閉鎖系の開発

- 単核球分画を、単核球マーカーであるCD11bのマイクロ磁気ビーズを用いて分離し(右上図)、単核球分画と非単核球分画に分ける。
- 得た細胞分画を、CD11b, CD14を用いたフローサイトメトリー、および免疫染色にて純度を確認する。その後、間葉系幹細胞 CD105, 造血幹細胞 CD34, 幹細胞マーカーSSEA3/4のFACS, 免疫染色にて調べる。投与後の脳組織変化も各種マーカーを用いた免疫染色、ウエスタンブロットで評価する。
- 培地の VEGF, TGF β など血管新生、神経進展作用を有する増殖因子を ELISA で評価する。
- 臨床応用を目指し、閉鎖系で OGD 刺激を行えるバックを開発し、その効果を検証する。実際のヒトの採血にて、細胞回収と、バック内で刺激が十分に行えるかを、血液中のサイトカインの ELISA で評価する。

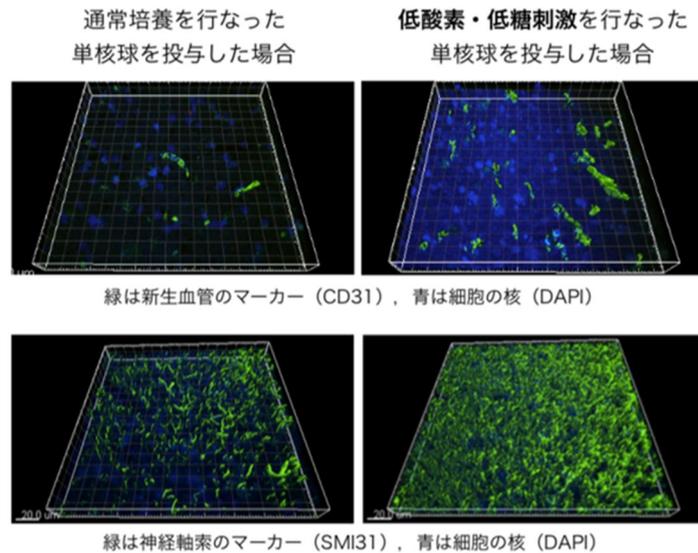
4. 研究成果

- 単核球に低酸素・低糖刺激を与えたところ、細胞培養培地の ELISA、ウエスタンブロットで、VEGF や TGF- β が、多く分泌されることがわかった。一方、単核球に分離したのちの細胞では、VEGF や TGF- β は検出されなかった。これらの因子の分泌促進は、核蛋白 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-) の発現増加によると考えられているが、細胞

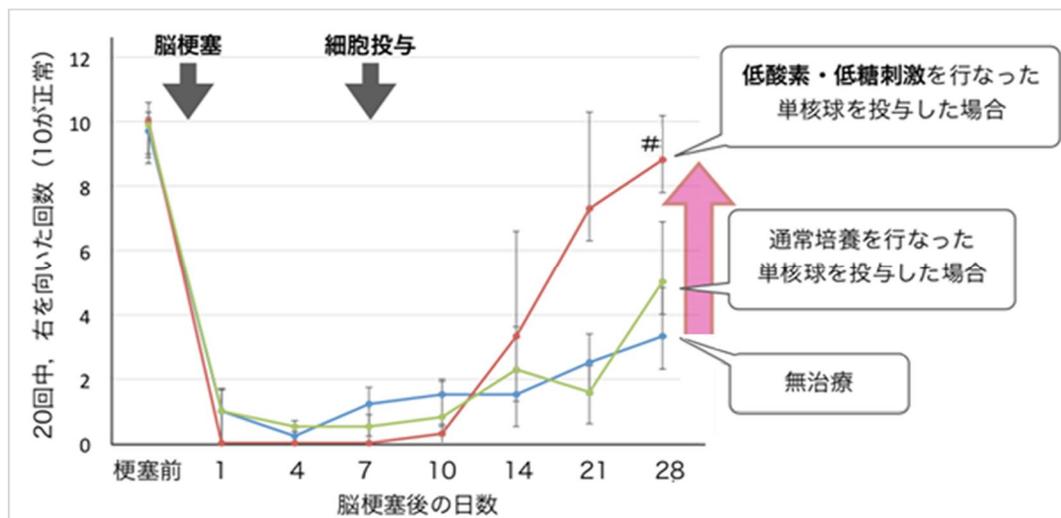
上清を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、OGD 刺激で PBMC 中の PPAR- の発現が刺激前と比べて、有意に増加することも明らかとなった。

- OGD 刺激前後の FACS の解析で、OGD 刺激後 PBMC に多能性幹細胞マーカー SSEA3 陽性細胞数が増加することも示した。
- OGD 刺激後の保護的 PBMC が血液脳関門を通過し、脳梗塞病変の辺縁に集まるかを検討するため、GFP マウス由来の初代 PBMC を OGD 刺激後に投与したところ、脳梗塞病変周辺に GFP の蛍光をみとめ、脳内に移行していることがわかった。一方、OGD 刺激していない GFP マウス由来の PBMC 投与では、脳内への移行を認めなかった。さらに、OGD 刺激後の保護的 PBMC 投与により、脳内で保護的極性を維持されているかを確認するため、この細胞が分泌するリモデリング因子である VEGF、TGF- β の脳内発現を免疫染色で検討した。虚血 28 日後、投与なし群では、これらの発現を認めなかったが、OGD 刺激後の保護的 PBMC を投与した群では、虚血域における VEGF、TGF- β の発現を認めた。

- 血管新生や軸索伸展効果について、新生血管マーカー CD31、神経軸索マーカー SMI31 を用いた免疫染色を行い、評価した。OGD 刺激後の保護的 PBMC 投与群では、無治療と比べて、さらに細胞数依存性に、虚血 28 日後の血管新生を認めた。さらに、虚血域周辺の虚血ペナンプラで神経軸索の有意な伸展を認め



た(右図)。運動感覚機能に関しても、OGD 刺激後の保護的 PBMC 投与群では、無治療と比べて、虚血 28 日後の麻痺感覚障害の有意な改善を認めた(下図)。なお、肉眼的出血の合併は認めず、無治療群と同様の生存率であった。なお、PBMC 中の単球・マクロファージに分離した群の投与では、治療効果を認めておらず、その他の細胞との相乗効果が治療効果には必要と考えている。



- バックの開発に関しては、データ取得後特許出願した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Otsu Yutaka, Namekawa Masaki, Toriyabe Masafumi, Ninomiya Itaru, Hatakeyama Masahiro, Uemura Masahiro, Onodera Osamu, Shimohata Takayoshi, Kanazawa Masato	4. 巻 419
2. 論文標題 Strategies to prevent hemorrhagic transformation after reperfusion therapies for acute ischemic stroke: A literature review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 117217 ~ 117217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.117217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 畠山 公大、二宮 格、小野寺 理、下畑 享良、金澤 雅人	4. 巻 72
2. 論文標題 総説 脳梗塞に対する低酸素低糖刺激末梢血単核球療法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hatakeyama Masahiro, Ninomiya Itaru, Otsu Yutaka, Omae Kaoru, Kimura Yasuko, Onodera Osamu, Fukushima Masanori, Shimohata Takayoshi, Kanazawa Masato	4. 巻 21
2. 論文標題 Cell Therapies under Clinical Trials and Polarized Cell Therapies in Pre-Clinical Studies to Treat Ischemic Stroke and Neurological Diseases: A Literature Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6194 ~ 6194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176194	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 -
1. 著者名 Uemura Masahiro, Nozaki Hiroaki, Kato Taisuke, Koyama Akihito, Sakai Naoko, Ando Shoichiro, Kanazawa Masato, Hishikawa Nozomi, Nishimoto Yoshinori, Polavarapu Kiran, Nalini Atchayaram, Hanazono Akira, Kuzume Daisuke, Shindo Akihiro, El-Ghanem M, Abe A, Sato A, Yoshida M, Ikeuchi T, Mizuta I, Mizuno T, Onodera O	4. 巻 11
2. 論文標題 HTRA1-Related Cerebral Small Vessel Disease: A Review of the Literature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 545 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2020.00545	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 -

1. 著者名 Ninomiya Itaru, Kanazawa Masato, Uemura Masahiro, Onodera Osamu	4. 巻 27
2. 論文標題 Elevated serum pentraxin 3 levels might predict the diagnosis of branch atheromatous disease at a very early stage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 1279 ~ 1284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ene.14249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Masahiro, Kanazawa Masato, Ninomiya Itaru, Omae Kaoru, Kimura Yasuko, Takahashi Tetsuya, Onodera Osamu, Fukushima Masanori, Shimohata Takayoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16819 ~ 16819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53418-5	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 -

1. 著者名 Uemura Masahiro, Kanazawa Masato, Yamagishi Takuma, Nagai Takahiro, Takahashi Mami, Koide Shingo, Tada Masayoshi, Shimbo Junsuke, Isami Aiko, Makino Kunihiko, Masuko Masayoshi, Nikkuni Kouji, Okamoto Kouichirou, Igarashi Shuichi, Morita Kenichi, Onodera Osamu	4. 巻 408
2. 論文標題 Role of RNF213 p.4810K variant in the development of intracranial arterial disease in patients treated with nilotinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 116577 ~ 116577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.116577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanazawa Masato, Takahashi Tetsuya, Kawamura Kunio, Shimohata Takayoshi	4. 巻 59
2. 論文標題 VEGF-A therapeutic target against hemorrhagic transformation after t-PA treatment?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku	6. 最初と最後の頁 699 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5692/clinicalneuro.l.cn-001346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Masahiro, Ninomiya Itaru, Kanazawa Masato	4. 巻 15
2. 論文標題 Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 16~19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.264442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Masahiro, Nozaki Hiroaki, Koyama Akihito, Sakai Naoko, Ando Shoichiro, Kanazawa Masato, Kato Taisuke, Onodera Osamu	4. 巻 10
2. 論文標題 HTRA1 Mutations Identified in Symptomatic Carriers Have the Property of Interfering the Trimer-Dependent Activation Cascade	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 693-693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.00693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Kanazawa, Tetsuya Takahashi, Masanori Ishikawa, Takayoshi Shimohata	4. 巻 39
2. 論文標題 Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 753-769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X19834158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Hatakeyama Masahiro, Kanazawa Masato, Ninomiya Itaru, Omae Kaoru, Kimura Yasuko, Takahashi Tetsuya, Onodera Osamu, Fukushima Masanori, Shimohata Takayoshi
2. 発表標題 A therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation in ischemic rats
3. 学会等名 神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二宮格、金澤雅人、上村昌寛、小野寺理
2. 発表標題 ラクナ梗塞とBranch atheromatous diseaseの鑑別における、入院時血清PTX3値の有用性の検討
3. 学会等名 日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hatakeyama Masahiro, Kanazawa Masato, Ninomiya Itaru, Omae Kaoru, Kimura Yasuko, Takahashi Tetsuya, Onodera Osamu, Fukushima Masanori, Shimohata Takayoshi
2. 発表標題 A therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation in ischemic rats
3. 学会等名 International Stroke Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二宮格、金澤雅人、赤岩靖久、下畑享良、小野寺理
2. 発表標題 Branch Atheromatous Diseaseにおける急性期の血清Lox-1値の検討
3. 学会等名 日本神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatakeyama Masahiro, Kanazawa Masato, Ninomiya Itaru, Omae Kaoru, Kimura Yasuko, Takahashi Tetsuya, Onodera Osamu, Fukushima Masanori, Shimohata Takayoshi
2. 発表標題 A therapy using peripheral blood cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation against ischemia
3. 学会等名 日本神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二宮格、金澤雅人、上村昌寛、下畑享良、小野寺理
2. 発表標題 ラクナ梗塞とBranch atheromatous diseaseの鑑別における、入院時血清PTX3値の有用性の検討
3. 学会等名 日本脳卒中学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masato Kanazawa, Tetsuya Takahashi, Takayoshi Shimohata
2. 発表標題 VEGF -A therapeutic target against hemorrhagic transformation after t-PA treatment-
3. 学会等名 日本神経学会学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masato Kanazawa, Kunio Kawamura, Tetsuya Takahashi, Takayoshi Shimohata	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 183
3. 書名 Progranulin and Central Nervous System Disorders	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞製剤の製造方法及びこれに用いる低酸素刺激用容器	発明者 金澤雅人、畠山公大、下畑享良、尾前薫、井川博史	権利者 新潟大学
産業財産権の種類、番号 特許、*	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞製剤および細胞製剤の製造方法	発明者 金澤雅人、下畑享良	権利者 新潟大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/031246	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	下畑 享良 (Shimohata Takayoshi) (60361911)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

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