

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07496

研究課題名(和文) 脳出血に対する新規治療としての低酸素・低糖刺激ミクログリア療法の検討

研究課題名(英文) Novel treatment using microglia preconditioned by oxygen glucose deprivation against cerebral hemorrhage

研究代表者

下畑 享良 (SHIMOHATA, TAKAYOSHI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60361911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではミクログリアの前段階である末梢血単核球(PBMCs)に対してOGD刺激を行い、その性質の変化を検討し、OGD-PBMCは血管内皮増殖因子(VEGF)やTGF- β といった血管リモデリング因子を分泌することを明らかにした。一方、動物モデルにおいて虚血7日目に経動脈的に投与したところ、脳実質に存在し、28日目の予後を改善することを明らかにした。しかもこの投与により、SSEA3陽性細胞を誘導できることを明らかにした。またOGD-PBMCsは血液脳関門の移行も促進されていた。さらにOGD-PBMCは血管新生と神経細胞の軸索進展を促進した。加えて臨床試験を目指して、OGD機器の開発を行った。

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り、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細胞を含む癌化の危険性(Kawai, JCBFM2010)、3.きわめて高額であることがあげられる。本研究によるOGD-PBMCを用いた新しい細胞療法はこれらの欠点を克服し、一般病院でも安価に細胞療法が行われる治療法になる可能性があり、社会への貢献は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the changes in the properties of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), a precursor of microglia, by stimulating them with OGD, and found that OGD-PBMCs secrete vascular remodeling factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and TGF- β . On the other hand, when OGD-PBMCs were administered transarterially on day 7 of ischemia in an animal model, they were found in the brain parenchyma and improved prognosis on day 28. Furthermore, we found that OGD-PBMCs can induce SSEA3-positive cells. In addition, OGD-PBMCs promoted migration through the blood-brain barrier. Furthermore, OGD-PBMCs promoted angiogenesis and neuronal axon extension. Finally, we developed an OGD device for clinical trials.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：低酸素低糖刺激 ミクログリア 末梢血単核球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは研究開始前に、初代培養マイクログリアを適切に低酸素低糖 (oxygen glucose deprivation; OGD) 刺激することで、マイクログリアの極性を、脳傷害的 (M1 様) マイクログリアから脳保護的 (M2 様) マイクログリアに変化できること、ならびにラット脳梗塞モデルにおいて、この OGD マイクログリアを経動脈投与することにより運動機能を著明に改善できることを明らかにした (Sci Rep 2017)。また科学技術振興機構 (JST) の支援を受けて国内・国際特許出願を行った (特願 2016-168543, PCT/JP2017/031246)。臨床応用を考えた場合、神経内視鏡を用いた血腫除去時に患者本人のマイクログリアを容易に採取できることから、OGD マイクログリアを用いた細胞療法は脳出血に適した細胞療法と考えられた。このため「脳出血に対し、最適な条件で OGD 刺激を行ったマイクログリアを用いた細胞療法が有効である」という仮説を検証したいと考えた。

2. 研究の目的

上述のように OGD マイクログリアの臨床応用を目指して、第 1 に OGD マイクログリアの有効性を脳出血動物モデルにて評価することを目的とした。第 2 により簡便で、安価、実用的な臨床応用を目指し、患者からの取得が極めて容易で、かつマイクログリアに性質が類似した末梢血由来の単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) に対して OGD 刺激を行い、マイクログリアと同様に保護的極性に誘導できるか、また in vivo で有効性を示すことがどうかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

倫理審査を受けた後、ラットおよびヒトから静脈血を採取し、フィコールを用いた遠心分離により単核球分画を分離し、上述の国内・国際特許出願中 (特願 2016-168543, PCT/JP2017/031246) の方法 (右

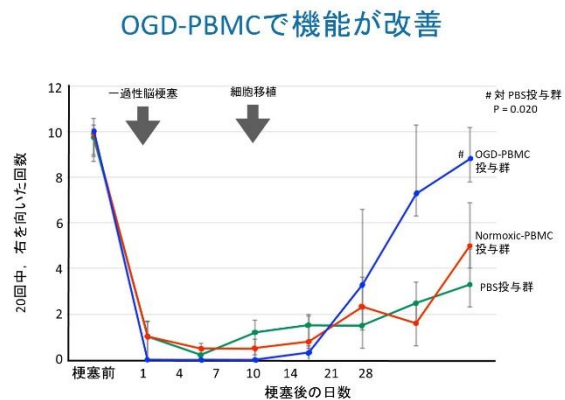


図)にて18時間, OGD 刺激を行った. OGD-PBMCs の細胞の性質(血管リモデリング因子の放出)と, 治療効果については, OGD ミクログリアで報告した方法を踏襲して行った. 具体的には経動脈的に投与した OGD-PBMCs が 血腫周囲の損傷組織に遊走するか, 血管新生や軸索新生の促進を介して, 機能回復を早めるかを明らかにするかを検証した.

4. 研究成果

まず OGD-PBMCs が血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)や transforming growth factor- β (TGF- β) といった血管リモデリング因子を分泌することを in vitro の実験系で明らかにした.

次に, 動物モデルにおいて7日目に経動脈的に投与したところ, 脳実質に移行し, 28日目の予後を改善することを明らかにした(右図). しかもこの投与により, stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA3) 陽性細胞(すなわち Muse 細胞; Multilineage-differentiating Stress Enduring cells)を



誘導できることを in vitro および in vivo において明らかにした.

また OGD-PBMCs は血液脳関門の移行も OGD 前と比較して促進されていた. さらに OGD-PBMC は血管新生と神経細胞の軸索進展を促進することを免疫組織学的に確認した.

以上の結果から, OGD-PBMC 療法は有望であると考えられる. なお上記結果については, 論文報告をおこなった (Sci Rep. 2019 Nov 14;9(1):16819). さらにヒトにおける臨床試験を目指して, OGD 刺激を臨床現場で簡便に行うための OGD 機器の開発を, 新潟大学, 医療イノベーション推進センター (TRI), および関連企業とともに産学官連携を行った. この機器により刺激を行った細胞の治療有効性を評価し慣れている動物モデルにて確認した. 今後, 臨床試験を目指す予定である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatakeyama M, Kanazawa M, Ninomiya I, Omae K, Kimura Y, Takahashi T, Onodera O, Fukushima M, Shimohata T.	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 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 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 M, Takahashi T, Ishikawa M, Onodera O, Shimohata T, Del Zoppo GJ.	4. 巻 Mar 6
2. 論文標題 Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cereb Blood Flow Metab.	6. 最初と最後の頁 271678X19834158
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
1. 著者名 畠山公大, 二宮至, 小野寺理, 下畑享良, 金澤雅人	4. 巻 72
2. 論文標題 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 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 無
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 M, Ninomiya I, Otsu Y, Omae K, Kimura Y, Onodera O, Fukushima M, Shimohata T, Kanazawa M.	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 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 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 無
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 Otsu Y, Namekawa M, Toriyabe M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Uemura M, Onodera O, Shimohata T, Kanazawa M.	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 J Neurol Sci.	6. 最初と最後の頁 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 無
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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 下畑 享良
2. 発表標題 トランスレーショナルリサーチの実践
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠山公大, 金澤雅人, 二宮格, 尾前薫, 木村泰子, 高橋哲哉, 小野寺理, 福島雅典, 下畑享良
2. 発表標題 脳梗塞に対する低酸素低糖刺激末梢血単核球を用いた細胞療法
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 下畑 享良	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 210
3. 書名 脳卒中エキスパート 神経保護・神経再生療法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳梗塞に対する治療薬開発を目指したトランスレーショナル・リサーチ
<http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurology/research/tr.html>

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	金澤 雅人 (Kanazawa Masato) (80645101)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	

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
---------	---------