

令和 3 年 6 月 8 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：18K07540

研究課題名(和文) 脳梗塞後の骨髄由来血管血球系幹細胞の単離と前臨床試験

研究課題名(英文) Isolation and Preclinical Application of Hemangioblast-like cells

研究代表者

松山 知弘 (Matsuyama, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授

研究者番号：10219529

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)：脳梗塞後遺症の治療法としての血管再生療法を確立するため、マウスおよびヒト脳梗塞後の骨髄から血管血球系幹細胞であるHemangioblast-like cell (HLC)を同定した。HLCはCD31陽性の血管内皮細胞とPlatelet-derived growth factor receptor (PDGFR) beta陽性の血管周皮細胞に分化し、梗塞脳で血管新生に関与することが示唆された。また、前臨床試験として、HLCを脳梗塞2日目のマウスに静脈内投与し、1か月目に行動テストを施行したところ、神経障害が改善されたことから、HLCが脳梗塞の細胞治療製剤として有用であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害後の細胞治療製剤として注目されている幹細胞のうち「自己骨髄単核球」は急性期心原性脳塞栓症患者の臨床研究でその有効性が報告されているが、その有効細胞分画は不明であった。本研究では、マウスおよびヒト骨髄細胞内に、Hematopoietic stem cell (HSC)とは異なり、血球細胞のみならず血管細胞にも分化しうるHLC分画があることを見いだした。本研究成果は脳梗塞患者への自己骨髄細胞移植が血管再生療法として有効であるとの科学的根拠を示したことで学術的意義があり、他の細胞移植療法より比較的簡便であるため脳卒中後遺症の軽減に役立つという社会的意義もあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To establish the therapeutic angiogenesis for cerebral infarction, we aimed to identify the hemangioblast-like cells (HLCs) which may have both hematopoietic and angiogenic capacity from mouse and human bone marrow. Also, the HLCs were preclinically administered into post-infarct mice to examine the possible beneficial effects of HLCs on the neurological outcome of cerebral infarction.

As a result, HLCs were shown to differentiate into CD31-positive endothelial cells and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) beta-positive pericytes as well as blood cells like leukocytes, suggesting their contribution on the angiogenesis in infarct brain. The mice undergoing intravenous administration of HLCs 2days post-stroke were examined behaviorally 1 month later. This study demonstrated that HLCs improved the neurological deficits shown in post-infarct mice, suggesting that the cell therapy with HLCs were useful to treat cerebral infarction.

研究分野：脳循環代謝学

キーワード：ヘマンジオブラスト ペリサイト 骨髄 脳梗塞 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞に対する治療法として、現在では血栓溶解療法や血管内手術による血行再建療法が進歩し、その治療効果が報告されているものの、なお後遺症で苦しむ人も多いのが現状である。そうした中で、幹細胞による再生医療は脱落した神経機能を回復できる新たな治療法になることが期待されている。我々は、幹細胞治療製剤の候補として、血管・血球系幹細胞に注目してきた。そして、動物モデルでは臍帯血中の CD34 陽性細胞分画が有効であり [1]、ヒト脳梗塞患者における臨床試験では「自己骨髄単核球」中に存在する血管血球系幹細胞が有効である [2] ことを報告している。しかし、これら血管にも血球にも分化する Hemogenic Endothels や Hamangioblast 様の細胞は胎生期造血組織ではみられるものの、そもそも「成体に Hemangioblast は存在するのか」という問いに答える報告は極めて少ないと言える [3]。さらに、成体の末梢血では種々の細胞表面マーカーで分離されたペリサイト前駆細胞 (Progenitor Pericyte : PPC) あるいは血管内皮細胞前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cells: EPC) の存在が提唱されているが、in vitro と in vivo で分化する「成体の Hemangioblast」は証明されていない [4]。

一方で、脳梗塞などの血管障害後は血管新生が起こることはよく知られている。我々は骨髄細胞がこの血管新生を促進することで脳梗塞後の神経機能改善をもたらすことを報告してきた [5]。脳の血管内皮細胞及びペリサイトは Neurovascular unit の機能維持のみならず幹細胞のニッチとしての機能もあり、組織修復や内因性の神経再生に重要な役割を果たしていると考えられる [6]。

これらの知見を踏まえ、我々は脳梗塞後の骨髄単核球分画中に血球細胞のマーカーである CD45 陽性であるにもかかわらず血管細胞系の遺伝子蛋白を発現している細胞群が存在することを見出した。さらに、この細胞はペリサイトへの分化にとどまらず、血管内皮細胞 (EC) やマクロファージ、赤芽球を含む血球系細胞にも分化することがわかった。以上の所見より、本幹細胞は、脳虚血負荷後の骨髄で新たに産生された血管・血球系幹細胞であり、我々が細胞治療製剤の候補として探してきた細胞 Hemangioblast-like cell (HLC) である可能性がでてきた。

2. 研究の目的

脳梗塞後遺症の治療法としての血管再生療法を確立するため、本研究ではマウスおよびヒト脳梗塞後の骨髄から抽出された血管血球系幹細胞である Hemangioblast-like cell (HLC) の特性を明らかにし、さらに、抽出したマウス HLC を脳梗塞マウスに投与して脳卒中の細胞移植治療の前臨床試験を行ない、その有用性を検討することを目的とした。

- 1) マウス Hemangioblast-like cell (HLC) の特性の解析
- 2) ヒト脳梗塞後の骨髄から HLC の同定・抽出

3) マウス HLC 投与の脳梗塞マウス神経症状に対する効果の解析

3. 研究の方法

1. マウス HLC の特性 (遺伝子プロファイルや分化能) を解析し、本細胞の増殖法やペリサイトや内皮細胞など血管細胞への特異的分化誘導法を確立する。
2. ヒト HLC (h-HLC) を同定・抽出する。
3. マウス HLC を成体マウスに移植し、血管への分化を検討する。
4. マウス HLC を脳梗塞マウスに投与し、神経機能改善効果を検討し、脳卒中の細胞移植治療の前臨床試験を行う。

そのために、Gene tip, PCR, FACS, Western blot, 免疫組織化学を駆使し、その情報を基に増殖・分化を行った。

ヒト由来 HLC (h-HLC) は重症脳梗塞患者の内減圧術施行時に得られた頭蓋骨片内の骨髓細胞から抽出を試みた (兵庫医科大学倫理委員会承認済)。

また、GFP 標識された HLC を皮下移植し、移植 8 日後に免疫組織化学にて観察することで HLC の生体内動態を観察した。

さらに、脳梗塞 (MCO) マウスに、HLC (MCAO-HLC 群) および Vehicle (PBS) (MCAO-Vehi 群) を静脈内投与し、行動テスト (オープンフィールド: OF、高架式十字迷路: EPM、尾懸垂テスト: TS、ホットプレートテスト: HP、ワイアハングテスト WH、Y 字型迷路: YM、水迷路学習 WM、受動的回避学習: PA、オープンスペース水泳テスト: OS、強制水泳テスト: FS、) を施行した。

4. 研究成果

その結果、遺伝子解析で、HLC は CD45⁺/CD44⁻/Tie1⁺/Tie2⁺/Myb⁺/Aplnr⁺/Gfi1⁺/Lin28⁺で、その基本性格は『活性化された細胞』であり、Hematopoietic potential を持った造血幹細胞と、間葉系・内皮細胞系の Common precursor である Mesenchymoangioblast の特性を併せ持つ胎生期に特異的に出現する細胞であることが示唆された。脳梗塞後のマウス骨髓由来 HLC は、in vitro、in vivo とも CD31 陽性の血管内皮細胞と PDGFR beta 陽性の血管周皮細胞に分化することが示された。ヒト骨髓由来の HLC も in vitro で CD31 陽性の血管内皮細胞と PDGFR beta 陽性の血管周皮細胞に分化することが示された。また、HLC 投与により脳梗塞後の運動機能改善や不安軽減効果、記憶学習機能改善効果などの脳梗塞後神経障害の改善効果があることが明らかとなった(表)。

現在までに、様々な幹細胞 (間葉系幹細胞: MSC や脂肪幹細胞: ADSC、骨髓単核球細胞: BMMC など) が試され、その有効性が報告されているが、効果発現のメカニズムは不明である。一方我々は独自に脳梗塞患者末梢血中の CD34 陽性細胞数測定の臨床研究 [7, 8] や動物実験での骨髓細胞の内因性神経幹細胞産生亢進効果の証明 [5] などを通して、細胞治療効果の発現には内因性神経幹細胞とそのニッチとしての血管細胞の

重要性を十分に認識し報告してきた。脳梗塞後の神経機能改善効果のメカニズムとしては、投与幹細胞が血管細胞に分化することを含めて傷害部位での血管新生を促進し、その結果内因性の神経幹細胞の産生を亢進することで神経再生を含む組織修復が達成されるのではないかと考えられ、今後 HLC の臨床応用が期待されると思われる。

<引用文献>

1. Taguchi A, et al. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004;114:330-338
2. Taguchi A, et al. Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients. *Stem Cells Dev* 2015;24:2207-18
3. Ciraci E, et al. Adult human circulating CD34⁺Lin⁻CD45⁻CD133⁻ cells can differentiate into hematopoietic and endothelial cells. *Blood* 2011;118: 2105-2115
4. Hirschi KK, et al. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1584-1595
5. Nakano-Doi A, et al. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells* 2010;28:1292-1302
6. Nakagomi N, et al. Endothelial cells support survival, proliferation and neuronal differentiation of transplanted adult ischemia-induced neural stem/progenitor cells after cerebral infarction. *Stem Cells* 2009;27:2185-95
7. Taguchi A, et al. Circulating CD34-positive cells provides a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:445-449
8. Taguchi A, et al. Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:34-38

表. 行動テストの結果

実験課題	評価される機能	脳梗塞による異常		HLCの有効性	
		MCO-vehi vs Sham-vehi	MCO-HLC vs MCO-vehi	MCO-vehi vs Sham-vehi	MCO-HLC vs MCO-vehi
1	OF	活動性・馴化	+	+	+
2	EPM	不安	-	-	-
3	TS	うつ	-	-	-
4	HP	感覚・知覚(痛覚)	+	±	±
5	WH	運動・筋力・持久力	+	±	±
6	YM	作業記憶	+	+	+
7	WM	学習・記憶・運動	+	+	+
8	PA	学習・記憶・衝動性	+	+	+
9	OS	うつ(動機づけ)・運動	+	+	+
10	FS	うつ	+	+	+

HLC に脳梗塞後神経障害の改善効果のあることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	中込 隆之 (Nakagomi Takayuki) (80434950)	兵庫医科大学・医学部・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