

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08972

研究課題名(和文) 脳梗塞に対する細胞移植・再生医療における健常対側大脳半球の制御メカニズム解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism for the hemisphere after stem cell transplantation following ischemic stroke

研究代表者

堀江 信貴 (HORIE, Nobutaka)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：70380912

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)：細胞機能向上を図った群は、いわゆるresting microgliaの割合が有意に多く見受けられ、抗炎症作用の更なる改善を認めた。また行動評価ではday21でのmNSSでは細胞機能向上させた群が有意差をもって改善を認めていた。Day7ではPBS群と比較して細胞機能向上群が若年群とともに有意差をもって行動改善が見受けられた。対側からの内在性幹細胞遊走については脳梗塞後3日後に対側のsubventricle areaに多く見られ、同細胞群は脳梗塞7日後には脳梁膨大部に多く観察され、病変に向けて遊走してい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

脳梗塞における後遺症は寝たきり増加の主な原因となり、世界において医療財政を逼迫する喫緊の課題である。我々の研究において、静脈内投与だけでなく経動脈的投与の有効性、至適条件、さらには対側大脳半球の関与について示すことができた。今後の臨床応用に寄与するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In the group with improved cell function, the proportion of so-called resting microglia was significantly higher, and further improvement in anti-inflammatory effect was observed. In the behavioral evaluation, the mNSS on day 21 showed a significant improvement in the group with improved cell function. On Day 7, behavioral improvement was observed in the cell function improvement group with a significant difference from the young group compared with the PBS group. Contralateral endogenous stem cell migration was frequently observed in the contralateral subventricle area 3 days after cerebral infarction, and the same cell group was frequently observed in the corpus callosum 7 days after cerebral infarction.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳梗塞 幹細胞移植 血管内手術

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の発表によると、平成 28 年の死因別死亡総数のうち脳血管疾患は全体の 9.0%で、全死因の第 4 位であった。このうち大半は脳梗塞が原因とされている。脳梗塞に一度罹患すると、後遺症によるハンディキャップをおった生活を強いられ、高齢者介護、医療財政問題の最大の要因と成っている。脳梗塞の急性期治療としては、t-PA を用いた血栓溶解療法、血管内治療や薬物療法が発展し、新しい治療として効果をあげてきている。しかしながら、その効果には限界があることも明らかとなり、慢性期にリハビリテーションを長期続けざるを得ないのが現状である。このような現状において、脳血管障害に対する細胞移植治療は、脳梗塞治療の新たなブレイクスルーとしての期待を浴びているが、劇的な効果を得られていないのが現状である。

2. 研究の目的

脳梗塞に対する幹細胞移植の効果、機能回復が健常な対側大脳半球にどれだけ制御されているかを検討した報告はこれまでにない。脳梗塞に対する再生医療は現在の薬物治療とは全く異なるアプローチであり、将来的により効果の高い治療方法を確立するためには、更に差し迫った臨床命題に即したテーマであるという特色がある。代表者が確立し世界に向けて発信した「幹細胞移植による内在性修復機構」の成果をもとに検証するという点で独創的である。本研究が達成されれば、より効果の高い幹細胞移植技術の実現に大きく寄与するものと考えられる。

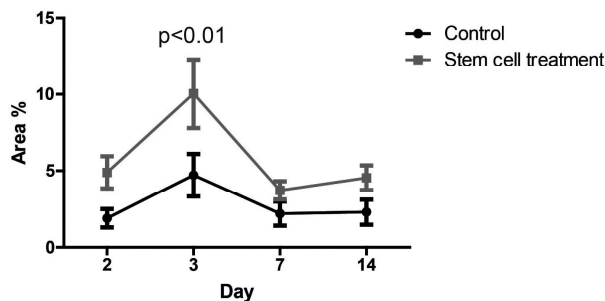
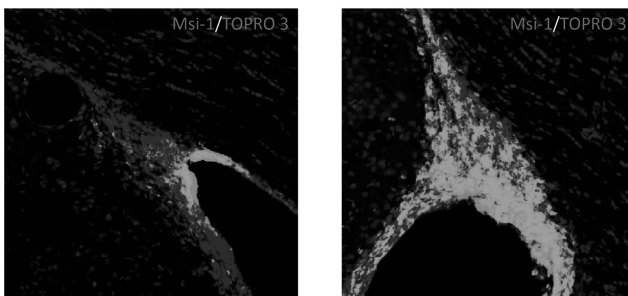
3. 研究の方法

- (1) 脳梗塞モデル、細胞移植投与方法の確立
再現性のある脳梗塞モデルの確立(皮質線条体梗塞モデル)
幹細胞移植方法の確立(静脈内投与、動脈内投与)
- (2) 幹細胞移植後の移植細胞の挙動に対する評価(急性期)
組織学的解析による移植細胞の定量的評価、細胞分布の評価
炎症細胞浸潤の定量、包括的プロテインアッセイ
- (3) 幹細胞移植後の内在性修復機構における対側大脳半球の関与
組織学的評価(新生血管、樹状突起、軸索)及び経時的な運動麻痺評価

4. 研究成果

(1) 対側 subventricular area における挙動

ラット中大脳動脈モデルに対して、骨髄間葉系細胞を梗塞 1 日後に経動脈内投与を行った。梗塞後 2, 3, 7, 14 日後に sacrifice し、脳切片をホルマリン固定後、対側大脳半球における subventricular zone の Mushashi-1 陽性細胞を比較すると、day 3 において Musashi-1 陽性細胞数は細胞治療群において有意に亢進していた(図 1. 10.0% vs. 4.7%, $p < 0.01$)。



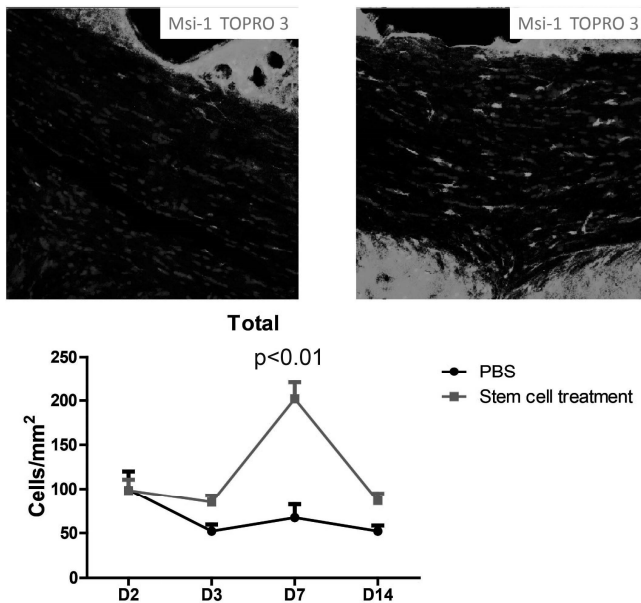
【図 1】

これらの結果から、脳梗塞後における機能回復には対側の内在性神経幹細胞が賦活化されることが重要であり、spontaneous な反応であること、また比較的早期にみられることが明らかとなった。更には神経幹細胞移植によって、この反応が 2 倍程度に活性化されることも明らかと

なった。

(2) 対側 corpus callosum における挙動

同様の検討を対側 corpus callosum において検討した。Mushashi-1 陽性細胞を比較すると、day 7 において Musashi-1 陽性細胞数は細胞治療群において有意に亢進していた (図 2. 192 cells/mm² vs. 67.5 cells/mm², p<0.01)。



【図 2】

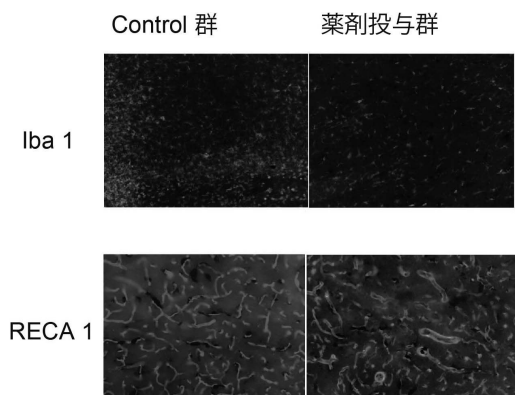
Corpus callosum における神経幹細胞の賦活化は、まさに対側 subventricular zone からの内在性幹細胞細胞が患側の脳梗塞巣にむけて遊走していることがうかがえる。この結果は時期的に 1 週間がピークであることも裏付けとなる。対側から遊走した内在性神経幹細胞の正確な機能目的は詳細不明であるが、行動機能回復が移植後 1-2 週後にピークをもって亢進することから、単純な抗炎症効果などの nursing effect だけではなく、内在性神経幹細胞自身が損傷を受けた神経組織に integrate されて、機能的に活動している可能性が示唆された。

(3) 健常脳活性における改善効果

ヒト骨髄間葉系幹細胞で経動脈的投与の適した再灌流モデルを作成した。投与タイミングを発症翌日にして同量(100 万個)の群と PBS を投与し、その効果を解析した。投与は、脳梗塞と同側のラット外頸より緩徐に行った (高齢者と若年者ヒト由来骨髄間葉系幹細胞それぞれを通常培養の 2 群とし、各々に健常側活性薬剤を添加した 2 群の計 4 群)。

Functional recovery はげっ歯類は高頻度で自然回復するために全群において評価時に十分な神経学的障害を前提とした。Motor cortex の評価として cylinder test を、sensory barrel cortex には whisker-paw test、総合的な神経評価に modified Neurological Severity Score を併用し評価した。評価時期は移植前、移植後 4 日、1 週、2 週、3 週に行った。

3 週までで行動評価を行った検体数は、高齢者 16、若年者 12、高齢者+NMN 9、若年者+NMN 12、PBS 23 であった。これらは cylinder test、modified Neurological Severity Score、体重について統計解析を行った。高齢者+NMN 群は、高齢群、PBS 群と比較して有意差をもって modified Neurological Severity Score で改善を認めた(図 3)。



【図3】

対側内在神経幹細胞の作用には抗炎症作用、血管新生作用も考えられるが、我々の予想通り、神経幹細胞移植を行うことで有意に炎症反応の鎮静化(二次的損傷の回避)、新生血管の亢進(損傷組織におけるneurovascular unitの構築)がみられた。またこれらの反応はドナーのqualityで効果が異なることが示唆された。

(4) 考察

脳梗塞に対する再生医療を現実的なものにするためにはその効果を最大限引き出す手法を確立することが必要である。また、必要移植細胞数、対象病型など医療経済的側面からも検討しなければならない。血管内治療を用いた経動脈的投与は、必要細胞数が少なく済み、大量に静脈内投与を行う手法と同等の効果をもたらす可能性が示唆された。特に対側大脳半球の関与についてはこれまで詳細な報告がない。機能回復についてはどれだけ対側大脳半球が健常であるか?もクリティカルな要素になりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horie N, Shobayashi K, Morofuji Y, Sadakata E, Iki Y, Matsunaga Y, Kanamoto T, Tateishi Y, Izumo T, Anda T, Morikawa M, Tsujino A, Matsuo T.	4. 巻 132
2. 論文標題 Impact of Mechanical Thrombectomy Device on Thrombus Histology in Acute Embolic Stroke.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 418-422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2019.6.JNS19704	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 Horie N, Morofuji Y, Iki Y, Sadakata E, Kanamoto T, Tateishi Y, Izumo T, Anda T, Morikawa M, Tsujino A, Matsuo T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Impact of basal ganglia damage after successful endovascular recanalization for acute ischemic stroke involving lenticulostriate arteries.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2019.3.JNS182909	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 Fujimoto Takashi, Morofuji Yoichi, Nakagawa Shinsuke, Kovac Andrej, Horie Nobutaka, Izumo Tsuyoshi, Niwa Masami, Matsuo Takayuki, Banks William A.	4. 巻 127
2. 論文標題 Comparison of the rate of dedifferentiation with increasing passages among cell sources for an in vitro model of the blood-brain barrier	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 1117～1124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-020-02202-1	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江信貴、伊木勇輔、定方英作、山口将、前田 肇、福田雄高、石坂俊輔、諸藤陽一、出雲 剛、案田兵夫、松尾孝之
2. 発表標題 目覚ましい発展を遂げる脳血管内治療の側面から見たトランスレーショナルリサーチ【依頼シンポジウム】
3. 学会等名 Stroke 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobutaka Horie
2. 発表標題 Maximize endogenous recovery after stroke with endovascular stem cell therapy
3. 学会等名 14th Korea-Japan Joint Conference on Surgery for Cerebral Stroke
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	日宇 健 (HIU Takeshi) (00404260)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	定方 英作 (SADAKATA Eisaku) (10772139)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・研究協力員 (17301)	
研究分担者	西田 教行 (NISHIDA Noriyuki) (40333520)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	出雲 剛 (IZUMO Tsuyoshi) (40343347)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	諸藤 陽一 (MOROFUJI Yoichi) (40437869)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐藤 克也 (SATOH Katsuya) (70398147)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（保健学科）・教授 (17301)	
研究分担者	山口 将 (YAMAGUCHI Susumu) (70712131)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員 (17301)	

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