

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08981

研究課題名(和文) 治療遺伝子を強発現させた歯髄幹細胞による脳梗塞治療法の確立-臨床応用へ向けて-

研究課題名(英文) Therapeutic gene transfer enhances neuroprotective effects of dental pulp stem cells following focal cerebral ischemia ~ for clinical application ~

研究代表者

仁藤 智香子 (Chikako, Nito)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30409172

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)：治療遺伝子である肝細胞増殖因子(HGF)を強発現させたDPSC(DPSC/HGF)を急性期脳梗塞モデルに投与することにより、幹細胞単独投与よりも有意な梗塞縮小効果が得られ、また動物の運動機能についても有意な改善を認めた。その効果のメカニズムとしては抗炎症作用や血液脳関門障害の軽減による神経細胞死の抑制や血管新生効果が考えられた。さらに、移植細胞の追跡を行うと、再灌流14日後では虚血脳半球に細胞生着が認められなかったことから、移植されたDPSCs/HGFは長期間脳内に生存しないため、宿主におけるHGF発現増強は一過性であり、免疫抑制等の副作用も少ないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、遺伝子修飾を施した治療用細胞を損傷脳組織に導入し、適切な期間維持させる方法を開発する基盤となり、新規脳梗塞治療へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Administration of DPSCs (DPSC/HGF), in which hepatocyte growth factor (HGF) as a therapeutic gene was strongly expressed, to an acute ischemic stroke model showed a more significant infarct reduction than administration of DPSCs alone, and also showed significant improvement in the motor function of the animals. The mechanism of these effects was thought to be the suppression of neuronal cell death due to anti-inflammatory effects, the reduction of blood-brain barrier damage and the promotion of angiogenesis. Furthermore, tracing of the transplanted cells showed that no cell viability was observed in the ischaemic brain hemisphere after 14 days of reperfusion, suggesting that the transplanted DPSCs/HGF did not survive in the brain for a long time, and that the enhancement of HGF expression in the host was transient and caused few side effects such as immunosuppression.

研究分野：脳卒中

キーワード：幹細胞治療 歯髄幹細胞 AAVベクター 脳保護効果 脳梗塞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちはラット脳梗塞モデルにおいて、ヒト脱落乳歯や親知らずから採取した歯髄幹細胞 (Dental pulp stem cell: DPSC) の経静脈投与により梗塞縮小や運動機能改善が得られることを証明し、DPSC 移植は虚血再灌流後の脳内ミクログリア活性や炎症性サイトカインを抑制することにより脳保護効果をもたらす可能性のあることを示した。DPSC は骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BM-MSC) よりも高い分化・増殖能を持ち(文献 1)、免疫原性も低く(文献 2)、歯には癌化がないことから腫瘍形成性も低いと考えられている。また、DPSC 由来の成長因子等の働きが神経保護作用や血管新生に寄与する可能性も報告され(文献 3)、その臨床学的重要性が示されている。

しかし、細胞治療においては至適移植細胞数には制限があり、用量依存的に有効性が高まるわけではない。そこで、私たちは細胞治療に遺伝子治療を組み合わせることにより脳保護効果を増強する方法を考え、治療遺伝子として抗炎症作用や血管内皮保護に加え神経再生促進作用などを有する肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) に注目した。HGF はラット脳虚血モデルにおいて脳梗塞後の運動機能回復を促進する可能性が報告されており(文献 4)、リコンビナント HGF は現在 ALS などの神経変性疾患で臨床応用されている。

2. 研究の目的

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて治療遺伝子である肝細胞増殖因子(HGF)を強発現させた DPSC(DPSC/HGF)の移植により、ラット 急性期脳梗塞における治療効果の増強が得られるか検討し、その治療効果のメカニズムや安全性を評価することにより、この遺伝子細胞治療を新規脳梗塞治療法として確立させることを目指す。

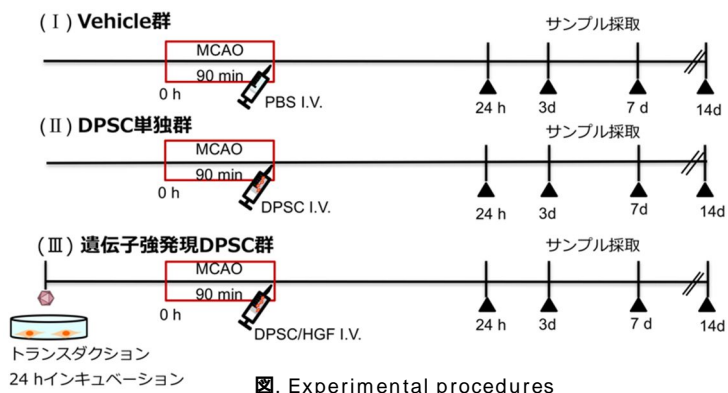
3. 研究の方法

(1) AAV ベクターの構築：治療遺伝子 (HGF や IL-10) をクローニングした pAAV-CMV Vector と pRC2-mi342 Vector、pHelper Vector を HEK293 細胞にトランスフェクションして培養し、AAV1 ベクターを構築し精製する。RT-PCR 法により AAV ベクターのタイターを測定する。

(2) AAV ベクターを用いた治療遺伝子発現 DPSC の作製：国内企業 J 社 (共同研究契約締結済) より提供を受けたヒト DPSC を拡大培養し、上記の HGF を搭載した AAV を DPSC に感染させることにより治療遺伝子強発現 DPSC を準備する。(文献 5)

(3) 一過性局所脳虚血モデルの作成 と細胞移植：ラット中大脳動脈にナイロン糸を挿入し、90 分間閉塞した後に糸を抜き、血流を再灌流させることによって脳梗塞モデルを作成し(文献 6)、虚血再灌流直後に移植細胞を経静脈的に投与する。

(4) 虚血脳での移植細胞の生着の検証：増殖細胞の標識として Bromodeoxyuridine(BrdU)を用い、脳虚血導入後 24 時間より 1 日 2 回、1 回 50mg/kg の BrdU を実験動物に 3 日間腹腔内投与する。TUNEL 法にて TUNEL/BrdU 陽性細胞率を算出することで移植細胞の経時的な生存率を評価する。



(5) 運動機能・認知機能・脳梗塞体積の評価：虚血再灌流後における動物の運動機能を Bederson 法や Rota-Rod 試験で評価する。評価後断頭し、脳を 2mm 幅でスライスし、TCC 染色法より梗塞体積を測定する。

(6) 動物の生存率の評価：各治療群における動物の生存率を評価する。

(7) 各種タンパク発現および血管新生作用の検討：虚血再灌流後の虚血脳内や血清中の治療タンパク(HGF)や炎症性タンパク(IL-1, TNF-), tight-junction 構成蛋白(ZO-1, Occlusion), 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現をウェスタンブロット、ELISA 法、RT-PCR 等の分子生物学的手法を用いて測定し治療効果や安全性の評価を行う。さらに、免疫染色にて血管内皮細胞マーカーの RECA1 発現を調べる。

(8) 神経細胞死抑制効果の検討：虚血再灌流後の虚血側脳における神経細胞死の評価を Fluoro-Jade C 法にて行う。

4. 研究成果

虚血再灌流 24 時間、3 日後、7 日後において、DPSC/HGF 群では対照群および DPSC 単独群と比べて有意な梗塞・浮腫体積の縮小を認め、モデル動物の神経徴候(片麻痺・姿勢異常)や前肢握力の改善、Rota-Rod 試験における騎乗時間の延長が認められた。組織免疫染色法では、皮質梗塞境界領域における Iba1, TNF- の発現の有意な抑制や、Fluoro-Jade C 染色法にて神経細胞変性数の有意な減少を認めた。また、Evans-blue 法を用いた実験では、虚血再灌流 3 日後において HGF 強発現 DPSC 群にて有意な Evans-blue 漏出の抑制効果が得られ、また BBB の構成成分である、ZO-1 や Occlusion といった tight-junction 構成蛋白の発現が DPSC 単独投与に比べより保たれていたことから、DPSC/HGF は BBB の機能維持にも関与している可能性が示唆された。虚血再灌流 14 日後の評価では、HGF 強発現 DPSC 移植により、皮質梗塞境界領域における RECA-1 の発現が有意に増強し、脳微小血管の有意な増生を認めた。

以上より、治療遺伝子である肝細胞増殖因子(HGF)を強発現させた DPSC(DPSC/HGF)を急性期脳梗塞モデルに投与することにより、幹細胞単独投与よりも有意な梗塞縮小効果が得られ、またモデル動物の運動機能についても有意な改善を認めた。その効果のメカニズムとしては炎症性サイトカイン発現の抑制や血液脳関門障害の軽減による神経細胞死の抑制や血管新生効果が考えられた。さらに、移植細胞の追跡を行うと、再灌流 14 日後では虚血脳半球に細胞生着が認められなかったことから、移植された DPSCs/HGF は長期間脳内に生存しないため、宿主における HGF 発現増強は一過性であり、免疫抑制等の副作用も少ないと考えられた。

文献：

- (1) Ponnaiyan D, et al. *Eur J Dent.* 2014.
- (2) Pierdomenico L, et al. *Transplantation.* 2005.
- (3) Sugiyama M, et al. *Tissue Eng Part A.* 2011.
- (4) Tsuzuki N, et al. *Neurol Res.* 2001.
- (5) Tomono T, Okada H, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016.
- (6) Nito C, Ueda M, et al. *Neurol Res.* 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nito C, Sowa K, Sakamoto Y, Takahashi S, Arakawa M, Suda S, Nishiyama Y, Takahashi A N, Kasahara YN, Kimura K, Okada T.
2. 発表標題 Transplantation of human dental pulp stem cells attenuates brain injury after transient middle cerebral artery occlusion.
3. 学会等名 第25回 日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nito C, Suda S, Sowa K, Nakajima M, Sakamoto Y, Takahashi S, Nishiyama Y, Kasahara YN, Okada T, Kimura K.
2. 発表標題 Neuroprotective effects of human dental pulp stem cells after acute cerebral ischemia.
3. 学会等名 The 25th Internal Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function (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	須田 智 (Suda Satoshi) (00366733)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	

	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
研究協力者	岨 康大 (Sowa Kota)	日本医科大学・脳神経内科	

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
研究協力者	中島 壯崇 (Nakajima Masataka)	日本医科大学・脳神経内科	
研究協力者	坂本 悠記 (Sakamoto Yuki)	日本医科大学・脳神経内科	
連携研究者	岡田 尚巳 (Okada Takashi) (00326828)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	

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