

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08985

研究課題名(和文) 血行再建併用intensive cell supplyによる脳梗塞治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment for cerebral infarction by intensive cell supply by indirect bypass

研究代表者

折戸 公彦(Orito, Kimihiko)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：50597408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、本来もやもや病に対して使用される間接血行再建術を応用し、成人の脳梗塞巣に対し血管新生を促す方法の開発を目的とした。脳梗塞となった脳表面に対し、間接血行再建術を行い、側頭筋と脳表が接した状態を作る。側頭筋を栄養する外頸動脈に繰り返し細胞移植を行い、血管新生を促進する。脳表と側頭筋の間に幹細胞により作成したシートを配置し、側頭筋から脳内への血管新生を促進する。移植細胞に対し電磁気刺激(EMF)を行い、細胞の活性化や増殖能力の向上を目指すものである。間接血行再建術を行い、その栄養血管に骨髄間葉系細胞を移植することにより、脳梗塞となった脳組織に細胞を届ける事が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は医療費を非常に多く必要とする疾患であり、寝たきりの原因の3割を占め、医療的、社会的に重要な疾患である。近年、脳梗塞治療の進歩は著しく、急性期治療に関しては10年前と比較して明らかに治療成績は向上している。その一方で、時間的に治療を行うことができなかった症例や、治療にもかかわらず梗塞巣が完成された場合は、脳梗塞となった脳組織自体を再生させる方法や失われた脳機能を改善させる有効な治療法が確立されていない。侵襲の少ない間接血行再建術は高齢者にも行う事が可能であり、今後脳梗塞に対する細胞移植療法が実用化された際には、細胞の移植経路として間接血行再建術を用いることが出来る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to apply indirect bypass surgery to cerebral infarction. Indirect bypass surgery is performed for adult cerebral infarction, and bone marrow stromal cells are transplanted there. Furthermore, electromagnetic stimulation (EMF) was applied to the transplanted cells with the aim of activating the cells and improving their proliferative capacity. We could not show the effect of EMF. However, it was possible to deliver the transplanted cells into the brain by transplanting the cells into the indirect bypassed tissue.

研究分野：脳神経外科

キーワード：間接血行再建術 骨髄間葉系細胞 細胞移植療法 中大脳動脈閉塞モデル 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

脳梗塞は医療費を非常に多く必要とする疾患であり、寝たきりの原因の3割を占め、医療的、社会的に重要な疾患である。近年、脳梗塞治療の進歩は著しく、急性期治療に関しては10年前と比較して明らかに治療成績は向上している。その一方で、時間的に治療を行うことができなかった症例や、治療にもかかわらず梗塞巣が完成された場合は、脳梗塞となった脳組織自体を再生させる方法や失われた脳機能を改善させる有効な治療法が確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は、本来もやもや病に対して使用される間接血行再建術を応用し、成人の脳梗塞巣に対し血管新生を促す方法の開発を目的としている。

脳梗塞となった脳表面に対し、間接血行再建術を行い、側頭筋と脳表が接した状態を作る。

側頭筋を栄養する外頸動脈に繰り返し細胞移植を行い、血管新生を促進する。

脳表と側頭筋の間に幹細胞により作成したシートを配置し、側頭筋から脳内への血管新生を促進する。

移植細胞に対し電磁気刺激 (EMF) をを行い、細胞の活性化や増殖能力の向上を目指す。脳表に幹細胞シートをひくことで、新生血管の材料補給とナーシングエフェクトが期待でき、側頭筋の栄養血管へ幹細胞を供給することで持続的な幹細胞の供給を可能とする。また、移植細胞に対し、培養中に EMF を付加することで、増殖率と生着率等の向上を期待する。間接血行再建術は脳を傷つけることなく施行可能であり、間接血行再建術で新生した還流路は最も脳血流を必要とするところへ交通することが期待され、より効果的な細胞移植療法を可能とする。

3. 研究の方法

ラットに90分の一過性中大脳動脈閉塞モデル (MCAO) を作製。

骨髄間葉系細胞の採取培養

虚血脳への血管新生の評価

) HE 染色

) 免疫染色

) 電子顕微鏡

運動機能、神経学的機能評価、脳血流評価

4. 研究成果

ラットにて90分の一過性中大脳動脈閉塞モデル (MCAO) の安定した作製方法を樹立

) 耳鏡にて喉頭展開を行い、14G のアンギオカットをガイド下に挿入

) ベンチレーターにて呼吸管理

) 直腸温プローベを挿入、体温を37 に管理

) 右側頭筋を剥離し、側頭骨に接するようにレーザードップラープローベを挿入

) 脳血流モニターで血流が下がる部位まで4-0 ナイロンを内頸動脈へ挿入し、90分の虚血負荷を与える

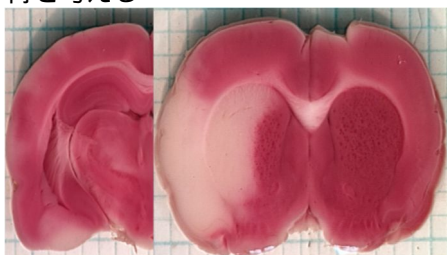


図1. MCAO 90min モデル (TTC)

間接血行再建術

) 腹臥位にて頭部を正中切開、帽状筋膜を頭蓋骨から剥離し、展開

) 右頭蓋骨の登頂部に直径5mmのcraniotomyを作製

) 軟膜に一部切開を加え、皮膚を戻し縫合

骨髄間葉系細胞の採取培養方法を確立

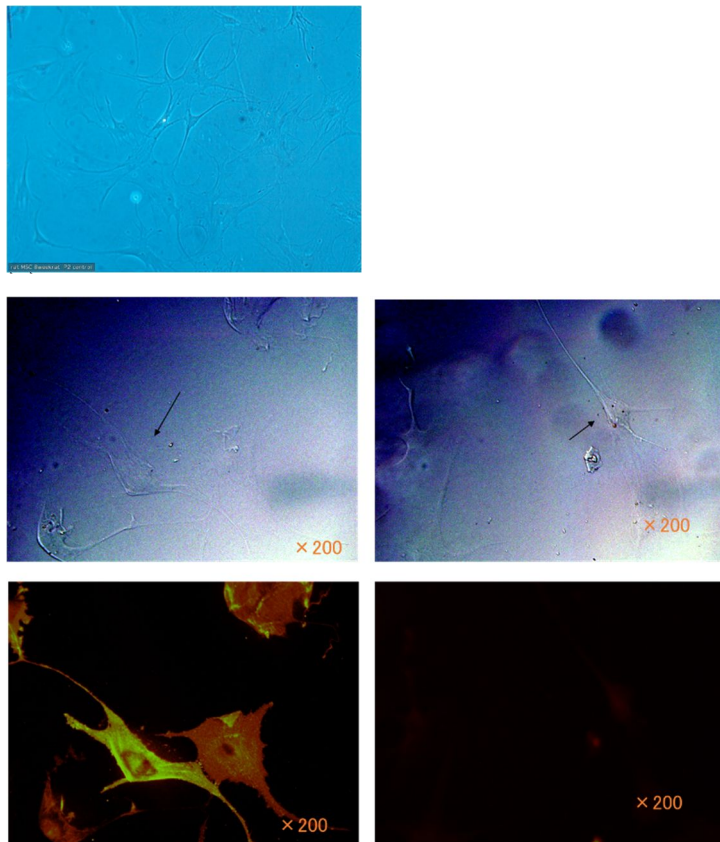
) 7week s の Lewis ラット雄を用いる

) 腹腔内臓器を避け、大動脈を24Gのアンギオカットで確保、ヘパ水で下半身をwash outを行う。

) 大動静脈ともcut

-) 両側大腿骨を採取し、生食内で保存
-) 大腿骨内を 18G で削り出し、Ficoll-paque PLUS にて顆粒球の層を分離
-) -MEM(20%FBS)にて培養を行う

図 2



CD 90

CD 34

図 3

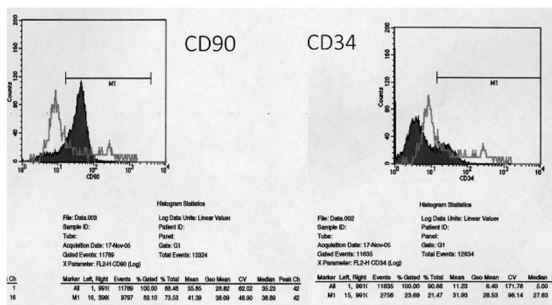


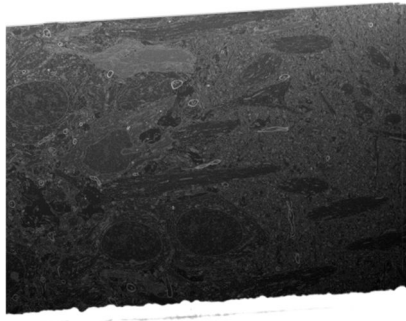
図 2 の示すように、初期培養を行った骨髄間葉系細胞の染色を行ったところ、CD90 で陽性、CD34 で陰性であることを確認。

FACS scan にてそれぞれの陽性細胞の陽性率を検討したところ、CD90 83.1% CD34 23.7%であり、骨髄間葉系細胞の特徴として矛盾しない所見であった。

虚血脳への血管新生評価

) 間接血行再建を行った部位において、脳表に新生血管が確認されるかどうかを検討した。これまでに我々は、間接血行再建を行った部位の HE 染色において、帽状筋膜下の間隙組織内に新生血管の数が増える事を報告しており、その部位において電子顕微鏡での評価を行った。

図 4 電子顕微鏡

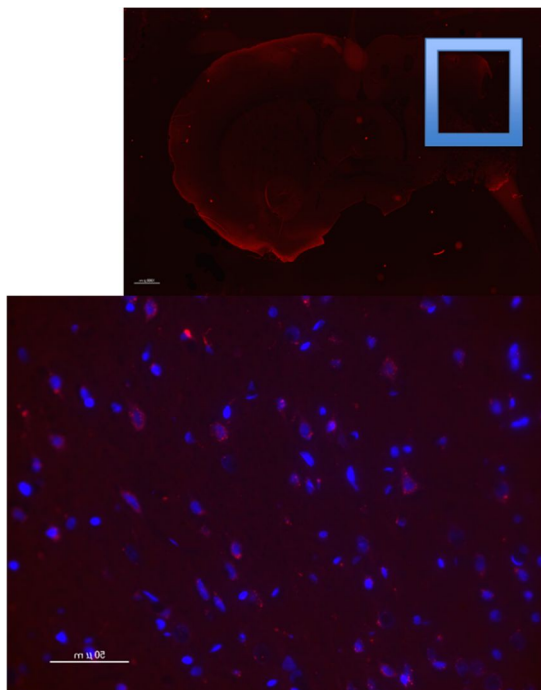


間接血行再建を行った部分は、脳表に帽状筋膜が付着している状況であり、理想としては連続切片にて帽状筋膜から新生血管が連続して脳内に入っていくスライスが切り出せるのが望まれたが、筋膜と脳表の接続は弱く、一塊としての処理が困難であった。梗塞巣の存在する側の皮質領域の組織を検討してみたが、脳内に浸潤するような新生血管は確認できなかった。
また脳梗塞側の海馬 CA1 も電子顕微鏡にて評価を行ったところ、pyramidal cells が脱落したと考えられる所見が認められた。

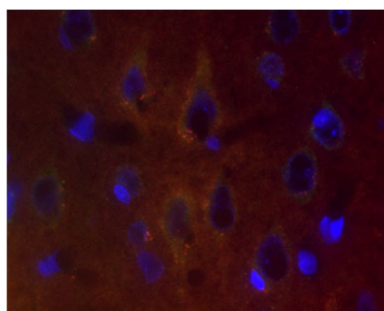
）脳表と接する側頭筋内に骨髄間葉系細胞を直接注入する事により、脳内への移動、分化が可能かどうかを検討した。

上記にて示した方法で骨髄間葉系細胞を用意し、P3 の状態の細胞に対し DyeI にて標識を行い、 5.0×10^6 個ずつ側頭筋内へ注入を行った。

図 5 脳内における移植細胞の確認



脳内、梗塞巣周辺



NeuN 発現細胞

MCAO 作製後 2 週間経過したラットに対し、骨髄間葉系細胞の注入を行い、さらに 2 週間後に評価を行った。移植細胞 (赤) と DAPI (青) を合わせる事で、脳内へ移植細胞が定着していることが確認された。更に、NeuN を merge させる事で NeuN を発現した移植細胞を確認する事が出来た。

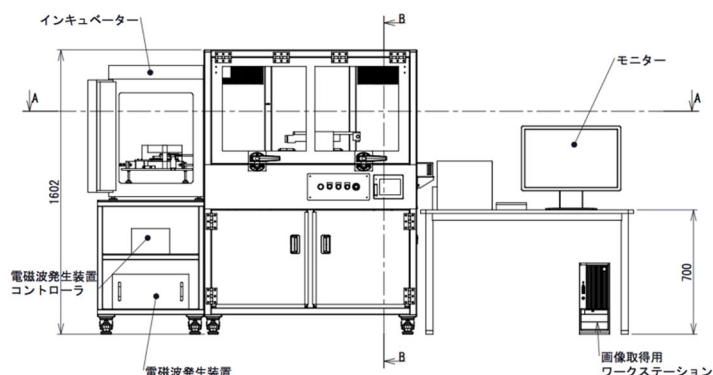
以上より移植された骨髄間葉系細胞が脳内へ移動していることが確認された。そのため、間接血行再建術後の領域を通過して筋肉内に投与された細胞が脳内へ到達することが可能であると示唆された。

骨髄間葉系細胞に対する電磁気刺激 (EMF) 負荷

我々はこれまでに PC12 細胞に対して EMF の連続刺激 (2mT, 10Hz, sign wave) を行いながら、吸光度測定で細胞数を計測したところ、72 時間の刺激を加えた群で細胞数の増殖率が上がる事を確認している。

そのため、上記にて示した方法で骨髄間葉系細胞を用意し、P3 の状態の細胞に対し EMF の連続刺激 (2mT, 10Hz, sign wave) を負荷した。

【電磁刺激幹細胞誘導培養システム】



培養の結果、表面抗原には変化なく、細胞の増殖速度の上昇が認められた。間接血行再建術を行ったラットの側頭筋にこの細胞を移植し生着率や神経機能の回復速度を測定する事を検討していたが、上記磁気刺激幹細胞誘導培養システムに温度変化がある事が発覚した。外気にさらさず、他の電磁波を排除して細胞の観察ができるシステムであるが、EMF を用いた群に温度上昇が確認され、細胞増殖速度の上昇に影響を与えていた可能性は否定できなかった。

今後の課題

間接血行再建術を行ったラットの側頭筋に注入した細胞が脳梗塞巣内に確認され、間接血行再建術は脳梗塞患者に対する細胞移植の経路として低侵襲で有効な移植経路となる可能性が考えられた。

幹細胞をシート状にして脳表に敷いたり、EMF 刺激を負荷して培養することでより効果的な幹細胞移植を可能とすることを目的としていたが、今回は確証が得られなかった。今後も EMF 条件や間接血行再建術の方法など様々な検討が必要である。

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 2件）

1. 著者名 Noguchi K, Ali TFS, Miyoshi J, Orito K, Negoto T, Biswas T, Taira N, Koga R, Okamoto Y, Fujita M, Otsuka M, Morioka M	4. 巻 163
2. 論文標題 Neuroprotective effects of a novel carnosine-hydrazide derivative on hippocampal CA1 damage after transient cerebral ischemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejmech.2018.11.060.	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 Yamamoto M, Orito K, Nakamura Y, Takeshige N, Yoshitomi M, Takeuchi Y, Uzu H, Takasu O, Abe T, Tanoue S, Uchiyama Y, Morioka M	4. 巻 161
2. 論文標題 Leakage sign for acute subdural hematoma in clinical treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neurochirurgica	6. 最初と最後の頁 233-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00701-018-3755-x.	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 竹内靖治、廣畑 優、折戸公彦、梶原壮翔、橋本 彩、藤村直子、山下 伸、中村普彦、森岡基浩	4. 巻 34
2. 論文標題 高度脳血管攣縮に対する経皮的血管拡張術の有用性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳血管攣縮	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 折戸 公彦
2. 発表標題 当院における破裂前大脳動脈遠位部動脈瘤の治療成績
3. 学会等名 第48回日本神経放射線学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 折戸 公彦
2. 発表標題 くも膜下出血におけるLeakage signについて
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 折戸 公彦
2. 発表標題 Overlap stent assist aneurysm embolizationを選択した椎骨動脈の部分血栓化大型解離性動脈瘤の1例.
3. 学会等名 第20回脳神経血管内治療琉球セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Orito K
2. 発表標題 Leakage sign for intracerebral hemorrhage in relation to the site of hemorrhage
3. 学会等名 BRAIN & BRAIN PET 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 折戸 公彦
2. 発表標題 血管内治療後皮質盲の発生機序に関する研究
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Orito K
2. 発表標題 Coil embolization for unruptured cerebral aneurysm in elderly people (over 70 years old)
3. 学会等名 15th Congress of the World Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology (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	森岡 基浩 (Morioka Motohiro) (20295140)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	広畑 優 (Hirohata Masaru) (40218863)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	原田 秀樹 (Harada Hideki) (30198923)	久留米大学・付置研究所・客員准教授 (37104)	
研究分担者	青木 孝親 (Aoki Takachika) (70330842)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	

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