

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008 年度
 課題番号：19390373
 研究課題名（和文） 神経再生医療実現のためのミニブタ穿通枝脳梗塞モデルを用いた基盤的研究
 研究課題名（英文） Underlying research on autologous stem cell transplantation for axonal regeneration by using miniature pig model of lacunar infarction
 研究代表者
 今井 英明 （IMAI HIDEAKI）
 群馬大学・医学部・助教
 研究者番号：70359587

研究成果の概要：ミニブタ穿通枝脳梗塞モデルを開発して、神経幹細胞移植による脳梗塞治療法の開発を目指した。白質に局限した脳梗塞が再現性よく作成できた。経時的な組織学的所見では、梗塞巣は虚血後 7 日では拡大することが判明した。軸索が最も脆弱でミエリンやその他の組織に障害が及ぶことが判明した。血管組織だけは障害から免れ、梗塞巣内でも生き残ることが判明した。また、ミニブタ脳より採取した神経細胞より、自己複製能と多分化能をもつ神経細胞塊が得られた。これらの細胞を標識し脳内に移植した。移植細胞が、ホスト脳で神経ネットワーク形成やそれに伴い機能改善をもたらしているかについては確認できなかったが、MRI と病理組織学的にホーミング（生着の前段階と考えられる）までは確認することができた。神経幹細胞のみの移植ではホスト脳での増殖や神経ネットワーク形成には不十分である。ドラッグデリバリーシステムによる栄養因子持続投与の必要性を実感した。そこでラット脳梗塞モデルを用いてドラッグデリバリーシステムによる bFGF 持続投与実験を追加した。bFGF 持続投与により軸索の伸長が一部確認できたが、bFGF の副作用のためか脳梗塞巣は対照群に比較して脳浮腫のため大きくなる傾向を示した。栄養因子の種類や組み合わせさらに至適濃度は今後詳細に検討する必要がある。神経幹細胞のみでなく血管内皮細胞などと組み合わせた neurovascular signalling を考慮した治療法も期待が持てる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳梗塞、再生医学、軸索再生、ミニブタラクナ梗塞モデル、ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

これまでの齧歯類（ラット、マウス：滑脳型動物）を中心とした脳梗塞モデル研究の結果から脳虚血障害における白質障害の重要性

と、よりヒト脳（脳溝型脳）に近い実験モデルの必要性が、認識されてきている。基礎から臨床への橋渡しをする研究（トランスレーショナルリサーチ）を目的とし大型動物（ミ

ミニブタ：脳溝型脳動物)を用い選択的白質梗塞モデル(ラクナ梗塞モデル)を作成し、脳梗塞急性期の病態変化を多角的に解明する。さらに得られた基礎データの蓄積をもとに神経幹細胞移植を中心に据えた新しい脳梗塞治療法(成長因子持続投与による神経再生など)の開発戦略の構築を目指す。

2. 研究の目的

基礎から臨床への橋渡しをする研究(トランスレーショナルリサーチ)を目的としてミニブタ脳梗塞モデルを開発し、神経幹細胞自家移植による脳梗塞治療を試みる。側脳室より細胞を採取し神経幹細胞をクローニングし移植する。広範囲に障害される脳梗塞では、移植する細胞自身の生着・分化の問題と共に、いかに正確に神経細胞ネットワークを再構築し脳機能を回復させられるかという難題がある。そこで、脳梗塞移植治療法への第一歩として、本研究テーマでは穿通枝(ラクナ)梗塞という脳梗塞のなかでも最もシンプルな病態にターゲットを絞ることとした。つまり、穿通枝梗塞とは、白質に限定した虚血障害のために神経細胞体の障害は認められず、軸索とそれに付随したミエリンとその形成細胞-オリゴデンドロサイトが選択的に障害される病態である。したがって、原理的には、軸索の再生伸展とミエリン形成がなされれば機能的な回復が期待できる。神経細胞そのものは再生能力をもっており、再生阻害的なグリア環境を再生に適した環境に置き換えることにより再生を促すと考えられている。この実現のためには増殖・分化能の高い細胞と細胞の分化・増殖を誘導するための至適な環境(場)が必須と考えられる。しかしながらこれまで少なくとも脳梗塞治療のための移植再生研究においては移植細胞(ドナー)のみに研究の主眼がおかれレシピエントである生体組織(脳梗塞脳)に関してはほとんど注目されてこなかった。本申請課題では、ミニブタ穿通枝脳梗塞モデルを用いて、脳梗塞部位の病態・生理(微小環境変化)を経時的にかつ多角的(神経学的変化、組織学的変化、電気生理学的变化、画像変化)に評価し移植再生治療に最適な環境を検索・同定し、かつ軸索再生に必要な栄養因子を効率よく持続的に投与する方法を開発し、軸索再生医療へ向けた基礎研究を目的とすることである。中枢神経(脳)軸索再生のための基盤となる研究を目指している。

3. 研究の方法

(1) ミニブタ穿通枝梗塞モデルの作成と病態

の多角的評価

① ラクナ脳梗塞モデルの作成

メキシカンヘアレスミニブタ(体重14~24 kg)を使用する。イソフルラン全身麻酔下に右前頭側頭開頭を行い、顕微鏡直視下に内頸動脈より分岐する穿通枝(前脈絡叢動脈:AchA)を電気凝固後切離する。大脳皮質や大脳基底核障害を起こすことなく内包に選択的な梗塞巣を作成する。

② MRIによる梗塞巣評価

脳梗塞発症 24 時間後、ケタミン筋肉注射による沈静下(気管挿管、自発呼吸下)にMRI(T1、T2、FLAIR、DWI)撮影を行う。DWI、T2、FLAIRにて内包を中心とする深部白質に選択的な高信号領域を確認する。

③ 運動機能評価:内包と線状体の一部に梗塞巣を呈することより、直後より運動機能障害を呈する。以下の基準で障害程度をスコアリングする。立位(4)、発声(5)、頭位(2)、前肢(4)、後肢(4)、顔面(1)、歩行(3)=25点のスコアリングシートを用い経時的(3, 6, 12, 24, 48 時間・3, 4, 5, 6 日・1, 2, 3, 4 週)に評価する。

④ 虚血白質障害の病理組織学的評価と定量

(2) 移植細胞調製法の確立

ミニブタ側脳室壁細胞を用いる。

① ミニブタ側脳室からの神経幹細胞培養条件の検討 ミニブタ脳の側脳室壁より脳室下層・上衣層細胞を採取する(約300 mm³)。側脳室壁より得た神経幹細胞を含む中枢神経系の細胞をEGEやbFGFを加えた無血清培地で浮遊培養を行い増殖させ、神経塊(neurosphere)を形成する。この細胞群を限界希釈法で単一培養し、数週間で同様のneurosphereを形成させる。神経幹細胞のマーカーで染色され、自己複製能と多分化能(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)をもつことを証明する。

② 培養細胞のMRI標識法の開発 培養した移植細胞を超磁性酸化鉄粒子造影剤(フェルモキシデス)にて標識し、ミニブタ脳梗塞モデルの脳内に移植する。この鉄剤による標識法の利点としては、細胞障害性が少ないことのほかにMRIにて経時的に移植細胞の動態を確認する(同一個体において空間的・時間的移植細胞の追跡が可能)と共に、組織標本にてもPrussian Blueを用いて移植細胞が検出可能なことがあげられる。

(3) 定位的細胞移植法と移植後の機能評価の確立

脳梗塞モデルへの神経幹細胞塊の移植

細胞補充療法として移植細胞の量的な問題のほかに、どの部位に移植するとより効率的な移植効果が得られるかという課題がある。脳梗塞巣対側あるいは梗塞巣近傍の皮質下のいずれが良いか見極める必要がある。これら移植細胞の未分化状態の維持と分化の方向性、ホーミング・遊走・生着のコントロールの問題のほかに移植細胞と宿主脳との機能的なネットワークの構築を如何に促進させることができるかが移植治療の成否を決めると思われる。繰り返し実験 (try and error) により移植環境の最適化条件の検索が必要と思われる。

4. 研究成果

【ミニブタラクナ梗塞の病態生理と経時的な変化】

MRI (DWI・FLAIR)にて内包後脚に局限した梗塞が確認された。MRIにて内包に91.4% (32/35)の再現率でラクナ梗塞が確認された。

電気生理学的評価：再灌流モデル(n=7)において閉塞後6'13"±1'10"にて電気活動の消失が確認された。血流遮断10分間群(n=3)では血流再開後速やかにMEPの回復を認めたが、15分間群(n=4)では血流再開後30分間はMEPは消失した状態であった。しかし15分遮断群全例に運動機能障害やMRI、病理組織で虚血性障害を認めなかった。

運動機能評価では、AchA閉塞(AchA0)群では行動障害が出現し24時間で最大障害となるが12日目までには機能が回復された。運動機能評価ではsham群では障害が出現しなかったのに比べAchA0群では10日まで障害が残存し両群間に統計学的有意差が認められた。梗塞巣経時的な変化を組織学的(Luxol fast blue染色にて)に評価すると：AchA0発症24時間から1週間の間に梗塞巣の有意な拡大をみとめた。1週から4週間の間では梗塞巣に統計学的有意差はなかった。

HE染色にて24時間後Ischemic core辺縁部に腫大軸索および著明な細胞間隙浮腫を認め、抗APP抗体により軸索流の停滞が確認された。梗塞後1週間では辺縁部からの炎症細胞、macrophageの集簇や抗GFAP抗体によるreactive astrocyteが認められた。4週間後ではastrocyteによる瘢痕形成の他、梗塞部のmacrophageによる占拠および血管の残存が認められ、さらに皮質下白質において瀰漫性の軸索障害が認められた。

脳梗塞巣内の微小血管数においては梗塞後24時間、7日、14日後とも有意な変化は認められず、梗塞巣内では血管構築は維持されて

いることが確認できた。

電子顕微鏡所見ではIschemic Coreでは軸索・髄鞘の壊死が認められたが血管周囲では乏突起膠細胞や星状膠細胞わずかに確認され、Irreversible damaged areaでは24時間後に認められた著明な細胞間隙・傍軸索間隙の浮腫及び軸索の破壊が1週間後には壊死領域となった。Peri-infarct areaでは24時間後に軸索は腫大、髄鞘は形態を留めていたが、1週間後にはmacrophageに貪食されている所見が得られた。Marginal zoneでは1週間後には梗塞巣の拡大と軸索変性が認められた。

【ミニブタ神経幹細胞移植】

ミニブタ側脳室壁(脳室下層・上衣層細胞)より採取した細胞から自己複製能と多分化能をもつ神経細胞塊が得られた。これらの神経細胞塊は鉄剤にて標識した。脳内に移植した細胞もMRIにて低信号として同定できた。組織学的見も鉄染色にて同定できた。しかし、本研究では、神経幹細胞移植のみでは、ホーミングがかろうじて認められる状態(MRI,組織像)であり生着、遊走、分化、神経ネットワークの形成にはいっていないことが判明した。ミニブタによる神経幹細胞移植研究から、細胞が増殖・分化しやすい環境を移植に先駆けて整えておく必要性(たとえば網細血管)が判明した。徐放化ゲル(ゼラチン粒子30 μ m)を用いて持続的に栄養因子(bEGF/)の局所的投与を行う手段を確立した。

【ラット内包梗塞モデルにおける神経栄養因子の持続投与】

本研究では、ラットを用いて、定位的にEndothelin-1を注入し内包に局限したラクナ脳梗塞モデルを作成した。脳梗塞発症7日後に同部位にbFGFを吸着したゼラチンマイクロスフェア(生体吸収性材料)を注入し、bFGF持続的投与を行い、軸索再生に及ぼす効果について検証した。注入7-10日後の免疫組織標本では、同部位にマイクロスフェアが確認できた。その周囲はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(ChSPGs)に満たされたグリア瘢痕を認めた。ニューロフィラメント抗体にてneuronal sproutingは確認することができたが、グリア瘢痕の境界を越えて軸索が伸長する所見は認めなかった。bFGFの副作用のためか脳梗塞巣は対照群に比較して脳浮腫のため大きくなる傾向を示した。栄養因子の種類や組み合わせさらに至適濃度は今後詳細に検討する必要がある。神経幹細胞のみでなく血管内皮細胞などと組み合わせ

た nuerovasucular signalling を考慮した治療法も期待が持てる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. M Nakamura, H Imai, K Konno, C Kubota, K Seki, S Puentes, A Faried, HYokoo, H Hata, Y Yoshimoto, N Saito. Experimental investigation of encephalo-myo-synangiosis using gyrencephalic brain of the miniature pig: histopathological evaluation of dynamic reconstruction of vessels for functional anastomosis. **J Neurosurg Pediatrics** 2009 3:488-495 査読^有
2. Y Tanaka, H Imai, K Konno, T Miyagishima, C Kubota, S Puentes, T Aoki, H Hata, K Takata, Y Yoshimoto, N Saito. Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation. **Stroke** 2008 39:205-212. 査読^有
3. 今井英明, 中村光伸, 風間健, 嶋口英俊, 齊藤延人, 好本裕平 もやもや病血行再建術におけるEMSの重要性 基礎研究を基に考察した臨床所見(血行再建パターンの解析) 脳循環代謝(0915-9401)20 巻 1 号 Page154(2008. 11) 査読^有
4. Puentes Sandra, 今井英明, 内田孝幸, 石崎泰樹, 鹿児島海衛, 好本裕平 ラットのラクナ梗塞の新しい容積評価法 (A new method for the volume assessment of lacunar infarction in the rat) 脳循環代謝(0915-9401)20 巻 1 号 Page122(2008. 11) 査読^有
5. 今井英明, 中村光伸, 鹿児島海衛, 嶋口英俊, 風間健, 齊藤延人, 好本裕平 もやもや病に対する広範囲血行再建術後の血行再建パターンの解析 血管新生機序から考察したEMSの重要性67 回日本脳神経外科学会総会 CD-ROM 抄録集 (1347-9040) Page3J-04-P80-06(2008. 10) 査読^有
6. 今井英明 脳血管性認知症 動物モデルからみた脳血管障害(会議録) **Dementia Japan**(1342-646X)22 巻 2 号 Page125(2008. 08) 査読^有
7. 中村光伸, 今井英明, 今野兼次郎, プエンテス・サンドラ, フェリエッド・アマハド, 好本裕平, 齊藤延人 ミニブタ脳虚血モデルを用いた間接血行再建術(EMS)の病理組織学的検討 脳循環代謝(0915-9401)19 巻 2 号 Page126(2007. 10) 査読^有
8. サンドラ・プエンテス, 今井英明, 内田孝幸, 風間健, 石崎泰樹, 好本裕平 脳循環代謝(0915-9401)19 巻 2 号 Page99(2007. 10) 灰白質と白質におけるグルタミン酸(AMPA)による細胞傷害程度(脆弱性)の違い 査読^有
9. 田中志岳, 宮城島孝昭, 今井英明, 齊藤延人, 好本裕平 ラクナ梗塞モデルの開発 虚血性白質障害の病態 日本脳神経外科学会総会CD-ROM抄録集 (1347-9040)66 回 Page1K-P01-1-20(2007. 10) 査読^有
10. 中村光伸, 今井英明, 久保田知里, ぶえんてす・さんどら, 齊藤延人, 好本裕平 動物実験モデルによる間接血行再建術(EMS)の経時的な病理組織学的検討 日本脳神経外科学会総会CD-ROM抄録集 (1347-9040)66 回 Page1K-P01-1-18(2007. 10) 査読^有

[学会発表] (計 3 件)

1. H Imai, M Nakamura, C Kubota, S Puentes, A Faried, Y Yoshimoto, N Saito. The insight of revascularization mechanism based on angiogenesis and arteriogenesis from the experimental and clinical works in moyamoya disease **Brain & Brain PET 09** 2009. 07. 02 (発表確定) シカゴ
2. Y Tanaka, H Imai, K Konno, T Miyagishima, C Kubota, S Puentes, T

Aoki, H Hata, Y Yoshimoto, N Saito.
A new model of lacunar infarction in
the miniature pig: comprehensive
evaluation for the pure white matter
ischemia Brain 07& Brain PET07
2007.5.23 Osaka

3. R Yamaguchi, H Imai, M Hosaka, T
Takeuchi, Y Yoshimoto, N Saito.
Expression of cyclophilin
C-associated protein in focal cerebral
ischemia in rat
Brain 07& Brain PET07 2007.5.23 Osaka

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 英明 (IMAI HIDEAKI)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：70359587

(2) 研究分担者

風間 健 (KAZAMA KEN)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30396626

好本 裕平 (YOSHIMOTO YUHEI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50242061

石崎 泰樹 (ISHIZAKI YASUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90183003

田畑 泰彦 (TABATA YASHUHIKO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371

(3) 連携研究者

()

研究者番号：