

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591678

研究課題名 (和文) 電気刺激による脳内移植細胞の分化誘導法に関する研究

研究課題名 (英文) Differentiation of transplanted cells induced by electrical stimulation

研究代表者

杉生 憲志 (SUGIU KENJI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40325105

研究成果の概要：

in vitro では、培養神経幹細胞に対して低頻度電気刺激を行うことにより、神経幹細胞は陰極に遊走する傾向があり、神経系への分化を示し、脳由来神経栄養因子の分泌が増加していた。in vivo でも、脳梗塞モデルラットに対し電気刺激により脳梗塞体積が減少し、内在性の神経幹細胞の遊走が促進されることが示された。パーキンソン病モデルラットに対しては、神経幹細胞移植＋電気刺激療法を施行したところ、より強い治療効果が得られ、広い範囲に移植細胞が生存していたが、ドパミン神経への分化については影響を与えなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：機能脳神経外科学、パーキンソン病、ドパミン、分化、細胞移植、電気刺激、実験脳外科学

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病に対して、十分量のドパミンやニューロンを宿主脳内に供給でき、かつ倫理的問題を解決できるような移植ドナー細胞の開発が大切である。幹細胞は多分化能を有し、理想的な移植ドナーであるが、未分化な状態で移植しても目的の細胞に分化することはほとんどできない。また、幹細胞を分化させた段階で移植を行っても、目的の細胞は移植できるがほとんど生着できないという欠点がある。

ある。最近の報告ではES細胞からドパミンニューロンへの分化誘導法が開発され有用な治療法であるが、倫理的問題や

腫瘍化などの問題があり臨床応用は難しい状況である。脳由来神経幹細胞は、成体内にも存在することが発見され、この細胞を採取することにより自家移植が可能であり、有用な移植ドナーであるが、ドパミンニューロンへ分化させることは困難であった。電気刺激を用いたプレリ

ミナリーな研究で我々は神経幹細胞の形態が電気刺激により変化して、神経系へ分化する可能性が示された。本研究によって、電気刺激と細胞移植を組み合わせることにより、より治療効果を高められる可能性がある。

## 2. 研究の目的

幹細胞に対して持続的電気刺激を行い、*in vitro*において幹細胞のニューロンへの分化・遊走・生存および神経突起の伸長などに対して有用であるかどうか明らかにする。このとき、至適電気刺激強度を検討し、さらに細胞の状態や細胞内伝達を検討することによりそのメカニズムを解明する。

次に、幹細胞をパーキンソン病・脳梗塞モデル動物に脳内移植し、同時に電気刺激装置を同部位に挿入する。電気刺激により移植細胞がどのように変化するか、症状の改善が得られるかを明らかにする。特に、刺激の有無により移植細胞から産生されるカテコールアミン濃度の変化、移植細胞の生存・分化・遊走、そして神経突起の伸長などを検討し、新しい神経回路の再構築ができたかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

① *in vitro* で神経幹細胞を培養し、電気刺激を行うことによる、幹細胞の増殖・神経細胞への分化・遊走能について評価する。

② 脳梗塞モデルに対する電気刺激療法を、硬膜外刺激・実質内刺激という方法で行い、行動学的・組織学的評価により、神経保護効果があるかどうかを評価する。また、内在性の神経幹細胞の生存・分化・遊走について評価する。

③ パーキンソン病モデルに対する神経幹細胞移植+電気刺激治療を行い、その治療効果、移植細胞に対する効果、内在性の幹細胞に対する効果などについて評価する。

## 4. 研究成果

① *in vitro* で神経幹細胞に対して電気刺激を行ったところ、幹細胞の増殖能は何ら影響を受けなかったが、刺激開始から1日後には陰極方向への遊走を認めた。刺激頻度が高頻度刺激(50Hz以上)になると、遊走能はむしろ低下することも明らかになった。また、神経幹細胞が多数回の継代を経ると遊走能が減弱することも明らかとなった。神経細胞への分化に関しては、残念ながら一定の結果が得られなかったが、神経幹細胞からのBDNF(脳由来神経栄養因子)の分泌が電気刺激により増加することも分かった。

② 硬膜外・脳実質内 いずれの方法によっても脳梗塞モデルラットに対して強い神経保護効果を有することが明らかになった。つまり、行動学的改善と、神経放射線学的・組織学的に脳梗塞巣体積の減少が得られた。硬膜外刺激は、脳梗塞モデル作成前から開始し、神経保護効果を確認したにとどまったが、脳実質内刺激では、モデル作成から亜急性期に治療を開始しても、治療効果があることが判明し、臨床応用に向けて非常に大きな期待が持たれた。また、脳梗塞に向かう内在性神経幹細胞の遊走が、電気刺激によって強く認められた。

③ パーキンソン病モデルラットに対する神経幹細胞移植+硬膜外電気刺激を行った。モデル作成から1週間後に神経幹細胞移植を行い、同日より電気刺激を開始したところ、行動学的・組織学的改善が得られた。移植された神経幹細胞のドパミン神経への分化は残念ながら非電気刺激群と比較して有意差が得られなかったが、電気刺激群では、損傷線条体における移植細胞の分布が広がっていた。これは、神経幹細胞の有する遊走能が賦活化されたためと考えられた。

## 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 20 件)

① Continuous evaluation of regional oxygen saturation in cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage using INVOS<sup>®</sup>; portable near infrared spectrography  
Ono S, Arimitsu S, Ogawa T, Manabe H, Onoda K, Tokunaga K, Sugiu K, Date I

Acta Neurochir Suppl 104: 215-218, 2008  
査読有

② Effect of deferoxamine-activated hypoxia inducible factor-1 on the brainstem following subarachnoid haemorrhage  
Ono S, Hishikata T, Ogawa T, Nishiguchi M, Onoda K, Tokunaga K, Sugiu K, Date I

Acta Neurochir Suppl 104: 69-73, 2008  
査読有

③ Direct protein transduction method to cerebral arteries by using 11R: new

strategy for the treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage  
Ogawa T, Ono S, Ichikawa T, Michiue H, Arimitsu S, Onoda K, Tokunaga K, Sugiu K, Tomizawa K, Matusi H, Date I  
Acta Neurochir Suppl 104: 161-163, 2008  
査読有

④Endothelial nitric oxide synthase-11R protein therapy for prevention of cerebral vasospasm in rats: a preliminary report  
Ogawa T, Ono S, Ichikawa T, Arimitsu S, Onoda K, Tokunaga K, Sugiu K, Tomizawa K, Matusi H, Date I  
Acta Neurochir Suppl 104: 165-167, 2008  
査読有

⑤Orbital exenteration after transarterial embolization in a patient with Wyburn-Mason syndrome: Pathological findings  
Matsuo T, Yanai H, Sugiu K, Tominaga S, Kimata Y  
Jpn J Ophthalmol 52: 308-313, 2008  
査読有

⑥Effects of deferoxamine-activated hypoxia-inducible factor-1 on the brain stem after subarachnoid hemorrhage in rats  
Hishikawa T, Ono S, Ogawa T, Tokunaga K, Sugiu K, Date I  
Neurosurgery 62(1): 232-241, 2008  
査読有

⑦Japanese society of neuro-endovascular treatment specialist qualification system. Six years' experience and introduction of an animal model examination  
Hyogo T, Taki W, Negoro M, Takahashi A, Edura M, Hyodo A, Kobayashi S, Komiyama M, Kuwayama N, Matsumaru Y, Miyachi S, Murao K, Murayama Y, Nakahara I, Nemoto S, Sakai

N, Satoh K, Sonobe M, Sugiu K, Terada T, Yoshimura S, Abe T, Itoh Y, Kiyosue H, Nagashima H, Nakamura M, Matsushima S  
Interventional Neuroradiology 14: 235-240, 2008 査読有

⑧Endovascular treatment for ruptured cerebral aneurysms in elderly patients  
Sugiu K, Tokunaga K, Nishida A, Hayase H, Ono S, Onoda K, Date I  
Journal of Stroke & Cerebrovascular Disease 17(5)Supplement 1: S92, 2008  
査読有

⑨内頸動脈海綿静脈洞部巨大・大型動脈瘤に対する複合治療  
伊達 勲、徳永浩司、杉生憲志  
脳卒中の外科 36: 12-18, 2008 査読有

⑩塞栓物質の選び方と使用方法 2. コイル  
杉生憲志 IVR 23(2): 195-198, 2008  
査読有

⑪頸動脈ステント留置術と抗血小板療法  
平松匡文、杉生憲志、徳永浩司、西田あゆみ、早瀬仁志、菱川朋人、小野成紀、三好康之、伊達 勲  
新薬と臨床 57(12): 1987-1993, 2008  
査読有

⑫Packing efficacy of hydrocoil embolic system: in vitro study using ruptured aneurysm model  
Watanabe K, Sugiu K, Tokunaga K, Sasahara W, Ono S, Date I  
Neurosurg Rev 30: 127-130, 2007 査読有

⑬Novel protein transduction method by using 11R: an effective new drug delivery system for the treatment of cerebrovascular diseases  
Ogawa T, Ono S, Ichiakwa T, Arimitsu S, Onoda K, Tokunaga K, Sugiu K, Tomizawa K, Matsui H, Date I

Stroke 38(4): 1354-1361, 2007 査読有  
⑭Antivasospastic and antiinflammatory effects of caspase inhibitor in experimental subarachnoid hemorrhage  
Iseda K, Ono S, Onoda K, Satoh M, Manabe H, Nishiguchi M, Takahashi K, Tokunaga K, Sugi K, Date I  
Journal of Neurosurgery 107: 128-135, 2007 査読有  
⑮Triple-catheter Technique in the Transvenous Coil Embolization of Isolated Dural Arteriovenous Fistula  
Sugi K, Tokunaga K, Nishida A, Sasahara W, Watanabe K, Shigeki O, Onoda K, Date I  
Neurosurgery 61(3suppl): 81-85, 2007 査読有  
⑯Combined use of trifill DCS detachable coil system and guglielmi detachable coil for embolization of meningioma fed by branches of the cavernous internal carotid artery: Technical case report  
Kusaka N, Tamiya T, Sugi K, Tokunaga K, Nishiguchi M, Takayama K, Maeda Y, Ogiwara K, Nakagawa M, Nishiura T  
Neurologia medico-chirurgica 47(1): 29-31, 2007 査読有  
⑰塞栓術にて完治せしめた成人 pial AVF の 1 例  
伊丹尚多、杉生憲志、徳永浩司、小野成紀、小野田恵介、伊達 勲  
脳神経外科 35(6): 599-605, 2007 査読有  
⑱Internal trapping 後に再発した破裂椎骨動脈解離性動脈瘤の 1 例  
菊池陽一郎、杉生憲志、徳永浩司、西田あゆみ、西村卓士、伊達 勲  
脳神経外科 35(8): 813-819, 2007 査読有  
⑲高齢者に対する脳神経血管内治療

杉生憲志、徳永浩司、西田あゆみ、佐々原渉、小野成紀、小野田恵介、伊達 勲  
Geriatric Neurosurgery 19: 39-41, 2007 査読有  
⑳新しい脳動脈瘤塞栓コイルの使用経験—Micrusphere と Microplex—  
杉生憲志、徳永浩司、西田あゆみ、早瀬仁志、小野成紀、小野田恵介、伊達 勲  
Journal of Neuroendovascular Therapy 1(1): 45-53, 2007 査読有  
〔学会発表〕(計 12 件)  
①第 24 回日本脳神経血管内治療学会総会：名古屋, 2008. 11  
頸部内頸動脈狭窄症における CEA と CAS 術後の医用画像を用いた患者特異的モデルと仮想モデルの流体力学シミュレーション  
早瀬仁志、中山敏男、徳永浩司、杉生憲志、西田あゆみ、有光帥二、菱川朋人、小野成紀、太田 信、伊達 勲  
②第 24 回日本脳神経血管内治療学会総会：名古屋, 2008. 11  
無症候性病変に対する脳神経血管内治療  
杉生憲志、徳永浩司、西田あゆみ、早瀬仁志、平松匡文、小野成紀、菱川朋人、伊達 勲  
③第 9 回近畿脳神経血管内治療学会：神戸, 2008. 09  
硬膜動静脈瘻治療における経動脈塞栓術（教育講演）  
杉生憲志  
④第 17 回脳神経外科手術と機器学会：長崎, 2008. 04  
岡山大学における脳神経外科手術シュミレーションのための cadaveric study のセットアップと工夫  
徳永浩司、安原隆雄、小野成紀、三好康之、杉生憲志、大塚愛二、伊達 勲

⑤第24回スパズムシンポジウム：京都，  
2008.03

ウサギくも膜下出血モデルにおけるHMGB1中  
和抗体の脳血管攣縮抑制効果

有光帥二、小野成紀、小野田恵介、徳永浩司、  
杉生憲志、西堀正洋、伊達 勲

⑥第24回スパズムシンポジウム：京都，  
2008.03

11Rを用いた新しいタンパク質導入法—脳血  
管障害治療への効果的な新しい薬物導入シ  
ステムの確立—

小野成紀、小川智之、市川智継、有光帥二、  
小野田恵介、徳永浩司、杉生憲志、富澤一仁、  
松井秀樹、伊達 勲

⑦岡山県保険医協会 第206回プライマリケ  
ア懇話会：岡山，2008.01

脳神経血管内治療の最前線—一切らずに治す  
脳卒中—

杉生憲志

⑧37th Annual Meeting of Society for  
Neuroscience 2007：San Diego，2007.11

Intrahippocampal transplantation of adult  
neural stem cells with neurotrophic factor  
reduces spontaneous recurrent seizures  
following kainate-induced status  
epilepticus

Shingo T，Kondo A，Jing M，Kuramoto  
S，Agari T，Tajiri N，Morimoto T，Yuan W，  
Wang F，Yasuhara T，Miyoshi Y，Sugiu K，  
Date I

⑨37th Annual Meeting of Society for  
Neuroscience 2007：San Diego，2007.11

Continuous electrical stimulation  
prevents apoptosis through the  
phosphoinositide 3-kinase-dependent  
pathway in the ischemia brain

Morimoto T，Baba T，Shingo T，Kameda M，  
Tajiri N，Miyoshi Y，Yasuhara T，Sugiu  
K，Matsumae M，Date I

⑩第23回NPO法人日本脳神経血管内治療学  
会総会：神戸，2007.11

頭蓋外PTA/Stenting—頸動脈を除く—  
(Continuing Education Program)

杉生憲志

⑪第66回社団法人日本脳神経外科学会総  
会：東京，2007.10

頸部内頸動脈狭窄症におけるCEAとCASの術  
前後の3D-CTA、3D-DSA画像を使った生体力  
学シミュレーション

早瀬仁志、徳永浩司、中山敏男、西田あゆみ、  
杉生憲志、小野成紀、小野田恵介、太田 信、  
伊達 勲

⑫第66回社団法人日本脳神経外科学会総  
会：東京，2007.10

破裂脳動脈瘤に対する意図的部分塞栓術  
杉生憲志、徳永浩司、西田あゆみ、早瀬仁志、  
小野成紀、小野田恵介、伊達 勲

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉生 憲志 (SUGIU KENJI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：40325105

### (2) 研究分担者

西田 あゆみ (NISHIDA AYUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教

研究者番号：70423316

### (3) 連携研究者

徳永 浩司 (TOKUNAGA KOJI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：40294467

三好 康之 (MIYOSHI YASUYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講  
師

研究者番号：00362997

上利 崇 (AGARI TAKASHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60423290

伊達 勲 (DATE ISAO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70236785

新郷 哲郎 (SINGO TETSURO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：50379749