様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年　6月　16日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19791335
研究課題名（和文）　血管内皮前駆細胞移植による一過性脳虚血後の血管発生の神経機能回復

研究課題名（英文）　Neovascularization and functional recovery promoted by transarterial transplantation of mononuclear cells after transient cerebral ischemia

研究代表者
船曳　知弘（FUNABIKI TOMOHIRO）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90317256

研究成果の概要：マウスに一過性脳虚血を作成し、血流再開の直後に経動脈的に別のマウスから採取した骨髄単核球を移植した。急性期に移植細胞はレシピエントマウスの脳内で確認できなかったが、慢性期では、非移植群に比して移植群において虚血巣の血管新生が有意に促進していた。新生された血管の血管内皮細胞はドナーマウス由来の細胞ではなく、レシピエントマウス由来であることが確認された。しかしながら、移植群で行動学的に有意な改善は得られなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	2,900,000	480,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学
キーワード：脳虚血、血管発生、動脈内投与、神経機能回復

１．研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞は生命を脅かす疾患であり、機能予後へも大きな影響を及ぼす重篤な疾患の一つである。

(2) 脳梗塞超急性期における血管溶解療法による機能回復が試みられ、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）の経静脈的投与が発症3時間に以内の症例において認められるようになった。

(3) 一方で発症6時間以内の症例において海外では経動脈的局所血栓溶解療法の有用性が報告されている。

(4) 近年、血管内皮前駆細胞の存在が明らかとなり、これが骨髄由来の細胞として末梢血中に存在し、重症虚血部位の血管形成に関与することが発見された。

(5) 脳血管においても骨髄由来の血管内皮前駆細胞が血管発生に関与しているとの報

告があり、さらに脳血管は脳細胞に対する血流供給のみならず、神経新生に対して促進的な微小環境を提供するとの報告もある。

2．研究の目的

(1) 脳虚血状態のマウスに血管内皮前駆細胞を移植することにより、脳内での血管発生が促進されるか、否かを検討する。

(2) 血管新生が促進された場合に、移植細胞自体が血管内皮細胞に分化しているのか、内在性の細胞を起源としているのかを検討する。

3．研究の方法

(1) マウスに一過性脳虚血を作成する。
 ① 全身吸入麻酔下にマウスの右頸部を切開し、頸動脈を露出する。外頸動脈の遠位を結紮し反転し尾側に転回する。
 ② ナイロン糸で作成した塞栓子を外頸動脈から挿入し、中大脳動脈の起始部まで挿入し、一過性の脳虚血を作成する。レーザードップラーで、体表から血流の低下を確認する。
 ③ 30 分の閉塞後、塞栓子を抜去し、血流を再還流させる。

(2) 骨髄単核球を移植する。
 ① 別のマウスから採取した骨髄単核球を、塞栓子抜去後に経動脈的に投与する。
 ② 非移植群に関しては同量の溶媒のみを注入する。

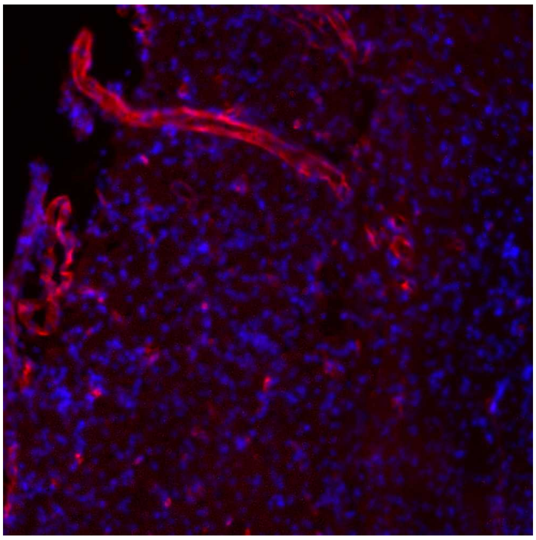
(3) 血管新生を評価する。
 ① 術後早期（30 分）の時点で屠殺して移植細胞が脳内にとどまっているか評価する。対象として脾臓・肝臓・肺を同時に評価する。
 ② 術後慢性期（6 週間）の時点で血管新生の有無を血管内皮細胞に特異的な抗原（CD31）を用いて評価する。

(4) 新生血管の血管内皮細胞の由来を検討する。
 ① ドナーとして、Green Fluorescent Protein (GFP)を発現するトランスジェニックマウス(CAG-GFP マウス)を用いて検討する。虚血・再還流用のマウス（レシピエント）と移植細胞を採取するマウス（ドナー）とにおいて、CAG-GFP マウスと野生型マウスとを組み合わせ、同様の実験を行う。

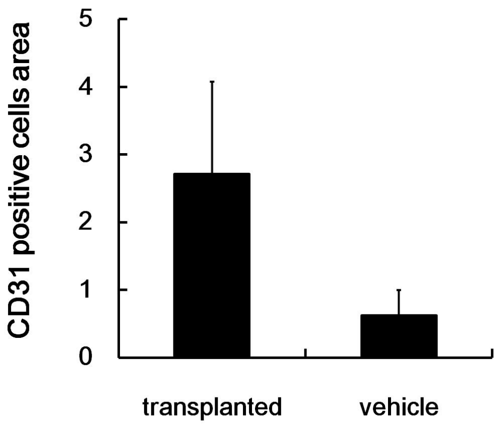
4．研究成果

(1) 移植の有無による血管新生の促進

非移植群では、血管新生は梗塞巣表面にしか見られなかったのに対して、移植群においては、梗塞巣の内部を貫くように血管新生が認められた（下図）。

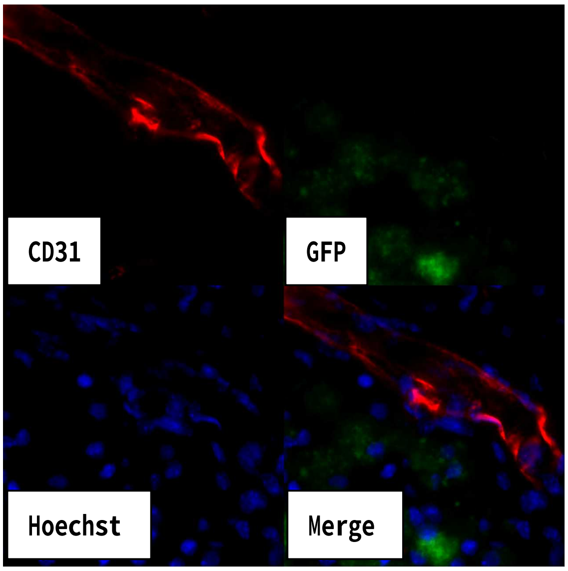


また CD31 抗体を用いた、移植群と非移植群における単位面積当たりの血管内皮細胞の面積は、移植群において促進されていた。統計学的にも有意差が確認された（下図、$p<0.05$）。

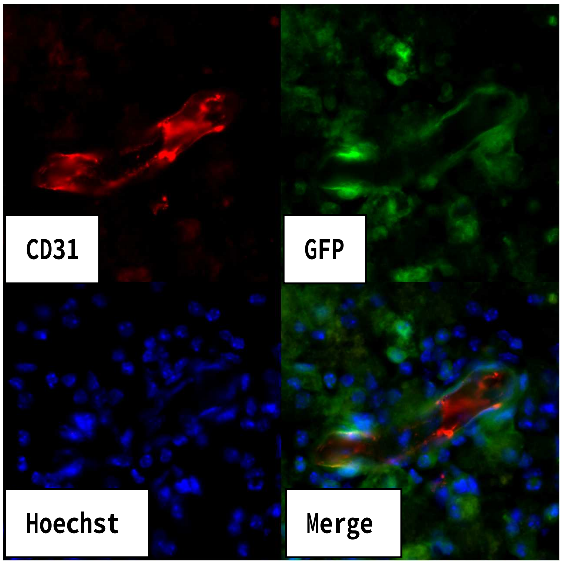


(2) 新生血管の由来

① ドナーマウスをCAG-GFPマウスにすることによって、移植細胞を標識し、血管内皮細胞をCD31で免疫染織したが、血管内皮細胞にはGFPの標識を認めなかった（下図）。



② 逆に、レシピエントマウスをCAG-GFPマウスにした場合、CD31陽性の血管内皮細胞は、GFPとの二重陽性を示した（下図）。以上より、新生された血管内皮細胞はレシピエントマウス由来の細胞であることが示された。



(3) 今後の展望

① 移植細胞の具体的関与

骨髄単核球の移植により、脳虚血巣の血管新生が促進されることが示されたが、移植細胞は投与後30分の時点ですでに脳内にとどまっていなかった。移植細胞が関与した液性因子の影響が寄与していると考えられたが、どのような因子が関与しているか判明していない。

また経動脈内投与を行ったが、細胞が脳内にとどまらないのであれば、経静脈投与でも十分な効果が得られる可能性があり、この検討は必要である。

今回は、細胞移植を脳梗塞の血流再開直後に行ったが、この時期に関しても検討を要する。

② 新生血管内皮細胞の由来

血管内皮細胞がレシピエントの細胞由来であることが判明したが、この細胞の由来が骨髄細胞由来なのか、脳表の細胞由来なのかは判明していない。骨髄置換マウスなどを用いてレシピエントマウスの骨髄細胞の関与を検討する必要がある。

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　１件）

① Tomohiro Funabiki, Jun Namiki, Sayuri Suzuki, Yumi Matsuzaki, Naoki Aikawa. Neovascularization promoted by mononuclear cell transplantation after transient cerebral ischemia. Inflammation and Regeneration. 29; 66-72, 2009. 査読あり

〔学会発表〕（計　３件）

① 船曳知弘　他. 動物モデルにおける脳梗塞後の骨髄単核球移植による血管新生. 第36回日本救急医学会総会・学術集会 2008年10月15日（札幌市）.

② 船曳知弘　他. マウス脳虚血後の経動脈的な骨髄単核球移植による血管新生. 第31回日本神経科学大会（Neuroscience 2008）2008年7月9日（東京都）.

③ 船曳知弘 他. 脳梗塞超急性期モデルマウスを用いた局所脳血栓溶解療法に続く再生医療の開発. 第 36 回日本 IVR 学会総会 2007 年 5 月 24 日（金沢市）.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

６．研究組織
(1)研究代表者
船曳 知弘（FUNABIKI TOMOHIRO）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90317256

(2)研究分担者

(3)連携研究者