

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07946

研究課題名(和文)再生アソシエイト細胞静注による認知症治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a new treatment for dementia by regeneration associate cells.

研究代表者

今関 良子 (IMAZEKI, Ryoko)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10328122

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)：血管性認知症の新規治療の確立を目指し、マウス慢性脳虚血(血管性認知症)モデルを作成し、マウス尾静脈からの再生アソシエイト細胞(血管内皮前駆細胞分化動態及び血管再生・修復能の高い細胞群)投与を行い、空間作業記憶、組織保護効果について、4週間後(短期評価)及び8カ月後(長期評価)を検討した。10週齢雌マウスでは短期評価で空間作業記憶改善と組織保護が確認された。40週齢雌、10週齢雄では有意差は確認できなかったが、投与回数を増やすことで効果が得られる可能性が得られた。今後、至適投与回数及び投与タイミング等、更なる検討が必要と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、認知症の根治療法は確立されておらず、今後、高齢化社会となる本邦において、認知症治療法の開発は、患者や家族の負担軽減のみならず、国家財政の観点からも急務である。本研究において、我々が独自に開発した、再生アソシエイト細胞(血管内皮前駆細胞分化動態及び血管再生・修復能の高い細胞群)を血管性認知症動物モデルに投与し、空間作業記憶の改善や組織保護効果を得たことは、今後、再生アソシエイト細胞投与は、ヒトの血管性認知症治療法につながる可能性を示唆した。本研究の進展は、学術的意義のみならず、社会的意義も大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：We aim to develop new therapies for vascular dementia. We used a chronic mouse ischemic model as vascular dementia model, and transplant the regeneration-associated cells (RACs) which contains high proliferative vascular endothelial progenitor cells to those mice via a mouse caudal vein. A space working memory test and tissue protection effect were evaluated at four weeks (short-term evaluation) and eight months (long-term evaluation) after the transplantation. On the 10 weeks of age female mice, space working memory test was improved and tissue protection effect was observed during short-term evaluation although there were no significant difference on 40 weeks of age female mice and the 10 weeks of age male. It is necessary to investigate the optimal number of doses and the timing of administration to be injected to vascular dementia model mice.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：再生アソシエイト細胞 血管性認知症 慢性脳虚血 血管内皮前駆細胞 認知症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

平成 28 年国民生活基礎調査によると、介護（要支援あるいは要介護）が必要となった原因の第 1 位は認知症（18.0%）、第 2 位は脳血管疾患（16.6%）である。認知症を標的にすることは、要支援あるいは要介護患者の 18.0%を救うことが可能となり、各患者や家族の負担軽減のみならず、国家財政の立場でも、極めて重要な戦略と位置づけられる。厚生労働省の認知症施策推進総合戦略（平成 27 年 1 月 27 日発表）によれば、わが国の認知症高齢者の数は、2012（平成 24）年で 462 万人と推計されており、2025（平成 37）年には約 700 万人、65 歳以上の高齢者の約 5 人に 1 人に達することが見込まれている。下方浩史（日本臨床、2004）によれば、認知症の有病率は、3.80%で、そのうち 2.1%がアルツハイマー型認知症、1.0%が血管性認知症、その他が 0.7%と報告されている。更に、アルツハイマー型認知症と血管性認知症は共通する危険因子も多く（Kusum Sinha et al, Drug Discovery Today, 2020）両疾患の併存による混合型認知症も多く存在する（栗山長門、京府医誌、2018）。認知症のうち、アルツハイマー型認知症は、抗アセチルコリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 阻害薬などが保険適応の治療法として認められてはいるが、いずれも根治療法ではない。血管性認知症に関しては、全く特効薬が存在していないのが現状である。わが国の高齢化社会の動向を踏まえ、認知症に対する根治療法の確立は急務であり、我々は、認知症の治療戦略として、神経細胞保護と血管再生・神経細胞再生の両輪が必須であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス慢性脳虚血モデルを用い、我々が独自に開発した、既存の EPC 治療とは異なる、質的・量的に優れた分化能をもつ EPC（再生アソシエイト細胞）による認知症治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

**再生アソシエイト細胞** 血管内皮前駆細胞（EPC）は、浅原らが、ヒト末梢血中にその存在を世界で初めて発見した（Science, 1997）。EPC は、骨髄由来で内皮細胞に分化する細胞であり、骨髄から動員されて末梢血中の単核球成分の一部（CD34 陽性細胞分画）に存在する。既に、多くの分野で臨床応用に向けての研究が展開され、脳梗塞や認知症を対象とした実験的研究も散見される。しかし、既存の EPC の有用性について、明確な結論には至っておらず、脳梗塞や認知症患者への既存の EPC 投与では、数量不足、分化能の低さ等により、血管再生や機能改善を期待する事は難しい。そこで、我々は、これまでの研究で用いられた EPC とは異なり、新規の培養法を確立して、コロニー定量化による EPC 分化動態及び血管再生・修復能の高い細胞を選び出すことに成功した（Masuda H, Circ Res, 2011）。ここで得られた EPC は、血管再生能が高く、かつ、再生・抗炎症型マクロファージと制御性 T 細胞の増加による血管再生効果、抗炎症効果、免疫寛容効果の相互作用を生み出す “極めて良好な血管再生環境” を形成する細胞群であり、我々は、この細胞群を「再生アソシエイト細胞 regeneration associate cells: RAC」と名付けた。

**細胞培養** 同種マウス（別個体）脾臓を抽出し、細かく粉碎・濾過した後に、ヒト組換え幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン、Flt-3 配位子、血管内皮増殖因子（VEGF）、インターロイキン-6（IL-6）を用いて、2 日間、非分画単核細胞（MNCs）の培養を行った。

**動物モデル作成** 動物種：C57B/6J マウス、成熟 10 週齢（雌雄）または 40 週齢雌を用い、マウスの両側総頸動脈に、内径 0.18mm の微小金属コイルを外側より装着し、両側頸動脈狭窄（BCAS）モデル（Shibata M., et al., Stroke, 2004）（図 1）を作成した。

**投与タイミング** BCAS モデル作成後、マウス尾静脈より、Day 1 の 1 回もしくは、Day 1、Day 8、Day 15 の 3 回、Control 群には PBS 溶液 0.1ml、RAC 群には RAC  $1 \times 10^5$  個/0.1ml を投与した。

**行動評価** 動物モデル作成から 4 週間後または 8 カ月後に、Y Maze Test (Brian B. Griffiths, et.al, Neuro Molecular Medicine, 21, 170-181, 2019.) を用いて行動評価を行った。Test 前に、マウスを実験室に 1 時間以上静置した。Y maze 装置は、互いに 120 度の角度をなす、3 つの灰色の不透明なプラスチックアームを備えた Y 字型の迷路で、長さ：30cm、幅：6cm、高さ 15cm のサイズを用いた。行動観察では、マウスを迷路の中心に導入し、10 分間、3 本のアーム内を自由に探索させ、SMART Video Tracking System (Panlab<sup>®</sup>) Version 3.0.04 にて解析した。

**組織評価** Y Maze Test 終了直後に殺処分し、組織標本処理を行った。HE 染色においては細胞脱落や脳萎縮の状況を評価し、脳梁前膝部の髄鞘脱落変化については、KB 染色を用い、既報告の手法 (Wakita H, et.al, Acta Neuropathol. 87, 484-492, 1994.) に基づき髓

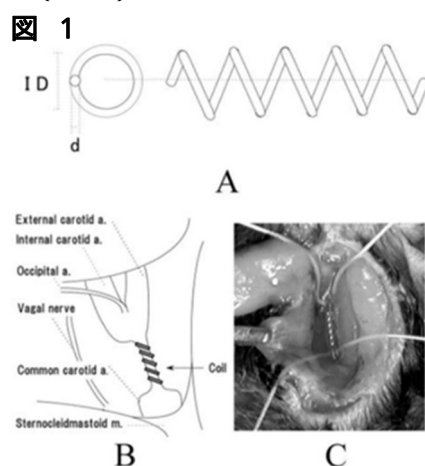
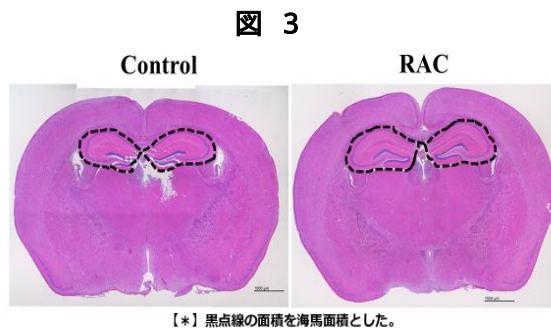
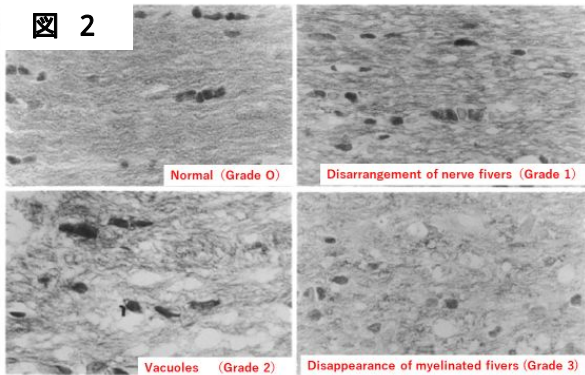


Figure 1. The microcoils (A) and the procedure for BCAS (B and C). A microcoil made of piano wire (d; wire diameter of 0.08 mm) with an inner diameter of 0.18 mm, pitch 0.50 mm, and total length 2.5 mm was twined by rotating it around the CCA just below the level of the carotid bifurcation.

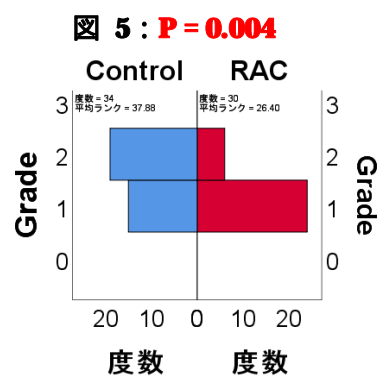
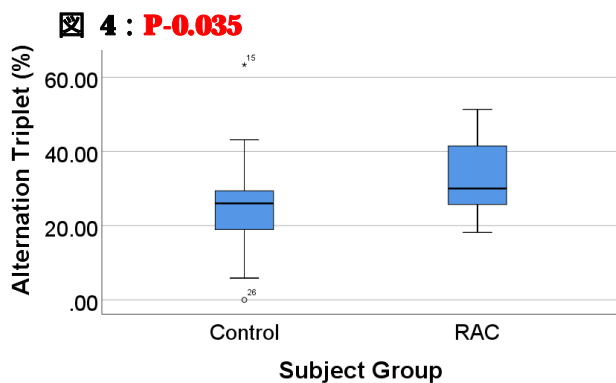
鞘破壊の程度を Grade 0-3 (図 2) に分類した。更に長期評価においては、海馬面積比 (海馬面積/全体面積比率) の測定 (図 3) と Aβ-42 染色をもちいて、アミロイド沈着の有無を評価した。



#### 4. 研究成果

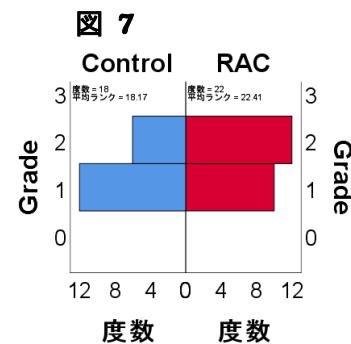
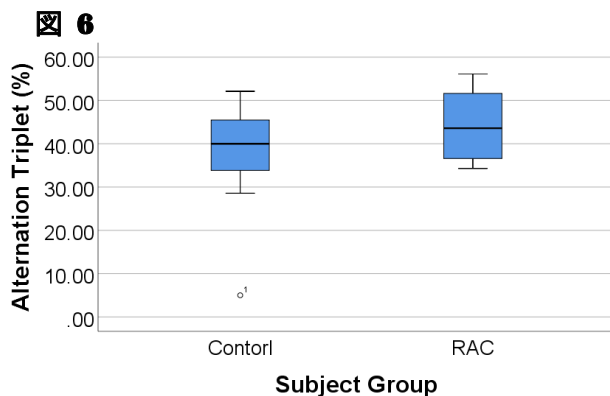
##### 10 週齢雌マウス (1 回投与、短期評価)

RAC 投与群で空間作業記憶改善 (図 4) 及び髄鞘保護効果 (図 5) が確認された。



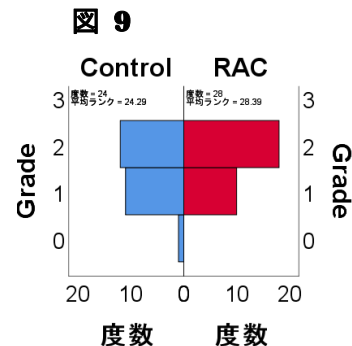
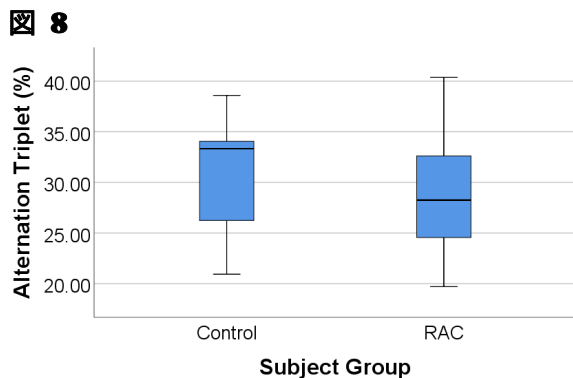
##### 40 週齢雌マウス (1 回投与、短期評価)

Control 群と RAC 群間で空間作業記憶 (図 6) 及び髄鞘保護効果 (図 7) の差異はなかった。



##### 10 週齢雄マウス (1 回投与、短期評価)

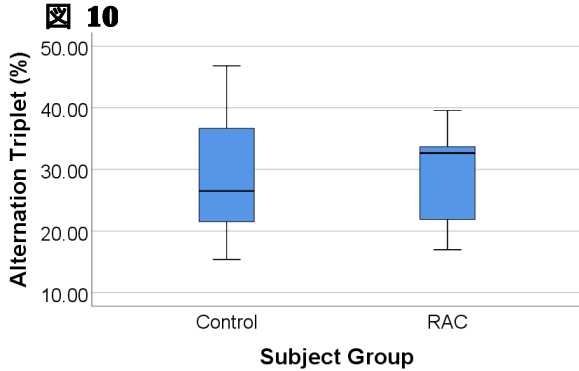
Control 群と RAC 群で空間作業記憶 (図 8) 及び髄鞘保護効果 (図 9) の差異はなかった。



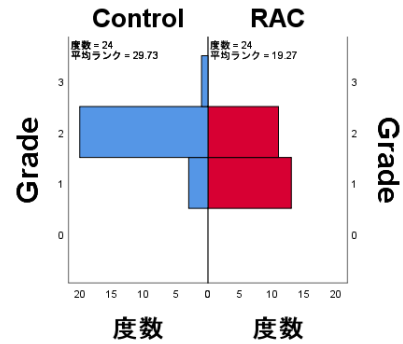
ここまでの結果から、10週齢の雌マウスと加齢雌マウス及び雄マウスでRACの有効性の差異があることが判明した。そこで、雄や加齢マウスではRACの投与回数を増やす必要があると考え、10週齢雄マウスの投与回数を3回に増やし、短期及び長期評価での検討を行った。

**10 週齢雄マウス (3 回投与、短期評価)**

空間作業記憶 (図 10) では、Control 群と RAC 投与群の差異はなかったが、髄鞘保護効果 (図 11) は RAC 群の方が優れていた。



**図 11 : P = 0.002**

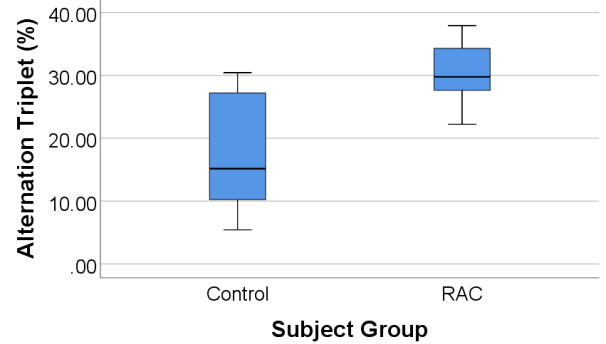


**10 週齢雄マウス (3 回投与、長期評価)**

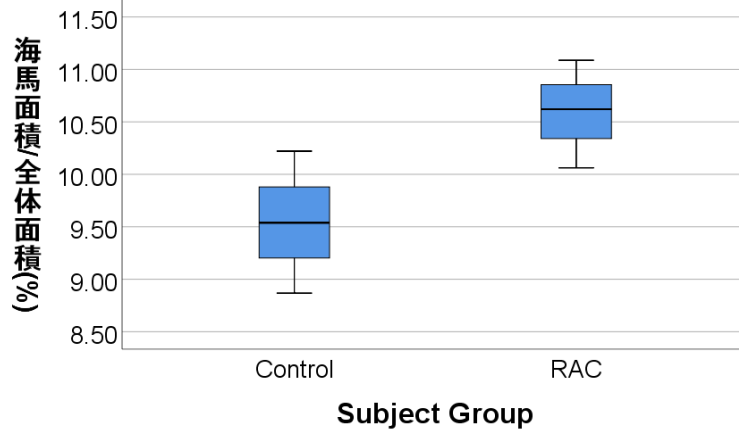
空間作業記憶は、Control 群より RAC 投与群の方が優れていた (図 12)。

組織学的検討では、髄鞘保護効果での差異はなかったが、HE 染色における海馬形態学的検討において、海馬面積比 (図 13) は、Control 群の海馬比率: 8.87% に対して、RAC 群では海馬比率: 11.9% と、RAC 群の方が海馬萎縮が少ない傾向がみられた (統計学的有意差はなし)。

**図 12 : P = 0.015**

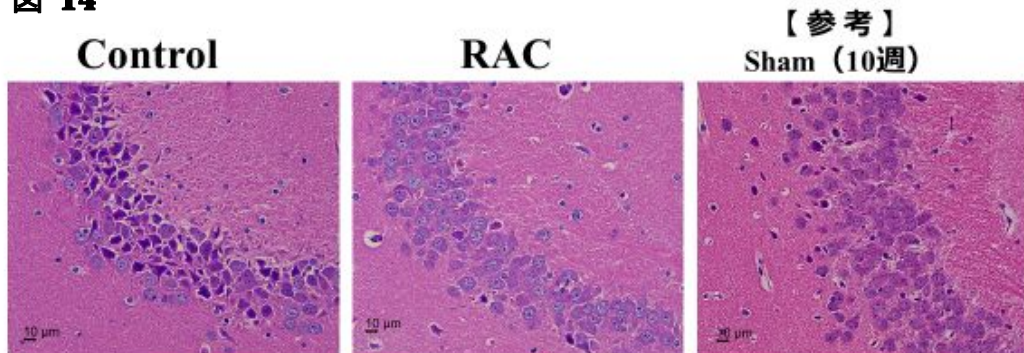


**図 13**



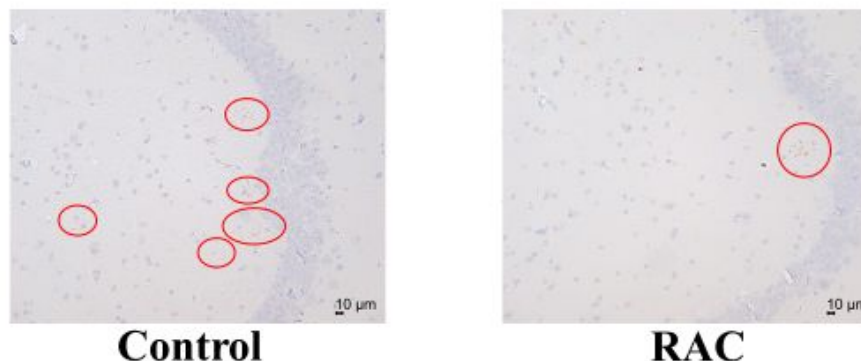
また、海馬細胞 (CA3 領域) を観察すると、Control 群では海馬細胞の核濃縮が顕著であったが、RAC 群では核濃縮がほとんど見られなかった (図 14)。

**図 14**



更に海馬の A $\beta$ -42 染色においては、Control 群に比べて、RAC 群の方がアミロイド蛋白沈着が少ない傾向があった (図 15)。

図 15



## まとめ

10週齢雌マウスではRACによる空間作業記憶維持や髄鞘保護効果が認められたが、40週齢雌や10週齢雄ではその効果を確認するには至らなかった。この雌雄やAgingでのRACの効果の差異は、エストロゲンを作れないマウスでは空間作業認知能力が低い (Lu Y, et al., J of Neuroscience, 2019) との既報告から、エストロゲンが関与したのではないかと推測したが、RACの投与回数を増やすことで、この差異を打ち消し、RACの効果を期待できるのではないかと考え、10週齢雄マウスの3回投与を行い、短期及び長期評価を行った。3回投与の短期評価では、空間作業記憶の有意差までは確認できなかったが、髄鞘保護効果が認められた。長期評価では、これまでの既報告 (Nishio, K. et al., Stroke, 2010) では、慢性脳虚血モデル作成の8カ月後に海馬萎縮や海馬細胞の核濃縮を来すことが組織学的に確認されており、我々のControl群の結果と一致する。一方、RAC投与群では、海馬萎縮が軽減されており、海馬細胞の核濃縮も目立たなかった。これらのことから、RACの投与によって、「血管新生による脳血流低下の軽減」や「抗炎症効果、免疫寛容効果の相互作用が生み出され、脳虚血に伴う細胞変化を阻止」した可能性が考えられた。さらに、空間作業記憶は、これまで主に、前頭皮質及び前頭皮質に関連したネットワークの関与のみが論じられてきたが、最近の研究では、歯状回 - 海馬回路も重要な役割を果たしていることが分かってきている (Sasaki T, et al., Nature Neuroscience, 2018)。10週齢雄マウスのRAC3回投与の長期評価では、海馬の形態学的変化及び細胞変性、アミロイド蛋白沈着が軽微であったことから、空間作業記憶の差が生じた可能性が推測された。

本研究の結果から、RAC投与により、血管性認知症の長期的進行を抑止する可能性が示唆されると共に、動脈硬化を促進する因子は、血管性認知症のみならず、アルツハイマー型認知症の危険因子でもあり、血管性認知症とアルツハイマー型認知症が混合した病態が多く見られることや動脈硬化はEPCの機能低下を招き、これらの病態を悪化させると共に、血管障害は認知機能低下を促進させることが知られていること、加えて、アルツハイマー型認知症ではEPCの機能低下を来すとの報告もある (Kusum Sinha et al, Drug Discovery Today, Volume 25, Number 4, April 2020) ことから、RACの投与は、血管性認知症のみならず、アルツハイマー型認知症の進行抑止に寄与する可能性も推測される。RACによる認知症治療法の確立に向け、今後も引き続き、更なる検討を行っていく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今関良子
2. 発表標題 マウス慢性脳虚血モデルにおける再生アソシエイト細胞静注療法の効果（長期における検討）
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会学術集会（STROKE 2020）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今関良子
2. 発表標題 再生アソシエイト細胞による血管性認知症治療法確立の可能性について
3. 学会等名 第11回日本脳血管・認知症学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今関 良子
2. 発表標題 マウス慢性脳虚血モデルにおける再生アソシエイト細胞静注療法の行動学習評価及び組織学的検討
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今関 良子
2. 発表標題 マウス慢性脳虚血モデルにおける再生アソシエイト細胞静注療法の行動学習評価及び組織学的検討
3. 学会等名 第10回日本脳血管・認知症学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今関 良子
2. 発表標題 マウス脳血管性認知症モデルにおける 再生アソシエイト細胞静注療法の効果について
3. 学会等名 第38回日本日本認知症学会
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	永田 栄一郎 (NAGATA Eiichirou) (00255457)	東海大学・医学部・教授  (32644)	
研究分担者	浅原 孝之 (ASAHARA Takayuki) (20246200)	東海大学・医学部・教授  (32644)	
研究分担者	瀧澤 俊也 (TAKIZAWA Shunnya) (70197234)	東海大学・医学部・教授  (32644)	

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