

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09492

研究課題名(和文) 脳虚血後肺炎に対する歯髄由来幹細胞治療：肺内免疫に注目し、治療応用の可能性を探る

研究課題名(英文) Dental pulp-derived stem cell therapy for post-stroke pneumonia: Focusing on intrapulmonary immunity and exploring the possibility of therapeutic application.

研究代表者

須田 智 (Suda, Satoshi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00366733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後の感染症、特に肺炎は頻度が高い合併症である。脳梗塞後肺炎は、年齢、脳梗塞の重症度やその他の併存症と独立した転帰不良因子である。本研究では、脳虚血後肺炎モデルを用いて、歯髄由来幹細胞の経静脈的投与により肺内に分布した幹細胞が肺内免疫・肺組織に与える影響と虚血性脳損傷との関連を明らかにすることを目的とした。肺炎により、脳梗塞体積の増大及び神経徴候の増悪を認めた。幹細胞投与により、肺組織における炎症の改善及び脳梗塞後の運動機能の改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞の治療においては、血行再建療法の良好な治療成績が報告されるなど超急性期治療の発展は目覚ましい。しかし、その一方で、高齢で入院時の重症度が高い患者の転帰は不良であり、肺炎を始めとした感染症の合併で症状の増悪、死亡率の上昇、リハビリの遅延、在院日数の延長などを招き、社会的・経済的に大きな問題である。

本研究では、脳卒中後に肺炎を併発することで脳梗塞体積の増大及び神経徴候の増悪を認め、さらに歯髄幹細胞を投与することにより、脳だけでなく肺組織の炎症の改善を認めた。今後、肺は脳梗塞に対する治療標的臓器となりうる可能性が示唆され、脳梗塞および脳梗塞後の肺炎の治療を前進させる一歩になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Post-stroke infection, especially pneumonia, is a frequent complication. Postischemic pneumonia is a poor outcome factor independent of age, severity of stroke and other comorbidities. In this study, we used a model of postischemic pneumonia to determine the effects of transvenous administration of dental pulp-derived stem cells on intrapulmonary immunity and pulmonary tissue and their relationship to ischemic brain injury. Pulmonary inflammation caused an increase in cerebral infarct volume and exacerbation of neurological signs. Stem cell administration improved inflammation in lung tissue and motor function after cerebral infarction.

研究分野：脳卒中

キーワード：肺炎 脳卒中 幹細胞治療 免疫調整

## 1. 研究開始当初の背景

近年の血行再建療法の発展により、脳主幹動脈閉塞患者の転帰は劇的に改善したが、3ヶ月後の mRS0-2 の転帰良好患者は全体の 45%程度であり、半数以上の患者は何らかの介助が必要な状態である。脳梗塞の更なる転帰改善のためには、血行再建に加えて修正可能な転帰不良因子への介入が必要である。

脳梗塞後の感染症は、脳梗塞患者の20～40%に合併する。特に肺炎は、高齢者や脳主幹動脈閉塞症例などの重症例に多く、転帰不良と密接に関連することが報告されている(Suda S et al. J Neurol 2018)。

脳梗塞後の感染症予防や治療は、脳梗塞患者の転帰改善のための治療標的となりうると考えられ、抗菌薬の早期投与や 遮断薬を用いた臨床試験が行われてきたが、有効性を示すエビデンスは構築できていない(右表)。本研究

では、脳梗塞後の肺炎発症のメカニズムの解明と克服に向けた新規の治療法を確立することで、脳梗塞の更なる転帰改善を目指すことを目的とする。

予防的抗菌薬投与の有効性を検討した臨床試験	
文献	アウトカム
Liu L, et al. Sci Rep. 2016	肺炎リスク:有意差なし(オッズ比0.91) 尿路感染リスク:低下(オッズ比0.34) 死亡:有意差なし(オッズ比1.07)
Kalra L, et al. Lancet. 2015	肺炎リスク:有意差なし(オッズ比1.21)
Westendorp WF, et al. Lancet. 2015	肺炎リスク:有意差なし(オッズ比0.80) 尿路感染リスク:低下(オッズ比0.34) 3か月後mRS:有意差なし(オッズ比0.95) 3か月後死亡:有意差なし(オッズ比0.96)
予防的β遮断薬投与の有効性を検討した臨床試験	
文献	アウトカム
Starr JB, et al. Stroke. 2017	感染症:増加(16.4 vs. 10.7%, p = 0.030) 死亡:有意差なし(12.3 vs. 12.7%, p = 0.914)
Maier IL, et al. PLoS One. 2015	肺炎リスク:有意差なし(レート比1.00) 尿路感染リスク:低下(レート比0.65) 30日後死亡:増加(ハザード比1.93)

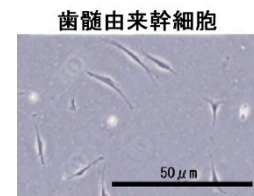
## 2. 研究の目的

本研究は、1) 脳虚血が肺内免疫に与える影響を探求することで脳虚血後肺炎の発症メカニズムを解明する。2)脳血後肺炎モデルを用いて、歯髄由来幹細胞が新規治療となり得るかを検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 脳虚血モデルの作成と気管支肺胞洗浄液および肺組織の解析

SD (Sprague-Dawley)ラットを用いて、90 分間の一過性中大脳動脈閉塞モデルを作成する。再灌流 48 時間後に気管支肺胞洗浄を施行する。細胞学検査およびリンパ球サブポピュレーション解析を行い、上清は、ELISA 法を用いて炎症性サイトカインの測定を行う。肺胞形態や好中球、肺胞マクロファージの浸潤の観察を行うとともに、ELISA 法を用いて、栄養因子の測定を行い、群間比較を行う。



### 2) 脳虚血後肺炎モデルの作成と気管支肺胞洗浄液および肺病理、肺組織の解析

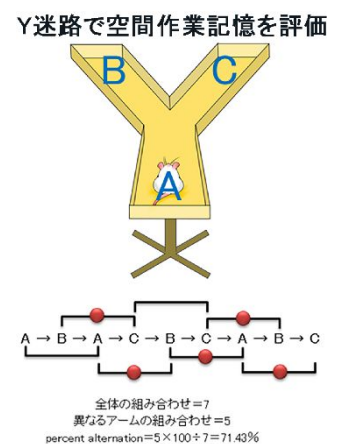
再灌流 24 時間後に、尾静脈から、コントロール群は PBS 治療群は髄由来幹細胞の投与を行う。再灌流 48 時間後に LPS を用いて脳虚血後肺炎モデルを作成する。脳虚血 3、7、28 日後に、前述の方法で気管支肺胞洗浄液および肺病理、肺組織蛋白の解析を行う。

### 2) 経静脈内投与を行った髄由来幹細胞の生体内分布・生存の検討

投与細胞を、あらかじめ蛍光色素 PKH26 で標識しておき、肺・脳・脾臓での経時的集積変化を明らかにする。

### 3) 肺炎が脳梗塞体積および神経徴候に与える影響の解明

肺炎が脳虚血に与える影響および髄由来幹細胞の治療効果を評価するため、梗塞体積を測定する。また、脳行動解析は、Rota-rod を用いて、運動機能を梗塞体積測定と同じスケジュールで評価すると共に、28 日後には Y 迷路を用いて空間作業記憶も評価する(右図)。



#### 4. 研究成果と考察

脳虚血を発症することで、肺内免疫の脆弱化を惹起し、さらに肺炎を起こすことにより、神経徴候の増悪を認めた。静脈内投与した歯髄由来幹細胞は肺にもっとも多く集積を認めた。歯髄由来幹細胞投与により、運動機能および認知機能に対する改善効果だけでなく、肺組織の炎症の軽減を認めた。

本研究結果より、脳虚血後の肺炎は運動機能、認知機能に対して増悪因子に働き、幹細胞投与は、脳虚血だけでなく、肺内免疫調整作用を發揮し、治療効果を發揮したと推察された。脳虚血だけでなく、頭部外傷や脳出血など様々な脳損傷にも応用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nito Chikako, Suda Satoshi, Nitahara-Kasahara Yuko, Okada Takashi, Kimura Kazumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Dental-Pulp Stem Cells as a Therapeutic Strategy for Ischemic Stroke	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 737 ~ 737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10040737	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 Satoshi Suda, Chikako Nito, Shoji Yokobori, Yuki Sakamoto, Masataka Nakajima, Kota Sowa, Hirofumi Obinata, Kazuma Sasaki, Sean I Savitz, Kazumi Kimura	4. 巻 21
2. 論文標題 Recent Advances in Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 6718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186718	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	神尾 孝一郎  (Kamio Koichiro)  (20465305)	日本医科大学・医学部・講師   (32666)	
研究分担者	仁藤 智香子  (Nito Chikako)  (30409172)	日本医科大学・医学部・教授   (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	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	横堀 将司  (Yokobori Shoji)  (70449271)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授     (32666)	

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