

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24314

研究課題名（和文）脳梗塞に対するiPS細胞を用いた再生医療とリハビリテーション介入効果

研究課題名（英文）Therapeutic effects of combined regenerative medicine using iPS cells and rehabilitation for cerebral infarction model

研究代表者

下川 能史（SHIMOGAWA, TAKAFUMI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30849104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳梗塞に対する細胞移植とリハビリテーションの併用療法の効果検証を目的として行った。生後4週マウスの大脳皮質梗塞モデルを作成し、胎仔大脳皮質細胞移植を行った。細胞移植4週間後の脳組織を用いて移植細胞由来の軸索を評価すると、同側の線条体、内包後脚、大脳脚に認められた。また、同側の赤核周囲や対側の大脳皮質にも認められたが、脊髄には認めなかった。運動機能評価として、foot fault test および三次元モーションアナライザーによる四肢運動機能の解析を治療前後で行ったが、統計学的な改善は認めなかった。同検討では、細胞移植にリハビリテーションを加えた群、リハビリテーション単独群の検討は行えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は罹患率の高い疾患で要介護の主要な原因である。脳梗塞後の運動機能障害に対する治療として、リハビリテーションの有効性が示されているが、リハビリテーションのみでは完全回復は望めず、新たな治療アプローチとして再生医療による失われた神経回路の再構築が期待されている。しかし、既存の報告では脳梗塞モデルに対する局所細胞移植の神経回路再構築は限局的である。そのため、他治療との併用療法が期待されており、特にリハビリテーションとの併用が注目されている。脳梗塞に対する細胞移植ならびにリハビリテーションの併用療法の効果を示すことができれば、脳梗塞に対して新規治療アプローチを提案できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the therapeutic effect of combined cell transplantation and rehabilitation in mouse with brain infarction. We transplanted neural cells derived from the frontal cortex of fetal mice to 4-week-old mice with brain infarction. Four weeks after the cell transplantation, graft-derived neurites were observed in the ipsilateral striatum, internal capsule, cerebral peduncle, red nucleus, and contralateral cerebral cortex via corpus callosum, however, not spinal cord. A motor functional analysis using foot fault test and the 3D motion analyzer showed that motor performance was not significantly different between affected side and not affected side. We could not examine about only rehabilitation group and combined cell transplantation and rehabilitation group.

研究分野：脳神経外科学、神経科学、再生医療学

キーワード：脳梗塞 脳損傷 再生医療 細胞移植 リハビリテーション iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞は脳卒中全体の約6割を占めており、中長期的に神経回路の破綻を引き起こす。後遺症として運動機能障害が残る場合が多く、要介護の主要な原因となっている。脳梗塞後の運動機能障害に対する治療として、リハビリテーションの有効性が示されている。リハビリテーションが運動機能回復をもたらすメカニズムとして、神経栄養因子やサイトカインの上昇、神経新生の誘導、シナプス可塑性の強化、代替神経回路形成や脳機能再構成等が報告されている(下川ら、日本基礎理学療法学雑誌、2018)。しかし、リハビリテーションのみでは運動機能の完全回復には至らない。

(2) 脳梗塞によって大脳皮質が障害を受けると、脳室下帯に存在する神経幹細胞が活性化して失われた細胞機能を代替することが示されている(Lindvall et al., J Clin Invest 2010)。しかし成体脳における幹細胞の数は僅かであることから失われた運動機能を回復するまでには至らず、また障害によって生じる炎症性細胞等には内在神経細胞に対して悪影響を及ぼすものも含まれる。そこで近年、内在神経細胞の保護及び神経回路の再構築という観点から、脳梗塞に対する新たな治療アプローチとして再生医療、特に細胞移植(iPS細胞由来神経細胞移植)による失われた神経回路の再構築が期待されている(Hermanto, Takahashi et al., J Neurosci Res. 2019)。脳梗塞モデルに対するiPS細胞由来神経細胞を用いた細胞移植実験からは、失われた神経回路を再構築することが明らかにされているが、移植細胞由来の軸索伸展は限局的であり、運動機能回復も十分ではない(Tornero et al., Brain 2013)。

(3) 細胞移植治療効果を強化する方法として、細胞移植とリハビリテーションの併用療法が注目されている(下川ら、日本基礎理学療法学雑誌、2018; Shimogawa et al. NPJ Regen Med. 2019)。申請者はこれまでに、外傷性脳損傷モデルラットに対して、マウス胎仔大脳皮質組織を用いた細胞移植治療と運動トレーニングの併用療法が、細胞移植単独治療群に比べて、移植細胞由来の軸索伸展に寄与することを報告した(Shimogawa et al. NPJ Regen Med. 2019)。さらに、併用療法が、細胞移植単独治療群に比べて、運動機能改善を促進し得ることを報告した。以上から、外傷性脳損傷に対して細胞移植治療と運動トレーニングの併用療法は、失われた神経回路の再構築の強化と運動機能回復に期待できるが、本治療が脳梗塞後にも同様に有効であるかどうかは解明されていない。脳梗塞後の運動機能障害克服のために、脳梗塞に対する本併用療法の効果の検証が必要である。

## 2. 研究の目的

(1) 脳梗塞モデルマウスに対して、細胞移植治療(iPS細胞由来大脳皮質オルガノイド移植)と運動トレーニングの併用療法を行い、脳梗塞に対する細胞移植治療ならびにリハビリテーションの効果を検証する。

(2) 神経回路の再構築によってもたらされる運動機能変化のメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳梗塞モデルの作成

生後4週マウス(C57BL/6NCrSlc)にイソフルレン(1.5%)および酸素と窒素(50%:50%)を用いて麻酔をかけ、頭部を水平に保つように、定位的細胞移植装置に固定する。ローズベンガルの腹腔内投与後、頭蓋骨上5mmの高さから、前肢運動野の領域にレーザー照射(550~650nm)を15分を行い、血栓性大脳皮質梗塞を作成する。ローズベンガル投与量および、投与から照射までの時間について条件検討を行う。

## (2) 細胞移植

申請者による以前の報告 (Shimogawa et al. NPJ Regen Med. 2019) と同様の方法で細胞移植を行う。E14.5 マウス大脳皮質組織を採取する。脳梗塞作成 1 週後の段階で、前肢運動野梗塞巣の前方に、E14.5 マウスより採取した大脳皮質組織を移植する。マウスは脳梗塞作成時と同じ手技で麻酔および頭部を固定し、ドリルを用いて梗塞巣の前方に小さな骨削除を行う。マウス大脳皮質組織は 22 ゲージの針を用いて吸い上げ、以下の座標で損傷部位前方の前頭葉に、1 か所あたり 1.0  $\mu$ l、計 4 か所移植する (Bregma から前方に 2.0mm、正中から外側に 1.0mm と 3.0 mm、深さ 0.5mm と 1.0mm)。vehicle 移植群には、同様の手技で HBSS を投与した。

## (3) リハビリテーション

申請者による以前の報告 (Shimogawa et al. NPJ Regen Med. 2019) と同様の方法で、トレッドミルトレーニングを用いたリハビリテーションを行う。脳梗塞作成 2 日後から、1 日 10 分、5 日間、10 cm/sec のスピード負荷で、傾斜 0 度で TMT を開始する。走行スピードは移植前日まで 1 日 1cm/sec づつ上げていく。細胞移植翌日から 15 cm/sec のスピード負荷で 1 日 40 分 TMT を行う。

## (4) 移植細胞由来軸索伸長の評価

細胞移植 28 日後に、マウスを径心臓的に 4%PFA を用いて灌流し、脳と脊髄組織を採取する。組織を固定後スライスする (脳冠状断 50  $\mu$ m スライス、頸髄 C1 レベル以下の脊髄冠状断 30  $\mu$ m スライス)。切片の免疫染色は以下のように行う。0.3% Triton X-100 で透過処理し、2% skim milk を用いてブロッキングを行う。一次抗体は anti-GFP (rabbit 1:1000)、二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:400) を用いる。最後に 4,6-dimamidino-2-phenylindole (DAPI) での染色を行う。免疫染色陽性細胞と陽性軸索は、蛍光顕微鏡 (BZ-9000) や共焦点顕微鏡 (LSM700, ZEISS) を用いて観察する。

## (5) 運動機能評価

申請者による以前の報告 (Shimogawa et al. NPJ Regen Med. 2019) と同様の方法で、運動機能評価を行う。Foot fault test は、マウスを網 (1.5 cm  $\times$  1.5 cm の網目状) の端に置き、ラットが網を横切る様子を 2 分間ビデオで撮影する。麻痺側の前肢および後肢が網から滑り落ちた回数を記録し、全歩数における失敗した歩数の割合を計算する。評価は脳梗塞作成前、細胞移植前、細胞移植 1 週間後、2 週間後、4 週間後に行う。観察者は治療介入について情報を得ていない状態で、撮影したビデオを元に行動解析を行う。また、三次元モーションアナライザーによる四肢運動機能の解析を脳梗塞作成前、細胞移植 1 週間後、2 週間後に行う。マウスにイソフルレンおよび酸素と窒素を用いて麻酔をかけ、両側前肢の肩、肘、手首に直径 3mm 大のマーカーボールを装着し、トレッドミルマシン上を走行させる。その様子を 1 分間ビデオで撮影し、その中で 10 歩行分をランダムに抽出し、三次元モーションアナライザーで麻痺側と非麻痺側の動作解析を行う。

## (6) iPS 細胞由来大脳皮質オルガノイドの作成

Sakaguchi et al., Stem Cell Reports (2019) のプロトコールに従い、多能性幹細胞由来の大脳オルガノイドを作成を行う。

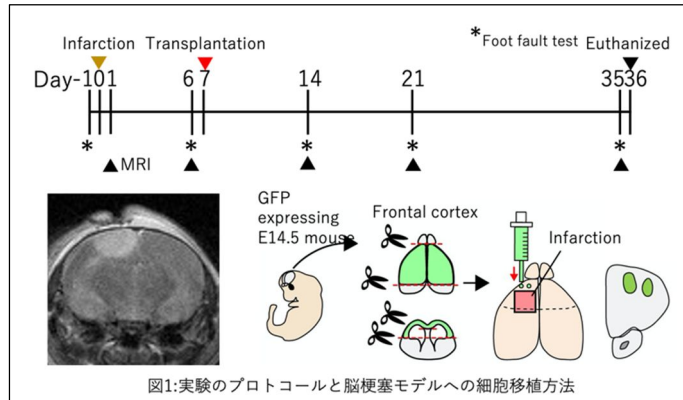
## (7) 統計学的検討

統計解析ソフトは PRISM を用いた。行動解析は two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test を用いて行った。統計学的差は p 値が 0.05 未満の場合を有意と判断した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。

#### 4. 研究成果

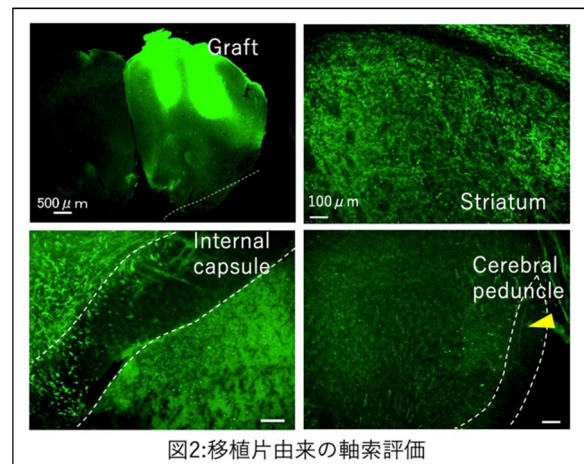
##### (1) 脳梗塞モデル作成の為の条件検討

症候性脳梗塞モデルの確立にあたり、まずローズベンガル投与量を 0.03mg/kg とし、投与から照射までの時間を 5 分、10 分、15 分、20 分に分けて検討した。脳梗塞の有無は MRI を用いて評価した。麻痺症状の有無はフットフォールテストを用いて評価した。結果として、投与から照射までの時間を 5 分とした群のみで脳梗塞を確認した。つづいて、照射までの時間を 5 分として、投与量を 0.03mg/kg、0.06mg/kg、0.09mg/kg、0.12mg/kg の 4 群に分けて検討した。0.09mg/kg で最も明瞭な脳梗塞を確認した。以上から、ローズベンガル 0.09mg/kg を腹腔内投与し、5 分経過したのちにレーザー照射 (550 ~ 650 nm) を 15 分行うことで良好な症候性脳梗塞モデルを作成できることを確認した。上記プロトコルを用いて作成した脳梗塞モデルに対して細胞移植実験を行った (図 1)。



##### (2) 移植細胞由来軸索伸長の評価

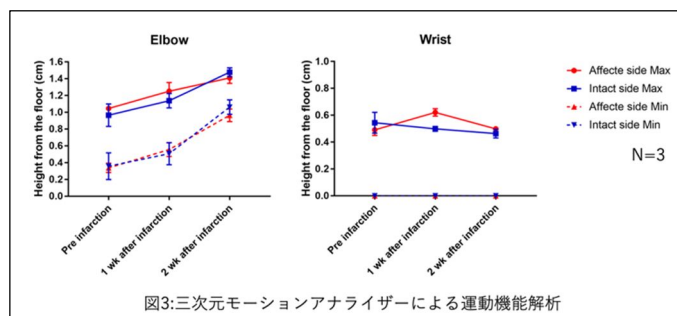
細胞移植4週間後に脳と脊髄組織を採取し、免疫染色を行った (n=3)。全例で移植細胞由来の軸索を、同側の線条体、内包後脚、大脳脚レベルに認めた。全例で同側の赤核周囲に認め、また脳梁を介して対側の大脳皮質にも認めた (図2)。全例脊髄レベルには認めなかった。本検討では、細胞移植にリハビリテーションを加えた群の検討は行えなかった。



##### (3) 運動機能評価

Foot fault testによる前肢・後肢の運動麻痺の推移を測定した

(n=3)。脳梗塞作成前と比べて、細胞移植前には前肢の歩行成功率は低下していた。細胞移植1週後、2週後、4週間後と経時的に前肢の歩行成功率の改善傾向を示したが、細胞移植群と対照群間に統計学的な差は認めなかった。三次元モーションアナライザーによる解析では、脳梗塞作成前、細胞移植1週後、2週後において、麻痺側・非麻痺側間に統計学的な差を認めなかった (図3)。本検討では、リハビリテーション単独群、細胞移植にリハビリテーションを加えた群の検討は行えなかった。



多能性幹細胞由来大脳皮質オルガノイドの作成には至らなかった。

< 引用文献 >

1. Hermanto Y. et al. Xeno-free culture for generation of forebrain oligodendrocyte precursor cells from human pluripotent stem cells. *J Neurosci Res.* 97;828-845 (2019).
2. Lindvall O. and Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *J Clin Invest.*120:29-40 (2010)
3. Sakaguchi H. et al. Self-Organized Synchronous Calcium Transients in a Cultured Human Neural Network Derived from Cerebral Organoids. *Stem Cell Reports.* 13;458-473 (2019)
4. Shimogawa, T., Sakaguchi, H., Kikuchi, T. et al. Therapeutic effects of combined cell transplantation and locomotor training in rats with brain injury. *NPJ Regen Med.* 5;4:13 (2019).
5. 下川能史、取越貞治、高橋淳: 中枢神経疾患における細胞移植とリハビリテーション. *日本基礎理学療法学雑誌* 21:23-32, 2018
6. Tornero, D. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery. *Brain.* 136; 3561-3577 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下川能史、坂口秀哉、菊地哲広、土持諒輔、佐野徳隆、取越貞治、飯原弘二、高橋淳
2. 発表標題 脳損傷モデルラットに対する細胞移植治療と運動トレーニングの併用効果
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下川能史、坂口秀哉、菊地哲広、土持諒輔、佐野徳隆、取越貞治、飯原弘二、高橋淳
2. 発表標題 脳損傷モデルラットに対する細胞移植治療と運動トレーニングの併用効果
3. 学会等名 STROKE2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下川能史、坂口秀哉、菊地哲広、土持諒輔、佐野徳隆、取越貞治、飯原弘二、高橋淳
2. 発表標題 脳損傷モデルラットに対する細胞移植治療と運動トレーニングの併用効果
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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