

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03787

研究課題名(和文) レドックスナノ粒子と口腔内間葉組織由来神経系細胞による脳梗塞急性期再生医療の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for ischemic stroke using redox nanoparticles and oral mesenchymal tissue-derived neuronal cells

研究代表者

丸島 愛樹 (Marushima, Aiki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40722525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞の細胞移植では、移植細胞が脳虚血病巣で生存することが困難である。この課題を解決するために、レドックスナノ粒子による移植細胞の生存率の改善効果の検証、神経系細胞移植の有効性を評価した。神経系細胞の低酸素耐性能の評価では、レドックスナノ粒子は濃度依存性に細胞の生存率を改善させた。細胞移植による脳梗塞の有効性評価では、レドックスナノ粒子は、移植細胞の生存率を改善させた。神経症状の評価では、DRNP群で神経症状の改善傾向を認めた。これらの成果は、レドックスナノ粒子が脳梗塞病巣への細胞移植の課題を解決できる可能性を示唆しており、新たな脳梗塞に対する再生医療の開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞の細胞移植では、移植細胞が脳虚血病巣で生存することが困難である。本研究で実施した、レドックスナノ粒子による移植細胞の生存率の改善効果の検証、神経系細胞移植の有効性を評価は、いずれも再生医療における細胞移植の課題を解決するものであった。レドックスナノ粒子を取り込んだ細胞は、再生医療に実用化可能な技術であることから、特許出願を行った(PCT/JP2022/39300：レドックスナノ粒子の細胞処理への使用)。また、サル脳主幹動脈閉塞モデルを確立し、レドックスナノ粒子の有効性を確認できたことにより、今後、臨床利用を見据えた新たな神経保護、細胞保護、及び再生医療の研究開発を行うことができる。

研究成果の概要(英文)：In cell transplantation for ischemic stroke, it is difficult for transplanted cells to survive in cerebral ischemic lesion. To solve this problem, the effectiveness of redox nanoparticles in improving the survival of transplanted cells and the efficacy of nervous system cell transplantation were evaluated. In the evaluation of hypoxia tolerance of nervous system cells, redox nanoparticles improved cell viability in a concentration-dependent manner. In an evaluation of the efficacy of cell transplantation in cerebral infarction, redox nanoparticles significantly improved the survival of transplanted cells. In the evaluation of neurological symptoms, a trend towards improvement of neurological symptoms was observed in the RNP group. These results suggested that redox nanoparticles might be able to solve the problem of cell transplantation into cerebral infarction lesions, and the development of new regenerative medicine for cerebral infarction can be expected.

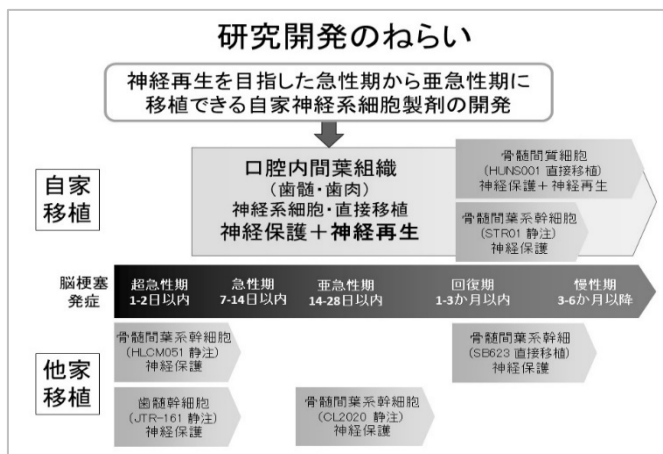
研究分野：脳神経外科

キーワード：歯髄幹細胞 神経系細胞 レドックスナノ粒子 再生医療 細胞保護

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞の再生医療において、冷凍保存可能な他家細胞移植の主な効果は神経保護・免疫調整作用であり、神経再生は困難である。自家細胞移植は神経保護と細胞の生着・分化による神経再生効果を期待できるが(Cui, Ann Neurol. 2019)、細胞製剤作製に6週間以上要し、移植する脳梗塞回復期には病巣の瘢痕形成が始まっているため期待する神経再生を得られない課題がある。研究代表者は、神経堤由来の歯髄・歯肉などの口腔内間葉組織の初代培養細胞から3~7日で神経幹細胞、未熟・成熟神経系細胞を作製する技術を開発した（神経系細胞含有製剤の製造方法：特願2019-91625）。これにより、脳梗塞急性期から亜急性期の自家細胞移植による新たな脳梗塞再生医療の開発が可能である。しかし、同時期の脳梗塞病巣は虚血による低酸素、酸化ストレスと炎症細胞浸潤などにより、移植細胞の生着、分化が困難である。そのため細胞治療に期待される神経再生を目的とした再生医療は実現されていない。



2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞再生医療において最も効果が高い急性期から亜急性期に移植可能で、免疫拒絶反応、感染、腫瘍化、倫理的問題がない自家神経系細胞含有製剤を開発し、その移植技術を確認し、作用機序を解明する。

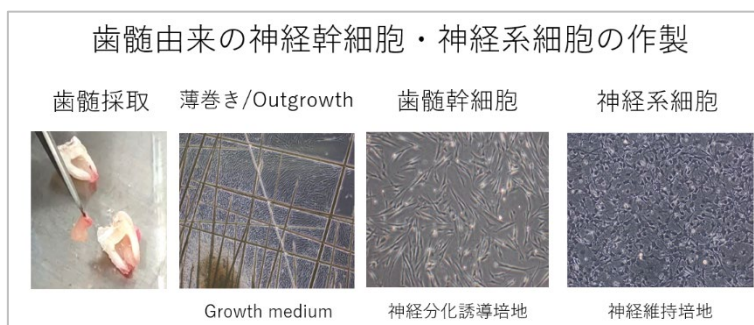
3. 研究の方法

本研究ではこの課題を解決するために、研究開発1：神経系細胞製剤の作製、研究開発2：各神経系細胞製剤の低酸素耐性能の評価とレドックスナノ粒子による改善効果の検証。研究開発3マウス脳梗塞移植実験によるナノ粒子濃度と移植細胞の分化度、細胞数、移植部位の最適化、研究開発4：サル脳梗塞モデルの確立とレドックスナノ粒子による移植環境制御の可能性について探索した。

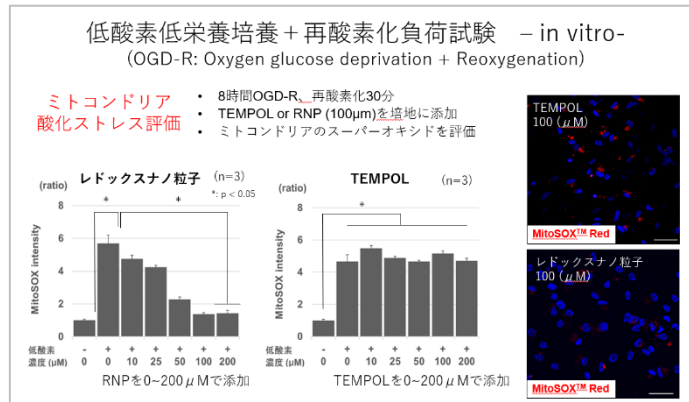
4. 研究成果

ヒト歯髄から歯髄幹細胞を作製し、神経系細胞に分化誘導した。歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞は、神経幹細胞、未熟・成熟神経細胞、アストロサイトなどの中枢神経系細胞マーカー陽性であった。

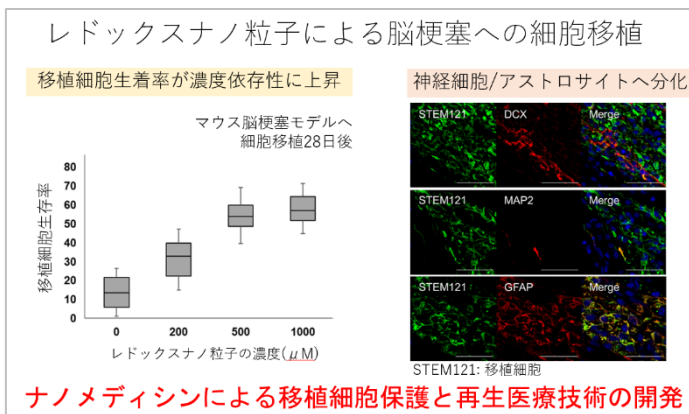
研究開発1では、E、及びNカドヘリン抗体を用いた培養法により、未成熟な神経細胞集団、あるいは成熟した神経細胞集団を作製することができた。



研究開発2では、神経系細胞を低酸素低グルコース負荷(OGD)培養モデルを確立した。神経系細胞へレドックスナノ粒子添加した低酸素培養実験を行い、レドックスナノ粒子の用量反応解析を行ったところ、レドックスナノ粒子は濃度依存性に神経系細胞の生細胞数を増加させ、アポトーシス細胞数を減少させ、神経細胞のミトコンドリアの活性酸素を減少させることを明らかにした。一方、レドックスナノ粒子に使用されている低分子ラジカルTEMPOのみの場合は、有効性を示さなかった。



研究開発3では、レドックスナノ粒子の至適用量を神経幹細胞、神経系細胞と混和して、マウス脳梗塞モデルに定位移植する行った。その結果、レドックスナノ粒子混和神経系細胞群では、神経系細胞単独の移植に比べて有意に移植神経系細胞の生存、生着率を上昇させた。レドックスナノ粒子を用いた細胞移植による脳梗塞再生医療の有効性評価では、免疫不全マウス脳梗塞モデルに神経系細胞をレドックスナノ粒子に混和して脳梗塞病巣に定位的に移植し、経時的な生着細胞数と分化を評価した。コントロール群 (C群)、PBS添加細胞製剤群 (PBS群)、レドックスナノ粒子添加細胞製剤群 (RNP群)に分け、移植7日後と42日後に各細胞の生着・分化、神経症状の評価を行ったところ、RNP群では、有意に移植細胞の生存率が改善した。神経症状の改善効果の検証では、有意差はなかったがDay42日後にRNP群で神経症状の改善傾向を認めた。



研究開発4では、レドックスナノ粒子を用いた大動物の実験では、脳血管内治療技術を用いてサル脳梗塞モデルを確立した。レドックスナノ粒子を脳動脈内投与する技術を確認し、レドックスナノ粒子が脳梗塞病変部で血液脳関門を超えて、神経細胞を保護する可能性を組織学的に確認できた。アップルテスト等による行動評価法を確立した。

これらの研究課題の成果により、レドックスナノ粒子を用いた神経保護や細胞保護、及び再生医療の基礎的技術を確認し、臨床利用を見据えた新たな治療法の研究開発を行うことができた。

特許出願

レドックスナノ粒子の細胞処理への使用

特願 2021-172795 2021/10/22

丸島 愛樹、平田 浩二、長崎 幸夫、松丸 祐司、石川 博、武川 寛樹、アルネラ ムヤギチ、大山 晃弘、豊村 順子、松村 英明、平山 暁

【特許出願人】 国立大学法人 筑波大学、筑波技術大学

PCT/JP2022/39300 2022/10/21

丸島 愛樹、平田 浩二、長崎 幸夫、松丸 祐司、石川 博、武川 寛樹、アルネラ ムヤギチ、大山 晃弘、豊村 順子、松村 英明、平山 暁、文 湊湖

【特許出願人】 CrestecBio 株式会社

学術論文

Koji Hirata, Aiki Marushima, Yukio Nagasaki, Hiroshi Ishikawa, Hideaki Matsumura,

Arnela Mujagić, Aki Hirayama Junko Toyomura, Akihiro Ohyama, Shohei Takaoka, Hiroki Bukawa, Akira Matsumura, Eiichi Ishikawa, Yuji Matsumaru. Efficacy of redox nanoparticles for improving survival of transplanted cells in a mouse model of ischaemic stroke, Human Cell 2023 Accepted

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 KOIDE Tomoki, ITO Yoshiro, HINO Tenyu, SATO Masayuki, MARUSHIMA Aiki, HAYAKAWA Mikito, MATSUMARU Yuji, ISHIKAWA Eiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Carotid Artery Stenting Using the Snake Hunt Technique for Highly Tortuous Carotid Artery Stenosis: A Technical Note	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 387 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmccrj.tn.2020-0343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 WATANABE Noriyuki, MARUSHIMA Aiki, HINO Tenyu, MINAMIMOTO Shinya, SATO Masayuki, ITO Yoshiro, HAYAKAWA Mikito, SAKAMOTO Noriaki, ISHIKAWA Eiichi, MATSUMURA Akira, MATSUMARU Yuji	4. 巻 9
2. 論文標題 A Ruptured Aneurysm in Aplanic or Twig-like Middle Cerebral Artery: A Case Report with Histological Investigation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 7 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/jns-nmc.2021-0276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hosoo Hisayuki, Ishikawa Eiichi, Tsuruta Wataro, Sato Masayuki, Ito Yoshiro, Hayakawa Mikito, Takigawa Tomoji, Marushima Aiki, Suzuki Kensuke, Hyodo Akio, Matsumaru Yuji	4. 巻 157
2. 論文標題 Antiplatelet Therapy and Periprocedural Risk Factor Analysis for Pipeline Embolization Device Treatment of Unruptured Internal Carotid Artery Aneurysms: A Retrospective, Multicenter Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e102 ~ e110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2021.09.109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura Hideaki, Marushima Aiki, Ishikawa Hiroshi, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Watanabe Miho, Takaoka Shohei, Bukawa Hiroki, Matsumura Akira, Matsumaru Yuji, Ishikawa Eiichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Induced Neural Cells from Human Dental Pulp Ameliorate Functional Recovery in a Murine Model of Cerebral Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 595 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-021-10223-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mujagic Arnela, Marushima Aiki, Nagasaki Yukio, Hosoo Hisayuki, Hirayama Aki, Puentes Sandra, Takahashi Toshihide, Tsurushima Hideo, Suzuki Kensuke, Matsui Hirofumi, Ishikawa Eiichi, Matsumaru Yuji, Matsumura Akira	4. 巻 1743
2. 論文標題 Antioxidant nanomedicine with cytoplasmic distribution in neuronal cells shows superior neurovascular protection properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146922 ~ 146922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.146922	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Toshihide, Marushima Aiki, Nagasaki Yukio, Hirayama Aki, Muroi Ai, Puentes Sandra, Mujagic Arnela, Ishikawa Eiichi, Matsumura Akira	4. 巻 88
2. 論文標題 Novel neuroprotection using antioxidant nanoparticles in a mouse model of head trauma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Trauma and Acute Care Surgery	6. 最初と最後の頁 677 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TA.0000000000002617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaoka Shohei, Uchida Fumihiko, Ishikawa Hiroshi, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Watanabe Miho, Matsumura Hideaki, Marushima Aiki, Iizumi Seiichiro, Fukuzawa Satoshi, Ishibashi-Kanno Naomi, Yamagata Kenji, Yanagawa Toru, Matsumaru Yuji, Bukawa Hiroki	4. 巻 35
2. 論文標題 Transplanted neural lineage cells derived from dental pulp stem cells promote peripheral nerve regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 462 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00634-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koji Hirata, Aiki Marushima, Yukio Nagasaki, Hiroshi Ishikawa, Hideaki Matsumura, Arnela Mujagic, Aki Hirayama Junko Toyomura, Akihiro Ohyama, Shohei Takaoka, Hiroki Bukawa, Akira Matsumura, Eiichi Ishikawa, Yuji Matsumaru	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy of redox nanoparticles for improving survival of transplanted cells in a mouse model of ischaemic stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸島愛樹、長崎幸夫、Arnela Mujagic、細尾久幸、平山暁、松井裕史、秋本大輔、渡邊真哉、石川栄一、松丸祐司、松村明
2. 発表標題 レドックスナノ粒子による新たな神経保護療法の実用化
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸島愛樹、松村英明、石川博、豊村順子、大山晃弘、渡邊美穂、高岡昇平、武川寛樹、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 ヒト歯髄由来分化誘導神経系細胞による虚血性脳卒中に対する再生医療の研究開発
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸島愛樹、松村英明、石川博、豊村順子、大山晃弘、渡邊美穂、高岡昇平、武川寛樹、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 ヒト歯髄由来分化誘導神経系細胞による脳梗塞に対する細胞治療
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸島愛樹、高橋利英、長崎幸夫、室井愛、Sandra Puentes、Arnela Mujagic、松村明
2. 発表標題 外傷性脳損傷に対するレドックスナノ粒子の脳保護効果
3. 学会等名 第34回日本酸化ストレス学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Arnela Mujagic, Aiki Marushima, Yukio Nagasaki, Hisayuki Hosoo, Aki Hirayama, Sandra Puentes, Toshihide Takahashi Hideo Tsurushima, Kensuke Suzuki, Hirofumi Matsui, Eiichi Ishikawa, Yuji Matsumaru, Akira Matsumura.
2. 発表標題	Antioxidant Nanomedicine with Cytoplasmic Distribution in Neuronal Cells Shows Superior Neurovascular Protection Properties for Ischemic Stroke in Mice
3. 学会等名	第34回日本酸化ストレス学会関東支部
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	丸島愛樹, 長崎幸夫, Arnela Mujagic, 秋本大輔, 松村英明, 渡邊真哉, 平田浩二, 後藤正幸, Sandra Puentes, 細尾久幸, 平山暁, 鈴木謙介, 石川栄一, 松村明, 松丸祐司,
2. 発表標題	脳梗塞急性期血栓回収療法におけるレドックスナノ粒子による脳保護療法の開発
3. 学会等名	第63回脳循環代謝学会2020.11.13 横浜, 学会認定シンポジウム(招待講演)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	丸島愛樹, 石川栄一, 井上貴昭, 松丸祐司
2. 発表標題	脳梗塞に対する新規治療の開発 血栓回収療法時代のアンメットメディカルニーズと医薬品開発戦略
3. 学会等名	第63回脳循環代謝学会2020.11.13 横浜, JSNETシンポジウム(招待講演)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	丸島愛樹, 長崎幸夫, Arnela Mujagic, 細尾久幸, 平山暁, 松井裕史, Sandra Puentes, 鈴木謙介, 石川栄一, 松丸祐司, 松村明
2. 発表標題	レドックスナノ粒子による虚血性脳卒中に対する脳保護療法の開発
3. 学会等名	第73回日本酸化ストレス学会, 2020.10.6, 米子(招待講演)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 丸島愛樹、松村英明、早川幹人、細尾久幸、池田剛、佐藤允之、伊藤嘉朗、滝川知司、中村和弘、鶴田和太郎、加藤徳之、上村和也、石川栄一、鈴木謙介、小松洋治、松丸祐司
2. 発表標題 急性主幹動脈閉塞に対する血栓回収療法後に生じる頭蓋内出血の予測因子と転帰の解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術集会, 2020.10.15-17 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸島愛樹、松村英明、佐藤允之、早川幹人、池田剛、伊藤嘉朗、滝川知司、鶴田和太郎、加藤徳之、鈴木謙介、小松洋治、松丸祐司
2. 発表標題 低ASPECTS症例における経皮経管的脳血栓回収療法の転帰不良因子の検討
3. 学会等名 第36回日本脳神経血管内治療学会学術集会, 2020.11.19-21 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸島愛樹、長崎幸夫、Arnela Mujagic、平田浩二、渡邊真哉、松村英明、細尾久幸、平山暁、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 ナノメディスンによる虚血性脳卒中に対する神経保護療法の開発
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸島愛樹、長崎幸夫、Arnela Mujagic、渡邊真哉、細尾久幸、平山暁、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 重症虚血性脳卒中中のレドックス反応を制御する神経保護薬の開発
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸島愛樹
2. 発表標題 疾患が細胞環境に与える変化と影響 - 細胞保護、神経再生、機能再生への挑戦 -
3. 学会等名 第40回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸島愛樹, 長崎幸夫, Arnela Mujagic, 渡邊真哉, 細尾久幸, 秋本大輔, 平山暁, 石川栄一, 松丸祐司
2. 発表標題 虚血性脳卒中に対する神経保護薬の研究開発と事業化構想
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 レドックスナノ粒子の細胞処理への使用	発明者 丸島愛樹、平田浩二、長崎幸夫、松丸祐司、石川博、武川	権利者 筑波大学、筑波技術大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-172795	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 レドックスナノ粒子の細胞処理への使用	発明者 丸島愛樹、平田浩二、長崎幸夫、松丸祐司、石川博、他6名	権利者 CrestecBio株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/39300	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	平山 暁 (Hirayama Aki) (20323298)	筑波技術大学・保健科学部・教授 (12103)	

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	鈴木 謙介 (Suzuki Kensuke) (20400674)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	石川 博 (Ishikawa Hiroshi) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	
研究分担者	揚山 直英 (Ageyama Naohide) (50399458)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター・主任研究員 (84420)	
研究分担者	松丸 祐司 (Matsumaru Yuji) (70323300)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	池田 豊 (Ikeda Yutaka) (70425734)	筑波大学・数理物質系・助教 (12102)	
研究分担者	関 禎子 (Seki Teiko) (90773309)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・先端材料解析研究拠点・NIMS特別研究員 (82108)	
研究分担者	赤池 敏宏 (Akaike Toshihiro) (30101207)	公益財団法人国際科学振興財団・その他部局等・主席研究員 (72101)	

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