

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16485

研究課題名（和文）保護的末梢血単核球を用いた脳梗塞治療法の機序の解明

研究課題名（英文）underlying mechanisms of cell therapy using tissue protective-peripheral blood mononuclear cells against ischemic stroke

研究代表者

畠山 公大（Hatakeyama, Masahiro）

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：20843618

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）：脳虚血モデルラットに、低酸素低糖刺激をした末梢血単核球（OGD-PBMC）を投与すると、投与21日後にラット脳内のミクログリアでのVEGF発現が、対照群に比し有意に増加していることを明らかにした。神経細胞や血管内皮細胞ではこの差は認めなかった。TGF- β についても同様に、OGD-PBMC投与群でミクログリアでの発現が増加していることを明らかにした。さらに、OGD-PBMCは虚血再灌流後低酸素領域に移行し、治療効果を発揮することを、組織学的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OGD-PBMCを用いた細胞療法は、従来の細胞療法に比し、安全かつ低コストな脳梗塞治療を実現しうるものと期待できる。現在、当研究室では同技術の臨床応用を目指した研究を進めている。本研究では、同技術の作用機序の一部を明らかにすることにより、臨床応用実現に一步近づくことができたと考える。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that the administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) preconditioned by oxygen-glucose deprivation (OGD) to rats with a cerebral ischemia model significantly increased VEGF expression in microglia within the rat brain at 21 days post-administration compared to the control group. This difference was not observed in neurons or vascular endothelial cells. Similarly, we found that TGF- β expression in microglia was increased in the OGD-PBMC administered group.

Furthermore, histological analysis revealed that OGD-PBMCs migrate to hypoxic regions after ischemia-reperfusion and exert therapeutic effects.

研究分野：神経科学

キーワード：再生医療 細胞療法 脳虚血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は 65 歳以上の要介護の原因疾患の 17.2%と最多であり、重度の後遺症が生じることから、脳梗塞後遺症の機能回復療法の開発が望まれている。

脳梗塞後遺症に対し、骨髄由来の細胞を用いた細胞移植療法の有効性が報告されている。しかし、脳梗塞の再発予防として、抗血栓療法が実施される患者に対し、骨髄穿刺を実施して細胞を回収することは、安全面での懸念が生じる。また、取得できる細胞数が少なく、有効な細胞数に増やすため、専用の細胞調整センターで、数週間の培養期間が必要である。また、ES 細胞を用いた細胞療法は倫理面での問題、iPS 細胞や遺伝子組み換え技術を用いた細胞療法は癌化の懸念もあり、細胞療法が一般に普及するためには、簡便・安全で、有効な数を容易に準備できる自己由来の細胞を用いた細胞療法が望ましい。

申請者らは、これまでミクログリアに低酸素低糖 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 刺激を加えることにより、ミクログリアが保護的な極性になることを報告した。また OGD 刺激をしたミクログリアを脳梗塞モデルラットに投与することにより、脳梗塞後遺症が改善することを報告した (Kanazawa, Hatakeyama et al. Sci Rep 2017)。

しかし、ミクログリアはヒト成体から分離することが困難である。そこで、申請者らは同技術のさらなる臨床応用を目指して、より簡便・安全に取得できる細胞として末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) に着目した。単球・マクロファージなどを含む PBMC はミクログリア類似の性質を持ち、脳梗塞後の病態に関与することが知られている。

申請者らはこれまで、PBMC に OGD 刺激を加えることにより、PBMC が保護的極性に変化し、血管内皮増殖因子 (VEGF) などの組織保護因子を分泌すること、OGD 刺激を加えた PBMC (OGD-PBMC) を脳梗塞 7 日後のラットに投与すると、投与 3 日後の時点で PBMC が脳内に移行していること、OGD-PBMC 投与 21 日後のラットの脳内で、VEGF の発現が亢進すること、OGD-PBMC 投与 21 日後のラットの脳内で軸索伸展、血管新生が亢進すること、

OGD-PBMC を投与したラットで脳梗塞後遺症が改善することを示した (Hatakeyama et al. Sci Rep, 2019)。

その一方で、実際に投与した PBMC は、機能改善が認められた脳梗塞 28 日後 (投与 21 日後) の時点で、脳内から消失していることを確認している。すなわち、OGD-PBMC は何らかのパラクライン作用により周囲の組織を保護的に変化させた後、自身は組織から排除されたと予想されるが、その詳細は未解明である。

2. 研究の目的

申請者らの先行研究では、OGD-PBMC 投与 21 日後にラットの脳内で発現が亢進していた VEGF が、どのような細胞から分泌されているのか、また投与した OGD-PBMC は、具体的に脳のどの部位に作用するのか、不明であった。本研究では以上の 2 点を明らかにし、本技術の作用機序をより詳細に解明することにより、本技術の基礎研究から臨床応用までの一貫した研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

ラットの中大脳動脈に塞栓系を挿入し、一過性に虚血を誘導する局所脳梗塞モデルを作成する。ラット及びヒトの末梢血から、フィコールを用いて PBMC を遠心分離し、OGD 刺激を加えたのち、脳梗塞 7 日後のラットに経動脈的に投与する。対照として、PBS を投与した群を用いる。

本モデルを用いて以下の検討を行う。

PBMC 投与後の脳における組織修復因子発現の局在の探索

PBMC 投与 3 日後、および 21 日後にラットを安楽死させパラフィン標本を作成する。同標本を用いて、VEGF、トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β) などの組織修復因子と細胞種特異的マーカーとの二重免疫染色を行う。二光子顕微鏡で観察を行い、組織修復因子を発現している細胞種を同定し、その時間的・空間的变化を明らかにする。

PBMC 投与後の脳における PBMC 作用部位の検討

申請者らはこれまで、虚血後の脳における低酸素領域の存在が、血管新生・神経再生に重要であると考えていた (Hatakeyama et al. Neural Regen Res. 2019)。そこで、OGD-PBMC による細胞療法はこの低酸素領域に作用する、という仮説を立てた。

これを検証するために、ヒト PBMC 投与 3 日後、および 21 日後のラット、および対照群に低酸素マーカーであるピモニダゾールを投与し標本を作成する。抗ピモニダゾール抗体と、ヒト細胞質

特異抗体（STEM121）を用いた二重染色を行い、低酸素領域と投与細胞との位置関係を明らかにする。また、ピモニダゾール陽性細胞数を測定し、OGD-PBMC 投与が低酸素状態に影響するか検討する。

4．研究成果

VEGF と TMEM119（ミクログリア特異抗体）に対する二重染色において、VEGF・TMEM119 共陽性の細胞は、OGD-PBMC 投与群において対照群に比し、有意に増加していた。VEGF と MAP2（神経細胞マーカー）、VEGF と von Willbrand 因子（血管内皮マーカー）の二重染色においては、共陽性細胞数は、2 群間で差はなかった。

TGF- β と TMEM119 についても同様に二重染色を行い、TGF- β ・TMEM119 共陽性の細胞は、OGD-PBMC 投与群において対照群に比し、有意に増加していた。

以上から、OGD-PBMC 投与により、ミクログリアからの VEGF、TGF- β 発現が増加していることが確認できた。

以上の内容は、Otsu, Hatakeyama, et al. Neurotherapeutics. 2023 において報告した。

OGD-PBMC 投与 3 日後の標本において、STEM121 陽性細胞はいずれも、ピモニダゾール陽性領域（低酸素領域）に移行していた。OGD-PBMC 投与 21 日後の標本において、STEM121 陽性細胞は認めなかった。

OGD-PBMC 投与 21 日後の標本において、虚血中心部でのピモニダゾール陽性細胞数は、対照群に比し、有意に減少していた。虚血辺縁部においては、二群間でピモニダゾール陽性細胞数に差はなかった。

以上から、OGD-PBMC は虚血後低酸素領域に移行し、虚血状態の細胞を減少させると考えた。

以上の内容は、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Otsu Yutaka, Hatakeyama Masahiro, Kanayama Takeshi, Akiyama Natsuki, Ninomiya Itaru, Omae Kaoru, Kato Taisuke, Onodera Osamu, Fukushima Masanori, Shimohata Takayoshi, Kanazawa Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 Oxygen?Glucose Deprived Peripheral Blood Mononuclear Cells Protect Against Ischemic Stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1369 ~ 1387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13311-023-01398-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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金山武史, 畠山公大, 大津裕, 秋山 夏葵, 二宮格, 小野寺理, 下畑享良, 金澤雅人
2. 発表標題 脳梗塞に対する低酸素低糖刺激末梢血単核球投与による脳内変化
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

1. 発表者名 Masahiro Hatakeyama, Yutaka Otsu, Natsuki Akiyama, Takeshi Kanayama, Itaru Ninomiya, Osamu Onodera, Takayoshi Shimohata, Masato Kanazawa
2. 発表標題 Peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation cause microglial phenotype conversion by secretome after cerebral ischemia.
3. 学会等名 11th Japan-Korea Joint Stroke Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金山武史, 畠山公大, 大津裕, 秋山夏葵, 二宮格, 小野寺理, 下畑享良, 金澤雅人
2. 発表標題 低酸素低糖刺激末梢血単核球を用いた細胞療法は虚血再灌流後低酸素領域を治療ターゲットとする
3. 学会等名 第66回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金山武史, 畠山公大, 大津裕, 秋山夏葵, 二宮格, 小野寺理, 下畑享良, 金澤雅人
2. 発表標題 低酸素低糖刺激末梢血単核球を用いた細胞療法は虚血再灌流後低酸素領域を治療ターゲットとする
3. 学会等名 第49回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2024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