

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 29日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650143

研究課題名（和文） リハ実施は移植神経幹細胞の生着率・分化に影響し、脳卒中後の麻痺回復を促進するか

研究課題名（英文） Dose the stem cell transplantation promote motor recovery after a brain lesion induced by photochemically initiated thrombosis?

研究代表者

安保雅博（ABO MASAHIRO）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：00266587

研究成果の概要（和文）：

ローズベンガル血栓性梗塞による脳卒中モデルを用いて運動麻痺の回復を検討している。ES細胞から分化誘導させた神経幹細胞を移植し、移植後の麻痺回復に及ぼす影響とグリア細胞の機能連携を検討し、脳卒中後の麻痺回復を促進するかの課題を考えた。また、脂肪組織由来間葉系幹細胞をモデル作成後1日後および3日後に大腿静脈より投与し、麻痺の回復スピードの変化をコントロール群と比較し、さらにPIT作成後9日目に脳を取り出し、脳切片を蛍光顕微鏡での観察をおこなった。この2つの手法とも、麻痺の回復を促進させることはなく、脳への取り込みも認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

We selected the rat model of a brain lesion induced by photochemically initiated thrombosis (PIT) through platelet aggregation. The technique involved in this model is simple enough to design the brain lesion as focal and uniform, and the hemiparesis of the hindlimb, induced by injury to the unilateral motor cortex, recovers completely by the 10th day with few individual differences after operation. The purpose of this study was to examine whether using the stem cell transplantation or the mesenchymal stem cell transplantation promotes motor recovery after brain damage in this PIT model. After recovery of left hindlimb function caused by a right sensorimotor cortex lesion, a lesion was induced photochemically in the left sensorimotor cortex as a second PIT and the beam-walking score was recorded for right hindlimb function. As a result, these two methods were not able to promote motor recovery after brain damage in this PIT model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	0	1,900,000
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	180,000	3,280,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：脳卒中、ES細胞、アストロサイト、機能回復、神経幹細胞移植、脂肪組織由来間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ローズベンガル血栓性梗塞による脳卒中モデルを用いて運動麻痺の回復を検討している。このモデルでは、感覚運動皮質に均一な梗塞巣が作成でき、beam walking score による麻痺の出現程度や回復も個体間でバラツキが極めて少ない。麻痺の回復は梗塞作成2日後から認められ、約10日で回復し、回復には損傷対側皮質の代償機能も関与しているが、とりわけ損傷側周囲皮質の代償機能の発達が重要であることをf-MRIを用いた研究から明らかにした。次に、回復初期(梗塞作成24時間後と72時間後)の損傷側周囲皮質並びに対側皮質において遺伝子発現を網羅的に解析した結果、両側の皮質においてIGFやFGFなどの神経増殖因子やグリシン受容体遺伝子の過剰発現を認めた。グリシン受容体遺伝子の過剰発現が麻痺の回復にいかなる影響を持つのかを解明するために、梗塞作成後5分以内にグリシン受容体拮抗薬を側脳室に投与したところ、麻痺の早期回復が促進された。機能代償皮質領域におけるプロテオーム解析の結果では、神経線維の細胞骨格タンパク質、細胞接着因子、シナプスの可塑的变化に関与するタンパク質、アストロサイト関連タンパク質などの発現が著明に変化することを観察した。これまでの一連の研究結果から、グリア細胞とニューロンの機能連携による神経回路の再構築が麻痺回復に寄与していると推察される(Abo et al; Eur Neurol. 2006, Neurosignals. 2004, 2006-2007., Brain Inj 2003, 2004, Neuroreport. 2001)。

2. 研究の目的

脳卒中モデルラットに対してマウスES細胞から分化誘導させた神経幹細胞を移植し、移植時期とリハビリテーション実施の影響に焦点を当て、生着率と麻痺回復の関係について検討することを第一目的とする。麻痺回復に必須な神経回路再構築は、障害されていない神経細胞や幹細胞由来の神経細胞によって生じるが、そこには神経細胞自身の機能以外にグリア細胞による環境整備が重要な役割を担っているという仮説を立てている。

脳損傷により特異的な神経機能が障害を受ける。一部の機能回復を認める症例は多いが、障害された機能が完治することは稀である。障害された機能の回復には、障害されていない神経細胞や内在性幹細胞から分化した神経細胞による機能補償が寄与していると考えられる。しかしながら、内在性幹細胞の数や分化能力は限られていることから、後

者の機能回復への貢献度は必ずしも高くはないと考えられる。近年の再生医療に関する研究の進歩から、障害された機能の回復に対して細胞移植の有効性が実証されている。しかし、生着率や機能回復の程度も十分でないことから、移植条件や移植後のリハビリテーションに関する検討が必要であると思われる本研究では、脳損傷後の麻痺回復に対する新たな治療法とリハビリテーションの重要性を示唆する研究成果が期待される。①に示す、ES細胞から分化誘導させた神経幹細胞を使用する場合と、②に示した脂肪組織由来間葉系幹細胞を使用する場合の2つのパターンを検討する。

①脳卒中モデルラットに対してマウスES細胞から分化誘導させた神経幹細胞を移植し、移植後のリハビリテーションの実施が生着率・分化と麻痺回復に及ぼす影響とグリア細胞の機能連携を検討し、脳卒中後の麻痺回復を促進するかの課題を考える。

②脳卒中モデルラットに対して脂肪組織由来間葉系幹細胞(MSC)を移植し、移植後のリハビリテーションの実施が生着率・分化と麻痺回復に及ぼす影響とグリア細胞の機能連携を検討し、脳卒中後の麻痺回復を促進するかの課題を考える。

3. 研究の方法

①移植神経幹細胞の培養として、マウスES細胞から神経幹細胞への分化誘導および神経幹細胞の培養は、独自に開発したNeural Stem Sphere (NSS) 法で行なった。すなわち、フィーダー細胞上で培養した未分化なマウスES細胞の塊(コロニー)を、実体顕微鏡下でガラスキャピラリーを使用して単離した。コロニーを非接着性ディッシュに移し、アストロサイト条件培地の中で浮遊培養して神経系細胞への選択的分化誘導を行い、神経幹細胞を含む球状の細胞集合体(NSS)を形成させた。

浮遊培養4日目のNSSを接着性のディッシュに移し、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)存在下で数日間培養して、NSSの周囲に神経幹細胞を増殖させ、NSS周囲に遊走した神経幹細胞だけを回収し、bFGF存在下で増殖させ、均質な神経幹細胞を調製した。細胞は凍結保存し、移植時に、解凍して培養を再開し、1mlのDMEMに懸濁し、動物に移植した。脳卒中非移植群にはvehicle 1ml

の静注処置のみを行った。

移植 1 日後から免疫拒絶を防ぐため、cyclosporine A (10mg/kg/day,ip)を材料採取まで投与した。

神経幹細胞移植の至適条件の検討を実施した。実験には体重約 150g の F344 系雄ラットを用いた。脳卒中非移植群 (n=7) と脳卒中移植群 (n=7) に分けた。すべての動物に対して、右感覚運動皮質に Rose Bengal 血栓性梗塞を作成した。脳梗塞作成 1 日後に神経幹細胞 (100 万個/個体) を静脈投与した。

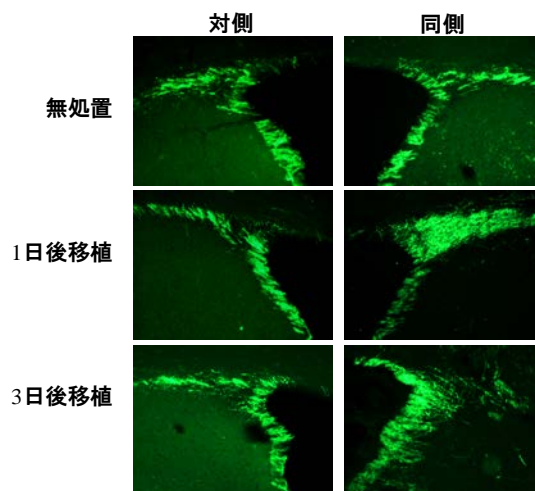
②脂肪組織由来間葉系幹細胞 (MSC) をモデル作成後 1 日後および 3 日後に大腿静脈より投与し、麻痺の回復スピードの変化をコントロール群と比較し、さらに PIT 作成後 9 日目に脳を取り出し、脳切片を蛍光顕微鏡での観察をおこなった。

株式会社シームスから提供されたヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (MSC) を乳酸リンゲル液 (ハルトマン溶液) 1mL に 5×10^6 個濃度で懸濁してモデルラットに静注した。MSC はあらかじめ PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit (Sigma: MINI26) で細胞標識をおこなった。シクロスポリン (10mg/kg per day) を MSC 投与 1 週間前から、投与後観察期間中継続投与した。コントロール群と同様、左下肢麻痺は、Beam-walking score にて評価をおこなった。また、PIT 作成後 9 日目にヘパリン生食で脱血後、リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒドで還流固定し、脳を摘出した。振動刃マイクロームを用いて $40 \mu\text{m}$ の切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した

4. 研究成果

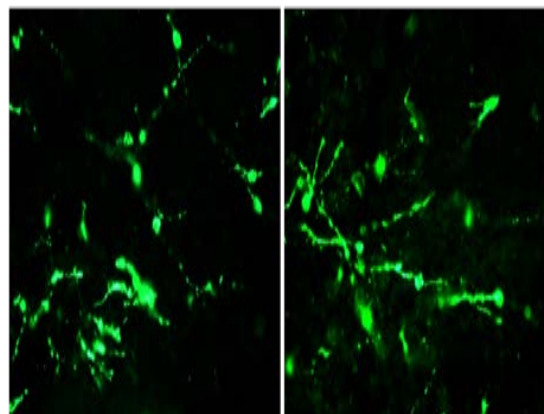
①移植神経幹細胞について

右感覚運動野皮質の損傷により生じた左下肢麻痺は、Beam-walking score で評価をした。脳卒中非移植群と脳卒中移植群とも損傷作成後約 10 日で麻痺は改善した。また、麻痺の回復スピードは、両群間に統計学的優位差を認めなかった。よって、さらに神経幹細胞移植の至適条件の検討をする必要がある。



Doublecortin-positive cell はいずれのラットでも側脳室周囲領域で観察される。梗塞ラットでは梗塞対側に比べて同側の側脳室周囲領域における Doublecortin-positive cell が多い。

1日後移植 3日後移植



梗塞周囲領域における新生神経の様子 Doublecortin-positive cell は梗塞ラット対側領域あるいは無処置ラットと同じ領域では観察されない。

②脂肪組織由来間葉系幹細胞 (MSC)

MSC を PIT 作成後 1 日後および 3 日後に静注したが、コントロール群と比べ両群とも麻痺の回復スピードは、統計学的優位差を認めなかった。また、脳切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、損傷半球、健常半球いずれにおいても標識された MSC は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Hideki Yamauchi, Kouhei Miyamura, Masahiro Abo. Proteomic Assessment of Important Proteins for Motor Recovery in a Rat Model of Photochemically-Induced Thrombosis. The Journal of Applied Research 査読有 9 2009, 139-147

〔学会発表〕（計 1 件）

① 安保雅博、山内秀樹. 脳損傷モデルとその解析、第 47 回日本リハビリテーション医学会総会、シンポジウム、2010 年 5 月、鹿児島

〔その他〕

ホームページ等

<http://jikei-reha.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安保 雅博 (ABO MASAHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：00266587

(2) 研究分担者

山内 秀樹 (YAMAUCHI HIDEKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60220224