

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15日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659344

研究課題名（和文） 蘇生後脳症に対する幹細胞移植のトランスレーショナルリサーチ

研究課題名（英文） Therapeutic benefits of bone marrow stem cells after global cerebral ischemia.

研究代表者 宮田 圭 (MIYATA KEI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80438051

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ラット心肺停止モデルを用いて、全脳虚血に対する骨髄幹細胞による細胞治療の効果を検討したものである。

心肺停止-蘇生後脳症のモデル作成と評価方法を確立し、心肺停止後の-蘇生後脳の状態を、動物実験用MRIを用いて代謝（MRS機能で測定）や脳機能（fMRIで測定）を解析し、また、組織学的評価や行動学的評価する系を確立した。その上で、骨髄幹細胞の静脈内投与治療の治療効果を検討した結果、著明な治療効果が期待できることが判明した。

また、細胞治療の最適条件を投与細胞数や投与時期を変化させて検討を加えた結果、 $1 \times 10^6$ 個を可及的速やかに投与することが最適との結果が得られた。

さらに遺伝子組換え細胞を用いた実験により、BDNF, GDNF, PLGFなどの治療遺伝子を組み込んだ細胞は、脳虚血に対して更なる治療効果が得られる可能性があることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Although intravenous delivery of mesenchymal stem cells (MSCs) prepared from bone marrow reduces infarction size and ameliorates functional deficits in rat middle cerebral artery occlusion models, there are few reports of MSC treatment in global cerebral ischemia. We utilized a global cerebral ischemia model induced by arresting the heart with a combination of hypovolemia and intracardiac injections of a cold potassium chloride solution in order to study the potential therapeutic benefits of MSCs on global cerebral ischemia. MSCs were intravenously injected into the rats after resuscitation from cardiac arrest. The effects on structural and functional outcome of MSC were assessed using magnetic resonance spectroscopy (MRS), histology, and cognitive functional analysis. Intravenous delivery of MSCs reduced the Lac/Cr ratios, nuclear DNA fragmentation, neuronal loss, and elicited functional improvement compared with the control sham group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of the hippocampus revealed an increase in BDNF in MSC-treated group. These data suggest that intravenous delivery of MSC may have a therapeutic effect in global cerebral ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,000,000	180,000	3,180,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：移植・再生医療 再生医学 神経科学 脳・神経 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳神経疾患に対する幹細胞を用いた細胞療法は、精力的な研究が世界レベルで遂行されていた。治療効果のメカニズムとして様々な機序を報告されていたが、その中でも、急性期には特に神経栄養因子を介した脳保護効果が注目されていた。

一方、心肺停止-蘇生後脳症は全脳の虚血であり、その病態生理は脳梗塞とは大きく異なる。すなわち、心肺停止-蘇生後脳症のoutcomeの多様性はapoptosisによると考えられるゆっくり進行する脳萎縮の程度に大きく依存している。

以上より、虚血性脳神経疾患に対する骨髄幹細胞を用いた細胞療法はアポトーシスを抑制する可能性が示唆されたこと、また、心肺停止-蘇生後脳症の病態生理はアポトーシスが多大に関与していること、から推測すると、心肺停止-蘇生後脳症に対する骨髄幹細胞を用いた細胞療法は有用である可能性が高かった。

2. 研究の目的

脳梗塞など局所の虚血性脳神経疾患に対する幹細胞を用いた療法における研究は進んでいたが、心肺停止-蘇生後脳症のような

全脳の虚血性脳神経疾患に対する幹細胞療法は未知数であった。

両者の病態生理は大きく異なっているものの、幹細胞の治療メカニズムを考慮すると、全脳の虚血性脳神経疾患に対しても治療効果が期待されていた。

当該研究計画では、当該仮説を検証する為の基礎研究を目的とした。

3. 研究の方法

【1】心肺停止-蘇生後脳症のモデル作成と評価方法の確立

従来Rongら(American J. Emergency Medicine 8: 1-6, 1990)の心肺停止モデルをmodifyして、循環停止時間を7 - 10分程度とした。これらのラットモデルに対して、画像診断学的、生化学的、組織学的、行動学的等、総合的に解析し、病態生理について総合的に検討した。

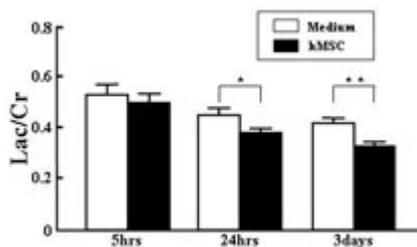
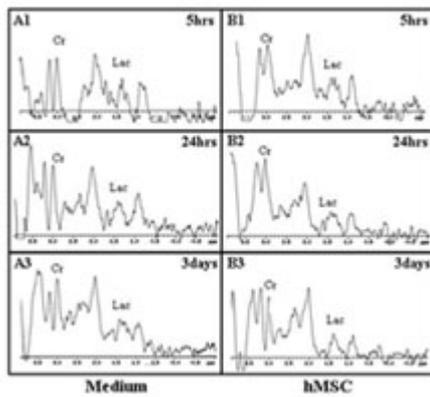
【2】骨髄幹細胞の治療効果の評価

上記のラット心肺停止-蘇生後脳症モデルに対して、骨髄幹細胞を静脈内投与し、治療効果の有無を評価し、また治療メカニズムを解析した。

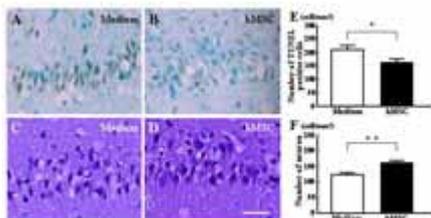
#### 4. 研究成果

心肺停止-蘇生後脳症のモデル作成と評価方法を確立した。すなわち、従来の Rongら (American J. Emergency Medicine 8: 1-6, 1990) の心肺停止モデルを modify して、循環停止時間を7分とした。モデルの作成率(生存率)が70%程度であった。

次に、心肺停止後の-蘇生後脳の状態を、動物実験用MRIを用いてMRS機能で代謝を測定した結果、早期からLactateの増加が観察された。

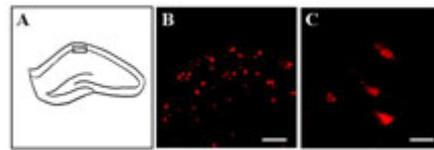


また、心肺停止-蘇生後脳の変化を、アポトーシスの観点から組織学的に解析した結果、海馬のCA1領域のPyramidal neuronが選択的に損傷を受けることが判明した。

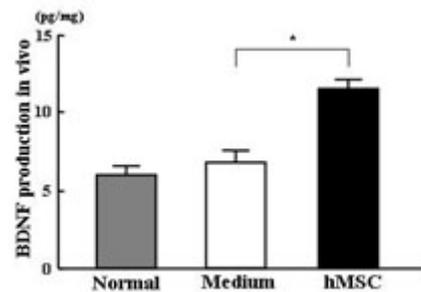


さらに、これらの変化が、骨髄幹細胞の静脈内投与治療によって著明に改善することが判明した。すなわち、静脈内に

移植された幹細胞は損傷部位に集積した。

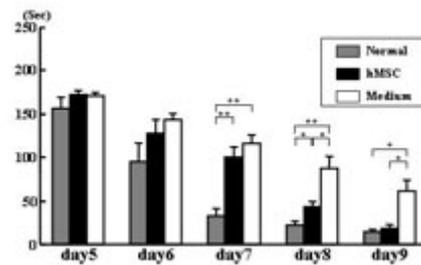


移植により損傷局所のBDNF濃度が上昇することが判明した。



局所のLactateの増加が抑制され、アポトーシスに陥る細胞数が減少し、結果的に多くの神経細胞が生存し続けることが判明した。

これらの移植による治療効果は、行動学的にも示めされた。



さらに遺伝子組換え細胞を用いた実験により、BDNF, GDNF, PLGFなどの治療遺伝子を組み込んだ細胞は、脳虚血に対して更なる治療効果が得られる可能性があることが判明した。

骨髄幹細胞の静脈内投与が、focalなischemic lesionに対しては治療効果が見込めることは判明しているが、本研究のように全脳虚血に対する治療効果を検討した報告は無い。また、心肺停止による全脳虚血は、ラットでモデルを作成す

ることも極めて高等な技術を要した。よって、本研究は、研究計画の面でも技術面でもチャレンジ性を有していた。

本研究では、現在では治療方法が全く無いとされている、心肺停止-蘇生後脳症に対して、細胞療法の観点から全く新しい治療戦略を考案することができた。

本研究の成果により、骨髄幹細胞を用いた細胞療法が、脳梗塞や心肺停止-蘇生後脳症ばかりでなく、虚血性の脳神経疾患全般に応用される可能性が高くなり、医学的・社会的貢献度は多大になると推測される。また、小児科領域の虚血性脳神経疾患への応用も期待された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Zheng W, Honmou O, Miyata K, Harada K, Suzuki J, Liu H, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD: Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia. Brain Res 1310: 8-16, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

鄭偉、本望 修、原田邦明、鈴木順平、宝金清博 心配停止後全脳虚血に対する骨髄幹細胞移植の検討 第18回日本意識障害学会 2009.7.24. 川越

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

宮田 圭 (MIYATA KEI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80438051

### (2)研究分担者

宝金清博 (HOUKIN KIYOHIRO)

北海道大学・大学院・医学研究科・教授

研究者番号：90229146