

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03043

研究課題名（和文）骨髄間質細胞由来細胞外小胞を用いた脳梗塞の包括的再生治療研究

研究課題名（英文）Comprehensive Bench-to-Bedside Research on Regenerative Medicine for Ischemic stroke with Bone Marrow Stromal Cell-derived Extracellular Vesicles (EVs)

研究代表者

黒田 敏（KURODA, Satoshi）

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：10301904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄間質細胞から単離した多能性幹細胞（Muse cell）を3種の動物脳疾患モデルに複数のルートから移植してその治療効果を様々な角度から検証した。（1）脳梗塞モデル：Muse cellを経静脈的あるいは経鼻的に移植した。運動機能の回復が有意に改善した。（2）脳挫傷モデル：Muse cellを経静脈的に移植した。運動機能の回復が有意に改善した。（3）アルツハイマー病モデル：Muse cellを経鼻的に移植した。認知機能の悪化が有意に抑制された。今後、これらの知見に基づいて、Muse cell由来のEVを用いた実験に展開する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって人生100年時代、健康寿命延伸時代においても患者QOLに大きく影響を及ぼす脳梗塞、脳挫傷、アルツハイマー病に対して、従来の薬物療法、リハビリテーションなどの治療よりも治療効果の高い細胞療法の開発に目処がついた。しかも本研究では、細胞の静注のみならず経鼻移植という非侵襲的な移植ルートの効果を示した点で、患者負担の軽い再生療法として画期的な成果が得られた。今後はMuse cellから分離できるEVsの研究を展開するとともに、細胞そのものを用いた臨床研究に発展させる予定である。

研究成果の概要（英文）：Pluripotent stem cells (Muse cells) isolated from bone marrow stromal cells were transplanted into three animal models of brain diseases via multiple routes, and their therapeutic effects were examined from various angles. (1) Cerebral infarction model: Muse cells were transplanted transvenously or intranasally, and the recovery of motor function was significantly enhanced. (2) Cerebral contusion model: Muse cells were transplanted intravenously, and the recovery of motor function was significantly enhanced. (3) Alzheimer's disease model: Transplantation of Muse cells intranasally significantly suppressed the deterioration of cognitive function. Based on these findings, we plan to expand the study to experiments using EVs derived from Muse cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：再生医療 細胞治療 Muse細胞 脳梗塞 脳挫傷 アルツハイマー病 運動機能 認知機能

1. 研究開始当初の背景

脳卒中はわが国の主要疾病の一つであり、なかでも最も高頻度の脳梗塞は、その後遺症のために多くの国民の日常生活に重大な支障を及ぼすとともに国民医療費の増加に拍車をかけている。一方、幹細胞を利用した再生医療は、脳梗塞による後遺症を改善させる新たな治療法として期待されて久しい。なかでも、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell; BMSC) は、患者自身の骨髄から採取・培養が可能で、ES 細胞や iPS 細胞などに比べると生命倫理や免疫反応、腫瘍形成などの問題がない点も臨床応用を考える上で有利である。申請者らは、この 19 年間、患者骨髄から分離できる BMSC が脳梗塞後遺症の改善に有効であることを、細胞ラベリング、免疫染色、フローサイトメトリー、光イメージング、核磁気共鳴法(MRI)、オートラジオグラフィ、DNA マイクロアレイ、共焦点顕微鏡、共培養システムなどを用いた、数多くの非臨床試験の知見を国内外で発表してきた (英文原著 50 編以上)。これらの非臨床試験を経て、申請者らは、2012 年以降、厚生労働省の『革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業』の実施機関の一員として臨床試験の準備を進め、2017 年から北海道大学病院にて第一相医師主導治験を実施中である。しかしながら、脳梗塞の急性期に患者本人から骨髄液を採取して BMSC を培養するには多大な時間とコストを要するため、今後、この手法を広く一般臨床にトランスレートして数多くの脳梗塞患者に提供する点で不利であることも判明しつつある。

一方、ごく最近の研究によって、アポトーシス細胞のみならず健康な細胞からも恒常的に細胞外小胞 (extracellular vesicle; EV) が放出されていること、EV はタンパク質、核酸 (mRNA、miRNA など) を有しており細胞間コミュニケーションに大きく寄与していること、BMSC から EV が放出されていることが判明している。EV は、細胞そのものとは異なり、生物学的に安定していることから製剤としての作成、搬送、保管が容易で、多くの細胞治療が単回投与で実施されている反面、EV は繰り返し投与することも可能と考えられる。したがって、EV は従来の幹細胞よりもさらに安全かつ効率的な再生医療を日常の臨床の場で実現できる可能性が高い。

以上の経緯に基づいて本研究では、BMSC 由来の EV (以下、BMSC-EV) を用いた、急性期および慢性期の脳梗塞に対する再生医療の基礎研究、トランスレーショナル研究を提唱することとした。

2. 研究の目的

本研究は新たに発見された BMSC-EV が中枢神経の再生にどのような役割を果たしているのかを、非臨床試験、臨床試験を通して多角的に検証する世界で初めてのものである。非臨床試験では、ラット脳梗塞モデルに BMSC-EV をさまざまな投与量、タイミング、投与ルートで投与することで、脳梗塞に対する再生治療の新たなドナーとなり得るかどうかを検証する。また、ボランティア、脳梗塞患者を対象とした臨床試験では、ヒト末梢血中における BMSC-EV の動態を解析することで、人体に備わった自己修復機能に BMSC-EV がどのような役割を果たしているかを明らかにして、将来的には、自己修復機能を強化するための創薬や、BMSC-EV を用いた再生治療の開発に発展させることを目的としている。

3. 研究の方法

3 年間の研究により以下の点を解明することで、新たな概念のドナーである BMSC-EV の脳梗塞に対する再生医療における意義を明らかとする。具体的には、

(1) ヒト BMSC-EV の中枢神経における生物学的特性を明らかとする

ヒト BMSC を 24 時間培養した上清を 10 分間、2500xg で遠心する。その上清をさらに 45 分間、14000xg で遠心して得られる pellet を BMSC-EV として単離する。細胞数あたりの重量を定量する。この BMSC-EV に含まれているタンパク質を 2 次元電気泳動 + プロテオーム解析により同定する。特に、神経保護効果や血管新生効果を有するサイトカインや栄養因子にターゲットを設定する。また、BMSC-EV から RNA を抽出して RT-PCR にて BMSC-EV に含まれる miRNA を同定する。

(2) ヒト BMSC-EV の神経保護効果を明らかとする

神経細胞の一次培養を実施し、神経細胞に興奮性アミノ酸であるグルタミン酸を暴露してアポトーシスを誘導する。同時に蛍光標識物質 (Mito-Tracker など) を用いてミトコンドリア膜電位の変化を測定する。グルタミン酸暴露後に上記 a) の手法で単離したヒト BMSC-EV を培養液に加えて、ヒト BMSC-EV が神経細胞のミトコンドリア膜電位の喪失、アポトーシスを抑

制するかどうかを検証する。有効なヒト BMSC-EV の投与濃度、タイミングを検証する。

(3)ヒト BMSC-EV のマウス脳梗塞モデルの治療効果を明らかにする

顕微鏡下にマウスの中大脳動脈を閉塞して脳梗塞モデルを作成する。Bederson のスコア、水迷路試験を用いて神経症状を客観的に評価する。各実験の適切なタイミングでマウスを安楽死させて HE 染色で脳梗塞の体積を測定する。蛍光標識したヒト BMSC-EV (50~200 μ g/rat) の懸濁液を脳梗塞作成後、3 日後、7 日後、30 日後、6 ヶ月後に異なる 3 つのルート (尾静脈、頸動脈、側脳室) から投与する。各群におけるマウスの運動機能、高次脳機能を経時的に定量解析するほか、投与 1 ヶ月後に組織学的評価を加えて、ヒト BMSC-EV の全身分布、脳への生着、神経幹細胞の増殖に与える影響などを詳細に検討する。

(4)ヒト BMSC-EV のマウス慢性脳虚血モデルの治療効果を明らかにする

顕微鏡下にマイクロ・スプリングを用いてマウス両側総頸動脈に高度狭窄を発生させて、慢性脳虚血モデルを作成する。自験例 (未公表データ) では、このモデルでは脳血流量はコントロール値の約 60% に低下する。モデル作成 7、あるいは 30 日後にヒト BMSC-EV を (50~200 μ g/rat) の懸濁液を尾静脈から投与する。水迷路試験を用いて、各群におけるマウスの高次脳機能を経時的に定量解析するほか、投与 1 ヶ月後にマウスを安楽死させて組織学的評価を加え、ヒト BMSC-EV の全身分布、脳への生着、側副血行路の形成に与える影響などを詳細に検討する。

(5)脳梗塞急性期における末梢血中 BMSC-EV の動態、生物学的特性

剖検から得られたヒト骨髄の標本を用いて、BMSC に特異的な細胞表面マーカー (CD90 など) に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を実施する。骨髄中における BMSC がどの程度の割合で EV を放出しているのか、さらにその生物学的特性を明らかにすることで、脳梗塞急性期に患者骨髄から BMSC-EV を動員させるための創薬に結びつけるための知見を明らかにする。

各年齢群の健常ボランティア 50 人から末梢血をサンプリングして、血漿を遠心することで健全な環境下で末梢血中に存在している BMSC-EV を定量する。年齢による差異の有無について検証する。この実験を通してヒト BMSC-EV の体内における動態を検証する。

さらに、脳梗塞を発症した患者 50 人を対象に、発症 1 日後、3 日後、7 日後、30 日後に経時的に採血して末梢血をサンプリングする。上記と同様に遠心器を用いて、末梢血中の BMSC-EV 量を定量的に解析する。また、血漿中のケモカイン (SDF-1 など) の濃度を ELISA を用いて測定する。この研究を通して、脳梗塞の発症によって BMSC-EV がどのようなタイミングで骨髄から末梢血に動員されて、損傷脳に遊走するのか? そのメカニズムとして、ヒトにおいてもケモカイン・システムが大きな役割を果たしているのか? を明らかにする。

4. 研究成果

骨髄間質細胞から単離した多能性幹細胞 (Muse cell) を 3 種の動物脳疾患モデルに複数のルートから移植してその治療効果を様々な角度から検証した。

(1) 脳梗塞モデル: Muse cell を経静脈的あるいは経鼻的に移植した。Muse cell を除去した骨髄間質細胞あるいは vehicle を移植した群よりもそれぞれ運動機能の回復が有意に改善した。

(2) 脳挫傷モデル: Muse cell を経静脈的に移植した。Muse cell を除去した骨髄間質細胞あるいは vehicle を移植した群よりもそれぞれ運動機能の回復が有意に改善した。

(3) アルツハイマー病モデル: Muse cell を経鼻的に移植した。Muse cell を除去した骨髄間質細胞あるいは vehicle を移植した群よりもそれぞれ認知機能の悪化が有意に抑制された。

また、脳梗塞急性期の患者から血液を採取して、Muse cell の動態を検証した。

今後、これらの知見に基づいて、Muse cell 由来の EV を用いた実験に展開する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kashiwazaki Daina, Yamamoto Shusuke, Hori Emiko, Akioka Naoki, Noguchi Kyo, Kuroda Satoshi	4. 巻 164
2. 論文標題 Thin calcification (< 2mm) can highly predict intraplaque hemorrhage in carotid plaque: the clinical significance of calcification types	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Neurochirurgica	6. 最初と最後の頁 1635 ~ 1643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-022-05205-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 KURODA Satoshi, FUJIMURA Miki, TAKAHASHI Jun, KATAOKA Hiroharu, OGASAWARA Kuniaki, IWAMA Toru, TOMINAGA Teiji, MIYAMOTO Susumu, The Research Committee on Moyamoya Disease (Spontaneous Occlusion of Circle of Willis) of the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan	4. 巻 62
2. 論文標題 Diagnostic Criteria for Moyamoya Disease - 2021 Revised Version	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 307 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/jns-nmc.2022-0072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Shusuke, Yamamoto Seiji, Akai Takuya, Sasahara Masakiyo, Kuroda Satoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Differentiation of Fibroblasts Into Myofibroblasts in the Arachnoid Membrane of Moyamoya Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 3465 ~ 3473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.122.039961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 黒田 敏	4. 巻 -
2. 論文標題 くも膜下出血	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 今日の治療指針2022	6. 最初と最後の頁 943-945
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 -

1. 著者名 黒田 敏、遠藤 薫、板橋 亮、小笠原邦昭、宮本 享	4. 巻 80 Suppl 1
2. 論文標題 脳卒中治療ガイドライン2021	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 34-38
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 -

1. 著者名 黒田 敏	4. 巻 89
2. 論文標題 特集 こんなときどうする?他科とのコミュニケーションガイド (第6章)脳神経内科・脳神経外科 妊産婦脳卒中	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 268 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34433/J00525.2022140465	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 黒田 敏	4. 巻 50
2. 論文標題 特集 STA-MCAバイパス術-日本が世界に誇る技を学ぶ 特殊なバイパス術 もやもや病に対するバイパス術 :その特殊性,成人例に対する私の手術法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 806 ~ 818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204624	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 Kato Shojiro, Dedeepiya Vidyasagar D., Kuroda Satoshi, Iwasaki Masaru, Senthilkumar Rajappa, Preethy Senthilkumar, Abraham Samuel J.K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Potential of Combination of Bone Marrow Nucleated and Mesenchymal Stem Cells in Complete Spinal Cord Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 385 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1574888X15666201029160542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akai Takuya, Hatta Toshihisa, Sakata-Haga Hiromi, Yamamoto Seiji, Otani Hiroki, Yamamoto Shusuke, Kuroda Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid may flow out from the brain through the frontal skull base and choroid plexus: a gold colloid and cadaverine injection study in mouse fetus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Child's Nervous System	6. 最初と最後の頁 3013 ~ 3020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00381-021-05253-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木則宏 シリーズ監修 / 黒田 敏 編集	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 210
3. 書名 脳卒中エキスパート 神経保護・神経再生療法～今後の展望と課題	

〔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
研究分担者	柏崎 大奈 (KASHIWAZAKI Daina) (50374484)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	
研究分担者	川堀 真人 (KAWABORI Masahito) (50399870)	北海道大学・大学病院・特任准教授 (10101)	
研究分担者	堀 恵美子 (HORI Emiko) (90372482)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	

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