

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09104

研究課題名（和文）実験的脳梗塞に対する骨髄幹細胞移植によって再構築される神経回路の網羅的解析

研究課題名（英文）Reconstructed neural circuits following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of experimental cerebral ischemia

研究代表者

長濱 宏史（Nagahama, Hiroshi）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20725676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：実験的脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与後の神経回路の再構築が、我々が既に明らかにしてきた局所の神経線維連絡の再編にとどまらず、脳梁全部の左右半球間連絡に解析対象を拡げることで、神経回路の再構築が全脳で生じていることを明らかにした。さらに我々は、神経線維ネットワークを最新のdiffusion magnetic resonance imaging技術とdiffusion tensor tractographyを用いた全脳の網羅的なコネクトーム解析と神経解剖学的手法を用いて解析し、再構築される神経回路の全貌の解明に至る可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血脳に対する細胞治療の研究は広く行われており、神経の構造および機能の再構築が惹起され、新しい神経回路が構築されることで、神経機能が回復することが知られている。一方、我々は骨髄間葉系幹細胞治療（MSC治療）が神経の再構築を亢進することで良好な機能改善効果を発揮することを明らかにしている。脳梗塞に対するMSC治療により誘導される脳全体における神経回路の再構築の詳細を解明することは、網羅的な神経回路の評価方法および新たなMSC治療効果評価法の確立に繋がり、次世代の治療法の開発に貢献することが期待できるとともに、再生医療の治療効果を評価、治療メカニズム解明に関わる革新的な成果の基盤となり得る。

研究成果の概要（英文）：Neural circuits were reorganized not only in the local neural fiber connection but in the entire brain in the following intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) in a rat model of experimental cerebral ischemia by extending our previously analysis of neural fibers in local interhemispheric connections to the entire corpus callosum. Furthermore, we found a possibility to elucidate the entire neural circuits that are being reconstructed by MSCs through the use of state-of-the-art diffusion magnetic resonance imaging techniques and connectome analysis using diffusion tensor tractography, and neuroanatomical analysis of the neural fiber network of the entire brain.

研究分野：神経可塑性

キーワード：神経可塑性 骨髄間葉系幹細胞 DTI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中大脳動脈閉塞のような脳主幹動脈閉塞による脳梗塞では、病側の脳梗塞巣に加えて、脳梁を介した左右大脳半球間を連絡する神経線維が破綻するが、次第にその神経線維に部分的な修復が生じることにより運動機能の一定の自然回復が生じるとされている。一方我々は、骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) の経静脈的投与 (MSC 治療) が、脳梗塞を含む神経疾患に対して治療効果を発揮することを報告してきた (研究業績参照)。その多彩な治療メカニズムのなかで、我々は、実験的脳梗塞に対する MSC 治療が、自然回復で得られる以上の運動機能の改善に貢献するメカニズムとして、脳の神経可塑性を賦活化するとともに、特に脳梁を介した左右大脳半球を連絡する神経線維を損傷から保護することを Ex vivo MRI Diffusion Tensor Tractography (DTT) およびアデノ随伴ウイルス (Adeno Associated Virus: AAV) による神経解剖学的トレーシングを用いた解析によって報告した。

以上より、脳梗塞に対する MSC 治療によって、脳内には左右大脳運動野間を連絡する神経線維の変化が惹起され、神経回路の再構築が起こることを見出した。

2. 研究の目的

我々は、これまでに実験的脳梗塞モデルに対する MSC の経静脈的投与によって神経可塑性が賦活化されるとともに脳梁を介する局所の神経線維連絡に変化が生じることを報告している。本研究では、脳全体に惹起される神経回路の再構築に対する革新的な DTT を用いて網羅的なコネクトーム解析を行い、脳の可塑性の亢進を詳細に明らかにすることを目的とした。神経可塑性の賦活化に焦点を置く詳細な解析により、脳梗塞に対する MSC 治療の新たな治療メカニズムを解明する基盤となり、新しい治療法の開発に貢献すると思われる。

3. 研究の方法

(1) MSC の培養・治療

SD ラットの大腿骨から骨髄を採取・培養を行った。3 継代目の MSC を下記の 2 群に対して、脊髄損傷作製後にランダム化し、非 MSC 治療群、MSC 治療群の 2 群に分け、大腿静脈から投与した。

- 非 MSC 治療群：新鮮な培養液 (1ml) 静脈内投与
- MSC 治療群：MSCs (1.0×10^6 個) を新鮮な培養液 1ml に懸濁させ静脈内投与

(2) 中大脳動脈閉塞モデル

深麻酔下にて SD ラット (雄、250g-300g) の外頸動脈から内頸動脈ヘナイロン製の糸を侵入させて、中大脳動脈を閉塞し、中大脳動脈閉塞 (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCAO) モデルを作製した。作製した MCAO ラットをランダム化し、非 MSC 治療群、MSC 投与群、MSC 繰返し投与治療群の 3 群に分けた。

(3) 行動学的評価

トレッドミル (Muromachi Inc, Tokyo, Japan) を用いてラットの最大走行速度を測定し、運動機能を評価した。また、Modified neurological severity scores (mNSS) によって、複合的な運動および感覚に関わる神経機能について評価した。同時に Beam balance test (BBT) を実施し平衡機能を評価した。

(4) 解析項目

(4-1) 画像診断学的解析

動物用 7T-MRI (70/16 PharmaScan, Bruker Biospin MRI GmbH, Et-tlingen, Germany) を用いて、経時的に脳の T2 強調像を撮像した。評価日は MCAO 作製後、1, 4, 7, 14, 21, 28, 42 日とした。また、観察期間終了後に、ラットを 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳組織を高解像度 Ex vivo DTT で撮像し、Tractography 解析 [Diffusion Toolkit and TrackVis software (<http://trackvis.org/>)] によって MSC 投与後の神経回路の再構築を解析した。

(4-2) 組織学的解析

観察期間終了後に脳を採集後、Nissl 染色し、脳梁の厚さを定量した。

(4-3) 免疫組織学的解析

観察期間終了後に脳組織を採集し、神経線維マーカーである抗 NF 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡 (LSM 780 ELYRA S.1 system; Carl Zeiss, Jena, Germany) で観察した (excitation/emission: 488/499-533 nm)。

4. 研究成果

(1) 行動学的解析

MCAO ラットのトレッドミルの走行速度は 8 週目で各群間で同等だが、9 週目から非 MSC 治療群よりも MSC 治療群で走行速度が有意に速くなり、最終観察点では MSC を繰返し投与することでより良好な運動機能改善が認められた。LPT, mNSS, BBT では非 MSC 治療群が経時的にほとんど変化が無いのに対して、MSC 治療群では有意に運動機能スコアの改善を認め、MSC の繰返し投与でさらなる改善を認めた (図 1)。

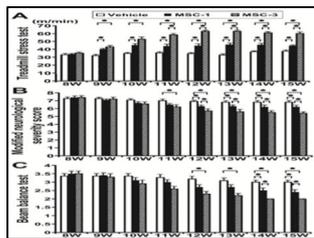


図 1. 行動学的解析結果

トレッドミル走行速度、mNSS、BBT いずれも MSC 投与 9 週目以降で、MSC 治療群が非 MSC 治療群に比べて有意な改善が認められた。MSC を繰返し投与することでより一層の改善効果を認めた (Takemura et al., J Neurosurg, 2021)

(2) 画像診断学的解析

T2 強調像を経時的に撮像し、脳梗塞の体積を計測したところ、各群間で有意差を認めなかった (図 2)。また、DTT を用いて脳梁全体の通過神経線維数を定量すると、MSC 治療群は非治療群に比べて、有意に神経線維数が多く、さらには MSC を繰返し投与することで、より多くの神経線維数を認めた (図 3)。

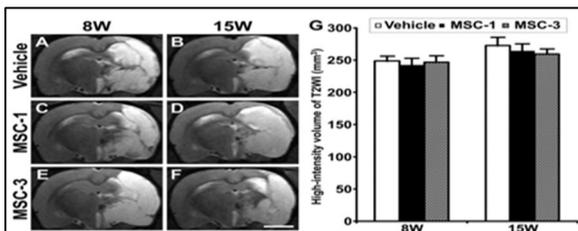


図 2. T2 強調像による脳梗塞体積計測

脳梗塞体積は各群間および経時的に有意差を認めなかった。(Takemura et al., J Neurosurg, 2021)

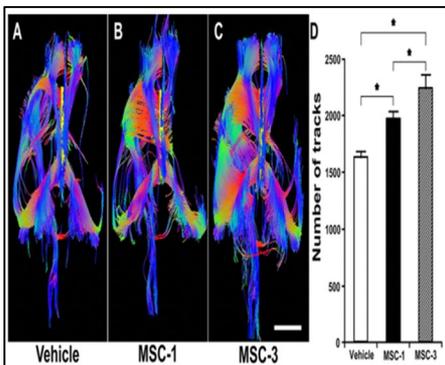


図 3. Tractography による神経線維描出

Diffusion tensor tractography を用いて脳梁全部を通過する左右大脳半球を連絡する神経線維数を定量したところ、MSC 治療群では非 MSC 治療群に比べて、有意に神経線維数が多かった。また MSC 1 回投与 (MSC-1) に比べて 3 回繰返し投与 (MSC-3) した群の神経線維数は有意に多かった。(Takemura et al., J Neurosurg, 2021)

(3) 組織学的解析

Nissl 染色を行い、脳組織断面より、脳梁の厚さを測定したところ、MSC 治療群が非治療群と比べて有意に厚く、MSC を繰返し投与することでさらに脳梁厚が厚くなった (図 4)。

(4) 免疫組織学的解析

Anti-NF antibody による神経線維の可視化を行い、免疫反応陽性数を定量したところ、MSC 治療群が非治療群に比べて有意に多く、繰返し投与を行うとさらに多かった(図 5)。

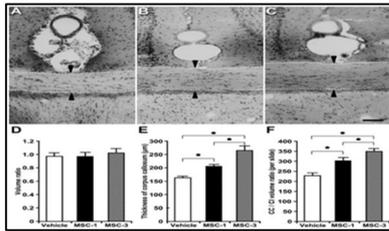


図 4 . Nissl 染色像による脳梁厚測定

光学顕微鏡を用いて脳梁の切片像を取得し、脳梁厚を測定したところ、MSC 治療群では非 MSC 治療群に比べて、脳梁が有意に厚かった。MSC を繰返し投与した群では、さらに脳梁厚は厚かった。(Takemura et al., J Neurosurg,

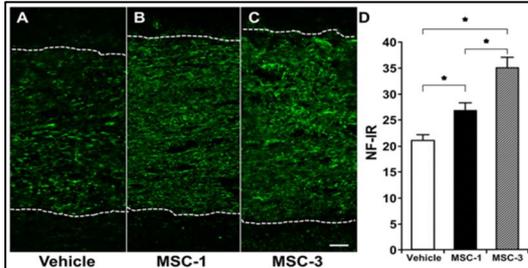


図 5 . 免疫組織学的解析

Neurofilament を免疫組織学的に解析したところ、免疫反応陽性数が MSC 治療群では非 MSC 治療群に比べて有意に多く、繰返し投与群ではさらに多かった。(Takemura et al., J Neurosurg, 2021)

(5) まとめ

実験的脳梗塞モデルに対する MSC 治療によって生じる、神経可塑性の賦活化は、MSC を繰返し投与することでさらなる神経機能改善が得られることが明らかになった。MSC を複数回投与することで、神経可塑性のさらなる亢進作用を惹起し、脳梁を介する神経連絡の構造的変化が誘導されることが、運動機能のさらなる改善に関与している可能性があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Takemura Mitsuhiro, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Kiyose Ryo, Nagahama Hiroshi, Oka Shinichi, Ukai Ryo, Yokoyama Takahiro, Kocsis Jeffery D., Ueba Tetsuya, Honmou Osamu	4. 巻 137
2. 論文標題 Repeated intravenous infusion of mesenchymal stem cells for enhanced functional recovery in a rat model of chronic cerebral ischemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 402 ~ 411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2021.8.JNS21687	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 Nagahama Hiroshi, Sasaki Masanori, Komatsu Katsuya, Sato Kaori, Katagiri Yoshimi, Kamagata Masaki, Kataoka-Sasaki Yuko, Oka Shinichi, Ukai Ryo, Yokoyama Takahiro, Terada Kojiro, Kobayashi Masato, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 386
2. 論文標題 A practical protocol for high-spatial-resolution magnetic resonance angiography for cerebral arteries in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 109784 ~ 109784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2023.109784	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroshi Nagahama, Masanori Sasaki, Takahiro Yokoyama, Shinichi Oka, Ryo Ukai, Yuko Kataoka-Sasaki, Kojiro Terada, Kaori Sato, Yoshimi Katagiri, Masaki Kamagata, Osamu Honmou
2. 発表標題 虚血脳に対する拡散 MRI 新規定量値による神経組織の推定法の検討
3. 学会等名 第50回日本磁気共鳴医学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	佐々木 祐典 (Sasaki Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	本望 修 (Honmou Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	横山 貴裕 (Yokoyama Takahiro) (60896116)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	鵜飼 亮 (Ukai Ryo) (30896113)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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