

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09194

研究課題名(和文)慢性期脳梗塞に対する細胞治療の効果

研究課題名(英文)peripheral blood CD34-positive cells for chronic stroke

研究代表者

斉野 織恵 (Saino, Orie)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・先端医療研究センター脳循環代謝研究部・研究員

研究者番号：90895111

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)：慢性期脳梗塞に対する治療はリハビリテーション以外に存在せず、新たな治療法の開発が望まれている。我々はこれまで亜急性期脳梗塞に対する造血幹細胞治療のメカニズムがギャップ結合を介した傷害血管内皮細胞へのエネルギー供与であると明らかにしている。本研究では慢性期脳梗塞に対する造血幹細胞治療に関する詳細な検証を行った。その結果、障害側のみならず健常側脳組織へもギャップ結合を介して物質が供与され代謝変化が生じ、シナプスが変化することで神経機能が改善することが明らかになった。一方で治療後の血管数に変化は無く、傷害血管に作用する急性期治療とは異なるメカニズムであることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性期脳梗塞の新規治療法開発が待たれる中、本研究により造血幹細胞治療メカニズムの一端が明らかになったことで実用化の実現へ一歩近づき、社会的意義は大きい。また治療メカニズムの解明は、造血幹細胞を他の疾患治療へ応用する際に大いに役立つと考えられ、学術的意義も深い。

研究成果の概要(英文)：There is no treatment for chronic cerebral infarction other than rehabilitation, and the development of new treatments is urgently needed. We have previously revealed that the mechanism of hematopoietic stem cell therapy for subacute cerebral infarction is the supply of energy to damaged vascular endothelial cells via gap junctions, and in this study, we conducted a detailed investigation of hematopoietic stem cell therapy for chronic cerebral infarction. As a result, it was revealed that substances are supplied via gap junctions to not only the damaged side but also the healthy side of the brain tissue, causing metabolic changes and changing synapses, thereby improving neural function. However, there was no change in the number of blood vessels after treatment, making it clear that this is a different mechanism from acute treatment that acts on damaged blood vessels.

研究分野：脳梗塞

キーワード：慢性期脳梗塞 造血幹細胞治療 再生医療 動脈内投与

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞発症後、慢性期に移行すると損傷した神経系が完全に失われることから機能回復は不可能と考えられてきた。そのため、脳梗塞治療の大半が急性期または亜急性期をターゲットにしており、慢性期脳梗塞に対する治療法はリハビリテーション以外に存在しない。我々はこれまで亜急性期脳梗塞に対する造血幹細胞治療に関し非臨床研究および臨床試験を行い、脳血管の再生と併せて神経機能の回復が促進されることを報告してきた。さらに慢性期脳梗塞に対する造血幹細胞治療においても、適切な運動療法を組み合わせることで神経機能を有意に改善させることを非臨床研究にて明らかにした。

2. 研究の目的

今後、慢性期脳梗塞に対する造血幹細胞移植治療が臨床で実現化するためには、具体的な細胞投与方法や、より詳細なメカニズムを明らかにすることが求められる。本研究ではこれらを検証することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 最適な投与経路に関する検証

これまでの研究成果より造血幹細胞の作用部位は病巣部位の脳血管内皮細胞であることから脳血管に到達する細胞が多い程、強い効果が期待されるため頸動脈内投与が最適と考えた。また骨髄単核球の場合、含まれる炎症細胞が脳内ミクログリアを活性化させ治療効果を抑制するため動脈内投与には不向きであることから、ヒト末梢血から純化させた造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) を使用した。SCID マウス (雄、5 週齢) の中大脳動脈永久閉塞モデル作製 4 週後、造血幹細胞 1×10^4 個を頸動脈または尾静脈より投与し行動テストにて治療効果を比較した。

(2) 治療メカニズムに関する検証

我々はこれまで急性期脳梗塞に対する造血幹細胞移植の治療メカニズムは、造血幹細胞による傷害血管内皮細胞へのギャップ結合を介したエネルギー供与であることを明らかにしている。傷害血管内皮細胞のエネルギー代謝が活性化され血管再生が生じ、神経機能が改善する。慢性期治療でも急性期同様、造血幹細胞がギャップ結合を介してエネルギー供与することで神経機能の改善をもたらしているのか、下記の 4 項目の研究を行うことで検証した。SCID マウス (雄、5 ~ 7 週齢) の中大脳動脈永久閉塞モデルマウス作製 4 週後、造血幹細胞または造血幹細胞を含む単核球画分を血管内投与することで行った。

造血幹細胞から脳組織への物質供与

移植した造血幹細胞からギャップ結合を介した物質供与が行われているか検証する目的で、低分子蛍光物質 (BCECF) を封入した造血幹細胞を血管内投与し、免疫組織染色にて BCECF の組織内分布を観察した。

治療後の脳内代謝関連遺伝子発現量変化

脳組織の代謝変化を検証する目的で、造血幹細胞投与直後である 3 時間後、および神経機能改善後である 10 週後、健常側大脳皮質、障害側大脳皮質 (前大脳動脈領域) について定量 PCR による代謝関連遺伝子発現量を測定した。

神経細胞の変化

治療後に神経細胞に変化が生じているか検証する目的で、造血幹細胞投与直後である 3 時間後、健常側大脳皮質、障害側大脳皮質 (前大脳動脈領域) について定量 PCR によるシナプス関連遺伝子発現量を測定した。また、神経機能改善後である 10 週後、脳組織のゴルジ染色により神経細胞形態の評価を行った。

血管再生

急性期脳梗塞では細胞移植治療により梗塞巣内、および梗塞巣周囲の血管再生が亢進している。慢性期脳梗塞治療後の血管再生について検証する目的で、造血幹細胞投与 1 週後の脳組織に対して免疫組織染色を行い血管数の計測を行った。

4. 研究成果

(1) 最適な投与経路に関する検証

静脈内投与に比し、動脈内投与では治療効果が高く、効果の持続時間が長いことが明らかとなった(図1)(Ogawa Y et al. Frontiers in Medicine. 2022)

図1 投与経路による治療効果の比較

(2) 治療メカニズムに関する検証

造血幹細胞から脳組織への物質供与

BCECF が障害側及び健常側の血管内皮細胞とその外側へ到達している様子が観察され、血管内投与された造血幹細胞からギャップ結合を介して障害側及び健常側脳組織へ物質が移行することが明らかになった。この結果から、慢性期治療では造血幹細胞から脳組織へギャップ結合を介した何らかの物質供与があると考えられた。

治療後の脳内代謝関連遺伝子発現量変化 障害側だけではなく健常側においても代謝変化が生じること、左右で治療効果の影響を受ける時期が異なることが明らかになった(図2)(Ogawa Y et al. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2021)

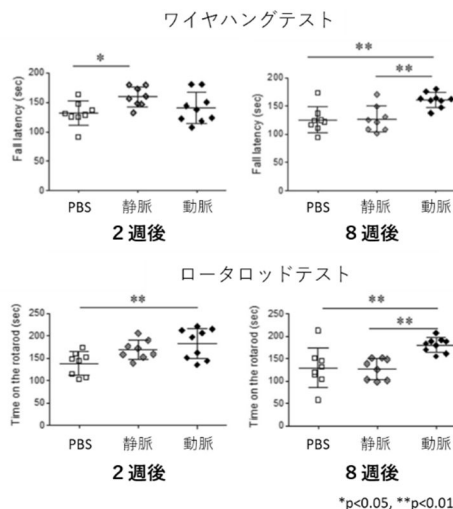


図2 治療後の代謝関連遺伝子発現変化

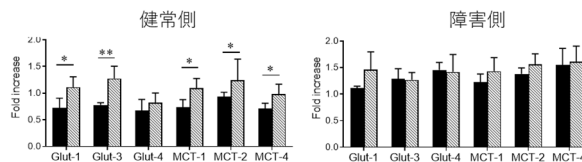
神経細胞の変化

造血幹細胞投与3時間後、シナプス関連遺伝子の定量PCR解析の結果、両側大脳皮質において遺伝子発現が優位に亢進していた。さらに投与10週間後、脳組織のゴルジ染色を行った結果、両側大脳皮質において神経細胞のスパン数の増加が観察された。これより慢性期治療後、神経細胞に変化が生じることが明らかになった。

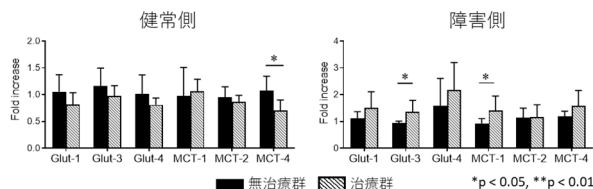
血管再生

両側大脳皮質において血管数の優位な変化は無く、慢性期脳梗塞治療後に血管再生は亢進しないことが明らかになった。

投与3時間後



投与10週間後



以上より、慢性期脳梗塞に対する造血幹細胞治療においては純化した造血幹細胞を投与する場合、動脈内投与が静脈内投与と比較して効果が高いことが明らかになった。さらに慢性期脳梗塞治療に対する造血幹細胞治療メカニズムは、造血幹細胞から両側脳組織へのギャップ結合を介した物質供与と神経細胞の変化であることが明らかになった。一方で、血管再生が亢進していないことより血管再生が先立って生じる急性期脳梗塞における治療メカニズムとは異なったメカニズムであることが明らかになった。

本研究にて慢性期脳梗塞に対する造血幹細胞治療の最適な投与方法やメカニズムの一端が明らかになったことで、慢性期脳梗塞に対する造血幹細胞治療の実用化実現へ一歩近づいたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogawa Yuko, Saino Ori, Okinaka Yuka, Kikuchi-Taura Akie, Takeuchi Yukiko, Taguchi Akihiko	4. 巻 30
2. 論文標題 Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation and Training Increased Transplantation of Energy Source Transporters in Chronic Stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 105932 ~ 105932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105932	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 Ogawa Yuko, Okinaka Yuka, Kikuchi-Taura Akie, Saino Ori, Tani-Yokoyama Ayumi, Masuda Satoru, Komatsu-Horii Miki, Ikemoto Yoshihiko, Kawamoto Atshihiko, Fukushima Masanori, Taguchi Akihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Pre-Clinical Proof of Concept: Intra-Carotid Injection of Autologous CD34-Positive Cells for Chronic Ischemic Stroke	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.681316	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 斉野織恵、小川優子、沖中由佳、赤松理恵、田浦映恵、田口明彦
2. 発表標題 慢性期脳梗塞モデルマウスに対する造血幹細胞の治療効果
3. 学会等名 第64回 日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斉野織恵、小川優子、赤松理恵、保井一太、淵崎晶弘、田中光信、木村貴文、田口明彦
2. 発表標題 慢性期脳梗塞に対する臍帯血単核球画分の移植治療の効果
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斎野織恵、小川 優子、赤松 理恵、保井 一太、瀧崎 晶弘、 田中 光信、木村 貴文、田口 明彦
2. 発表標題 慢性期脳梗塞に対する新たな治療法の開発
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

〔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	小川 優子 (Ogawa Yuko) (00454497)	公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員 (84503)	

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