

令和 6 年 6 月 7 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：21K11194

研究課題名(和文)慢性期脳梗塞に対する骨髄幹細胞とリハビリ併用による脳のplasticityの解析

研究課題名(英文) Induced neural plasticity following combination of intravenous infusion of mesenchymal stem cells and rehabilitation after chronic phase of cerebral ischemia in rats

研究代表者

山下 達郎 (Yamashita, Tatsuro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60815439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性期脳梗塞モデルラットに対するリハビリテーションと骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)の経静脈内投与(MSC治療)の併用療法による治療メカニズムを検討した。併用療法が、MSC治療やリハビリテーション単独と比較して行動機能の回復を促進した。また、併用療法では組織学的解析およびDTI解析より神経可塑性が亢進していた。これらの知見により、リハビリテーションとMSCの静脈内投与の併用療法によって回復が促進されることを示唆しており、今後の臨床プロトコル開発の基礎となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療におけるリハビリの重要性は高く、治療効果を最大限に引き出すリハビリプロトコルの確率は非常に重要である。2019年より、脊髄損傷の後遺症に対する再生医療等製品として自己骨髄間葉系幹細胞(ステミラック注)の期限・条件付き承認承認を受け、実用化が開始された。今後、ステミラック注を用いた再生医療の対象疾患は、脊髄損傷だけではなく脳梗塞などの疾患にも拡大していくことが推測される。MSC治療の治療効果を最大限に引き出すため、リハビリプロトコルの確立は、大きな役割を果たすと推測される。

研究成果の概要(英文)：We investigated induced neural plasticity following combination of intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) and rehabilitation after chronic phase of cerebral ischemia in rats. Combination therapy facilitated recovery of behavioural function compared to MSCs treatment or rehabilitation alone. The combination therapy is associated with enhanced neural plasticity shown with histological analysis and MRI diffusion tensor imaging. These findings provide behavioral evidence for enhanced recovery by combined therapy with rehabilitation and intravenous infusion of MSCs, and may form the basis for the development of clinical protocols in the future.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨髄間葉系幹細胞 リハビリテーション 慢性期脳梗塞 可塑性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) を用いた細胞療法は、再生医療の分野で脳梗塞などに対する新しい治療方法として期待されている。我々は、既に急性期脳梗塞モデルに対する MSC 治療にリハビリテーション (リハビリ) を併用すると、リハビリ単独群や MSC 治療単独群よりも、脳の可塑性の亢進を惹起し、さらに高い運動機能の回復が得られることを報告した (Sasaki et al., 2016)。また、我々は慢性期脳梗塞モデルに対しても MSC 治療を行い、運動機能の改善が認められることを報告した (Namioka et al., 2018, Takemura et al., 2021)。急性期と慢性期では病態は異なるものの、MSC の有する多彩な治療メカニズムを考えると、慢性期に MSC 移植とリハビリを併用することでさらなる治療効果が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

先行研究において、慢性期脳梗塞モデルラットに対する MSC 治療が、治療効果をもたらすことを報告した (Namioka et al., 2018, Takemura et al., 2021)。リハビリテーションは、経静脈的に投与された MSC によって誘導された神経可塑性の亢進をさらに増強するとともに、適切な方向に神経可塑性を導く可能性がある。本研究では、慢性期脳梗塞モデルラットに MSC 治療とリハビリテーションを併用し、その治療効果とメカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

(1) MSC の培養

SD ラットの大腿骨から骨髄を採取・培養を行なった。3 継代目の MSC を投与に使用した。

(2) 慢性期脳梗塞モデル

Intraluminal thread method を用いて中大脳動脈永久閉塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO) を作製した。ナイロン製の糸を、深麻酔下にした SD ラット (メス、250-300 g) の外頸動脈から内頸動脈へと侵入させて、中大脳動脈を閉塞した。MCAO 作製 8 週間後に、対照群、リハビリ群、MSC 群、併用群の実験群にランダムに分けた。

(3) リハビリテーション

リハビリテーションを行う 2 群 (リハビリ群、併用群) には、MCAO 作製 8 週後より毎日 20 分間のトレッドミル走行を 8 週間行なった。運動強度は 18m/min、傾斜は 20° に設定した。

(4) MSC の投与方法

MSC を投与する 2 群 (MSC 群、併用群) には、MCAO 作製 8 週後に、大腿静脈から MSC (1.0×10^6 個/1ml) を投与した。また、vehicle 投与を行う 2 群 (vehicle 群、リハビリ群) には、MCAO 作製 8 週後に、DMEM を 1ml 大腿静脈より投与した。

(5) MRI 解析

動物用 7T MRI を使用して、深麻酔下にしたラットの脳の T2 協調画像を撮影し、脳梗塞の体積を評価した。評価日は MCAO 作製 8 週、12 週、16 週後とした。

また、MCAO 作製 16 週後に、深麻酔下にしたラットを脱血、灌流固定し、脳組織を採取した。採取した脳を、動物用 7T MRI を使用して、ex vivo MRI (diffusion tensor imaging: DTI) 解析を行ない、脳梁を通る神経繊維数を評価した。

(6) 組織学的解析

DTI 解析後の脳組織を使用し、ニッスル染色を行い、光学顕微鏡を用いて脳梁の厚さを計測した。

(7) 行動学的解析

行動学的解析では Treadmill stress test、Limb placement test (LPT)、modified Neurological Severity Score (mNSS)、Beam balance test を用いて評価した。評価日は MCAO 作製 8 週から 16 週まで毎週評価した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞体積の経時的変化

MRI 解析によって経時的に脳梗塞の体積を評価した結果、MCAO 作製 8 週、12 週、16 週後に各群における脳梗塞の体積はほぼ変化せず、各実験群間に有意な差はみられなかった。

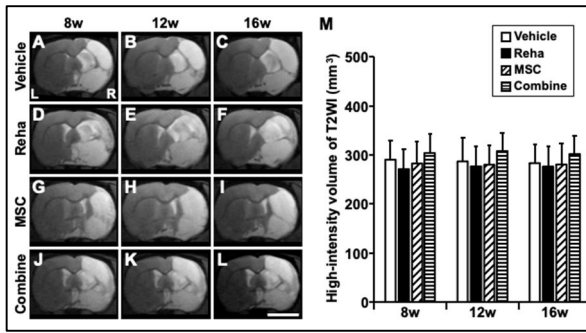


図1 脳梗塞体積の経時的変化
(Yamashita T. et al., Brain Res, 2024)

(2) 行動学的解析

行動学的解析ではTreadmill stress test、Limb placement test (LPT)、modified Neurological Severity Score (mNSS)、Beam balance test を用いて評価した。それぞれの評価方法において、MCAO 作製 8 週後では各実験群間に有意な差はみられなかった。Treadmill stress test では、併用群は MCAO 作製後 11 週目から 16 週目まで一貫して最高走行速度を示し、他の 3 群と比較して行動機能の改善を示した。LPT、mNSS、Beam balance test の結果からも、併用群は他の 3 群に比べ、特に投与後しばらく経過してから (13~16 週)、行動機能が改善したことが示された。これらのことは、MSC とリハビリテーションの併用が MCAO 後の行動機能回復に強く関与したことを示唆している。また、行動学的解析によって観察された改善時期の相違は、本研究で用いられた個々の行動評価方法の特性に起因していると考えられた。

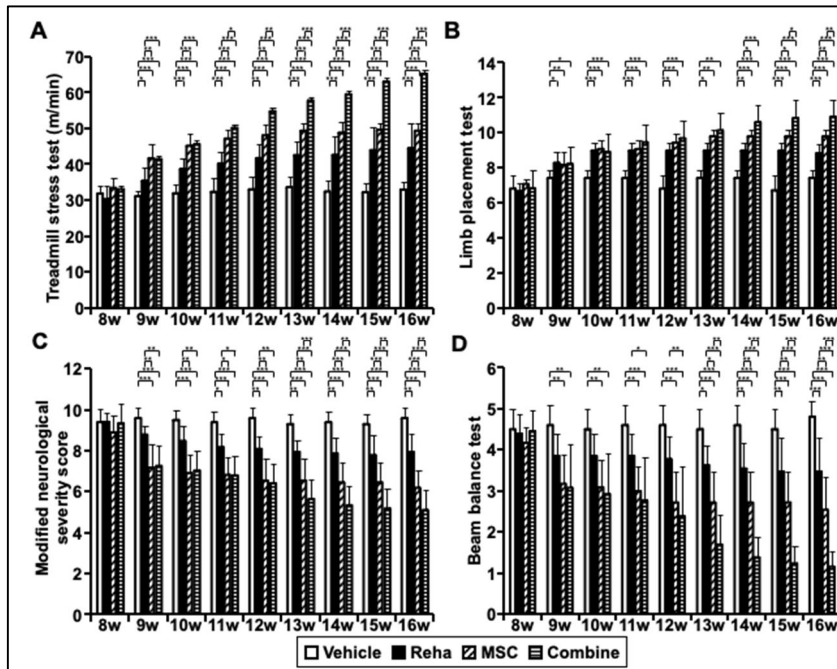


図2 行動機能は MSC 群と比較して 併用群でさらに改善
(Yamashita T. et al., Brain Res, 2024)

(3) DTI 解析

DTI 解析では脳梁を通る神経繊維数を評価した。脳梁を通る神経繊維数は 併用群が最も多く、次いで MSC 群、リハビリ群、 対照群の順で多くなっていた。

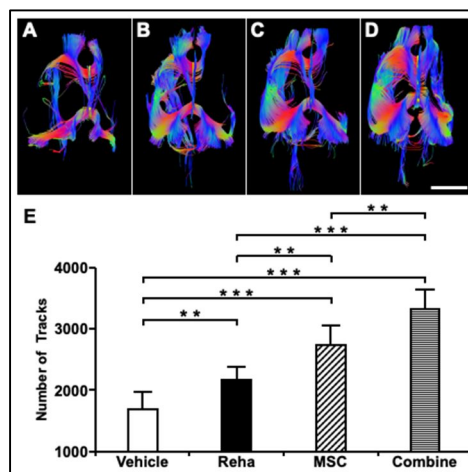


図3 神経繊維数は MSC 群と比較して 併用群でさらに増加
(Yamashita T. et al., Brain Res, 2024)

(4) 組織学的解析

組織学的解析ではニッスル染色を行い、光学顕微鏡を用いて脳梁の厚さを計測した。併用群は

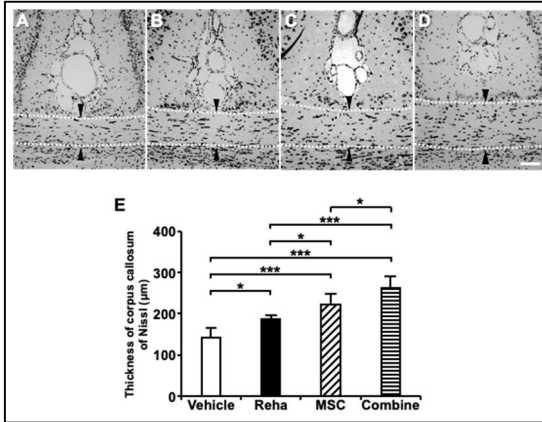


図4 脳梁は MSC

群と比較して 併用群でさらに肥厚

(Yamashita T. et al., Brain Res, 2024)

実験群の中で最も脳梁が厚く、次いで MSC 群、リハビリ群、対照群の順で厚くなっていた。

(5) 相関分析

Treadmill stress test における最高速度と、DTI 解析での神経繊維数および脳梁の厚さの両方に正の相関があることがわかった。このことは、運動機能が高いほど、神経繊維の数が多く、脳梁の厚みが増す可能性を示している。また、DTI 解析での神経繊維数と脳梁の厚さにも正の相関があった。このことは、脳梁の構造変化が神経線維数に関連しているということを示唆している。これらの結果は脳梁が最も厚く、脳梁を通る神経繊維数が最も多かった 併用群が、今回の実験群の群間で最大の行動機能の改善をもたらしたことと一致していると考えられた。

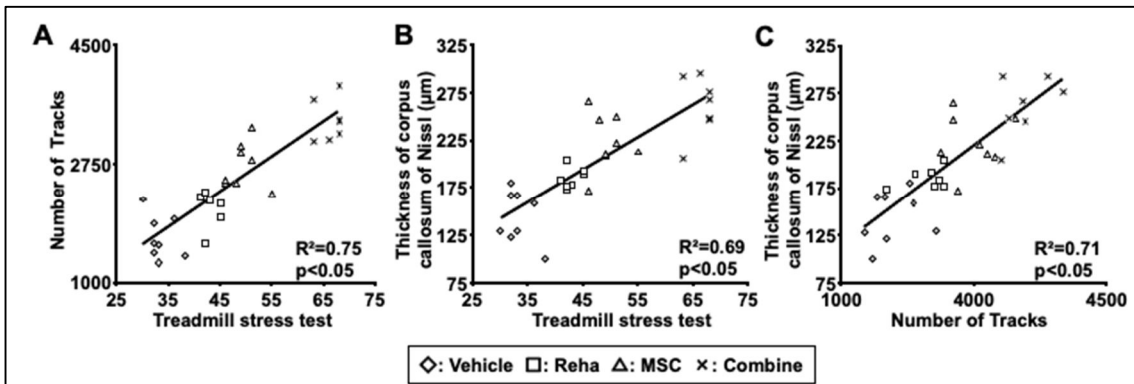


図5 Treadmill stress test における最高速度と神経繊維数および脳梁の厚さの両方に正の相関があり、神経繊維数と脳梁の厚さにも正の相関がみられた。

(Yamashita T. et al., Brain Res, 2024)

以上より、慢性期脳梗塞モデルラットに対する MSC 治療とリハビリテーションの併用療法が、MSC 治療やリハビリテーション単独と比較して行動機能の回復を促進した。また、併用療法を受けた動物モデルラットは、組織学解析では最も脳梁が厚く、DTI 解析では脳梁を通る神経繊維数の増加を認めた。これらの所見は、慢性脳梗塞に対する MSC 治療とリハビリテーションの併用療法には、最も運動機能の改善をもたらす可能性があり、さらに脳の構造的変化が機能回復に強く関連するという考え方を支持するものであると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Yamashita Tatsuro, Sasaki Masanori, Sasaki Yuichi, Nagahama Hiroshi, Oka Shinichi, Kataoka-Sasaki Yuko, Ukai Ryo, Yokoyama Takahiro, Kobayashi Masato, Kakizawa Masafumi, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 1825
2. 論文標題 Rehabilitation facilitates functional improvement following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in the chronic phase of cerebral ischemia in rats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148709 - 148709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2023.148709	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	鷓飼 亮 (Ukai Ryo) (30896113)	札幌医科大学・医学部・助教 (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
---------	---------