

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31日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791119

研究課題名（和文）：CD34陽性細胞移植によるラット脳内血管・神経新生、抗うつ効果の検討

研究課題名（英文）：Angiogenesis, neurogenesis and anti-depressive effect of CD34 positive stem cell transplantation in rat brain.

研究代表者：

亀野 陽亮（KAMENO YOSUKE）

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：40537255

研究成果の概要（和文）：うつ病の新しい治療戦略として、脳血流の回復が有望との報告がある。本研究計画では、この治療法研究に資する動物モデルの確立を目的として、ヒト CD34 陽性幹細胞を経頸動脈的にラット脳内へ移植する試みに取り組み、移植後にラット脳内毛細血管への造血幹細胞の生着を確認することに成功した。しかし、移植後1週間以内のラットの生存率が60%を越えなかったため、本研究計画の継続を断念した。

研究成果の概要（英文）：In recent studies, recovery of cerebral blood flow emerged as a novel therapeutic strategy for depression. To establish animal model for the therapy method research, I tried to transplant CD34 positive hematopoietic stem cell into rat brain through the internal carotid artery and succeeded to confirm its proliferation in the rat brain capillaries after transfusion in this project. However, I regretted to discontinue the project because the survival rate of rat was less than 60% within 1 week after transfusion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：精神生理学、血管・神経新生

1. 研究開始当初の背景

うつ病の治療に関しては、選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）をはじめとする抗うつ薬の効果が立証されている。抗うつ薬は神経新生を亢進させる作用を持ち、それが抗うつ効果の発現機序のひとつであると考えられているが、患者の30%は治療に反応せず、治療抵抗性の経過をたどる。近年の画像診断技術の進歩により、うつ病では前頭前野などの脳領域で血流量が低下することが明

らかになっている（Videbech、2000）。これらの低下はうつ病の重症度、再発回数との相関することが認められており、治療抵抗性うつ病ではより高度な血流量の低下が生じていることが想定される。このことから、低下した脳血流量を回復させることが治療抵抗性うつ病に対する新たな治療戦略として有望であるという提案がなされている（Newtonら、2004）。

CD34陽性細胞は成人の末梢血分画から単離

された造血幹細胞の一種である。CD34 陽性細胞をはじめとする造血幹細胞は、血球系だけでなく血管内皮細胞にも分化し、生体の虚血部位における血管新生に寄与している (Asahara ら、1997)。ラットを用いた実験結果によれば、造血幹細胞は脳虚血部位に生着し、脳内毛細血管網の新生を促して虚血部位を縮小させるという効果がある。また、vascular endothelial growth factor (VEGF)、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、insulin-like growth factor 1 (IGF1) などの増殖因子を放出し、神経新生を促進する効果も有している (Taguchi ら、2004)。さらに、新生された神経細胞により虚血部位に機能が回復することが最近の研究により明らかにされている (Shu et al, 2006)。脳梗塞モデルにおいては、虚血により脳血流閥門が障害されているため、造血幹細胞は末梢血管からの投与でも効率よく障害部位に動員され、治療効果を発揮する。そのため、造血幹細胞移植は脳梗塞の新規治療手段として脚光を浴びている。近年では、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病等の神経変性疾患、外傷による脳損傷、脊髄損傷への治療にも応用される可能性が広がっている (Sasaki ら、2004; Bouchez ら、2008; Sadan ら、2009)。

一方、精神疾患への治療応用については、まだ十分に検討がなされていない。最新の研究報告では、ラット脳に対する造血幹細胞移植は海馬の神経新生を亢進させ、抗うつ効果に類似した行動の変化をもたらすことが示されており、うつ病などの精神疾患に対する有用性が示唆されている (Tfilin ら、2009)。しかし、これらの先行研究では、造血幹細胞の移植は海馬への直接注入、または脳室内投与によって行われており、侵襲が大きくヒトへの応用が想定されていない。また、うつ病においては、脳血流閥門は障害されていないため、末梢血管からの移植では造血幹細胞の脳での利用率が著しく低下する。従って、造血幹細胞移植を精神疾患の治療に応用するためには、安全に、かつ効率よく細胞を脳内に生着させる手技を確立する必要がある。そのためには動物モデルを用いた基礎データを得ることが必須である。

本研究では、ラットを用い、末梢血管より移植した造血幹細胞を効果的に脳内に生着させる手技を開発する。すなわち、ラットにヒト CD34 陽性細胞を移植し、脳血流閥門の開放、CD34 陽性細胞の可動化を促すエリスロポエチンの投与による脳内生着率の変化を観察する。実験モデルが確立された後、移植によって生じる行動学的変化、脳内血管新生、神経新生の変化に関する検討を加え、うつ病に対する造血幹細胞移植の実現に向けた基礎的データを取得する。

2. 研究の目的

うつ病では、その脳内で血流量の低下が起きている。脳内血流量はうつ病の症状の改善とともに回復する。本研究では、ヒト CD34 陽性細胞による脳内毛細血管網の新生を促すことがうつ病の治療に有効であるかどうか、ラットを用いて実験的に検証する。具体的には、ヒト CD34 陽性細胞の末梢投与による脳内毛細血管網の新生を促す手法を開発し、次いで、その抗うつ効果を検討する。

3. 研究の方法

①実験動物、ヒト CD34 陽性細胞 : Sprague Dawley 系雄ラットを用いる。使用する CD34 陽性細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより購入する。

②ヒト CD34 陽性細胞の移植方法の確立 (使用ラット数 12 匹、期間 2 ヶ月、平成 22 年度) : シクロスポリンによる免疫抑制後、ケタミン麻酔下に動物を仰臥位で手術台上におき右大腿静脈を露出し、CD34 陽性細胞 (2×10^5 または $1 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$) をハミルトン・マイクロシリンジで 5 分間かけて大腿静脈内に注入する。移植後、ラットを包水クロラールによる深麻酔下に還流固定し、CD34 陽性細胞の生着率、脳内血管新生、神経新生を免疫組織学的に検討する。

③脳血管閥門の開放処置の検討 (使用ラット数 144 匹、期間 18 ヶ月、平成 22 年度～平成 23 年度) : 脳血管閥門開放による移植細胞の生着率の違い、処置の最適な時期を検討する。脳血管閥門開放処置としてマンニトール投与、電気けいれん処置を選択し、それぞれを CD34 陽性細胞の移植と平行して経時的に行う。以上の実験はケタミン麻酔下で行う。免疫組織学的観察により CD34 陽性細胞生着率、脳内血管新生、神経新生について対照群との比較検討を行う。

④行動学的実験 (使用ラット数 90 匹、期間 6 ヶ月、平成 22 年度～平成 23 年度) : 確立された細胞移植法によって生じる脳血管新生、神経新生が抗うつ薬様作用、抗精神病様作用を有するかを行動学的実験により検討する。細胞移植ラットに対し、open field test による基礎運動量の評価後、強制水泳テスト (うつ病モデル)、pre-pulse inhibition (統合失調症モデル) を施行し、CD34 陽性細胞移植の抗うつ薬様作用、抗精神病様作用の有無を検索する。行動実験終了後、抱水クロラールによる深麻酔下に還流固定し、CD34 陽性細胞生着率、脳内血管新生、神経新生と抗うつ薬様作用、抗精神病様作用の相関を免疫組織学的に検討する。

以上の計画により、CD34 陽性細胞移植の精神疾患に対する応用可能性について検討を加える。

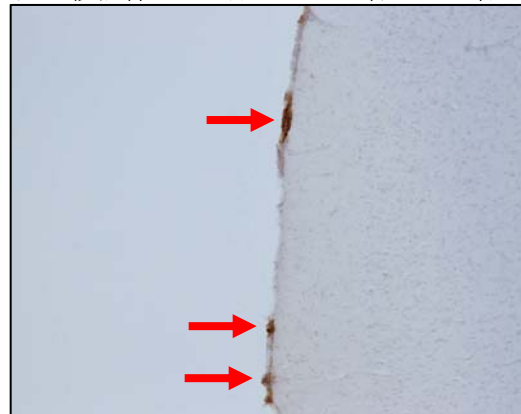
4. 研究成果

平成 22 年度は、ヒト CD34 陽性・造血幹細胞の末梢投与による脳内毛細血管網の新生を促す手法の開発に主眼をおいた。

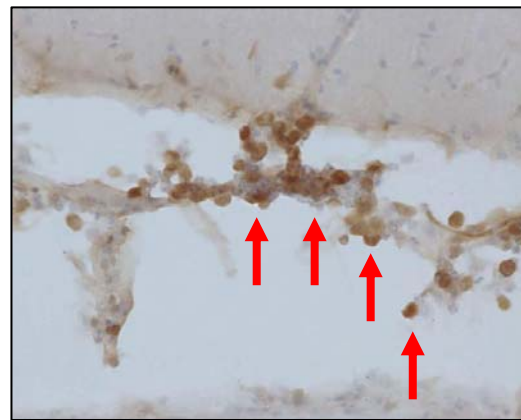
まず、マンニトールを投与して血液-脳関門を開放し、Evans Blueによりこれを確認した。次に、CD34 陽性・造血幹細胞を尾静脈より注入し、シクロスポリンの連日投与を行って細胞の生着を促した。そして、脳内血管に生着するか否かを、抗ヒト核抗体を用いた免疫組織学的染色法により検証した。しかし、作成した切片にはほとんどシグナルを認めず、幹細胞の生着を確認することができなかった。そこで、肺・肝臓の切片についても免疫組織学的に確認したが、シグナルを認めなかった。投与する細胞量やマンニトールの濃度・速度を変更するなど条件を変更したが、結果は陰性であった。そのため、投与経路を頸動脈に変更して幹細胞注入を行ったところ、脳内毛細血管への生着を確認することができた（下図参照）。平成 23 年度は、さらに移植細胞の生着率が最も高い条件を決定し、移植法の確立後、基礎行動量、不安関連行動、強制水泳テストによる抗うつ効果の検討を行う予定であった。

しかし、移植後 1 週間以内に死に至る例が多く認められた。十分な免疫抑制薬の投与は行っていたため、GvHDなどによる死亡率の増加は考えにくかった。さらに、様々な実験手法の変更を行ったものの原因は特定できず、1 週間以上の生存率は 60% を越えなかったため、最終年度限りで研究の継続を断念するに至った。

図 移植幹細胞の脳内毛細血管への生着



脳室周囲



脈絡叢



末梢血管

免疫染色+HE 染色

- ・ 1 次抗体 : Anti-Human Nuclei, MAB 1281, mouse, Monoclonal Antibody
- ・ 2 次抗体 : Vector BA-2001 Anti-IgG(H+L), Mouse, Horse-Poly, Biotin

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀野 陽亮 (KAMENO YOSUKE)

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：40537255

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし