

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成24年度～平成24年度

課題番号：24659660

研究課題名（和文）慢性期脳梗塞への Cell-based Cytokine Delivery 戦略検証

研究課題名（英文）Cell-based Cytokine Delivery strategy for chronic cerebral infarction

研究代表者

松山 晃文（MATSUYAMA AKIFUMI）

（公財）先端医療振興財団 再生医療開発支援部 部長

研究者番号：10423170

研究成果の概要（和文）：F344 脳梗塞完成個体に対し、syngenic 移植となる F344 個体由来 ADMPC と従来から脂肪組織由来幹細胞といわれる ADSC を経尾静脈的に投与したところ、F344 個体由来 ADMPC では行動解析にて改善傾向を認めた。一方、従来法で採取培養された ADSC では改善効果を認めなかった。サイトカイン分泌を確認したところ、とくに HGF の分泌が ADMPC では ADSC に比較して高値であり、HGF の分泌採用が作用の一機序であると推定された。今後、ADMPC の有する免疫・炎症制御作用も有効性発揮機序に寄与しているかを検討することとしている。

研究成果の概要（英文）：

INTRODUCTION: Stem cell therapy can promote good recovery from stroke. Several studies have demonstrated that adipose tissue-derived cells are safe and effective. However, more information regarding appropriate cell type is needed from animal model. This study was targeted at analyzing the effects in ischemic stroke of intravenous (i.v.) administration of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (ADMPCs) and adipose-derived-stem cells (ADSCs) on functional evaluation results. METHODS: ADMPCs or ADSCs were administered intravenously 30 minutes after permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) to rats. Infarct volume was analyzed by histologically. Function was evaluated by the Rogers and rotarod tests. RESULTS: Compared to infarct group, function had significantly improved after i.v. administration of ADMPCs but not ADSCs. Reduction in infarct volume was observed in the ADMPC-transplanted group but not in the ADSC-one. CONCLUSIONS: i.v. administration of ADMPCs but not ADSCs, in pMCAO infarct was associated with good functional recovery, and reductions in infarct volume.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：再生医学 脳血管障害学

## 1. 研究開始当初の背景

脳血流障害に伴う虚血性脳梗塞は、超急性期に血栓溶解療法や自然開通などにより血流再開が得られない限り、その障害範囲の大小により意識障害、運動機能障害、感覚障害、高次機能障害などの神経機能障害を罹患者に残す。このため脳梗塞治療は超急性期ないしは急性期における虚血性脳損傷の進行・拡大の予防がターゲットとされ、分担研究者の田口らは骨髄単核球による急性期脳梗塞治療臨床研究を実践している。これは骨髄由来細胞の神経分化能よりも、むしろその神経保護作用に着目した急性期治療であるといえる。骨髄由来単核球そのものの神経系への分化効率は高くはないため、脳梗塞慢性期の神経組織再生と機能改善を明確に示した報告は今のところない。

## 2. 研究の目的

新規脂肪組織由来幹細胞である脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) は脂肪組織から抽出される間葉系細胞集団である。ゴルジ装置の発達が未熟で接着性が低く、細胞代謝活動においてミトコンドリア比率が低く解糖系に ATP 産生を依存しているという特徴を有し、多能性幹細胞にその代謝活動に近い (Okura et al. 投稿中)。多くの間葉系幹細胞と同様、骨、軟骨、脂肪組織などへの分化誘導が可能であるのみならず (Komoda et al. Tissue Eng Part A. 2009.)、*in vitro* で肝臓、膵島細胞へと分化誘導可能で (Okura et al. JAO. 2009. Okura et al. Tissue Eng Part C, 2010.)、*in vivo* で心筋、肝臓へと

誘導するという特性を持つ (Okura et al. Tissue Eng Part C. 2009., Tissue Eng Part C. 2010., Okura et al. Tissue Eng Part C. 2011., Saga et al. BBRC. 2011.)。ヒト脂肪組織は比較的安全に採取でき、しかもそれら ADMPC は多量に単離、増幅できることから、再生医療への利用にとって有利な幹細胞ソースと考えられる。

さらにこの ADMPC は、*sox10* 発現する神経堤細胞へも誘導可能で当該誘導細胞から角膜内皮細胞へと分化誘導可能だけでなく (Soeda et al. 投稿準備中)、*nestin*、*sox2*、*nanog*、*sox1* など神経系系統発生に必須のマーカー発現を示す細胞への誘導が可能で、*in vitro* にて無血清培地にて *Tu-j1* や *NF 200* (Neuro Filament 200) を発現する神経系細胞へと誘導でき、神経系修復に応用できる可能性が示唆される。

これら ADMPC から神経系細胞へと誘導したのち、慢性脳梗塞に治療効果を有するかを検討し、その **Confidence in Mechanism** を得ることを目標とするに、その作用機序にかかる検討が必須となる。胚性幹細胞あるいは人工多能性幹細胞から誘導した神経系細胞にあっても、それら神経系に誘導した細胞が、生体内で神経系組織として生着するかには異論がある。特に、経静脈的に投与した細胞が、肺循環を経由して慢性脳梗塞部位に局所的に生着し、かつその生着細胞数が治療効果を有するかは、検討すべき課題であろう。すなわち、検討すべき課題は、

- ① ADMPC (神経系誘導および非誘導) が慢性脳梗塞巣に生着するのか
- ② ADMPC (神経系誘導および非誘導) が慢性脳梗塞巣の組織所見を改善さ

せるのか

- ③ 梗塞巣組所見を改善させるとしたらその作用機序がサイトカイン分泌によるのか (Cell-based cytokine delivery であるのか) である。

### 3. 研究の方法

Cell-based cytokine delivery という再生細胞医療にとっての新規戦略に展開可能性があるのかを検討する。そのため、

- ④ ADMPC (神経系誘導および非誘導) が慢性脳梗塞巣に生着するのか  
⑤ ADMPC (神経系誘導および非誘導) が慢性脳梗塞巣の組織所見を改善させるのか  
⑥ 梗塞巣組所見を改善させるとしたらその作用機序がサイトカイン分泌によるのか (Cell-based cytokine delivery であるのか) の3点につき、pilot study を行う。

- ① ADMPC (神経系誘導および非誘導) が慢性脳梗塞巣に生着するかの検討

ADMPC (神経系誘導および非誘導) に加えて研究分担者の田口らが開発してきた骨髓由来単核球を対照群として用いる。具体的には、それら細胞を蛍光標識したのち梗塞モデルマウスに経尾静脈経由投与を行い、肺にトラップされる細胞数と脳内に分布する細胞数を組織学的に計測する。マウス脳梗塞モデルは研究分担者田口らが開発した極めて再現性の高い手法を用いる。蛍光色素は GFP あるいは Venus のような緑色色素タンパクによる細胞標識だけでなく、赤色あるいは青色蛍光色素タンパクを用いることで、上記細胞種の生着比率を検証することが可能となる。具体的には、赤色標識した骨髓由来単核

球と緑色標識した神経系誘導 ADMPC を同数経尾静脈経由で投与し、翌日、7日後14日後と経時的に脳内標識細胞の赤色・緑色比率を確認すれば、いずれの細胞が脳内で生着しているかの判別が可能である。組織学的に細胞数を計測するだけでなく、酵素処理にて細胞を単離し、FACSにて比率検証も実施する。加えて、松山らが開発した定量的 *Alu*-PCR法 (Okura et al. *Tissue Eng Part C*. 2011) を用い、生着比率について検討する。

- ②ADMPC (神経系誘導および非誘導) が慢性脳梗塞巣の組織所見を改善させるのか

冠状断によるマクロ画像による観察に加え、新生血管を中心に血液脳関門について観察する。血液脳関門については、インドシアニグリーン溶出試験、あるいは墨汁法によるマクロ的な検討と、電子顕微鏡的なミクロ観察にて検証を行う。

次いで、梗塞巣の改善が認められるのであれば、ADMPCの神経系細胞への分化によるのか、生着後の血管新生によるのかを検証する必要がある。In vitroにて神経系に誘導あるいは非誘導のDiI赤色蛍光標識ADMPCの脳内生着を顕微鏡的に観察し、それら細胞が神経系細胞として機能しているか、NF200あるいはNF68といった中間系フィラメントを指標とする。native神経幹細胞の活性化によると想定されれば、Ki67による細胞増殖観察も交えて検討を加える。慢性期にあつては、グリオシスの程度について特に検証を行う。

神経機能回復の検証については、神経症状 (運動機能障害) の固定後 (脳梗塞作成より2週間後)、患側内頸動脈より神経系細胞に分化誘導・非誘導のADMPCを投与し、投与後1, 2, 4, 8, 12週で評価を行い、組織学的データとの整合性につき検討を加える。

③梗塞巣組所見を改善させるとしたらその作用機序がサイトカイン分泌によるのか

梗塞巣組所見を改善させる機序がサイトカイン分泌によるのか検討するため、*in vitro*では投与細胞におけるサイトカイン網羅解析を行い、*in vivo*での神経機能改善度、組織学的変化の相関性を検討する。経尾静脈的細胞投与で慢性脳梗塞が改善を認めるのであれば、それがサイトカイン等神経栄養因子によると想定するのが合理的である。特に、梗塞巣局所での細胞生着に比して組織所見の改善が著しい場合に検討すべき課題である。神経系細胞へと分化誘導した ADMPC が神経栄養因子を発現している場合、それが周囲の損傷をうけた細胞群を活性化させていると想定されるため、投与して脳内に生着した ADMPC そのものが神経細胞として生着機能しているのではなく、サイトカインを適切なタイミングで分泌していることを確認する。

上記3項目にて、Cell-based cytokine delivery という戦略が脳梗塞治療にとりうるかを検証し、feasible study として展開可能性が示せれば、脂肪組織由来多系統前駆細胞の脳梗塞治療への展開に向け、中大動物での検証を開始する。

#### 4. 研究成果

内頸動脈を閉塞し3時間後に再開通する栓子法にてラットF344の梗塞モデルを用いることとした。まず、脳梗塞の完成度の評価手法として、組織学的な検討と行動学的、生理学的な指標をもとに検索、①行動学的にはRotor rod試験にてスコアが4.5以上、②生理学的な指標として深部体温が39度を超える、の2項目

を満たす個体を梗塞完成動物として実験に供すべきであることを明らかとした。次いで、F344脳梗塞完成個体に対し、syngenic移植となるF344個体由来ADMPCと従来から脂肪組織由来幹細胞といわれるADSCを経尾静脈的に投与したところ、F344個体由来ADMPCでは行動解析にて改善傾向を認めた。一方、従来法で採取培養されたADSCでは改善効果を認めなかった。サイトカイン分泌を確認したところ、とくにHGFの分泌がADMPCではADSCに比較して高値であり、HGFの分泌採用が作用の一機序であると推定された。今後、ADMPCの有する免疫・炎症制御作用も有効性発揮機序に寄与しているかを検討することとしている。

#### 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)

[雑誌論文] (計7件)

1. Komoda H, Okura H, Lee C-M, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y and Matsuyama A. Reduction of Neu5GC Xenoantigen on Human ADMSCs lead to Them as Safer and More Useful Cell Sources for Realizing Various Stem Cell Therapies. Tissue Eng Part A. 査読有 16(4).2010. 1143-1155.
2. Okura H, Yamashita S, Tohru Ohama, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Ohyama R, Sawa Y and Matsuyama A. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. 査読有 J Atheroscler Thromb. 17(6) 2010. 568-577
3. Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. Tissue Eng Part C Methods. 査読有 16(3) 2010. 417-425

4. Okura H, Saga A, Soeda M. Ichinose A, Matsuyama A. Adipose Tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells as a Promising Tool for *In Situ* Stem Cell Therapy. *Current Tissue Engineering*, 査読有 In press. Accepted date at 03 Jan. 2012.
5. Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Komuro I, Yamashita S. Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb.* 査読有 19:2011. 263-275.
6. Masuda D, Sakai N, Sugimoto T, Kitazume-Taneike R, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Masuda Y, Matsuyama A, Komuro I, Yamashita S. Fasting Serum Apolipoprotein B-48 Can be a Marker of Postprandial Hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 査読有 18: 2011: 1062-1070.
7. Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T, Okano T. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today*. 査読有 42: 2012. 181-184.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：「心筋指向性細胞を含む細胞製剤」  
発明者：松山晃文・大倉華雪  
権利者：理化学研究所・大阪大学・（公財）  
先端医療振興財団  
種類：特許出願  
番号：特願2012-100362  
出願年月日：2012年4月25日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山晃文 (MATSUYAMA AKIFUMI)

(公財) 先端医療振興財団

再生医療開発支援部 部長

研究者番号：10423170

(2) 研究分担者

田口 明彦 (TAGUCHI AKIHIKO)

(公財) 先端医療振興財団

再生医療研究部 部長

研究者番号：10359276