

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462238

研究課題名(和文) 脳梗塞integrated surgical cell therapyの確立

研究課題名(英文) Integrated surgical cell therapy for acute cerebral infarction

研究代表者

折戸 公彦 (ORITO, KIMIHIKO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50597408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞に対し、神経再生を促進させる目的の研究である。(1)急性期脳梗塞に対し、間接血行再建術およびGCSF(顆粒球コロニー刺激因子)投与、骨髄間葉系細胞採取を行っておき、急性期は血管新生、神経栄養因子などの補充を目的とする。(2)慢性期の完成した脳梗塞巣に対し、血管新生にて再建された血行路より骨髄間葉系細胞の移植を行い、より効率的な神経再生を期待した。90分MCAOに対し、間接血行再建術およびGCSF投与を行い、側頭筋に骨髄間葉系細胞の注入を行った。結果として梗塞巣周囲に移植細胞の集簇を確認している。しかし、神経機能の改善は有意な差が認められなかった。更なる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：A purpose of this study is to promote the neural regeneration of the cerebral infarction lesion. For acute cerebral infarction, we give indirect bypass and GCSF. We obtain bone marrow stromal cells at the same time. It is intended to supplement of angiogenesis and the neurotrophic factor for the acute phase. To cerebral infarction of the chronic stage, we hoped that bone marrow stromal cell became easy to reach it through a new route made with angiogenesis. Indirect bypass and GCSF administration were provided for MCAO(90min). We injected bone marrow stromal cell into temporal muscle. As a result, we confirmed that transplant cells did colonization around a cerebral infarction lesion. However, in improvement of the neurologic function, we did not demonstrate a significant difference. A further study is necessary.

研究分野：脳神経外科

キーワード：間接血行再建術 骨髄間葉系細胞 顆粒球コロニー刺激因子 細胞移植 中大脳動脈閉塞モデル 血管新生

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は日本において毎年 50 万人が発症しており、全医療費の 1 割、寝たきり原因の 3 割を占める医学的、社会的に重要な疾患である。脳梗塞の有効な治療法の開発は生命予後の面のみならず、医療費などの面からも必要である。

脳梗塞超急性期における、rt-PA やカテーテルを用いた再灌流療法は近年目覚ましい発展を認めており、再灌流のえられた症例においては良好な予後が期待される。

しかし、時間的適応より外れた症例や、治療にも関わらず梗塞巣が完成された場合には有効な治療法が確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、完成した脳梗塞に対し長期的な見地から神経再生を促進させる目的で以下の治療研究を行う。

(1)急性期：間接行再建術＋GCSF（顆粒球コロニー刺激因子）＋骨髄間葉系細胞採取：血管新生、神経栄養因子等の分泌を促し、同時に骨髄間葉系細胞の採取培養を行う

急性期には血管の新生を促す目的で間接血行再建と GCSF の投与を行い、血管新生により脳梗塞の軽減を目的とする。それと同時に骨髄採取を行い、細胞移植に向けて培養をしておく

(2)慢性期：完成した梗塞巣に対し血管新生にて再建された血行路より骨髄間葉系細胞を移植を行う。

以上により脳梗塞に対する治療を、発症からそれぞれ時期に行う事で、全体としてより効率的な治療を確立する事を目的としている。

3. 研究の方法

(1)ラットに 90 分の一過性中大脳動脈閉塞モデル (MCAO) を作製。

(2)間接血行再建術および GCSF 投与

(3)骨髄間葉系細胞の採取培養

(4)虚血脳への血管新生の評価

①HE 染色

②免疫染色

③電子顕微鏡

(5)運動機能、神経学的機能評価、脳血流評価

4. 研究成果

(1)ラットにて 90 分の一過性中大脳動脈閉塞モデル (MCAO) の安定した作製方法を樹立

①耳鏡にて喉頭展開を行い、14G のアンギオカットをガイド下に挿入

②ベンチレーターにて呼吸管理

③直腸温プローベを挿入、体温を 37°C に管理

④右側頭筋を剥離し、側頭骨に接するように

レーザードップラープローベを挿入

⑤脳血流モニターで血流が下がる部位まで 4-0 ナイロンを内頸動脈へ挿入し、90 分の虚血負荷を与える

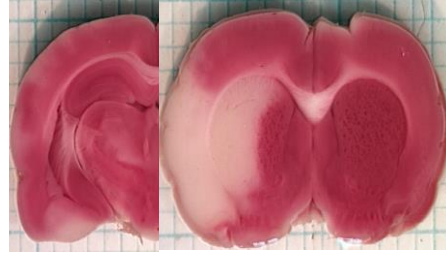


図 1. MCAO 90min モデル (TTC)

(2)間接血行再建術および GCSF 投与方法

①腹臥位にて頭部を正中切開、帽状筋膜を頭蓋骨から剥離し、展開

②右頭蓋骨の登頂部に直径 5mm の craniotomy を作製

③軟膜に一部切開を加え、皮膚を戻し縫合

④側頭筋または皮下に GCSF の注入を行う

(3)骨髄間葉系細胞の採取培養方法を確立

①7weeks の Lewis ラット雄を用いる

②腹腔内臓器を避け、大動脈を 24G のアンギオカットで確保、へパ水で下半身を wash out を行う。

③大動静脈とも cut

④両側大腿骨を採取し、生食内で保存

⑤大腿骨内を 18G で削り出し、Ficoll-paque PLUS にて顆粒球の層を分離

⑥ α -MEM (20%FBS) にて培養を行う

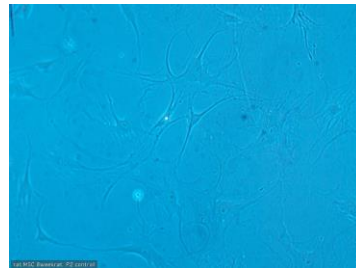
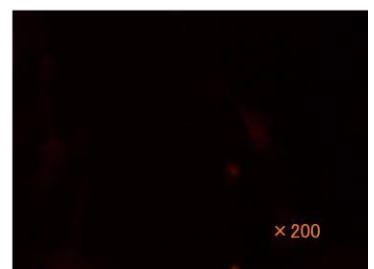
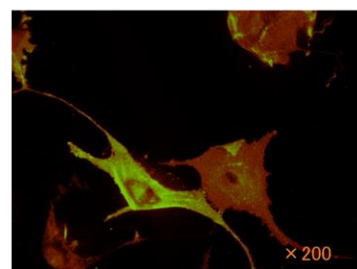
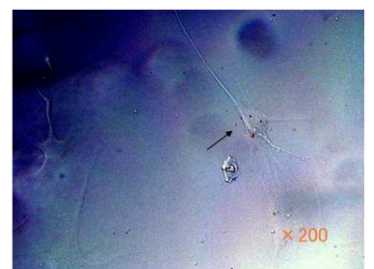


図 2. 8weeks P2



CD 90

CD 34

図 3

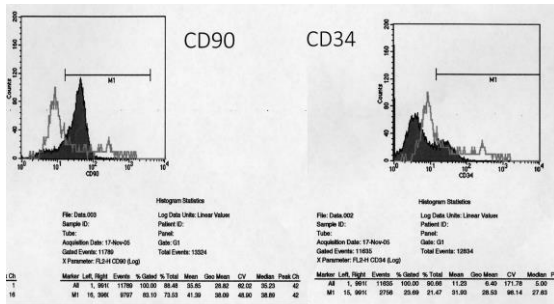


図 2 の示すように、初期培養を行った骨髄間葉系細胞の染色を行ったところ、CD90 で陽性、CD34 で陰性であることを確認できた。

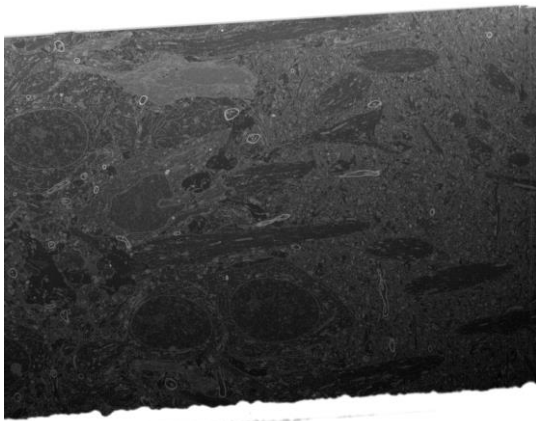
FACS scan にてそれぞれの陽性細胞の陽性率を検討したところ、CD90 83.1% CD34 23.7% であり、骨髄間葉系細胞の特徴として矛盾しない所見であった。

(4) 虚血脳への血管新生評価

① 間接血行再建を行った部位において、脳表に新生血管が確認されるかどうかを検討した。

これまでに我々は、間接血行再建を行った部位の HE 染色において、帽状筋膜下の間隙組織内に新生血管の数が増える事を報告しており、その部位において電子顕微鏡での評価を行った

図 4 電子顕微鏡頭微鏡



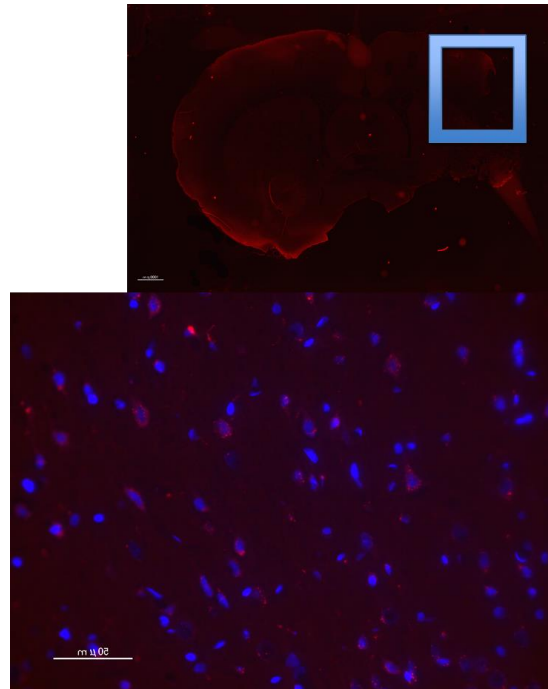
間接血行再建を行った部分は、脳表に帽状筋膜が付着している状況であり、理想としては連続切片にて帽状筋膜から新生血管が連続して脳内に入って行くスライスが切り出せるのが望まれたが、筋膜と脳表の接続は弱く、一塊としての処理が困難であった。

梗塞巣の存在する側の皮質領域の組織を検討してみたが、脳内に浸潤するような新生血管は確認できなかった。また脳梗塞側の海馬 CA1 も電子顕微にて評価を行ったところ、pyramidal cells が脱落したと考えられる所見が認められた。

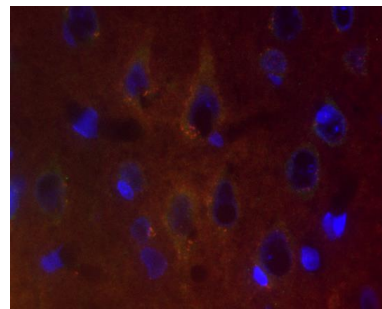
② 脳表と接する側頭筋内に骨髄間葉系細胞を直接注入する事により、脳内への移動、分化が可能かどうかを検討した。

上記 (3) にて示した方法で骨髄間葉系細胞を用意し、P3 の状態の細胞に対し Dye1 にて標識を行い、 5.0×10^6 個ずつ側頭筋内へ注入を行った。

図 5 脳内における移植細胞の確認



脳内、梗塞巣周辺



NeuN 発現細胞

MCAO 作製後 2 週間経過したラットに対し、骨髄間葉系細胞の注入を行い、さらに 2 週間後に評価を行った。

移植細胞 (赤) と DAPI (青) を合わせる事で、脳内へ移植細胞が定着していることが確認された。

更に、NeuN を merge させる事で NeuN を発現した移植細胞を確認する事が出来た。

以上より移植された骨髄間葉系細胞が脳内へ移動していることが確認された。そのため、間接血行再建術後の領域を通過して筋肉内に投与された細胞が脳内へ到達することが可能であると示唆された。

(5)今後の課題

この研究において、直接脳表に置いた組織から脳内への連続した新生血管は指摘する事が出来なかったが、脳表の組織内に注入した細胞が脳内へ移動した事が確認でき、間接血行再建術は脳梗塞患者に対する細胞移植の経路としては可能性が考えられた。

しかし、全身投与された細胞も梗塞巣へ血流にのって集まる可能性は否定できず、全身投与群との比較も必要と思われた。

また、今回は記していないが、細胞移植を行ったラットと control との間に神経学的 score で差は認められなかった。

治療としての有用性を示すために条件の検討や評価方法等をさらに検討していく必要がある。

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 3 件)

- ① Orito K, Hirohata M, Morioka M: "Leakage sign" for primary intracerebral hemorrhage: a novel predictor of hematoma growth, 査読有 Stroke, 47, 2016, 958-963
DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.011578
- ② 折戸公彦、広畑優、森岡基浩、脳の病気：診断から治療まで 7. 脳血管疾患の治療、査読無、日本放射線技術学会雑誌、71、2015、542-548 DOI: 10.6009/jjrt.2015_JSRT_71.6.542
- ③ 森岡基浩、折戸公彦：II. 感染性疾患 5. 細菌感染症 (2)脳膿瘍. 新領域別症候群シリーズNo.26 神経症候群(第2版)(I) -その他の神経疾患を含めて- 査読無 日本臨床社 2013: 738-742

[学会発表] (計 3 件)

- ① 折戸公彦、森岡基浩、齋藤秀之、バルビツレート療法の新たな可能性: step-down infusion method, 第39回日本脳神経外傷学会 2016. 2. 26-27 (仙台国際センター・仙台)
- ② 折戸公彦、広畑優、森岡基浩、内頸動脈硬膜枝に対する術前腫瘍塞栓術の有用性について、第31回日本脳神経血管内治療学会総会 2015. 11. 19-21 (ホテルグランヴィア岡山・岡山)
- ③ Orito K, Ohmori Y, Morioka M, Granulocyte-colony stimulating factor enhances the angiogenic effect of indirect bypass surgery for chronic cerebral hypoperfusion in a rat model. 45th Annual Meeting of Neuroscience 2015, 2015. 10. 17-21 (シカゴ・アメリカ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

折戸 公彦 (ORITO Kimihiko)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：50597408

(2) 研究分担者

森岡 基浩 (MORIOKA Motohiro)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：20295140

原田 秀樹 (HARADA Hideki)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：30198923

(3) 連携研究者