

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861282

研究課題名(和文)脳梗塞に対する幹細胞移植後の機能回復の内在性修復メカニズムの解明

研究課題名(英文)Endogenous repair mechanisms after human stem cell transplantation following stroke

研究代表者

日宇 健(HIU, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：00404260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：移植されたヒト神経幹細胞がホストの内在性修復機構を促進するという仮説を基に機能回復の内在性修復メカニズムを検証した。

ヌードラットに中大脳動脈脳梗塞モデルを作成し、1週間後にヒト神経幹細胞を同側皮質に定位置植した。機能回復は移植4週間後でみられた。独自に開発した高解像度イメージングを駆使したarray tomographyにて、シナプスの定量化を行い、皮質第5層に興奮性シナプスが増加することが明らかとなった。神経幹細胞移植に伴うシナプスの変化をin vivoで捉え、synaptogenesisが機能回復に一致して起こることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Vehicle or human neural progenitor cells (hNPCs) derived from fetal cortex were transplanted into the ischemic cortex of Nude rats at 7 days after distal middle cerebral artery occlusion. Transplantation of hNPCs significantly improved behavioral recovery after stroke compared to vehicle-treated rats at 4 weeks post-transplantation. hNPC-treated rats had a higher density of glutamatergic synapses in layer 5 at 4 weeks post-transplantation, compared to vehicle-treated rats. These results provide novel new information about the organization of synaptic circuitry and its plasticity after stem cell therapy. These data suggest that stem cells alter the synaptic remodeling of glutamatergic synapses after stroke and this is coincident with stem cell-induced functional recovery.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経幹細胞 脳梗塞 シナプス

1. 研究開始当初の背景

(1)これまでの脳梗塞研究においては、発症急性期における血栓溶解療法(t-PA)静注による再開通療法やエダラボンによる脳保護療法に焦点が置かれてきた。しかしながら現状では急性期脳梗塞治療にて恩恵を受ける患者はあくまで一部であり、今後は慢性期患者への治療のアプローチが必要とされる。そこで再生医療はブレイクスルーとして非常に期待されている。

(2)申請者のグループを含み、いくつかのグループから、動物脳梗塞モデルにおける機能障害への幹細胞移植の有効性が報告されている。臨床応用としては脳梗塞患者に外来性に神経幹細胞を移植し神経学的予後の改善が見られたと報告しており、現在 10 を超える clinical trial が進行中である。申請者らのグループは脳梗塞モデル動物に対しヒト神経幹細胞移植を行い、angiogenesis、axonal sprouting、dendritic plasticity について報告した。脳梗塞に幹細胞移植が有効な治療であることに疑いの余地はないが、移植された幹細胞がどのように機能回復を図るのか、特に宿主側脳にどのような分子シグナルが機能変化を来すのか、メカニズムに言及した報告はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本邦においては、高齢化に伴い、脳梗塞による寝たきり患者は増加の一途であるが、慢性期の有効な治療法はなく、医療財政を圧迫する大きな要因となっている。そのような状況下で脳梗塞に対する再生医療の基礎的研究は精力的に進められ、近年では神経幹細胞の臨床治験により human での機能回復の可能性が言われている。しかし幹細胞による治療効果は多彩な作用メカニズムが時間的にも空間的にも多段階的に作用するため、未解決の問題も数多く残されている。脳梗塞に対する再生医療の内在性修復メカニズムを解明し、慢性期脳梗塞に対する再生医療の将来的な臨床応用を目指す。

神経幹細胞移植における内在性修復メカニズム、特にシナプスの関与に着目した。シナプスは前シナプスである軸索と後シナプスである樹状突起の接続部位であり、シグナル伝達などの極めて重要な神経活動に関わり、脳の高次機能と密接に関連している。興奮性シナプスであるグルタミン酸シナプスと抑制性シナプスである GABA シナプスに分けられる。脳梗塞発症直後から数日の間、梗塞周辺部ではニューロンは生存するものの樹状突起の棘突起は失われシナプス活性は障害される。1-4 週間の間で growth-promoting process が上昇し樹状突起の棘突起のターンオーバーが起こり 4-8 週にシナプスの結合が増強する。このように脳梗塞後には梗塞周辺部でシナプスの劇的な変化を認めることが報告されている。シナプスはコネクソーム

の機能的なユニットであるため、脳梗塞後の機能回復にはシナプスの可塑性の変化が大きく影響している。

その中でも脳梗塞におけるグルタミン酸シナプスの役割には時期により 2 面性がある。脳梗塞発症直後の hyperexcitability は神経細胞死を誘導し有害であるものの、一方で機能回復である慢性期には hyperexcitability は Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) シグナルを増強させ機能回復に有効に作用する。

本研究では神経幹細胞移植における内在性修復メカニズム、特にシナプスの関与を検証した。

3. 研究の方法および結果

ヌードラットを用いて distal MCA occlusion モデルを作成し、梗塞 1 週間後にヒト神経幹細胞を患側大脳皮質に定位置植 (1 × 10⁵ cells/site, 3-4 sites) し、cylinder test, whisker-paw test, modified neurological severity score test にて 1 週毎に機能評価を行った。定位置植 3 週-4 週間後に細胞移植群で機能回復を来した(図 1)。

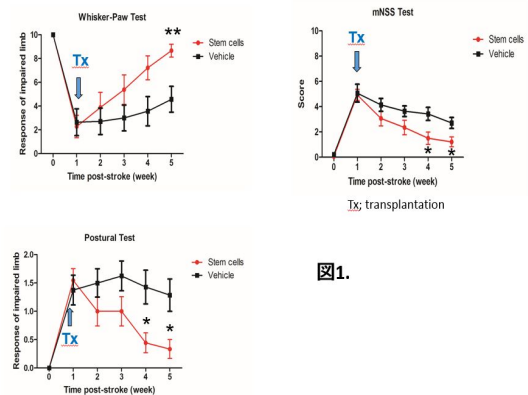


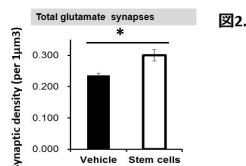
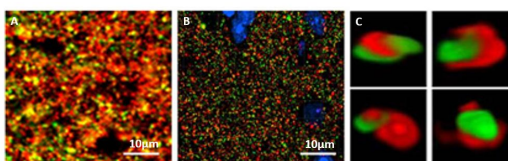
図1.

梗塞周辺部において著明に血管新生が亢進し移植後 2 週目にピークがあった。ヒト VEGF 中和抗体 Avastin を移植同日から隔日で投与を行うと細胞移植群にて Avastin 投与群では血管新生が抑制された。また Avastin 投与により機能回復がブロックされ、機能回復には VEGF による血管新生が寄与していることを示した。同側においては移植後 2 週、4 週で皮質第 5 層の錐体細胞の dendrite branching の亢進を認めた。一方、対側では 2 週後に亢進はみられたものの 4 週後には正常化した。axonal sprouting については、脳梗塞後には axon の伸長が亢進し、皮質脊髄路の再構築がなされるとの報告されている。移植 4 週間後に anterograde tracer である biotin dextran amine (BDA) を対側皮質に注入したのち、2 週後に評価した。幹細胞移植は障害側の皮質への axonal sprouting を増強させた。また対側にも axonal sprouting が起こった。移植した幹細胞は 4 週間後においても生存しており、一部は脳梗塞の周辺部位まで遊走した。生着した幹細胞は、成熟した神経細胞であるのは一部で、多くがアストロサイトあるいは未熟な神経

細胞であり、このことは幹細胞からの栄養因子により内在性修復機構が増幅される機序を示唆する。

4. 研究成果

独自に開発した高解像度イメージングである array tomography にて、Z stack を著明に改善させることで個々のシナプスを三次元的に構築し、シナプスの定量化を可能とした。前シナプスマーカーと後シナプスマーカーの colocalization のあるものをシナプスと定義しグルタミン酸シナプスと GABA シナプスの定量化を行った。synapsin と PSD の colocalization のあるものをグルタミン酸シナプスと定義した。



移植後4週間後に梗塞周辺部のシナプスの定量化を行い、グルタミン酸シナプスの増加を認めた。一方で GABA シナプスは増加していなかった。この変化は移植1週間後には認めなかった。機能回復が得られる移植4週間後にグルタミン酸シナプスの増加を認め、グルタミン酸シナプスが機能回復に寄与していることが示唆された。

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6件)

日宇 健, 堀江信貴, Tonya Bliss, 山口将, 福田 雄高, 堤 圭介, 松尾 孝之, 永田 泉, Gary Steinberg, 脳梗塞に対するヒト神経幹細胞移植後の内在性修復メカニズム - 幹細胞は興奮性シナプスを増加させる -, 脳循環代謝, 査読無, 掲載確定

Izumo T, Matsuo T, Morofuji Y, Hiu T, Horie N, Hayashi K, Nagata I, Microsurgical Clipping for Recurrent Aneurysms after Initial Endovascular Coil Embolization, World Neurosurg, 査読有, 83(2), 2015, 211-218

Horie N, Hiu T, Nagata I, Stem cell transplantation enhances endogenous brain repair after experimental stroke, Neurol Med Chir (Tokyo), 査読有, 55(2), 2015, 107-12

So G, Nakagawa S, Morofuji Y, Hiu T, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Matsuo T, Niwa M, Candesartan improves ischemia-induced impairment of the blood-brain barrier in vitro, Cell Mol Neurobiol, 査読有, 35(4), 2015, 563-72

Fukuda Y, Horie N, Satoh K, Yamaguchi S, Morofuji Y, Hiu T, Izumo T, Hayashi K, Nishida N, Nagata I, Intra-arterial transplantation of low-dose stem cells provides functional recovery without adverse effects after stroke, Cell Mol Neurobiol, 査読有, 35(3), 2015, 399-406

Fukuda S, Hayashi K, Horie N, Morikawa M, Yamaguchi S, Morofuji Y, Hiu T, Nagata I, Carotid artery stenting with proximal and distal protection for radiation-induced carotid stenosis: a case report, No Shinkei Geka, 査読有, 42(7), 2015, 635-9

〔学会発表〕(計13件)

Hiu Takeshi, Potentiation of GABA-mediated synaptic inhibition as a novel target for post-stroke recovery, AANS/CNS Joint Cerebrovascular Section Annual Meeting, San Diego (USA), 2014年2月12日-14日

Hiu Takeshi, Potentiation of GABA-mediated synaptic inhibition as a novel target for post-stroke recovery, Internal Stroke Conference 2014, San Diego (USA), 2014年2月12日-14日

Hiu Takeshi, Synaptic remodeling after stroke enhanced by transplanted human neural stem cells is coincident with functional recovery, Internal Stroke Conference 2014, San Diego (USA), 2014年2月12日-14日

日宇 健, 臨床応用に向けた脳梗塞に対するヒト神経幹細胞移植後の内在性修復メカニズム, 第39回日本脳卒中学会総会(シンポジウム), 大阪, 2014年3月13日-15日

日宇 健, 脳梗塞後の機能回復とシナプスの可塑性との関連性: phasic GABA を標的とした新規治療薬の可能性, 第39回日本脳卒中学会総会(シンポジウム), 大阪国際会議場(大阪府), 2014年3月13日-15日

日宇 健, 脳梗塞に対するヒト神経幹細胞移植後の内在性修復メカニズム, 日本脳神経外科学会 第73回学術総会, グランドプリンスホテル新高輪(東京都), 2014年10月9日-11日

Hiu Takeshi, Current management of incidental small (<5 mm) unruptured intracranial aneurysms, 13th Kyushu-Ho Youngnam Neurosurgical Joint Meeting (Luncheon Symposium), Daegu (Korea), 2014年11月8日

日宇 健, 脳梗塞に対するヒト神経幹細胞移植後の内在性修復メカニズム(シンポジウム), 第26回日本脳循環代謝学会総会, 岡山コンベンションセンター(岡山県), 2014年11月21日-22日

日宇 健, 近年における破裂前交通脳動脈瘤治療法選択の動向 長崎 SAH 研究会 data base における過去10年間764例の後方視的検討, 第30回日本脳神経血管内治療学会総会, パシフィコ横浜(神奈川県), 2014年12月4日-6日

Takeshi Hiu, Post-ischemic synaptic remodeling is enhanced by transplanted human neural stem cells, WFNS World Congress of Neurosurgery, Seoul (Korea), 2013年9月8-13日

Takeshi Hiu, Synaptic Remodeling in the Ischemic Brain is Enhanced by Stem Cell Treatment, Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting, San Francisco (USA), 2013年10月19日-23日

Takeshi Hiu, Potentiation of GABA-mediated synaptic inhibition as a novel target for post-stroke recovery, Neuroscience 2013, San Diego (USA), 2013年11月9日-13日

Takeshi Hiu, Post-ischemic synaptic remodeling is modulated by transplanted human neural stem cells, Neuroscience 2013, San Diego (USA), 2013年11月9日-13日

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
日宇 健(HIU, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
客員研究員
研究者番号：00404260