

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26350618  
研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞移植およびリハビリによって誘導される虚血脳の可塑性の基礎的解析

研究課題名(英文) Induced neural plasticity by intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSC) and rehabilitation in ischemic brain

研究代表者  
佐々木 雄一 (Sasaki, Yuichi)  
札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00570136  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、実験的脳梗塞モデルに対するリハビリテーションと骨髄間葉系幹細胞(MSC)の経静脈内投与の併用療法による治療効果を検討した。MSC療法にリハビリテーションを組み合わせることで、リハビリテーション単独群およびMSC療法単独群と比較して、脳梗塞後の運動機能をさらに改善させることが判明した。脳梗塞体積の減少や脳梗塞周辺領域のシナプス新生が運動機能の改善に貢献していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adult bone marrow improves behavioral function in rat stroke models. The purpose of this study was to investigate whether synergic effects of daily rehabilitation and intravenous infusion of MSCs has therapeutic effects after stroke in rats. A permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) was induced by intraluminal vascular occlusion with a microfilament. Rat MSCs were intravenously infused after MCAO induction, and the rats received daily rehabilitation with treadmill running exercise. Both combined therapy and MSC infusion reduced lesion volume, induced synaptogenesis, and elicited functional improvement compared with the groups without MSC infusion, but the effect was greater in the combined therapy group. The data indicate that the combined therapy of daily rehabilitation and intravenous infusion of MSCs improved functional outcome in a rat MCAO model.

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 可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) の経静脈的投与が治療効果を有することを数多く報告してきた。

これまでの基礎研究の知見より、骨髄間葉系幹細胞移植による治療効果のメカニズムは、サイトカインによる神経栄養作用、血管新生、脱髄軸索の再有髓化、神経再生による脳の可塑性の調節、と多段階的に進むことが分かっており、臨床研究の結果より、臨床上の神経症状の回復も、ほぼこれと平行して進むことが判明した。

また、我々の functional MRI (fMRI) を用いた研究では、実験的脳梗塞モデル作成後 6 時間後に経静脈的に MSC を移植し、対側前肢を刺激して動物用 MRI により fMRI で大脳皮質の活動を測定した。その結果、病側の大脳皮質のみの活動が賦活される群と、病側とともに健側の大脳皮質の活動が賦活される群に分けられ、両側の大脳皮質が賦活される群には運動機能の著しい改善を認めることを報告した。

以上より、虚血性神経疾患に対する MSC 移植は、病側皮質の治療効果のみならず健側皮質の活動性を賦活させることが示唆された。この機能回復のメカニズムは、MSC 移植によって、対側からの皮質-皮質、皮質-線条体、皮質-視床および皮質-脊髄間の軸索の構築する神経回路における rewiring の増加が神経機能回復に寄与すると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞モデルラットに骨髄間葉系幹細胞移植とリハビリテーションの併

用療法を行い、相乗治療効果が認められるかどうかを検討し、その基盤となるそれぞれの治療効果と併用したときの機能回復のメカニズムを、脳の可塑性のパターンの変化に注目して、神経回路の再構築、シナプス新生などの観点から詳細に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MSC の培養

SD ラット及び GFP 陽性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 を移植に使用した。

### (2) 脳梗塞モデル

脳梗塞モデルは中大脳動脈永久閉塞 (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCAO) モデルを使用した。ナイロン製の糸を、深麻酔下にした SD ラット (メス、250g-300g) 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。作製した MCAO ラットをランダム化し、vehicle 投与群、リハビリテーション群、MSC 移植群、MSC + リハビリテーション群の 4 群に分けた。

### (3) リハビリテーション

リハビリテーションを行う 2 群 (リハビリテーション群、MSC + リハビリテーション群) には、MCAO 作成 1 日後より毎日 20 分間のトレッドミル走行を 6 週間行った。運動強度は 3 m/min から開始し、1 週ごとに速度を 3 m/min 上げ、6 週後には 18 m/min になるように設定した。

### (4) MSC の投与方法

MSC を移植する 2 群 (MSC 移植群、MSC +リハビリテーション群) には、MCAO 作成 6 時間後に、大腿静脈から MSC を移植した。また、vehicle 投与を行う 2 群 (vehicle 投与群、リハビリテーション群) には、MCAO 作成 6 時間後に、DMEM を 1 ml 大腿静脈より投与した。

#### ( 5 ) MRI の撮影方法

動物用 7 T MRI を使用して、深麻酔下にしたラットの脳の T2 強調画像を撮影した。評価日は MCAO 作成 1 日、14 日 35 日後とした。

また、MCAO 作成 45 日後の T2 強調画像から、脳梁の厚さを測定した。

#### ( 6 ) Limb Placement Test ( LPT )

6 種類のテストから構成される LPT では、損傷半球の対側四肢の機能レベルを計測した。計測日は MCAO 作成 1 日、14 日 35 日後とした。

#### ( 7 ) 免疫組織学的検査

MCAO 作成 50 日後に、深麻酔下にしたラットを脱血・還流固定し、脳組織を採取した。採取した脳を、シナプスの抗体である Synaptophysin を用いて免疫染色を行なった。

#### ( 8 ) シナプスの定量化

運動皮質のレイヤー 1 / 2 レベルにおいて、共焦点顕微鏡を用いて画像を取得し、解析ソフトを用いてシナプス数を定量解析した。

### 研究成果

#### ( 1 ) 脳梗塞体積の継時的変化

脳梗塞の体積では、細胞移植 + リハビリテーション群、細胞移植群、リハビリテーション群、vehicle 投与群の順に有意に体積の減少を認めた ( 図 1 )。

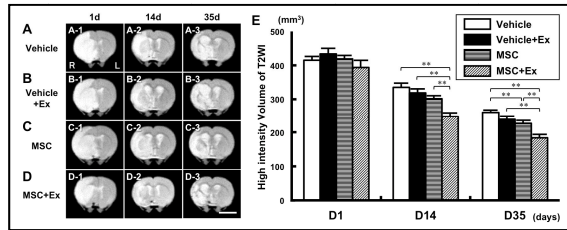


図 1 : MSC 移植にリハビリを併用することで、脳梗塞巣を縮小する。

( Sasaki Y. et al., PTJ, 2016 )

#### ( 2 ) 運動機能の継時的変化

LPT においても細胞移植 + リハビリテーション群、細胞移植群、リハビリテーション群、vehicle 投与群の順に有意に運動機能の改善を認めた ( 図 2 )。

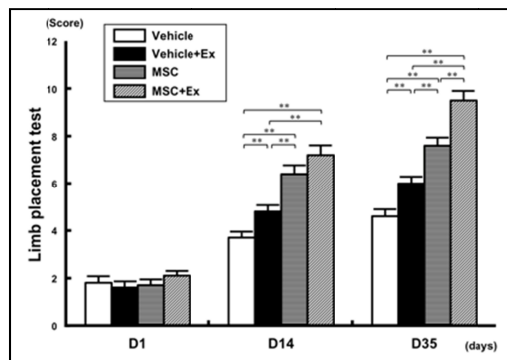


図 2 : MSC 移植にリハビリを併用することで運動機能の改善を促進する。

( Sasaki Y. et al., PTJ, 2016 )

#### ( 3 ) シナプス新生

脳梗塞周辺領域のシナプス数は有意な増

加傾向を示した(図3)。

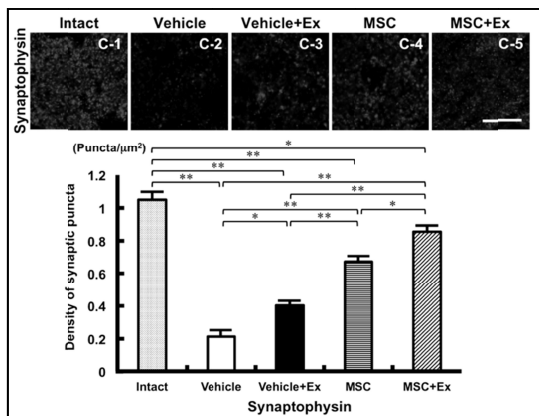


図3：リハビリ併用群では、脳梗塞周辺領域のシナプス新生が促進され、脳の可塑性が賦活化された。

(Sasaki Y. et al., PTJ, 2016)

#### (4) 脳梁の変化

MRI における脳梁は萎縮の抑制を認めた(図4)。

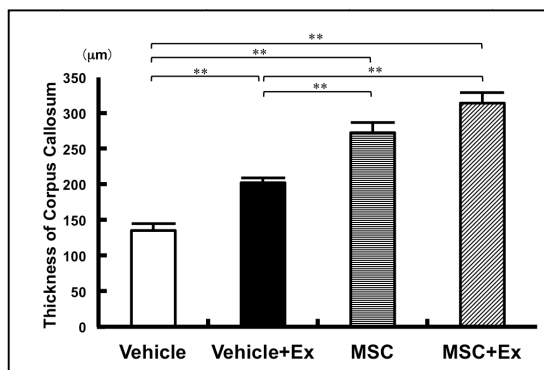


図4：リハビリ併用群では、脳梁の萎縮の抑制が認められた。

(Sasaki Y. et al., PTJ, 2016)

以上の結果から、MSC 移植にリハビリテーションを組み合わせる事で、リハビリテーション単独群や MSC 移植単独群と比較して、脳梗塞後の運動機能をさらに改善させることが分かった。

脳梗塞後の運動機能改善のメカニズムはまだ詳細には解明されていないが、本研究では脳梗塞体積の減少だけではなく、脳梗塞周

辺領域のシナプス数の増加や脳梁の萎縮の抑制などのメカニズムを解明することができた。MSC 移植とリハビリテーションを併用することで、大脳皮質機能や神経活動の再編成、神経回路の再構築などの皮質の神経可塑性が促進され、運動機能の改善が得られたものと考えられる。さらに、脳梁の萎縮の抑制が観察されたことから、メカニズムの一つとして考えられていた神経栄養因子の賦活による神経保護作用に加えて、非梗塞側皮質からの神経回路の再構築などの脳全体での神経可塑性も運動機能の改善に関与していると推測される。

今後は、脳梗塞後における神経機能の可塑性をさらに解明するために、解剖学的な検討も含め研究を進める必要がある。

#### 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 2 件)

Synergic Effects of Rehabilitation and Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells After Stroke in Rats.

Sasaki Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Nagahama H, Suzuki J, Tateyama D, Oka S, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Mikami T, Wanibuchi M, Kakizawa M, Ishiai S, Kocsis JD, Honmou O.

Phys Ther. 2016, 96: 1791-1798. 査読有

Elevated brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels in plasma but not serum reflect in vivo functional viability of infused mesenchymal stem cells after middle cerebral artery occlusion in rat.

Nakamura H, Sasaki Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Namioka T, Namioka A, Onodera R, Suzuki J, Nagahama H, Mikami T, Wanibuchi M, Kocsis JD, Honmou O, J Neurosurg Sci. 2017, in press. 査読有

[学会発表](計 2 件)

第7回日本ニューロリハビリテーション学会

発表者：佐々木雄一

発表課題：実験的脳梗塞に対するリハビリ

テーションと骨髄間葉系幹細胞の静脈内移植との相乗効果

発表年月日：2016年5月21日

場所：神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

第51回日本脳循環代謝学会

発表者：佐々木雄一

発表課題：実験的脳梗塞に対する骨髄間葉系幹細胞移植とリハビリテーションの相乗効果

発表年月日：2016年11月12日

場所：あわぎんホール（徳島県徳島市）

〔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

佐々木 雄一 (SASAKI, Yuichi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00570136

### (2) 研究分担者

佐々木 祐典 (SASAKI, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20538136

鰐淵 昌彦 (WANIBUCHI, Masahiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30343388

三上 毅 (MIKAMI, Takeshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30372816

中崎 公仁 (NAKAZAKI, Masahito)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70722461

浪岡 愛 (NAMIOKA, Ai)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60748995

浪岡 隆洋 (NAMIOKA, Takahiro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70748996

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )