

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461320

研究課題名(和文)新規血管再生促進性培養細胞移植による脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文) Ischemic stroke therapy using quality and quantity-controlled culture system enriched in endothelial progenitor cells

研究代表者

瀧澤 俊也 (TAKIZAWA, Shunya)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70197234

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)：脳梗塞急性期の血栓溶解療法は全体の10%しか対象にならず、神経保護や血管再生を標的とした根本的治療法が急務である。我々は新規培養法による血管再生能に優れた血管内皮前駆細胞を含有する単核球群(Quality and quantity mononuclear cells: QQ-MNCs)をマウス中大脳動脈永久閉塞モデルに局所動注し、血管再生・梗塞巣縮小効果を評価した。中大脳動脈閉塞後翌日にQQ-MNCsを動注するとコントロールと比較して梗塞後7日目、21日目ともに梗塞巣の減少を認めた。さらに、IL10やVEGFなどの抗炎症作用を伴う血管再生因子の増加を認めた。

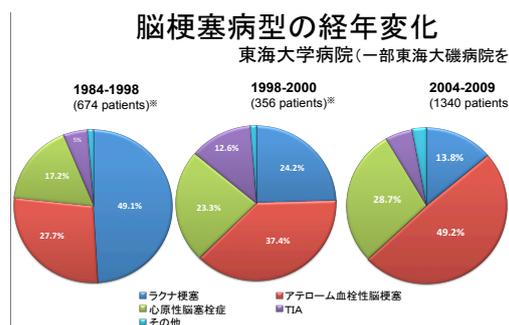
研究成果の概要(英文)：Quality and quantity-controlled culture system enriched in endothelial progenitor cells (EPCs) from unfractionated mononuclear cells (QQ-MNCs), which we developed, have a potential to activate anti-inflammatory cytokines and expanding vasculogenic EPCs. QQMNCs injected to mice at 1-day after occlusion of middle cerebral artery (MCA) reduced the rate of ischemic stroke volume compared with PBS. The immunohistochemistry showed the increase of positive cells reacted with VEGF and IL-10 after 7 and 21-days in QQ-MNCs-treated mice. These findings reveal that QQ-MNCs might promote repair and regeneration of neurovascular units after acute focal ischemic stroke.

研究分野：神経内科学

キーワード：単核球培養 血管内皮前駆細胞 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

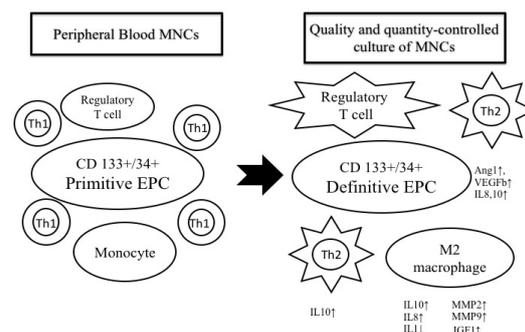
脳卒中は日本人の死因の第4位、寝たきりになる疾患の第1位、心筋梗塞の3~10倍の発症率を来す重大な国民病である。特に食生活の欧米化で脂質異常症や糖尿病の合併頻度が高まり、当科の検討でもアテローム血栓性脳梗塞の割合が49%を占めている。高齢化に伴い心原性脳塞栓症も28%に増加している。この両病型が全体の8割を占めており、重篤な脳梗塞の割合が増加している(下図)。



脳梗塞の急性期治療として発症4.5時間以内は血栓溶解療法、8時間以内は血管内治療が適応となるが、実際の臨床現場では脳梗塞全体の10%以下しか加療されていない。すなわち、90%以上の脳梗塞患者は、再発予防を目的とした抗血栓薬投与やリハビリテーションに頼らざる終えない。またrt-PA静注療法を施行できても、3ヶ月後の完全自立者(modified Rankin Scale:mRSで0または1)は40%以下に留まっている(Stroke, 2010)。こうした現状を打開すべく、我々は神経細胞の保護・再生とともに栄養血管新生による血行改善が最も重要であると考え。そこで血管再生能力の高い血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell: EPC)(Asahara T, et al., Science, 1997)を用いて脳梗塞の根治療法を目指すこととした。これまでEPCは多くの分野で臨床応用に向けて研究が展開されており脳梗塞を対象とした実験的研究はいくつか散見されるが、現時点ではEPCの有用性については明確な結論には至っていない。

2. 研究の目的

我々は血管再生能力の高いEPCを用いて脳梗塞の根治療法を目指すという unmet medical needs を視野に入れ、従来のEPC治療とは異なる質的・量的に優れた分化能をもつEPCを安全かつ効率的に投与する研究を立案した。すなわち、我々は下図のごとく新規の培養法を確立してコロニー定量化によるEPC分化動態及び血管再生・修復能の高い細胞を選び出すことに成功した(quality and quantity-controlled mononuclear cells (QQ-MNCs))(Masuda H, Circ Res, 2011)。このQQ-MNCsを用いてマウス中大脳動脈永久閉塞モデルに動注することにより、梗塞巣への改善効果を検討することを研究目的とした。



3. 研究の方法

(1) マウス中大脳動脈永久閉塞モデルの作成

生後10週齢の雄マウス(C57BL/6J)(23-25g)(n=60)を用いて、4%イソフルラン/66%N₂O/30%O₂麻酔下で、左側頭骨にドリルにて穴を明け、左中大脳動脈(MCA)を露出後に、結紮し、さらに電気メスにて血管を焼いて中大脳動脈永久閉塞モデルを作成した。その後、手術創部を縫合し、ケージにマウスを戻し翌日に頸部を正中切開し、左側総頸動脈よりマイクロシリンジ(50μl)を用いて、QQ-MNCs(1X10⁴⁻⁵)、MNCs(1X10⁴⁻⁵)、sham群としてPBSを動注した。

(2) Quality and quantity-controlled mononuclear cells (QQ-MNCs)培養

マウス左心室より末梢血を採取 (800 μ l/匹) し、リンパ球分離溶液 (ナカライテスク、京都) を用いて単核球を分離した。分離した単核球からCD34陽性細胞、CD34陰性細胞を抗体ビーズ法によるAuto MACSを用いて採取した。同定されたCD34陽性細胞内未分化EPC分画を分離し、SCF、TPO、Flt-3リガンド、VEGF、IL-6の5種類の因子を加えたEPC分化増幅培養 (Masuda, 2012) を5日間行い、 5×10^5 細胞/500 μ lの濃度で培養した単核球細胞群をこの実験に使用した (QQ-MNCs培養)。

(3) 行動解析

マウスの神経学的所見として、中大脳動脈閉塞後7日目の時点で神経症候 (Bederson score、Rotor Rod試験) の評価を行った。

(4) タンパク質発現の検討

マウス中大脳動脈閉塞後7日目において、PB-MNCs群 (1×10^4 個)、QQ-MNCs群 (1×10^4 個) とコントロールとしてPBS動注群のマウスから麻酔下で脳を摘出し、左右の大脳半球に分離した。ホモジェナイジングバッファーにてホモジェナイズし、3000rpmで遠心した後に、上清を採取して、以後の実験に用いた。タンパク質量キット (BioRadプロテインアッセイキット) を用い1レーンが20 μ gになるようにタンパク質を定量し、loading bufferを加えて、4-12%のグラディエント・ゲルを用いて電気泳動を行った。その後PVDF膜に転写し、室温で2時間3%スキムミルクを含むPBS-T (Tween 20) 溶液でブロッキングを行い、その後一次抗体として抗マウスiNOS抗体 (Stress Gene, USA)、抗goat VEGF (R&D, MN, USA)、抗ラットIL-10 (Abcam, Cambridge, UK) をPBS-T溶液で1000倍に希釈して、4°Cにて一昼夜反応させた。一次抗体反応後は、PBS-Tで3回洗浄し、二次抗体を反応させて、ECLキットにて発色させた。発色させたメンブレンを画像解析装置にて取り込み、検出される目的のバンドにつきoptical densityを測

定した。内因性のコントロールとして一次抗体に抗ラビット β アクチン抗体を用いた。

(5) 免疫組織学的検討

マウスを麻酔下で開胸し、左心室よりPBSを注入して脱血し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) にて灌流固定を行った。その後にマウス脳を摘出し、4%PFA溶液に脳を浸漬し、sucroseにて脱水を行った。脳はOCTコンパウンドにて包埋して、-80°C保存とした。クリオスタットにて10 μ mの脳切片を作成し、後固定として4%PFAに10分間インキュベーションし、内因性ペルオキシダーゼ除去のために5mMのH₂O₂溶液に10分間、室温でインキュベーションした。5% normal goat serum (NGS)、10分間切片をブロッキングした後に、一次抗体として抗goat VEGF (R&D, MN, USA)、抗ラットIL-10 (Abcam, Cambridge, UK) をそれぞれ50倍と100倍に5% NGSを含む溶液で、4°C、一昼夜反応させた。その後、3回PBSにて洗浄し、室温にて1時間二次抗体と反応させた。さらにPBSで3回洗浄しABC法にてDABで発色させた。

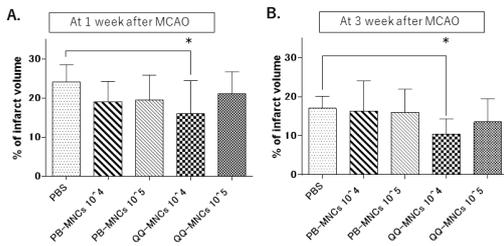
(6) 新生血管の評価

QQ-MNCs動注による梗塞部位の新生血管の形成を評価するために、中大脳動脈閉塞後7日目の時点で、マウスを麻酔下で開胸し、右心耳を切開して、静脈血を排出し、左心室より2mlの生理食塩水を注入した。その後、50 μ L/mL black pigmented ink (Hitohada gel, Exseal Co., Ltd. Japan) を含む0.5mlのwhite urethane resinを注入した。その後脳を摘出し、大脳表面をCCDカメラで撮影して、大脳皮質表面の血管像を撮影した。測定には、中大脳動脈閉塞大脳半球側で、中大脳動脈と前大脳動脈の境界を中心に両側0.6mm幅の領域に存在する血管の数をPBS動注群とQQ-MNCs 1×10^4 群で比較検討した。

4. 研究成果

(1) QQ-MNCs動注により梗塞巣の減少

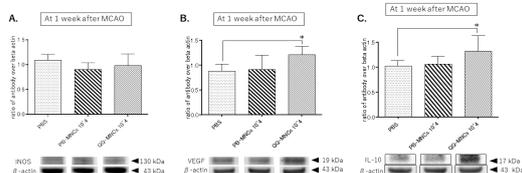
梗塞範囲の検討では、大脳半球に占める梗塞巣の割合 (%) が、PBS動注群と比較して、梗塞後7日と21日後において、PB-MNCs群 (1X10⁴個、1X10⁵個)、QQ-MNCs群 (1X10⁴個、1X10⁵個) ともに減少傾向にあったが、特にQQ-MNCs 1X10⁴個群において有意に梗塞巣の減少を認めた (p<0.05) (下図)。行動解析や神経学的所見では、PBS動注群とPB-MNCs群、QQ-MNCs群間では明らかな変化を認めなかった。



(2) 梗塞周囲 (ペナンプラ) でVEGFおよびIL-10陽性細胞の増加

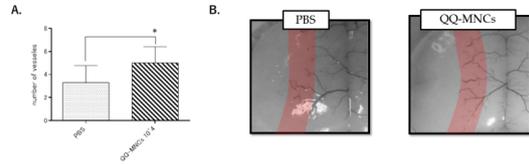
梗塞周囲部 (ペナンプラ) の3か所 (0.62mm²) (拡大倍率X400) において、全体の細胞数に対するVEGFおよびIL-10陽性細胞の割合を調べた結果、PBS動注群 (コントロール) と比較して、PB-MNCs群 (1X10⁴個、1X10⁵個)、QQ-MNCs群 (1X10⁴個、1X10⁵個) ともにVEGF、IL-10で陽性細胞数が増加していた。さらにVEGF陽性細胞では、動脈閉塞後7日目ではPBS動注群と比較して、PB-MNCs群 (1X10⁴個)、QQ-MNCs群 (1X10⁴個、1X10⁵個) で有意差を認めた。また、閉塞後21日後では、PBS動注群と比較してQQ-MNCs群 (1X10⁵個) のみ有意差をもって陽性細胞が増加していた。

IL-10陽性細胞においては、PBS動注群と比較して、閉塞後7日目でQQ-MNCs群 (1X10⁴個、1X10⁵個) で有意に陽性細胞の増加を認めたが、21日目では有意な増加を認めなかった。



(3) ペナンプラ領域での新生血管の増加

ペナンプラ領域の新生血管数はPBS動注群と比較して、QQ-MNCs群 (1X10⁴個) において有意に増加しており、QQ-MNCsの血管新生能が示された (下図)。



本研究は、自己再生細胞を用いて脳梗塞の治癒を目指した研究である。現在までに様々な脳梗塞治療薬が報告されてきているが、実臨床に使用できる薬剤はほんの一部であり、また、多くの動物実験モデルに投与されている薬剤は、脳梗塞前に投与して梗塞巣の減少が見られたとするものが多く現実的ではなかった。本研究はそれらの研究とは異なり、脳梗塞後に治療を開始するというリアルワールドの臨床に沿った形での治療を目指すものである。今回の動物実験 (マウス) での結果より、中大脳動脈閉塞後1日で、QQ-MNCs 1X10⁴での動注が最も梗塞巣を減少させることが明らかとなった。さらに、血管新生に重要な因子であるVEGFとIL-10が、QQ-MNCs群 (1X10⁴個) 動注群の7日目でコントロール群 (PBS動注群) と比較して有意に上昇していたことより、この時期に血管新生もしくは、抗炎症作用が強く働くことが重要と考えられる。

本研究の血管再生能に富み良質なEPCとともに抗炎症型マクロファージや制御性T細胞の増加による抗炎症効果・免疫寛容効果を併せ持つQQ-MNCs培養は世界で初めて開発した技術であり、我々のみが成し得る独創的研究である。特に、この細胞移植は、1) 培養開始後1週間で移植可能となること、2) 採血量が少ないこと、3) 自己細胞なので免疫拒絶反応の危険が少ないこと、4) 培養に際し特別な機器や施設を必要としないことなど多くの臨床応用上の利点を有する。

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 4 件)

- ① Takizawa S, Nagata E, Nakayama T, Masuda H, Asahara T. Recent Progress in Endothelial Progenitor Cell Culture Systems: Potential for Stroke Therapy. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 56(6): 302-309, 2016. 査読有 DOI:10.2176/nmc.ra.2016-0027
- ② Nagata E, Nonaka T, Moriya Y, Fujii N, Okada Y, Tsukamoto H, Itoh J, Okada C, Satoh T, Arai T, Hasegawa M, Takizawa S. Inositol hexakisphosphate kinase 2 promotes cell death in cells with cytoplasmic TDP-43 aggregation. *Mol Neurobiol*. 53(8): 5377-83, 2016. 査読有 DOI:10.1007/s12035-015-9470-1
- ③ Tsukamoto Y, Nagata E, Fukuyama N, Itoh Y, Yuzawa K, Kohara S, Shimizu M, Takahara Y, Takizawa S. Cilostazol protects against microvascular brain injury in a rat model of type 2 diabetes *Neuroscience Research*. *Neurosci Res*. In press, 2016. 査読有 DOI:10.1016/j.neures.2016.12.001
- ④ Masuda H, Tanaka R, Fujimura S, Ishikawa M, Akimaru H, Shizuno T, Sato A, Okada Y, Iida Y, Itoh J, Itoh Y, Kamiguchi H, Kawamoto A, Asahara T. Vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes endothelial progenitor cell expansion and phenotype transition of anti-inflammatory macrophage and T lymphocyte to cells with regenerative potential. *J Am Heart Assoc*. 3(3): e000743, 2014. 査読有 DOI:10.1161/JAHA.113.000743

[学会発表] (計 13 件)

- ① 瀧澤俊也、中山平、永田栄一郎、増田治史、浅原孝之。再生アソシエイト細胞による新規脳梗塞治療法の開発。第 42 回日本脳卒中学会総会シンポジウム。大阪国際会議場(大阪府大阪市)、3 月 16-19 日、2017 年。
- ② Nakayama T, Nagata E, Asahara T, Masuda H, Takizawa S. Quality and quantity mononuclear cells rescue peri-infarct lesion during acute stroke phase. *Neuroscience*. San Diego (USA), Nov 12-16, 2016.
- ③ 瀧澤俊也、中山平、永田栄一郎、増田治史、浅原孝之。脳梗塞・もやもや病を対象とした新規血管再生促進性培養細胞移植の臨床応用の試み。第 59 回日本脳循環代謝学会総会シンポジウム。徳島市あわぎんホール(徳島県徳島市)、11 月 11 日-12 日、2016 年。
- ④ 瀧澤俊也。脳梗塞急性期-脳保護治療の新たな展開-。第 59 回日本脳循環代謝学会総会ランチョンセミナー。徳島市あわぎんホール(徳島県徳島市)、11 月 11 日-12 日、2016 年。
- ⑤ 中山平、永田栄一郎、増田治史、小原さおり、浅原孝之、瀧澤俊也。もやもや病における血管内皮前駆細胞(EPC)を含む再生アソシエイト細胞のプロファイリング。第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会。徳島市あわぎんホール(徳島県徳島市)、11 月 11 日-12 日、2016 年。
- ⑥ 蓼沼啓介、湯澤公子、中山平、増田治史、永田栄一郎、浅原孝之、瀧澤俊也、木村啓志。マイクロ流体デバイス技術を応用した脳血管モデルの構築。第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会。徳島市あわぎんホール(徳島県徳島市)、11 月 11 日-12 日、2016 年。

- ⑦ 瀧澤俊也。脳梗塞の創薬における G-CSF の現状と展望。第 57 回日本神経学会学術大会シンポジウム。神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市）、5 月 18 日-21 日、2016 年。
- ⑧ 中山平、永田栄一郎、増田治史、小原さおり、湯澤公子、高張洋子、浅原孝之、瀧澤俊也。脳梗塞モデルマウスへの血管内皮前駆細胞を含む培養単核球群を用いたその効果と投与時期に対する検討。第 41 回日本脳卒中学会総会。ロイトン札幌（北海道札幌市）、4 月 14 日-16 日、2016 年。
- ⑨ 中山平、永田栄一郎、増田治史、小原さおり、湯澤公子、高張洋子、浅原孝之、瀧澤俊也。Therapeutic time window on transplant auto-mononuclear cells into stroke mice. 第 56 回日本神経学会学術大会。新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）、5 月 21 日、2015 年。
- ⑩ Nakayama T, Nagata E, Masuda T, Kohara S, Takahari Y, Asahara T, Takizawa S. Mononuclear cells (MNCs) including endothelial progenitor cells (EPCs) protect cerebral ischemic damage on mice. Brain2015, Vancouver (Canada), May 25, 2015.
- ⑪ Nakayama T, Nagata E, Masuda T, Kohara S, Takahari Y, Asahara T, Takizawa S. Quality and quantity mononuclear cells protect neuronal cell death in stroke mice. Neuroscience, Chicago (USA), Oct 14, 2015.
- ⑫ Nakayama T, Nagata E, Masuda T, Kohara S, Takahari Y, Asahara T, Takizawa S. Endothelial progenitor cells protect ischemic cell damage after cerebral infarction. Neuroscience 2014. Washington DC (USA), Nov 15-19, 2014.

- ⑬ 中山平、永田栄一郎、小原さおり、高張洋子、湯澤公子、増田治史、浅原孝之、瀧澤俊也。脳梗塞モデルマウスにおけるヒト血管内皮前駆細胞 (EPC) の効果について。第 55 回日本神経学会学術大会。福岡国際会議場(福岡県福岡市)、5 月 21 日-24 日、2014 年。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧澤 俊也 (TAKIZAWA Shunya)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70197234

(2) 研究分担者

永田 栄一郎 (NAGATA Eiichiro)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00255457

浅原 孝之 (ASAHARA Takayuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20246200

増田 治史 (MASUDA Haruchika)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50278496

木村 啓志 (KIMURA Hiroshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：40533625