

受賞対象論文

Toyoshima A, Yasuhara T, Kameda M, Morimoto J, Takeuchi H, Wang F, Sasaki T, Sasada S, Shinko A, Wakamori T, Okazaki M, Kondo A, Agari T, Borlongan CV, Date I: Intra-Arterial Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Mounts Neuroprotective Effects in a Transient Ischemic Stroke Model in Rats : Analyses of Therapeutic Time Window and Its Mechanisms. PLoS One (2015) 10, e0127302.

豊嶋 敦彦
Atsuhiko Toyoshima

岡山大学病院 脳神経外科
Department of Neurological Surgery, Okayama University Hospital



<プロフィール>

昭和56年生まれ
平成18年3月 関西医科大学医学部医学科卒業
平成18年4月 関西医科大学附属枚方病院 初期研修医
平成20年4月 香川県立中央病院 脳神経外科 後期研修医
平成23年4月 岡山大学病院 脳神経外科 医員
平成23年10月 岡山大学病院 3次救命センター 医員
平成24年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経外科学 研究員
平成27年11月 岡山大学病院 脳神経外科 医員
現在に至る

研究の背景と経緯

骨髄幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) 移植は脳梗塞に対する新たな治療法の一つとして注目されており、多くの動物実験でその神経保護効果が証明されている¹⁾。これまでは経静脈的移植の報告が多かったが、経静脈的移植には脳内への移植細胞の生着が少ないという欠点がある。一方、経動脈的移植は比較的侵襲低であり、脳内への細胞生着は多く、近年その有効性が報告されてきている¹⁾。治療効果の機序としては、移植 MSC からの神経栄養因子の分泌等が推測されているが、完全には明らかにされていない。また、経動脈的移植の最適な移植時期に関してはコンセンサスが得られていない。今回我々は、一過性脳虚血モデルラットに対し、急性期の様々なタイミングで経動脈的同種 MSC 移植を行い、神経保護効果と治療効果の機序および最適な移植時期について検討した。

研究成果の内容

1. モデル作製と移植方法

Wistar 系雄性ラット (200~250 g) を用い、全身麻

酔下に右外頸動脈からナイロンスレッドを挿入し、右中大脳動脈を90分間閉塞する右中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion : MCAO) を施行し、一過性脳虚血モデルを作製した。移植 MSC は同種ラットの大腿骨から採取し、2週間培養した。移植直前に Quantum-dot (ナノクリスタル) を用いて移植 MSC の蛍光標識を行った。移植方法は、 1×10^6 個の MSC を 1 ml の PBS に溶解し、右内頸動脈から経動脈的に投与した。移植群をモデル作製 1, 6, 24, 48時間後移植群の4群に分け、コントロール群は 1 ml の PBS をモデル作製 1 時間後に右内頸動脈から投与した。全群に対し、再灌流直後、モデル作製 3・7 日目に、脳梗塞に起因する運動・感覚障害を評価するため modified Neurological Severity Score (mNSS) を行い、神経症状を比較検討した。全てのラットをモデル作製 7 日目に組織学的評価のため安楽死させ、摘出した脳組織を用いて、全群の脳梗塞面積を比較し、移植群ラット脳内の生着細胞数を比較した。脳梗塞面積は bregma から 2 mm 前方と bregma のレベルで 2 mm 厚のスライスを作成し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を行い、健側に対する患側の脳梗塞面積比を評価した。生着細胞数は bregma から 2

mm前方, bregma, bregma から 2 mm後方のレベルで30 μ mの凍結切片を作成し, 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で重染色を行い, 上記 3 スライスで蛍光標識された移植 MSC の核の数を計測し, その平均値を各移植群で比較した. さらに, 移植 MSC からの神経栄養・保護効果を有する物質の分泌能を検討するため, 成長因子の一つである bFGF (basic fibroblast growth factor) とサイトカインの一つである SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 α) に着目して, 別コホートのラットを用いて, 同様の方法でコントロール群とモデル作製24時間後移植群を作製した. それぞれをモデル作製7日目に安楽死させ, 脳組織を摘出後, 直径3 mm, 厚さ2 mmの大きさで両側の penumbra 領域を含む大脳皮質および線条体をそれぞれ摘出し, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法を用いて bFGF と SDF-1 α を測定した.

2. 一過性脳虚血モデルラットに対する経動脈的 MSC 移植は神経保護効果を示し, モデル作製24時間後の経動脈的 MSC 移植が最も神経症状を改善させた

mNSS で, モデル作製 3・7 日目の時点で, コントロール群に比べモデル作製24時間後移植群, 48時間後移植群で有意に点数が低下し, 神経症状が改善した. 特にモデル作製24時間後移植群は神経症状の改善が顕著であり, モデル作製 3・7 日目の時点で他群に比して有意に改善した.

3. モデル作製24時間後移植群の脳梗塞面積が最も縮小し, 脳内の生着細胞数も最も多く認められた

脳梗塞面積は, モデル作製24時間後移植群で, コントロール群, 1時間後移植群, 6時間後移植群に比べ有意に縮小した. 脳梗塞面積と mNSS の点数は正の相関を示し, 脳梗塞面積が縮小するほど, 神経症状が改善していた. 生着細胞に関しても, モデル作製24時間後移植群の脳内で, 他の移植群に比べ有意に多く認められた.

4. 経動脈的 MSC の治療効果の機序に, bFGF, SDF-1 α の関与が示唆された

2 群間の両側大脳皮質での比較検討で, bFGF, SDF-1 α ともに, モデル作製24時間後移植群の患側皮質で有意に多く分泌されていた. 両側線条体での比較検討では, いずれの因子も有意差を認めなかった.

研究成果の意義

我々は, 本研究において一過性脳虚血モデルラットに対する経動脈的同種 MSC 移植の神経保護効果を明らかにした. 今回の検討では, 一過性脳虚血モデル作製24時間後の移植が最も有効であった. また, 治療効果の機序に移植 MSC からの bFGF および SDF-1 α の分泌が関与している可能性が示唆された. これまで, 多くの動物実験で経静脈的 MSC 移植の有効性が証明されており, その治療効果の機序は, 脳内への移植細胞の生着というよりは, 移植 MSC からの神経栄養因子の分泌によるものと考えられてきた. しかし近年, 移植細胞の生着も神経保護効果に関与している可能性が指摘され, 経動脈的移植が有用な移植方法として着目されてきている¹⁾. 一過性脳虚血モデルラットに対する経静脈的 MSC 移植と経動脈的 MSC 移植の直接比較で, 経動脈的移植が有意に多くの細胞生着を促し, 行動学的評価においても有意な改善を示したとする報告がなされた. さらに臨床試験においても経動脈的自家 MSC 移植の安全性も証明された²⁾. 一方で, 経動脈的移植の重大な合併症として脳塞栓症が挙げられており, 脳実質内移植よりも低侵襲とはいえ, 移植を行う際には手技が熟達している必要があると考える. モデル作製24時間後移植群のラットの患側大脳皮質では bFGF および SDF-1 α の上昇が認められたが, 当科では以前よりこれらの因子に着目し, 様々な動物実験でその神経保護効果を報告してきた^{3,4)}. 脳虚血モデルラットに対するカプセル化 bFGF 分泌細胞の移植や, パーキンソン病モデルラットに対する SDF-1 α 分泌能を有する MSC の経静脈的移植で, 主に抗アポトーシス効果を介した神経保護効果を報告した⁴⁾. 本研究における MSC 移植の神経保護効果にも, このような作用が関与していると考えられる. 最適な移植時期に関しては様々な意見があるが, 一過性脳虚血モデルラットに対する human MSC の経動脈的移植における, 急性期移植と慢性期移植の比較検討で, 急性期移植の方が有意に多くの移植細胞の生着を認め, 血管増生を促し, 抗炎症作用も示した結果, 神経症状の改善を得たと報告されている¹⁾. 本研究ではさらに早期も含め, 急性期の様々なタイミングに経動脈的移植を行った. 最も効果があったのはモデル作製24時間後移植であり, いわゆる超急性期移植は細胞生着も少なく, 効果も乏しかった. この理由の一つとして, 脳梗塞後の血

液脳関門の破綻の時期が関与していると推測される。経動脈的に移植された MSC が脳内に生着するには破綻した血液脳関門を通過する必要があるが、脳梗塞超急性期はまだ破綻の時期に達しておらず、移植 MSC が効率よく脳内に生着できない可能性がある。過去の報告と、脳梗塞後の脳内の経時的変化を考慮すると、モデル作製24時間後の経動脈的移植は妥当な時期であると思われる。

今後の展開や展望

今回、一過性脳虚血モデルラットに対する経動脈的同種 MSC 移植は神経保護効果を示した。モデル作製24時間後の移植が最適な時期であり、治療効果の機序として、移植細胞からの bFGF および SDF-1 α の分泌の関与が示唆された。脳梗塞に対する経動脈的 MSC 移植の有効性は動物実験で証明されてきており、臨床研究でも安全性は示されつつあり、期待が持てる治療法である。ただ、実臨床においては急性期の自家移植は現時点では非現実的であるし、同種移植を考慮する際には免疫抑制等の問題も生じる。今後も臨床応用に向けて、さらなる基礎実験、臨床試験での評価が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I : Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke* (2013) 44, 720-726.
- 2) Moniche F, Gonzalez A, Gonzalez-Marcos JR, Carmona M, Piñero P, Espigado I, Garcia-Solis D, Cayuela A, Montaner J, Boada C, Rosell A, Jimenez MD, et al. : Intra-arterial bone marrow mononuclear cells in ischemic stroke : a pilot clinical trial. *Stroke* (2012) 43, 2242-2244.
- 3) Wang F, Yasuhara T, Shingo T, Kameda M, Tajiri N, Yuan WJ, Kondo A, Kadota T, Baba T, Tayra JT, Kikuchi Y, Miyoshi Y, et al. : Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats : focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1 alpha. *BMC Neurosci* (2010) 26, 11 : 52.
- 4) Fujiwara K, Date I, Shingo T, Yoshida H, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Tamiya T, Ohmoto T : Reduction of infarct volume and apoptosis by grafting of encapsulated basic fibroblast growth factor-secreting cells in a model of middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* (2003) 99, 1053-1062.

平成28年4月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話 : 086-235-7336 FAX : 086-227-0191

E-mail : atsuhiko.t@kyj.biglobe.ne.jp