

＜表題＞ 脳梗塞に対する骨髄幹細胞を用いた再生医療の実用化研究

研究代表者 札幌医科大学医学部脳神経外科講師
本望 修
共同研究者 札幌医科大学医学部脳神経外科教授
宝金清博
札幌医科大学医学部第四内科教授
新津洋司朗
札幌医科大学医学部分子医学教授
濱田洋文
エール大学神経再生研究所教授
Jeffery Kocsis

【まとめ】

本研究は、高齢者の医療・福祉に多大な影響を及ぼす脳梗塞に対して、新しい治療技術の確立を目的としていた。骨髄細胞は再生医療のドナーとして重要視されており、我々は既に、成人の骨髄幹細胞を用いた脳梗塞に対する新治療基盤技術を、脳梗塞モデル動物への移植実験で確立していた。本研究計画により実用化研究を施行することで、今後、高齢者の寝たきり防止効果、自立生活支援、生きがいの向上につながるものと期待される。また、急速に超高齢化社会を迎えつつある我が国の高齢者福祉へ貢献するものと考えられる。

1. 研究の目的

骨髄細胞をドナー細胞とした再生医療は世界的に注目され、既に皮膚、軟骨、虚血性疾患の治療の分野で実用化されている。一方、同骨髄細胞は、脳神経疾患の分野においても再生医療を担うドナーとして重要視されつつある。我々は世界に先駆けて、成人の骨髄幹細胞を用いた神経系細胞への誘導方法を基盤技術として既に確立しており、動物実験レベルでは著名な効果を確認していた。本研究計画は、同基礎技術を実際に再生医療へ応用するための実用化研究開発試験を早急に実施し、骨髄細胞を医療デバイスとした脳神経疾患に対する再生医

療を実現化することを目的とした。

2. 2ヶ年の研究の方法・経過

計画1：臨床プロトコール作成のための実用化試験

従来までの基礎研究で、骨髄幹細胞が神経再生に有用であることを明らかとしていた。本研究計画により、本年度は、ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、脳梗塞治療時の必要細胞数や投与方法の検討を行った。治療効果は、画像診断学的、組織学的、行動学的に検討した（結果は下記参照）。来年度は、これらの結果を総合的に考察し、また、安全性の検討も併せて行ない、臨床プロトコール案のための基礎データを収集する。

計画2：治療効果機序の解明

過去の予備実験で、骨髄幹細胞移植は脳梗塞に対して著明な治療効果が確認していたが、詳細な作用機序は不明のままであった。本年度は、移植した細胞の脳梗塞巣への到達機序と、治療効果の分子メカニズムの一部を解明することに成功した。来年度は、治療効果の分子メカニズムを更に解明し、臨床研究のための基礎データを収集する予定であった。

3. 《1年目の研究の成果》

計画1：臨床プロトコール作成のための実用化試験

ドナー細胞は、ヒト骨髄幹細胞とし、移植治療効果の検討を多角的に施行した。また、投与時期や投与方法等を検討し、実際の治療に必要なデータを収集した。

神経幹細胞を病巣へ直接注入した場合は優れた組織修復を呈すが、静脈内への投与では脳組織への移行率は低い。一方、ES細胞は安全面（腫瘍性）での問題が現在の科学レベルでは解決されることは困難であった。ところが、骨髄幹細胞は静脈内へ注入した場合でも、病巣へ直接注入した場合も、神経幹細胞と同等の組織修復能を呈することを明らかとした。

また、同一個体において、MRI・MRSにて治療効果を検証したが、やはり、一旦、損傷を受けた脳組織、または、脳組織

の代謝は、治療により著名に改善することを明らかとした。

これら、画像診断学的な治療効果の解析は、同一個体を経時的に解析でき得るため、客観性の高い科学的に非常に意味の有る結果である。最終結果としては、 1×10^6 個の幹細胞を静脈内に注射すれば十分な治療効果が得られることを突き止めた。

脳梗塞急性期に対する骨髄幹細胞の静脈内移植は、超急性期、急性期、および慢性期の移植治療は、治療効果の差異は認められるものの、基本的にはいかなる時期の移植でも脳梗塞に対する治療効果が期待できることを突き止めた。特に、超急性期に移植することで、ドナー細胞は宿主虚血脳組織に対する神経保護作用をも併せて発揮し、治療効果が非常に高いことを明らかとした。以上の結果より、脳梗塞に対する細胞移植治療は、可及的早期に施行されるのが望ましいのが結論である。特に、超急性期の移植では、神経保護作用が極めて強いことより、超々急性期(経過時間: 3、6、12、24、72時間)における治療効果を、神経保護作用と神経再生の観点から比較検討した結果、やはり、脳梗塞急性期においては、静脈内投与でも、急性期治療が最も高い治療効果を発揮することを明らかとした。

また、脳梗塞後72時間を経過した段階で移植治療を行った群においても、少なからず治療効果が認められたことは特記すべきことである。

計画2：治療効果機序の解明

骨髄幹細胞を静脈内に移植すると、脳梗塞に対して著明な治療効果を呈することを確認していたが、作用機序は不明のままであった。本研究計画により、脳梗塞局所への集積と治療効果の分子メカニズムの一部を解明した。

脳梗塞局所への移植と比較して静脈内移植の場合は約100倍の細胞数を必要としたが、逆に、100倍の細胞を移植すれば同様の効果が得られることを明らかとした。

治療効果の検討では、治療群と非治療群とを、組織学的、行動学的に比較検討したが、治療群において、移植細胞数と比例した治療効果が認められた。

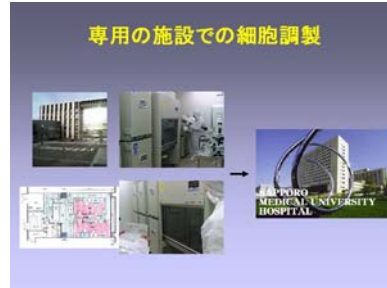
また、脳梗塞患部に到達した骨髄幹細胞は、BDNF等のサイトカインを放出するこ

とで周囲の死にかけている神経細胞に対して保護作用を発揮し、損傷を最小限に止める働きがあることを突き止めた。また、骨髄幹細胞自身も神経細胞になり、損傷された脳組織に置き換わり、脳神経を再生させることで治療効果を発揮することを明らかとした。来年度は、本年度の知見を基に、治療機序の解明を更に発展させる予定である。

《2年目の研究の成果》

計画1：臨床プロトコール作成のための実用化試験

本研究の知見をもとに、臨床プロトコールの策定を行うことができた。また、細胞処理の専用施設(Cell Processing Center: CPC)の稼働させ、同プロトコールに沿った臨床研究を開始することができた。

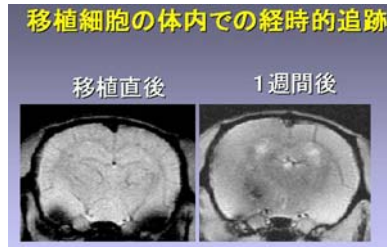
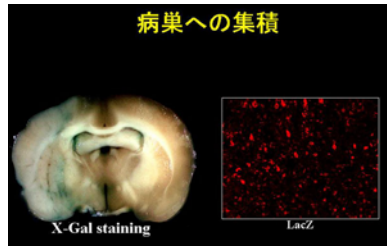


計画2：治療効果機序の解明

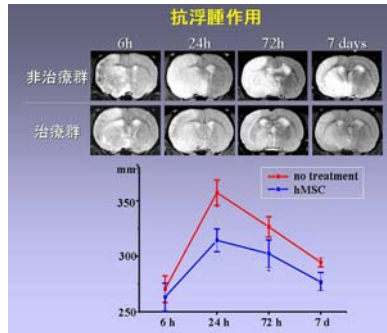
骨髄幹細胞移植の脳梗塞に対する治療効果の作用機序が大分解明された。

すなわち、

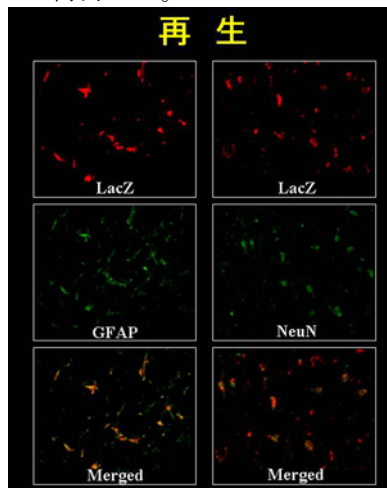
- (A) 静脈内に注射された骨髄幹細胞は、その homing 作用と遊走能により、損傷を受けた部に到達する様子を経時に解析することに成功した。



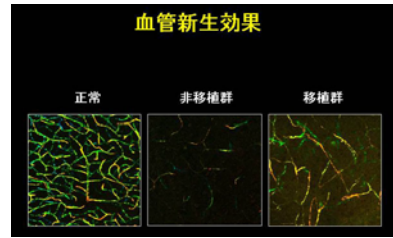
(B) 病巣に到達した骨髄幹細胞は、抗浮腫作用を發揮し、損傷の拡大を最小限に抑える作用があることが判明した。



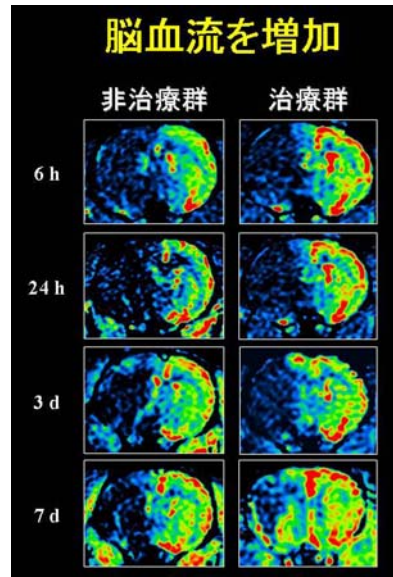
(C) 骨髄幹細胞は病巣において、神経細胞へ分化することで再生作用を發揮することが判明した。



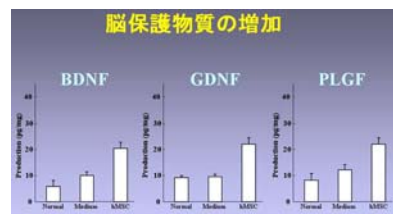
(D) 骨髄幹細胞は、自らも血管内皮細胞へと分化すると同時に、ホスト側に血管新生を誘導することが判明した。



(E) 骨髄幹細胞の血管新生作用により、脳血流の改善作用が確認された。



(F) 多数のサイトカインを分泌することで神経保護作用を發揮し、ホストの脳神経を損傷から救うことで治療効果を上げることが判明した。



4. 今後の課題

再生医療は、今後の医療の一部を担うであろうと期待されている一方、倫理的に十分検討され、かつ、社会全体に対する informed consent (説明に基づいた同意) を得なければならない医療分野である。また、神経再生医療におけるドナー細胞の確保は必ずしも容易なことではない為、期待される治療効果、社会事情、実現の可能性をトータルでバランスよく検討し最良の選択をすることが必要である。

骨髄幹細胞の静脈内投与は、以下の点で現実性が高いと思われる。すなわち、1) 確実な治療効果が期待できる、2) 副作用の危険性が少ない、3) 自己の細胞を使用できるため感染症

のリスクが低い、4) 同理由で免疫拒絶反応が無い、5) 同理由で倫理的問題が無い、6) 十分なドナー細胞の供給が期待できる、7) 非侵襲的な治療、8) 一般社会に受け入れられやすい治療内容・方法、9) 一般的な医療として広く定着しやすい。

以上のように、骨髄幹細胞を用いた移植治療は、非常に現実性が高く、また、適応となる疾患の範囲も広い。当該研究計画では、骨髄細胞移植による脳疾患の治療を目的とした実用化研究が遂行され、有用な結果が得られた。

今後、これらの結果を総合的に考察し、現在進行中の臨床研究を着実に遂行し、事業化へと結びつけることが重要と思われる。

5・研究結果の公表方法

* 本研究計画は、下記の3つの学会で発表された。

(1) 日本脳神経外科学会総会(平成16—平成18年)

(2) Annual Meeting of Society for Neuroscience in USA(平成16—平成18年)

(3) 日本脳卒中学会総会(平成16—平成18年)

* また、下記の英文原著論文で発表された。

Ukai, R., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D.: Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J Neurotrauma*, 24(3): 508-520, 2007.

Harada, K, Honmou, O., Liu H., Bando, M., Houkin, K., Kocsis, J.D.: Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery

occlusion model. *Brain Research*, 1134: 206-213, 2007.

Kim, S., Honmou, O., Kato, K., Nonaka, T., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D.: Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone marrow-derived precursor cells. *Brain Research*, 1123(19: 27-33, 2006.

Horita, Y., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D.: Intravenous administration of GDNF gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *J. Neuroscience Research*, 84:1495-1504, 2006.

Liu, H., Honmou, O., Harada, K., Nakamura, K., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D.: Neuroprotection by PlGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *BRAIN*, 129: 2734-2745, 2006.

Honma, T., Honmou, O., Iihoshi, S., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D.: Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp Neurol*, 199: 56-66, 2006.

Nomura, T., Honmou, O., Harada, H., Houkin, K., Hamada, H., Kocsis, J.D.: Intravenous infusion of BDNF gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*, 136: 161-169, 2005.