

厚生労働科学研究研究費補助金

痴呆・骨折臨床研究（若手医師・協力者活用に要する研究）事業

再生医療的手法による、脳血管性痴呆症および
虚血性脳血管障害に対する早期診断および
予防法の確立に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 松山 知弘

平成17（2005）年 3月

目次

I. まえがき	2
II. 研究組織	3
III. 研究報告	4
1. 総括研究報告	4
再生医療的手法による、脳血管性痴呆症および虚血性 脳血管障害に対する早期診断および予防法の確立に関する研究 松山 知弘	
2. 臨床研究実施チーム研究報告	
1) 脳血管障害における末梢血 CD34 陽性細胞定量法の開発	15
芳川 浩男、中込 隆之、沖中 由佳	
2) 痴呆患者における患者病態と末梢血 CD34 陽性細胞定量法 の関連	19
西村 裕之、辰巳 美晶、森岡 佳恵	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
V. 研究成果の刊行物・別刷	24
VI. 資料	37
VII. 研究報告の図および表	52

まえがき

わが国は超高齢化社会を迎えようとしており、高齢者が健康で自立した生活を送るためには、脳卒中やその後遺症としての痴呆症は克服すべき緊急の課題である。これらの疾患を克服するため、様々な研究が積み重ねられてきたが、有効な治療法を提供できない状況であり、要介護者は依然として急速に増加している。従って、従来の治療法とは全く異なった観点から、革新的な手法を用いた早期診断法や予防法、治療法の確立が切望されている。

脳卒中や痴呆症等の中枢神経細胞死に起因する疾患は、不可逆的な病態であると考えられてきた。しかし神経幹細胞の発見以降、神経細胞再生のメカニズムやその本質についての基礎研究が進められ、これらの疾患も治療しうる病態である可能性が高いことが明らかになっている。また、血管再生に関しては、末梢血中の血管血球系幹細胞の発見以来、これが血管の維持や修復に非常に重要な役割を果たしている事が明らかにされてきている。我々は、すでにヒトにおける臨床応用を目的とした研究チームを構築し、

- 1) 神経細胞再生に関する基礎研究
- 2) 脳血管等の支持組織の再生に関する基礎研究
- 3) 虚血性脳血管障害患者における再生と病態の検討
- 4) Translational study による再生医療の実践

を兵庫医科大学と国立循環器病センターを拠点とした共同研究体制にて推進し、これらの再生医療技術を用いた、ヒトにおける新しい治療法の開発を目的とした総合的研究を行っている。

循環器領域では近年、血管血球系幹細胞の移植に向けた基礎研究が急速な勢いで進められている。本研究ではこれらの知見を背景に、臨床研究実施チームにより末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞や痴呆症の病態の関連に関する断面研究、および末梢血中血管血球系幹細胞と患者予後との関連の解明を目的とした前向き経時的コホート研究を行ない、血管血球系幹細胞を解析することで脳血管性痴呆症および虚血性脳血管障害発症における早期診断や予後の予測、疾患予備軍のスクリーニングを可能とする基礎データを築くことを目的としている。そしてそれらの知見を総合することにより、痴呆症や虚血性脳血管障害に対する治療法としても発展させていくことができると考えている。

研究組織

統括主任研究者

松山 知弘	兵庫医科大学医学部	神経内科	講師
-------	-----------	------	----

臨床研究実施チーム

(a組)

芳川 浩男	兵庫医科大学医学部	神経内科	教授
中込 隆之	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者
沖中 由佳	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者

(b組)

西村 裕之	兵庫医科大学医学部	神経内科	助手
辰巳 美晶	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者
森岡 佳恵	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者

平成16年度厚生労働科学研究費補助金
痴呆・骨折臨床研究事業

総括研究報告書

再生医療的手法による、脳血管性痴呆症および虚血性脳血管障害に対する
早期診断および予防法の確立に関する研究

主任研究者
兵庫医科大学、神経内科
松山 知弘

研究要旨

血管内皮細胞は一酸化窒素やプロスタサイクリンなどの血管作動物質を産生して血流調節を行うのみならず、自ら血管の新生や再生に関与して微小循環を維持している。すなわち、血流の維持には内皮細胞の存在が必須であるが、内皮細胞の寿命は約3年であるので絶えず修復、再生されなければならない。従来血管の修復は既存の内皮細胞が分裂再生しておこなわれるといわれてきたが、近年になり、骨髄由来の血管系幹細胞が流血中に存在しており、これが修復にあたることが明らかになってきた。また、血管血球系幹細胞は血管新生にも関与している。

近年、これらの知見をもとに、従来の治療法では対処できなかった難治性の虚血性心疾患等に対して、血管系幹細胞移植などの再生医療学的手法を用いた治療法の臨床応用が開始され、十分な治療的効果が示されている。我々は、脳血管の維持や修復に関しても末梢血中の血管血球系幹細胞が重要な役割を果たしているのではないかと考え、末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する小規模断面临床研究とこれらの関連性を証明するための基礎実験を行い、今年度からは末梢血中血管血球系幹細胞と患者予後との関連の解明を目的とした、前向き経時的コホート研究を開始した。

その結果、末梢血中の幹細胞分画である CD34、CD133、CD117、CD135 陽性細胞数と頸動脈動脈硬化性病変や内膜肥厚に関する有意な相関関係は見られず、末梢血中血管血球系幹細胞と頸動脈動脈硬化性病変との関連は低いことが明かとなった。その理由としては、頸動脈病変の進展には物理的なずり応力やマクロファージなど、他の因子が大きく関与するため、末梢血中幹細胞数の減少による動脈硬化発症の影響は比較的少ないためと考えられた。

また、MRI 上観察される虚血性病変と末梢血中幹細胞の関連についての検討の結果、血管内皮前駆細胞系の幹細胞を多く含む CD34、CD133 抗原陽性細胞数の減少が、脳梗塞巣の増加と有意に関連しており、脳循環維持機構やその修復機構の破綻は脳虚血性病変と関連していることが示唆された。さらに、脳循環代謝機能に対する末梢血幹細胞関与の検討のため、PET を用いて脳主幹動脈閉塞あるいは高度狭窄のある患者の評価を行った結果、血管血球系幹細胞の属する分画である CD34、CD133 抗原陽性細胞数の減少が、慢性虚血部位の脳血流量の低下や酸素摂取率の反応性の欠如と有意に関連しており、側副血行路の形成低下や血管反応性の低下など血流血管維持機構の低下と関連するとともに血管血球系幹細胞数の減少が神経機能の低下にも関連していることが明らかとなった。以上の所見は、血管血球系幹細胞が多ければ脳循環代謝が改善する可能性を示すものである。

その可能性を証明するために脳梗塞を起したマウスに血管系幹細胞数を増やす目的で静脈内投与すると、血管血球系幹細胞は脳内で内皮細胞へ分化しており、マウスの脳の灌流領域の拡大と新生血管の発現が認められた。すなわち、血管系幹細胞の投与は血管新生を促進することが明かとなった。さらに、血管系幹細胞投与後の脳組織を観察すると、神経をも含む脳組織が再生していた。従って、血管血球系幹細胞が血管新生を介して神経再生を促すことが明かとなった。

血管血球系幹細胞を用いた心血管再生療法はすでに臨床応用がなされている。これを虚血性脳血管障害による血管性痴呆やアルツハイマー型老年痴呆に応用できれば高齢者の福音となる。本研究では、脳血管再生療法が脳機能を改善し、痴呆の治療法となりうるかどうかを評価する目的で、虚血性脳血管障害患者、脳血管性痴呆患者やアルツハイマー型痴呆患者など痴呆患者を対象に血管再生に関わる末梢血中血管系幹細胞（CD34陽性細胞）数を測定し、1）臨床診断の根拠として活用できるか、2）早期診断に有用であるか、3）虚血性脳血管障害や痴呆の予後の予測が可能であるか、について検討した。平成17年3月までの60名のエントリー患者のうち、脳梗塞既往のあるものは45名、痴呆を有する者は30名であった。本研究では、末梢血中幹細胞（CD34陽性細胞）を量的、質的に評価し、12ヶ月後にも再評価することで、機能予後や痴呆の進行に関しても検討する予定である。

背景および目的

近年の高齢社会において脳血管障害後遺症による痴呆などが誘因となって要介護となる患者の急激な増加が指摘され、これは重大な社会問題となっている。痴呆の治療法の確立は、我が国の活力ある社会を保ち続けるための克服すべき最重要課題であるといっても過言ではない。脳血管障害のうち脳梗塞に対する有効な治療法は発症後 3 時間以内の血栓溶解療法であるが、その機会を逸した患者に有効な治療法は乏しく、さらにその後遺症としての脳血管性痴呆に対しては全く有効な治療手段がないのが現状である。従って、従来の治療法とは全く異なった観点からの革新的な手法を用いた早期診断法や予防法および治療法の確立が切望されている。

循環器領域における虚血臓器障害の治療の新戦略としては、難治性の虚血性心疾患や末梢動脈閉塞症に対する血管血球系幹細胞による血管新生をめざした治療法の臨床応用が既に開始され、その十分な治療的効果も明らかにされている。また、末梢血中の血管血球系幹細胞を増加させる目的で、臍帯血中幹細胞の移植、内因性幹細胞の動員、*in vitro* での幹細胞増殖培養などの研究が行われており、近い将来に治療法として臨床応用されると考えられている。しかしこの血管新生療法は、神経領域における応用を支持しうる十分な臨床データがないのが現状である。それらの医療技術を虚血性脳血管障害の分野に応用するためには、脳障害患者における血管血球系幹細胞の動態と障害脳の病態に関する検討が必要不可欠であり、本研究は障害脳に対する再生医療学的手法を用いた治療法の臨床応用に向けた重要な基盤研究となると考えている。本研究はこれらの成果を通じて我が国の要介護者の大幅な減少をもたらすことをめざしており、健康で自立して生活できる高齢者とともに、活力のある社会を保ち続けることに大きく貢献することができると考えている。

本研究では血管再生に関わる血管血球系幹細胞が虚血性脳血管障害患者の予後決定に関与するか、アルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆における痴呆進展と相関があるかどうかを検討した。また、痴呆症例の解析においてはアルツハイマー型痴呆などの神経変性型痴呆症例と脳血管性痴呆症例の末梢血中血管系幹細胞の対比検討を予定している。それによりアルツハイマー型痴呆における血管因子の関与が明らかになると共に、脳血管性痴呆症とアルツハイマー型痴呆症の鑑別診断において末梢血中血管系幹細胞の定量的評価は有用な検査法として発展が可能であると考えている。

研究方法

1. 末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態に関する小規模断面研究

A. 対象患者群

急性期患者群：虚血性脳血管障害発症後 24 時間以内に採血が可能な患者。

慢性期患者群：虚血性脳血管障害や虚血性心疾患などの循環器系虚血性疾患発症後 30 日以上経過した患者。女性においては閉経後の患者のみを対象とし、また感染症など末梢血中の血球成分に、大きな影響を与える可能性のある疾患を有する患者も除外した。

B. 末梢血中幹細胞の解析

1) CD34 陽性細胞の末梢血中絶対数の測定

各患者より 3ml のヘパリン加採血を行い、内部標準ビーズを用いて、CD34 陽性細胞の絶対数測定を行った。また、CD34 細胞の絶対数の正確な測定のため、threshold 設定に nucleic acid dye を用い、洗浄ステップの排除、内部標準としてのビーズの添加、リバースパイレット法による正確な定量化、CD34 抗体と抗体価や蛍光強度が一致するコントロール抗体の使用、3 回測定による平均値の採用を行った。

2) 他の幹細胞系表面マーカー陽性細胞数の測定

CD34 陽性細胞以外の幹細胞系表面マーカーとして、造血前駆細胞、血管内皮前駆細胞系の CD133 抗原、Stem Cell Factor 抗原である CD117 抗原、初期骨髓系および B 細胞系前駆細胞を中心に発現する CD135 抗原を用いた。これらの細胞数の測定には、抗 CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66b 抗体を用いて lineage removal を行い、成熟細胞を除去した後に、細胞数のカウントを行った。また、CD34 陽性細胞において、KDR、TIE、TEK 発現細胞の解析を行った。

C. 脳梗塞患者の病態評価

1) 頸動脈における動脈硬化性変化の評価

7.5MHz のリニア型プローベを用いて頸部超音波による総頸-内頸動脈における動脈硬化の定量的評価を行った。

2) 脳虚血性病変の評価

Blinded Investigator による脳 MRI(T1、T2、FLAIR 画像)の評価を行い、虚血によると考えられる病変の量的評価を行った。

3) 脳血流代謝機能の評価

脳主幹動脈閉塞あるいは高度狭窄のある患者には PET(Positron Emission Tomography)を用いて脳血流量(CBF)、脳血液量(CBV)、酸素摂取率(OEF)および酸素代謝量(CMRO₂)の定量的測定を行った。

2. 血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連性を検討する基礎的研究

A. 脳梗塞モデル

1) マウス中大脳動脈永久虚血モデル作成法

すべての実験は兵庫医科大学動物実験基準を遵守して行われた。モデルの作成はハロセン吸入麻酔下にて行われた。マウスは右側臥位にて固定し、左目と左耳の中央を切開し側頭骨にミニドリルにて穴を開け、中大脳動脈を露出させた。電気凝固器にて中大脳動脈を凝固しはさみで切断した。その後切開した外皮を縫合した。マウスは MRI 測定までの約 1 時間白熱灯下で保温した。

2) CD34 陽性細胞投与法

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞 (50 万個) を脳梗塞作成後 2 日目に静脈投与した。また虚血作成後から飼料を自由摂取させた。コントロール群には CD34 陰性細胞あるいは生理食塩水を投与した。飲料水は給水瓶による自由摂取とした。

B. 血管新生の評価

CD34 陽性細胞投与後 24 時間目に carbon black を経心的に注入した後に脳を摘出して TTC 染色を行うことにより、脳灌流領域と脳梗塞領域とを同時に観察した。正常脳と梗塞脳を横断する carbon black 灌流毛細血管の数を測定することにより angiographic score を算定し、機能血管の新生を評価した。また、CD34 陽性細胞投与後 2 週目には CD31 に対する免疫組織化学を施行して脳梗塞領域の血管新生を評価した。

C. 神経再生の評価

CD34 陽性細胞投与後経時的に (14、35、90 日後) 脳を摘出し、梗塞側の 大脳皮質と反対側 (健常側) の大脳皮質幅の比を測定することにより、cortical width index を算出して脳組織再生を評価した。また、CD34 陽性細胞投与後 5 週目まで BrdU を動物に投与し、脳を摘出固定して BrdU と神経のマーカーである NeuN に対する二重染色免疫組織化学を施行し、さらに虚血領域の神経細胞数を CD34 陽性細胞投与群と CD34 陰性細胞投与群、生理食塩水投与群と比較することにより、神経再生を評価した。

D. 脳機能の評価

行動テストとしてオープンフィールドを施行した。動物を 30x30 cm のアクリル製の箱に入れ、明条件で 10 分、暗条件 10 分の計 20 分間の活動性を観察した。活動量は X 軸 Y 軸に設定された赤外線ビームの通過回数で算定した。

3. 末梢血中血管血球系幹細胞と患者予後との関連の解明を目的とした、前向き経時的コホート研究

A. 研究計画書の作成および審査

兵庫医科大学病院倫理委員会において承認を受け、十分なインフォームドコンセントに基づいた本人（本人にその能力のない時は、その代理人）の意志で同意書を得た後に検査を施行した（資料 1：説明書、資料 2：同意書、参照）。また、施設外に出すサンプルは採取後に完全に匿名化を行い、個人識別情報は厳重に管理し、プライバシーの保護に努めている。

B. 対象患者群

- 1) 虚血性脳血管性障害患者
- 2) 痴呆症状を呈する患者（アルツハイマー型痴呆、脳血管性痴呆、混合型痴呆、前頭葉型痴呆、パーキンソン病にともなう痴呆症）

C. 血管血球系幹細胞解析方法

- 1) 解析方法によるばらつきを抑えるため、匿名化後、全ての病院のサンプルを国立病院機構大阪南病院に集積する。
- 2) 測定による変動や誤差を最小限とするために、我々は非常に精度の高い測定方法開発した。（解析の詳細に関しては、臨床研究実施チーム(a)組研究報告書を参照）
- 3) 採取血液中の CD34 陽性細胞の免疫組織化学的検討を行い、末梢血中 CD34 陽性細胞の形態を観察することにより、脳血管障害患者や痴呆患者の末梢血血管系幹細胞の質的評価を試みる。

D. 脳障害患者の病態評価（資料 3：症例報告書参照）

- 1) 脳障害による機能障害の評価
Barthel Index、modified Rankin Scale、NIHSS、MMSE、HDS-R、CDR、DSM-III-R による痴呆の判定
- 2) 経過中の脳血管障害（脳梗塞、TIA および脳出血等）の発症
- 3) 経過中の脳血管障害以外の虚血性循環器疾患（心筋梗塞、狭心症および ASO 等）の発症および死亡（全ての原因を含む）

E. エンドポイント

登録時における末梢血中 CD34 陽性細胞数と下記項目に関する関連を検討する。

- 1) 主要評価項目
 - i) 1 年以内の脳血管障害再発
 - ii) 登録時と 1 年後の比較による Barthel Index の低下

2) 副次評価項目

- i) 初回評価時と1年後の比較による NIHSS、modified Rankin Scale、MMSE、HDS-R、CDR の低下
- ii) 初回評価時と2年後の比較による Barthel Index、NIHSS、modified Rankin Scale、MMSE、HDS-R、CDR の低下
- iii) 登録時における NIHSS、modified Rankin Scale、Barthel Index、MMSE、HDS-R、CDR と CD34 陽性細胞の比例的関連
- iv) 2年以内の脳血管障害再発
- v) 1年および2年以内の痴呆症の発症
- vi) 1年および2年以内の脳血管障害以外の虚血性循環器疾患の発症、および死亡

研究結果

1. 末梢血中血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連に関する小規模断面研究

A. 末梢血幹細胞測定の実験的再現性の検討

最初に我々の測定系の検討を行い、脳梗塞患者における Cumulative intra-assay coefficient of variation が CD34、CD133、CD117、CD135 陽性細胞測定においてそれぞれ 14%、13%、14%、15%であり、臨床検査における許容範囲である 15%以内であることを確認した。また、正常人ボランティアを用いた検討においては、10日の間隔において測定した CD34、CD133、CD117、CD135 陽性細胞測定において、Test-retest intraclass correlations がそれぞれ 0.88、0.75、0.86、0.86 であり、健常人においては測定日による変動が少くないことを明らかにした。

B. 急性脳虚血後の末梢血中 CD34 陽性細胞数の経時的変化

急性期脳梗塞患者末梢血中の CD34 陽性細胞数の経時的検討では、虚血後 7日および 14日の時点で有意な上昇を認め、梗塞後 30日にはほぼ、虚血直後の値に戻っていた (図 1)。これらの結果より、慢性期患者に関しては梗塞後 30日以上経た時点で採血を行った。

C. 末梢血中 CD34 陽性細胞数と年齢の検討

正常対照群では末梢血中の CD34 陽性細胞数は年齢により低下する傾向が見られたが (図 2)、脳梗塞患者群では年齢による有意な減少は見られなかった (図 3)。

D. 慢性期脳梗塞患者における末梢血中幹細胞数と脳血流動態の関連

最初に末梢血中幹細胞数と plaque score による頸動脈動脈硬化性病変との関連を検討した。末梢血中の CD34 (図 4)、CD133、CD117、CD135 陽性細胞数と頸動脈動脈硬化性病変や内膜肥厚に関する有意な相関関係は見られなかった。頸動脈病変の進展には物理的なずり応力やマクロファージなど、他の因子が大きく関与するため、末梢血中幹細胞数の減少による動脈硬化発症の影響は比較的少ないと考えられた。

そこで次に、脳循環維持機構やその修復機構の破綻は脳虚血性病変と関連していると考え、MRI 上観察される虚血性病変と末梢血中幹細胞の関連について検討を行った。その結果、血管内皮前駆細胞系の幹細胞を多く含む CD34 抗原陽性細胞数 (図 5)、CD133 抗原陽性細胞数 (図 6) の減少が、脳梗塞巣の増加と有意に関連している一方、血管内皮前駆細胞と関連の薄い CD117 抗原 (図 7) および CD135 抗原細胞数 (図 8) との有意な関連は見られなかった。

E. 脳主幹動脈病変を有する患者における末梢血中幹細胞数と脳血流動態の関連

次に、脳循環代謝機能に対する、末梢血幹細胞関与の検討のため、PET を用いて脳主幹動脈閉塞あるいは高度狭窄のある患者の評価を行った。その結果、血管血球系幹細胞の属する分画である CD34 抗原陽性細胞数 (図 9)、CD133 抗原陽性細胞数 (図 10) の減少が、慢性虚血部位の脳血流量の低下に有意に関連しており、側副血行路の形成低下や血管反応性の低下など、血流血管維持機構の低下と関連していると考えられた

また CD34 抗原陽性細胞数減少患者においては、慢性虚血部位における酸素摂取率の反応性の上昇は認められず (図 11)、その結果酸素代謝量の低下が認められた (図 12) (図 1-12 は研究成果発表文献 *Circulation* より引用、改変)。

2. 血管血球系幹細胞と脳梗塞の病態の関連性を検討する基礎的研究

A. 脳梗塞モデル

マウス左中大脳動脈を凝固しはさみで切断すると、左大脳皮質の中大脳動脈領域に限定した再現性のよい均一な脳梗塞が作成されることが明らかになった (図 13)。脳梗塞作成後の動物の生存率は 3 ヶ月まではほぼ 100%で、CD34 陽性細胞投与群と CD34 陰性細胞投与群、生理食塩水投与群間での差は認められなかった。従って、本モデルが脳梗塞後に施した治療効果の長期観察に適していることが明かとなった。

B. 血管新生の評価

CD34 陽性細胞投与後 24 時間目の梗塞と正常脳の境界部の有効血管数 (angiographic score) や、BruU 陽性の新生血管内皮細胞数は CD34 群で有意

に多かった (図 14)。また、CD34 陽性細胞投与後 2 週目には CD31 免疫陽性の毛細血管が梗塞境界部に向かって水平に分布しており、この領域に血管新生が生じていることが示唆された (図 15)。

C. 神経再生の評価

左右大脳皮質幅の比 (Cortical Width Index) は 7 日目では 0.34 と 3 群間で差はなかったが、14 日目以降は CD34 群が陰性群と PBS 群に比べて有意に増加していた (図 16)。BrdU 陽性の再生神経細胞数も CD34 群で有意に多く (図 17)、さらに虚血領域の神経細胞数や神経前駆細胞数も CD34 陽性細胞投与群で有意に高かった。従って、CD34 陽性細胞投与による血管新生が神経再生を亢進させることが示唆された。

D. 脳機能の評価

オープンフィールドテストでは脳障害が強いほど動物の活動量は増えるが、CD34 群は他群に比し過剰な活動が少なく、また暗所での行動パターンも偽手術正常群と同様のレベルであった (図 18)。このことより、CD34 陽性細胞投与による神経再生が亢進した結果、大脳皮質の抑制性神経活動が保たれ、神経機能異常が軽快したものと考えられた。(図 13-18 は研究成果発表文献 *J Clin Invest* より引用、改変)

3. 末梢血中血管血球系幹細胞と患者予後との関連の解明を目的とした、前向き経時的コホート研究

本研究は末梢血中血管血球系幹細胞と患者予後との関連の解明を目的とした、前向き経時的コホート研究であり、各種痴呆症患者および虚血性脳血管障害患者を対象にした臨床研究プロトコールを作成し、兵庫医科大学の倫理委員会において承認後、患者エントリーを開始している。平成 17 年 3 月の時点で 60 名の患者の病態評価と末梢血中幹細胞の測定を終えており、引き続き患者登録を行っている。患者平均年齢は 74.5 歳 (55~93 歳) で、60 名のエントリー患者のうち、脳梗塞既往のあるものは 45 名、痴呆を有する者は 30 名であった (表 1)。痴呆患者のうち 13 例はアルツハイマー型痴呆、3 例はパーキンソン病ともなう痴呆と診断されている (表 2)。

本研究では、患者末梢血中幹細胞 (CD34 陽性細胞) を量的、質的に評価し、12 ヶ月後にも再評価することで、機能予後や痴呆の進行に関しても検討する予定である。予備研究において末梢 CD34 陽性細胞は単一の丸い核を有するほぼ円形の細胞であり、形態的に mononuclear cell であることが確認された (図 19)。細胞の形態学的変化が病態によって変化するかどうかを評価できれば血管系幹細胞機能を評価できる新たな有用な検査法として発展が可能であると考えている。

考察

我々はすでに末梢血中の CD34 陽性細胞や CD133 陽性細胞などの血管血球系幹細胞の減少が脳梗塞の発症と強く関連していること、そしてこれらの血管血球系幹細胞の減少が単に血流低下に関与しているだけではなく、血管新生に関わる血管内皮細胞の機能の低下とも関連していることを示している。このことは、末梢血中の血管血球系幹細胞が脳血管のメンテナンスに関与しているだけでなく、神経組織の代謝や機能にまで影響を与え高次神経機能の低下や痴呆症の発症とも関連しており、血管系幹細胞数が多ければ神経機能が改善する可能性を示唆している。

実際、マウス脳梗塞モデルを用いた動物実験では、脳梗塞後に投与した血管血球系幹細胞が脳内で血管内皮細胞に分化して神経再生を亢進させることにより神経機能を改善させることが明かとなっている。しかし、本研究の予備結果ではアルツハイマー型痴呆患者で末梢血中血管血球系幹細胞数の増加が観察されており、これは血管血球系幹細胞数と神経変性が必ずしも相関しないことを示すか、あるいは血管血球系幹細胞の機能と神経機能との間に関連性がある可能性も考えられる。これらの結果を基礎に、前向き経時的コホート研究においては、血管血球系幹細胞の形態学的検討を組み合わせた評価を行っており、痴呆症の病態解明や治療法の開発に直結する知見も得られると考えている。

結論

我々は慢性脳低灌流動患者における血管新生による側副血行維持に血管血球系幹細胞が関与すること(1)、脳梗塞動物モデルにおいては、血管血球系幹細胞の移植が、脳機能の改善をもたらすことを明らかにしてきた(2)。これらの研究は、脳梗塞患者に対する血管血球系幹細胞移植による治療法の可能性を示すものである。さらに現在、血管再生と神経再生との関連についての検討、および霊長類を用いた血管系幹細胞移植実験を開始している。今後は本研究で得られた知見と総合し発展させることにより脳梗塞患者に対する新しい治療法が確立されると考えている。

文献

- 1) Taguchi A, Matsuyama T, Soma T, et al. (2004) Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109:2972-2975.
- 2) Taguchi A, Soma T, Nishimura H, Yoshikawa H, Matsuyama T, et al. (2004) Administration of CD34⁺ cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model. *J Clin Invest* 114: 330-389.

厚生労働科学研究研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
研究報告書

臨床研究実施チーム（a組）

脳血管障害における末梢血 CD34 陽性細胞定量法の開発

芳川 浩男	兵庫医科大学医学部	神経内科	教授
中込 隆之	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者
沖中 由佳	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者

研究要旨

血管維持と血管新生において、末梢血中に存在する CD34 陽性細胞を含め、血管内皮前駆細胞(EPCs)の役割が指摘されている。我々は CD34 陽性細胞が多ければ脳循環代謝が改善する可能性を示したが、その可能性を証明するために基礎実験で、CD34 陽性細胞の投与が血管新生を促進すること、および CD34 陽性細胞が血管新生を介して神経再生を促すことを明かとした (1)。これは、EPCs と脳機能との関連性を強く示唆するデータであるが、脳血管障害など脳機能に障害を持つ患者での検証が必要となる。その目的を果たすために、本研究では CD34 陽性細胞が少ない脳血管障害患者においても末梢血中の CD34 陽性細胞の絶対数を容易に測定できる新しい方法の開発を、国立病院機構大阪南医療センター相馬らと共に行った。

研究目的

血管維持と血管新生において、末梢血中に存在する CD34 陽性細胞を含め、血管内皮前駆細胞(EPCs)の役割が指摘され始めている。CD34 陽性細胞はまた、虚血性疾患で成長因子、血管再生誘導因子として血管恒常性を与えるものともされている。さらに、心臓性虚血(cardiac ischemia)や下肢への細胞移植といった臨床的試みも、有効な結果があるとしてなされている。以上のことに基づき、脳血管障害患者の循環血液中の EPCs と CD34 陽性細胞も注目されることとなり、血管機能レベルとの強い関係が報告された。しかしながら、EPCs と CD34 陽性細胞の評価法は簡単でもなければ、単純なものでもない。ましてや、脳血管障害患者の CD34 陽性細胞は少ないので、日常的に FACS 解析することは不可能である。本報告書において、我々は CD34 陽性細胞が少ない患者でもその絶対数を容易に測定できる新しい方法を開発したので報告する。

研究方法

1. 研究計画書の作成および審査

本研究は兵庫医科大学倫理委員会、大阪南医療センター倫理委員会および国立循環器病センター高度先駆的医療・研究専門委員会および倫理委員会により認可され、すべての検体はインフォームドコンセントに基づき採取した。実験結果は平均±標準誤差(SE; standard error)で表記する。

2. 末梢血の解析方法

脳血管障害患者より 3ml の末梢血をヘパリン採血した。まず最初に、ProCount(BD Bioscience, San Jose, California, USA) と Stem-Kit(Beckman Coulter, Marseille, France)の標準プロトコルを用いて CD34 陽性細胞を測定した。これらのプロトコルは ISHAGE ガイドラインに基づき、動員末梢血中の CD34 陽性細胞数の測定に用いられている。次に、CD34 陽性細胞のカウント数をあげるために、Stem-Kit のプロトコルを以下のように改良した。サンプル量、抗体量、溶血試薬量を倍量にした。標準粒子コントロールビーズ(Stem count: Beckman Coulter)を 30 μ l 加えた後、450g で 5 分間遠心し、注意して 3860 μ l の上澄みを取り除いた。サンプルを Coulter CYTOMICS FC500 & XL-system II software (Beckman Coulter)で 6 分間測定した。

まず最初に、全細胞から、7-AAD で染まっている細胞(死細胞)を除いた領域 A を設定した後(図 20)、領域 A の細胞から、すべての CD45 陽性細胞(白血球)をふくめた領域 B を設定し(図 21)、領域 C はリンパ球(bright CD45, low Side Scatter) のみに設定した。次に、領域 A と B の細胞から、CD34 陽性の血液細胞前駆細胞(HPCs)をふくめた領域 D を設定し(図 22)、領域 A と B と D の細胞から、CD34 陽性 HPCs(low side scatter and low to intermediate CD45 staining)の集団を領域 E に設定することにより(図 23)、CD45 で明るく染まっている細胞を除いた。そして、領域 A と C の細胞から、混在しているかもしれない血小板を除くために、リンパ球・芽球の領域 F を設定した(図 24)。領域 A と B と D と E の細胞から、領域 F に存在する細胞のみを CD34 陽性 HPCs とした(図 25)。すべての蛍光色素や検出器は ISHAGE ガイドラインによる。全細胞から、標準粒子コントロールビーズである領域 G を設定した(図 26)。

研究結果

1. CD3 陽性細胞カウント数の増加

動員末梢血中の白血球分画における CD34 陽性細胞は約 0.2-0.5%とされている。最初に、ProCount と Stem-Kit を用いて心臓血管疾患(cardiovascular disease)患者の末梢血中の CD34 陽性細胞を測定した(table 1)。白血球分画の CD34 陽性細胞パーセントは、 $0.024 \pm 0.003\%$ (range: 0.012%-0.06%; ProCount)と $0.021 \pm 0.001\%$ (range: 0.011%-0.032%; Stem-Kit)であった。細胞のカウント数は再現性を決めるにあたり、主な要因の一つである。そこで我々は CD34 陽性細胞のカウント数を上げるためにプロトコルを改良した。しかし、単にサンプル量を増やし、測定時間を増やしただけでは再現性を改善することはできない。なぜなら、標準粒子コントロールビーズの細胞への吸着、沈降、細胞の凝集が起こるからだ。そこで従来のプロトコルを改良し、短い測定時間でより多くのカウント数を得ようとした。結果として、CD34 陽性細胞のカウント数は平均 174 ± 18 (range: 88-404)に増加し、白血球におけるパーセント値は標準プロトコルの測定結果に近い 0.019 ± 0.002 (range: 0.014%-0.038%)であった。取り除いた上澄みは解析したところ、細胞も標準粒子コントロールビーズも見当たらなかった。

2. 累積変動係数の向上

文献等によると、動員末梢血で測定した変動係数は、ProCount では 8%、Stem-Kit では 4%である。しかし、脳血管障害患者の非動員末梢血では、動員末梢血と比較してみると、CD34 陽性細胞は 10%程度であった。累積変動係数でみれば、ProCount で 30.3%、Stem-Kit で 25.7%であった。我々の測定法では同じ測定時間で 5 倍にも細胞カウント数を増加させることができ、累積変動係数も 7.4%であった(表 3)。

考察

CD34 陽性細胞数は各方法とも近い値を示しているが、実際十分な再現性が得られたのは改良した方法であった。そして新しい方法は、我々が以前用いた手法よりも再現性のあるものとして、取り入れた。

CD34 陽性細胞の CV 値は、得られた CD34 陽性細胞数の平方根に比例して変動する。CV 値を 10%得るには最終的な CD34 陽性細胞のカウント数が 100 は必要である。改良プロトコルでは、100 以上のカウント数を得て、CV 値も 7%となった。単にサンプル量を増やし、測定時間を長くしただけでは再現性を改善することはできない。末梢血中に CD34 陽性細胞が少ない患者の CD34

陽性細胞の絶対数を、この ISHAGE プロトコールを改良したもので、ただちに正確に測定し得ることを、この結果で示すことができた。この簡便な方法は、末梢血において幹細胞分画である CD34 陽性細胞の正確な測定方法となり、心臓脳血管障害患者のみならず他のあらゆる疾患、あらゆる状態の患者検体をスクリーニングすることが可能である。

結論

患者末梢血中の CD34 細胞数を信頼性高く定量する方法を開発した。

文献

- 1) Taguchi A, Soma T, Nishimura H, Yoshikawa H, Matsuyama T, et al. (2004) Administration of CD34⁺ cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model. *J Clin Invest* 114: 330-389.

厚生労働科学研究研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
研究報告書

臨床研究実施チーム（b組）

痴呆患者における患者病態と末梢血CD34陽性細胞定量法の関連

西村 裕之	兵庫医科大学医学部	神経内科	助手
辰巳 美晶	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者
森岡 佳恵	兵庫医科大学医学部	神経内科	専門臨床研究者

研究要旨

血管系幹細胞を用いた心血管再生療法はすでに臨床応用がなされている。これを虚血性脳血管障害による血管性痴呆やアルツハイマー型老年痴呆に応用できれば高齢者の福音となる。脳血管再生療法が脳機能を改善し、痴呆の治療法となりうるかどうかを評価する目的で、脳血管性痴呆患者やアルツハイマー型痴呆患者など痴呆患者を対象に血管再生に関わる末梢血中血管系幹細胞（CD34陽性細胞）数を測定し、1）臨床診断の根拠として活用できるか、2）早期診断に有用であるか、3）虚血性脳血管障害や痴呆の予後の予測が可能であるか、について検討した。本研究では、末梢血中幹細胞（CD34陽性細胞）を量的、質的に評価し、12ヶ月後にも再評価することで、機能予後や痴呆の進行に関しても検討する予定である。

研究目的

近年の高齢社会において脳血管障害後遺症による痴呆など要介護患者の急激な増加は重大な社会問題となっている。最近注目されている血管新生療法は、循環器領域における虚血臓器障害の治療の新戦略として注目されているが、神経領域における応用を支持しうる十分な臨床データがないのが現状である。本研究では血管再生に関わる血管系幹細胞が虚血性脳血管障害患者の予後決定に関与するか、アルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆における痴呆進展と相関があるかどうかを検討した。痴呆症例の解析においてはアルツハイマー型痴呆などの神経変性型痴呆症例と脳血管性痴呆症例の末梢血中血管系幹細胞の対比検討を予定している。それによりアルツハイマー型痴呆症における血管因子の関与が明らかになると共に、脳血管性痴呆症とアルツハイマー型痴呆症の鑑別診