

血管新生を促進し、臓器障害を予防するという戦略がとられている。我々はマウス脳梗塞モデルを用いて脳梗塞後の血管再生が神経機能の回復に必須であることを明らかにしてきたが、本研究ではそれらの知見を脳梗塞患者に応用するための知見の収集を行った。

方法

1. 我々が開発した非常に再現性の高いマウス脳梗塞モデルを使用し、脳梗塞後の①骨髄単核球投与、②顆粒球を含む全骨髄球投与、③G-CSFによる骨髄細胞の動員、等の治療による脳梗塞後の神経機能の改善効果に関する検討を行うと共に、それらの最適な治療時期についても検討を行った。

2. 脳梗塞後骨髄単核球投与の安全性および有効性の検討のため、カニクイザル脳梗塞モデルの手技の検討を行うと共に、長期予後に関する検討を行った。

結果

1. 脳梗塞後の G-CSF により脳梗塞巣周囲に著明な萎縮を認めると共に、神経機能の改善効果は全く認められなかった。また、顆粒球を含む全骨髄球投与においても、脳萎縮の促進を認めると共に、神経機能改善効果は認めなかった。

2. 脳梗塞後の骨髄単核球投与により、形態学的な改善効果を認めると共に、神経機能の改善を認めた。

3. 脳梗塞後の骨髄単核球投与は比較的少量の単核球細胞でも効果があることおよび脳梗塞 2-10 日目の投与で治療効果があるものの、48 時間以内の急性期および 11 日目以降の慢性期には治療効果がないことを明らかにした。

4. 放射光を用いた再生血管の評価

コントロール群で脳梗塞を来した大脳半球を撮影すると、対側の大脳半球と

比較して脳実質の萎縮が目立ち、梗塞巣周囲では脳表動脈は描出されるものの Perforator は消失していた。骨髄単核球投与群では脳実質の萎縮はあまり認められず、Perforator は対側の梗塞を来していない大脳半球のそれと比較してやや拡張や蛇行を認めるが、先述した正常血管解剖を参照して詳細に検討すると、治療群では移植によって本来の Perforator が残存していると考えられた。また、梗塞巣周囲で正常ではあまり血管が存在しない分水嶺や脳室周囲深部白質に Perforator よりも微細な血管が増生しており、移植により誘導された再生血管と考えられた。よってこれら再生血管が梗塞巣への側副路となり、梗塞巣へ必要な血液を供給したと示唆された。

5. カニクイザル脳梗塞モデルでは、既存の手技では脳ヘルニアによる急性期での死亡(骨髄細胞投与前)のため慢性期の観察が不適であることを明らかにし、比較的小さな脳梗塞が形成される方法の開発を行った。

6. 脳梗塞後に長期生存したカニクイザルにおいては、骨髄投与 8 ヶ月後の時点においても、出血や痙攣などの副作用は観察されなかった。

考察

脳梗塞後の骨髄系幹細胞の投与においては、炎症の促進などによる脳萎縮の拡大などの可能性があり、移植細胞を十分に考慮する必要があると考えている。また、カニクイザル脳梗塞モデルにおける慢性期の評価には今年度に行った PET や MRI (T1、T2、DWI) による評価とともに、perfusion MRI などを組み合わせた検討も必要であると考えている。

結論

脳梗塞後の神経幹細胞の投与では治療効果がほとんどないことが、様々な基

基礎研究および臨床試験で明らかになってきているが、血管血球系幹細胞の減少と認知機能の低下や循環器疾患の発症との関連の知見と総合することにより、新しい治療法の開発につなげることが可能であると考えている。

健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 吉原智之, 田口明彦, 中込隆之, 松山知弘, 温 仲民, 成富博章

脳梗塞後の G-CSF 投与による脳組織障害

第 30 回日本脳卒中学会

2005.04.22

2. 吉原智之、太田正佳、糸数裕、松本直也、出澤真理、鈴木義久、足立 靖 4、

池原進、田口明彦、杉本壽、井出千束

急性期の脊髄損傷に対する骨髄単核球細胞移植の有効性

第 33 回日本救急医学会

2005.11.26

3. 吉原智之、太田正佳、糸数裕、松本直也、鈴木義久、出澤真理、田口明彦、

杉本壽、井出千束

第 11 回日本脳神経外科救急学会

急性期の脊髄損傷に対する骨髄単核球細胞移植の有効性

2006. 1. 20

分担研究課題

末梢血中血管血球系幹細胞と認知症に関する研究

分担研究者

松山知弘 兵庫医科大学 先端医学研究所 教授

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脳血管性認知症やアルツハイマー型認知症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、認知症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、脳血管性認知症患者やアルツハイマー型認知症患者など認知症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。71名のエントリー患者のうち、脳梗塞既往のあるものは48名、認知症を有する者は29名であった。本研究では、末梢血中 CD34 陽性細胞を量的、質的に評価することで、機能予後や認知症の進行に関しても検討した。

A. 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認知症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、アルツハイマー型認知症や脳血管性認知症における認知症進展と相関があるかどうかを検討した。認知症症例の解析においてはアルツハイマー型認知症などの神経変性型認知症症例と脳血管性認知症症例の末梢血中血管系幹細胞の対比検討によりアルツハイマー型認知症における血管因子の関与が明らかになると共に、脳血管性認知症とアルツハイマー型認知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。

B. 研究方法

1) 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。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。

2) 対象患者群および病態評価

脳梗塞発症後 30 日以上の患者 48 名（うち脳血管性認知症症状を呈するもの 16 名）、アルツハイマー型認知症患者 13 名、アルツハイマー型と脳血管性認知症の混合型認知症患者 10 名を対象とし、NIHSS、modified Rankin scale、Barthel Index、Mini Mental State Examination (MMSE)、長谷川式痴呆スケール(HDS)、Global Clinical Dementia Rating (CDR)を行い、末梢血中 CD34 陽性細胞測定用の採血を行った。

3) 血管血球系幹細胞解析方法

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し、測定による変動や誤差を最小限とするために、我々が開発した非常に精度の高い測定方法にて解析した。

また、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とともに、血管内皮前駆細胞によるコロニー形成能を測定することにより (EndoCult Liquid Medium Kit, StemCell Technologies)、脳血管障害患者や認知症患者の末梢血血管系幹細胞の質的評価を試みた。

4) 脳障害患者の病態評価 (症例報告書参照)

Barthel Index、modified Rankin Scale、NIHSS、MMSE、CDR、DSM-III-R、HDS-Rにより認知症の判定を行い、経過中の脳血管障害 (脳梗塞、TIA および脳出血等) の発症と、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) を評価する。

5) 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。

6) 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

7) 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年以内の認知症の発症
- 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

C. 研究結果

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、各種認知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、各施設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71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74.4歳（55-93歳）で、71名のエントリー患者のうち、脳梗塞既往のあるものは48名、認知症を有する者は29名であった。認知症患者のうち13例はアルツハイマー型認知症、10例は脳血管性認知症、6例は混合型痴呆と診断されている。

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調査している。

認知症の病型分類と末梢血中 CD34 陽性細胞との関連

i) 量的検討

脳血管性認知症およびアルツハイマー型認知症患者、混合型認知症群における末梢血中血管血球系幹細胞の定量的評価においては、脳血管性認知症群で著明な低下を認めるものの、アルツハイマー型認知症患者群においては明らかな低下は認めなかった。また混合型認知症群においては、低値～高値群までの分布を示しており、混合型認知症群における血管性因子の多様性を示しているものと考えている。

ii) 質的検討

末梢血中 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 1)。健常人や脳血管障害患者群においては末梢血中血管内皮前駆細胞によるコロニー形成能は CD34 陽性細胞数とよく相関したが、アルツハイマー型認知症患者群においては相関がみられなかった。また、その血管コロニー形成細胞は脆弱であり、血管血球系幹細胞の機能的変化が認知症病態の基盤に存在することが示唆された(図 2)。これにより、末梢血中血管内皮前駆細胞によるコロニー形成能の測定が、認知症群における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する可能性があると考えている。

D. 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、脳血管を構成する血管内皮細胞の平均寿命は約 3 年であることを考えると、末梢血中の血管血球系幹細胞が脳血管や脳血液関門のメンテナンスを介して神経組織の代謝や機能にまで影響を与え、脳神経機能の維持に重要な機能を果たしていることを示唆するものであり、末梢血中血管血球系幹細胞減少を伴う認知機能患者に対する、新しい治療法の発展に繋がるものであると考えている。

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、アルツハイマー型認知症患者では末梢血中幹細胞数の増加が観察されるにもかかわらず血管内皮細胞形成機能はかならずしも保たれていないことから、アルツハイマー型認知症患者における脳機能低下の背景に血管血球系幹細胞の機能低下による血管性因子の関与が存在する可能性が示唆された。これらの結果を基礎に、今後の前向きコホート研究では認知症の病態解明や治療法の開発に直結する知見が得られると考えている。

E. 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⁾。本研究で得られた結果は、血管血球系幹細胞が認知症の病態と深く関わっていることを示すものであり、脳梗塞患者や認知症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。今後は血管血球系幹細胞に関する医療技術と総合することにより、脳梗塞患者や認知症患者に対する新しい治療法が確立される

と考えている。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Taguchi, A., Matsuyama, T., et al. (2004) Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation*, 109:2972-2975.

2) Taguchi, A. Soma, T., 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.

2. 学会発表

1) 松山知弘, 田口明彦ら (2004) CD34 陽性細胞移植による脳梗塞の血管再生治療の基礎的検討. 第 27 回日本神経科学大会, 第 47 回日本神経化学大会, 合同大会.

2) 高岡俊雄, 松山知弘, 中込隆之, 西村裕之, 芳川浩男, 田口明彦, 福永満里, 山下達也, 石川誠 (2005) 脳梗塞急性期治療薬としてのシロスタゾールの基礎的評価:脳再生効果に焦点をあてて. 第 30 回日本脳卒中学会総会, 4. 21-22, 盛岡

3) 吉原智之、田口明彦、中込隆之、松山知弘、温 仲民、成富彰博 (2005) 脳梗塞後の G-CSF 投与による脳組織障害. 第 30 回日本脳卒中学会総会, 4. 21-22, 盛岡

4) 松山知弘、田口明彦、中込隆之、西村裕之、成富博章、芳川浩男 (2005) 脳梗塞に対する血管再生療法に関する基礎的検討. 第 46 回日本神経学会総会, 5. 25-27, 鹿児島

3. 平成 17 年度研究成果等普及啓発事業

発表会 (長寿科学総合研究)

松山知弘、田口明彦、芳川浩男、相馬俊裕、中山博文, 「どうすれば脳・血管は若返るか」, 平成 17 年 11 月 19 日, 兵庫医科大学平成記念会館, 西宮

4. 学術講演

1) 松山知弘 (2005) 脳梗塞モデルにおけるシロスタゾール急性期投与の治療効果. Fighting Vascular Events in Osaka-4, 9. 10, 大阪.

2) 松山知弘 (2004) 血管新生と神経再生, 金沢大学 21 世紀 COE 公開シンポジウム「発達・学習・記憶と障害の革新的脳科学の創生」, 11. 25, 金沢

3) 松山知弘 (2005) 脳梗塞に対する血管再生療法, 第 3 回福井大学 21 世紀 COE プログラムワークショップ「神経科学における多様なイメージング技術の応用と統合」, 3. 14, 福井

- 4) 田口明彦 (2004) 脳血管障害における CD34 陽性細胞測定の意義, 第 1 回脳血管障害の病態・治療研究会—急性期から慢性期まで—, 11.9, 豊中
- 5) 松山知弘 (2005) 脳卒中の治療戦略. 西宮市医師会総合臨床研究会, 2.9, 西宮
- 6) 松山知弘, 田口明彦, 芳川浩男 (2004) 脳梗塞に対する血管再生療法. 第三回大阪神経治療研究会, 4.15, 大阪

5. 総説・雑誌

- 1) 松山知弘、安部康二、卜部貴夫 (2005) 脳卒中とその予後 (Post Stroke) —脳保護を目指した治療戦略—, 日経メディカル9月号: 170—175.
- 2) 田口明彦、松山知弘 (2004) 脳こうそく、血管幹細胞で神経再生, 読売新聞夕刊, 9月17日, p. 1
- 3) 田口明彦、松山知弘 (2005) 脳こうそく、幹細胞不足再発要因か, 読売新聞朝刊, 2月2日, p. 3

H. 知的財産権の出願・登録状況

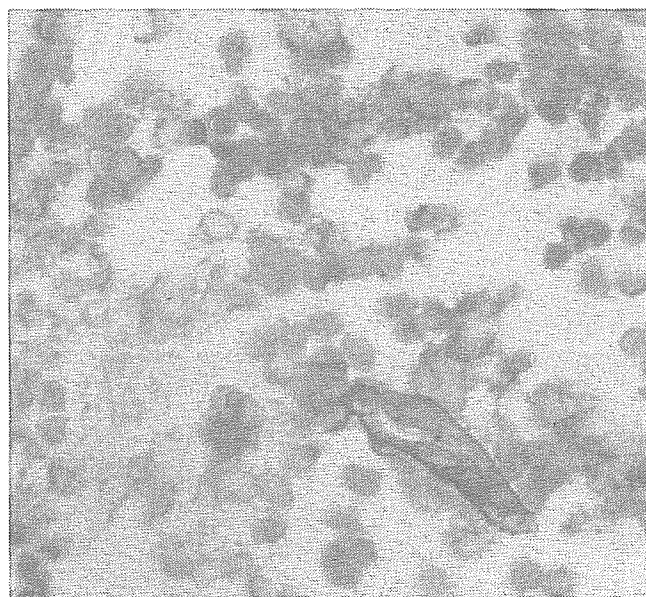
1. 松山知弘、田口明彦、芳川浩男 (2004) 「脳梗塞疾患モデルマウス」、特願 2004-108500 (特開 2005-287430), 科学技術振興機構 (JST)
2. 松山知弘、田口明彦、芳川浩男 (2005) 「神経幹細胞の調整法」、特願

2005-35032 (国際出願 PCT/JP2006/302350), 財団法人新産業創造研究機構,
財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

図1 末梢血中CD34陽性細胞

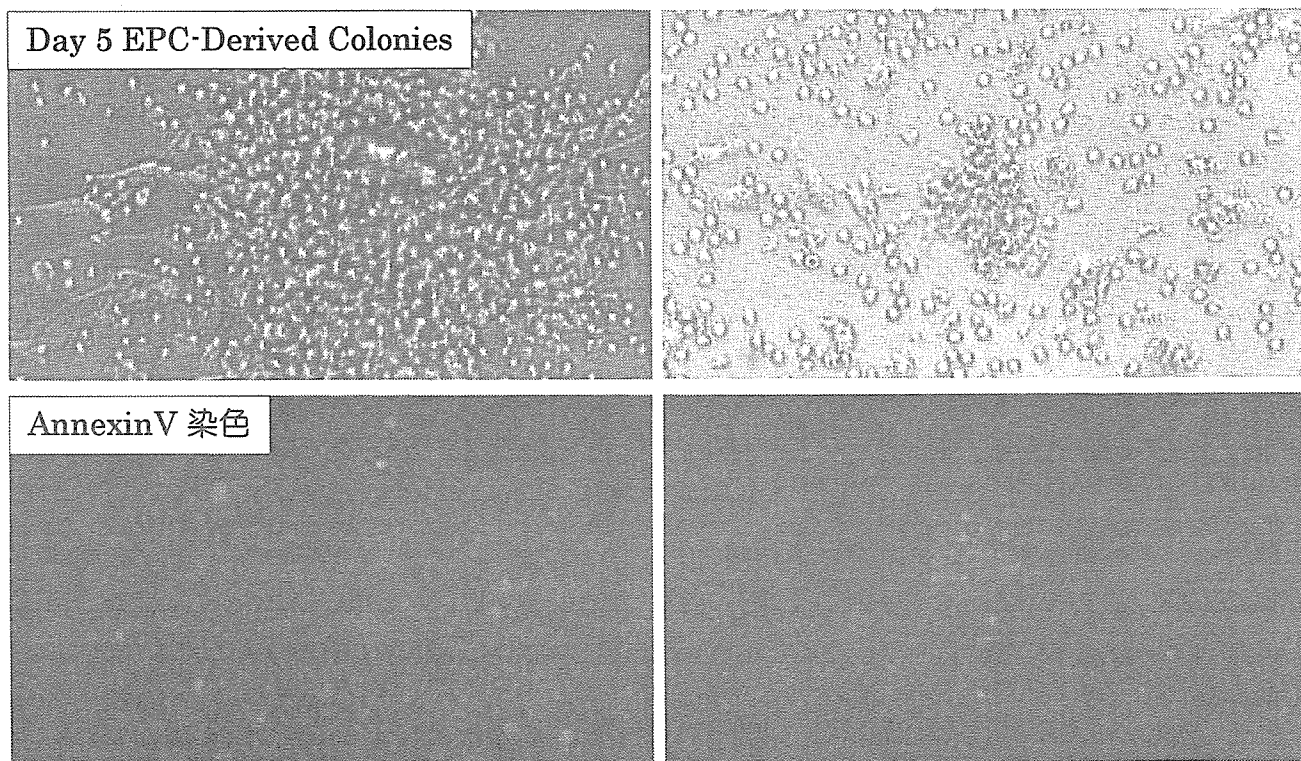


CD34陽性細胞



Diff-Quik染色

図2 痴呆患者における血管内皮前駆細胞コロニー形成とその質的変化



血管性認知症

アルツハイマー型

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）分担研究報告書

分担研究課題

糖尿病患者における末梢血中 CD34 陽性細胞の減少と心機能障害

分担研究者

田口明彦	国立循環器病センター研究所	循環動態機能部	室長
成富博章	国立循環器病センター	内科脳血管部門	部長

共同研究者

岡田 定規	国立循環器病センター	代謝内科	医師
吉政 康直	国立循環器病センター	代謝内科	部長
吉原智之	国立循環器病センター	内科脳血管部門	専門臨床研究者
清水葉子	国立循環器病センター	内科脳血管部門	専門臨床研究者

研究要旨 近年、血管内皮前駆細胞数の減少が血管内皮機能障害の程度と関連することや、心血管イベントの予知因子となりうることが注目されており、2型糖尿病患者では非糖尿病患者と比較して、血管内皮前駆細胞数が減少していることが報告されている。本研究で我々は高齢 2 型糖尿病患者において、末梢血中の血管内皮前駆細胞数が左心機能障害に関連する可能性を明らかにした。

A. 研究目的

2 型糖尿病患者の左心機能障害の評価における血漿 BNP (B-type Natriuretic Peptide) 濃度の有用性が報告されていることを用いて 5、高齢 2 型糖尿病患者

における左心機能障害と末梢血 CD34 陽性細胞数の関連を検討する。

B. 研究方法

当院動脈硬化代謝内科に入院した 60 歳以上の 2 型糖尿病患者のうち、明らかな冠動脈疾患を有さない 31 人(男性 14 人、女性 17 人)を対象とした。

測定項目 病歴から糖尿病罹患歴および冠動脈疾患の既往について調査した。病歴上、冠動脈疾患が疑われる例については、経胸壁心臓超音波検査または負荷心筋 SPECT 検査、冠動脈造影検査を行い冠動脈疾患の鑑別診断を行った。 早朝空腹時に末梢血採血を行い、血漿 BNP 濃度、CD34 陽性細胞数、空腹時血糖、HbA1c、血清クレアチニン、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、トリグリセライドを測定した。 また、同時期に臥位で血圧測定を行った。

末梢血 CD34 陽性細胞数測定方法 末梢血からフローサイトメーター (FACS 法) を用いて、CD34 陽性細胞の定量を行った。

高血圧症、高脂血症の定義 高血圧症として、収縮期血圧 140mmHg 以上、拡張期血圧 90mmHg 以上、降圧剤内服のいずれかを満たすものと定義した。 高脂血症として、総コレステロール 220mg/dl 以上、LDL コレステロール 140mg/dl 以上、HDL コレステロール 40mg/dl 未満、トリグリセライド 150mg/dl 以上、脂質降下剤内服のいずれかを満たすものと定義した。

解析方法 血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞数について単変量解析を行った。また、血漿 BNP 濃度とその他の臨床データ(年齢、性別、BMI、血清クレアチニン、空腹時血糖、HbA1c、糖尿病罹患歴、高血圧症、高脂血症)について単変量解析を行った。 単変量解析で相関を認めた項目について、最小 2 乗法による多変量解析を行った。

C. 研究結果

臨床背景

	n=31
年齢 (年)	70.3 ± 6.6
男性, n (%)	14 (45%)
BMI (kg/m ²)	25.8 ± 4.3
血漿BNP濃度 (pg/ml)	85.8 ± 292.3
末梢血CD34陽性細胞数 (/μl)	0.83 ± 0.49
血清クレアチニン (mg/dl)	0.76 ± 0.31
空腹時血糖 (mg/dl)	180 ± 55
HbA1c (%)	9.2 ± 1.8
糖尿病罹患歴 (年)	16.7 ± 10.4
収縮期血圧 (mmHg)	143 ± 20
拡張期血圧 (mmHg)	75 ± 13
総コレステロール (mg/dl)	197 ± 40
LDLコレステロール (mg/dl)	123 ± 34
HDLコレステロール (mg/dl)	53 ± 16
トリグリセライド (mg/dl)	131 ± 68
薬剤	
β 遮断薬, n (%)	3 (10%)
Ca拮抗薬, n (%)	17 (55%)
ACE阻害薬/ARB, n (%)	13 (42%)
スタチン, n (%)	12 (39%)
TZD誘導体, n (%)	2 (6%)
高血圧症, n (%)	27 (87%)
高脂血症, n (%)	19 (61%)

mean±S.D.

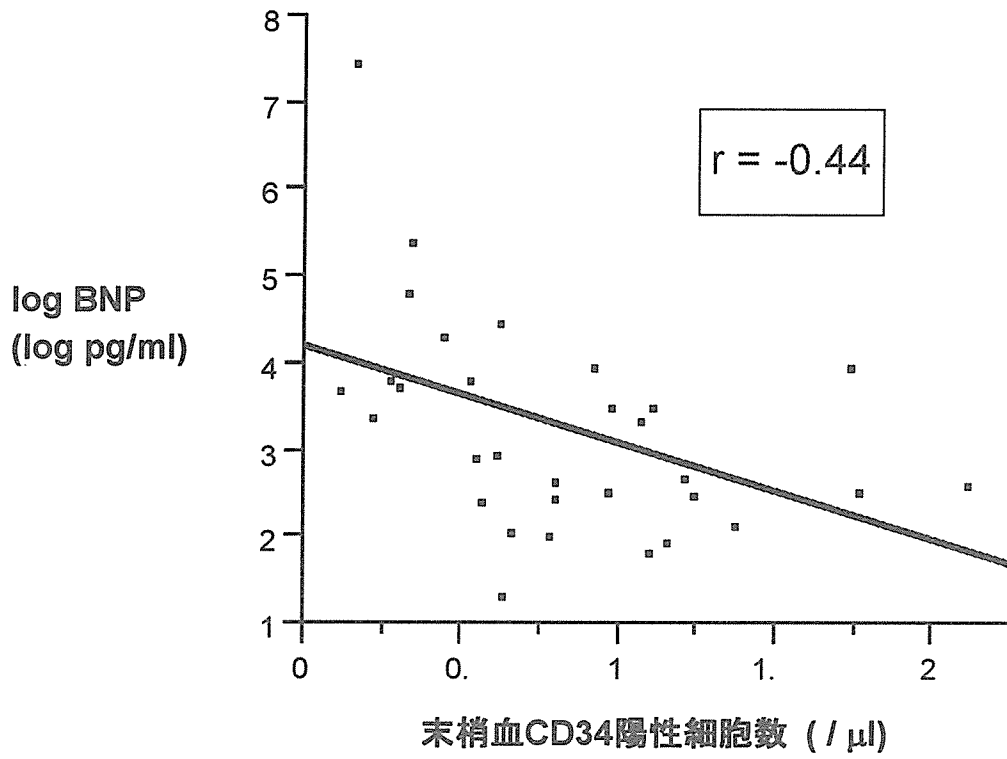
血漿 BNP 濃度と臨床データの単変量解析

	β	S.E.	<i>P</i>
末梢血CD34陽性細胞数	-1.11	0.42	0.01
年齢	0.08	0.03	0.01
男性	-0.27	0.45	0.55
BMI	-0.03	0.05	0.60
血清クレアチニン	0.80	0.72	0.27
空腹時血糖	0.00	0.00	0.44
HbA1c	-0.13	0.13	0.29
糖尿病罹患歴	0.02	0.02	0.45
高血圧症	0.86	0.65	0.20
高脂血症	0.22	0.46	0.63

血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞数、年齢の多変量解析

	β	S.E.	<i>P</i>
末梢血CD34陽性細胞数	-0.87	0.40	0.04
年齢	0.07	0.03	0.03

血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞の単変量解析



心臓超音波所見との関連

経胸壁心臓超音波検査を実施した 28 例において、血漿 BNP 濃度および血管内皮細胞数と心臓超音波所見との解析を行った。心臓超音波検査により以下の所見を測定した。左室内径短縮率 (%FS) 左室重量係数 (LV mass index) 左室流入拡張早期波/左室流入心房収縮期波 (E/A) 心臓超音波所見

%FS (%)	37.1 ± 7.0
LV mass index (g/m ²) (n=27)	98.9 ± 40.9
E/A (n=27)	0.79 ± 0.24
mean ± S.D.	

血漿 BNP 濃度と心臓超音波所見の単変量解析

	β	S.E.	P
%FS	-0.03	0.03	0.03
log LV mass index (n=27)	2.65	0.73	0.00
E/A (n=27)	2.22	0.94	0.03

D. 結果のまとめ、および考察

1. 単変量解析において、血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞数は負の相関を認めた。また血漿 BNP 濃度と年齢は正の相関を認めた。2. 多変量解析において、末梢血 CD34 陽性細胞数は年齢と独立して血漿 BNP 濃度と負の相関を認めた。