

Z00500383 A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究(痴呆・骨折臨床研究)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  
(臨床研究実施チームの整備)

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 松山 知弘

平成 18 (2006) 年 3 月

## 目次

I. まえがき	2
II. 研究組織	3
III. 研究報告	
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血管血球系幹細胞投与の影響	14
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血管血球系幹細胞との関連性	17
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	22
V. 研究成果の刊行物・別刷	23
VI. 資料	53
VII. 研究報告の図および表	68

## 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認知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。

脳卒中や認知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認知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、認知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 先端医学研究所 教授

### 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17年度厚生労働科学研究費補助金  
長寿科学総合研究（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 教授  
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、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、脳梗塞患者における末梢血中血管系幹細胞と脳循環病態に関する断面的検討においては、前年度に我々が明らかにした、末梢血中血管血球系幹細胞の定量的評価と画像診断との関連だけではなく、末梢血中血管血球系幹細胞の減少が、①Barthel Index や modified Rankin Scale、NIHSS など脳梗塞による機能障害の程度とは相関を示さないものの、②MMSE により評価された認知機能の低下や、③Clinical Dementia Rating による痴呆評価との相関を見出した。ま

た、認知症患者群における末梢血中血管系幹細胞の解析では、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を量的、質的に評価し、血管系幹細胞が脳梗塞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。その結果、CD34 陽性細胞数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。一方、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。さらに、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。これらの結果は、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認知症の発症とも関連していることを示すとともに、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。

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。我々は、血管再生と神経再生との関連についての関連について明らかにしてきたが、これらの知見に再生学的手法を取り入れることにより、認知症患者や脳梗塞患者に対する新しい治療法として発展させることができると考えている。

## 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認知症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。認知症の治療法の確立は、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認知症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。また、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を質的量的に対比検討した。それ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質的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) 認知症症状を呈する患者（アルツハイマー型、脳血管性、混合型認知症）

#### 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、平成 16 年度臨床研究実施チーム(a) 組研究報告書を参照）

#### 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

## 2. 末梢血中血管血球系幹細胞と認知症の病態の関連に関する小規模断面研究

### A. 対象患者群

- 1) 脳血管性認知症、混合型認知症およびアルツハイマー型認知症患者
- 2) 慢性期虚血性脳血管障害患者：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  
解析方法によるばらつきを抑えるため、サンプルを国立病院機構大阪南病院に集積した。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、リバースパイペ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) 末梢血中血管内皮前駆細胞によるコロニー形成能の観察  
各患者より 3ml のヘパリン加採血を行い、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した。また、EndoCult Liquid Medium Kit (StemCell Technologies)を用いて血管内皮前駆細胞によるコロニー形成能を測定した。培養開始後 5 日目にスプラウト形成血管内皮前駆細胞コロニー数を計測した。さらに、AnnexinV 染色を施してコロニー中の細胞死を観察し、内皮前駆細胞の脆弱性を検討した。

### C. 脳梗塞患者の病態評価

- 1) 観察項目
  - i) 脳障害による機能障害の評価  
Barthel Index、modified Rankin Scale、NIHSS、MMSE、CDR、DSM-III-R による判定を行った。
  - ii)経過中の脳血管障害（脳梗塞、TIA および脳出血等）の発症

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)

## 2) 評価項目

- i) 病態と末梢血中幹細胞の関連性の検討
- ii) 脳血管障害再発と末梢血中幹細胞の関連性の検討
- iii) 脳血管障害以外の虚血性循環器疾患の発症、死亡と末梢血中幹細胞の関連性の検討
- iv) Barthel Index、modified Rankin Scale、NIHSS、MMSE、CDR の経時的な低下と末梢血中幹細胞の関連性の検討

## 研究結果

### 1. 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（表 1）。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（表 2）。

#### 1) 脳梗塞患者における認知症発症と末梢血中 CD34 陽性細胞の関連

DSM-III-R にて認知症有りと判定された慢性期脳梗塞患者群においては、認知症なしの群に比べ著明な末梢血中血管血球系幹細胞の減少が認められた。

#### 2) 脳梗塞患者における日常生活動作と末梢血中 CD34 陽性細胞の関連

脳梗塞患者において、Barthel Index (図 1) や modified Rankin Scale (図 2)、NIHSS (図 3) など脳梗塞による機能障害の程度と末梢血中血管血球系幹細胞数には有意な相関関係は観察されなかった。

#### 3) 脳梗塞患者における認知機能と末梢血中 CD34 陽性細胞の関連

MMSE や Clinical Dementia Rating により評価された脳梗塞後の認知機能と末梢血中血管血球系幹細胞との関連の検討を行った。その結果、MMSE (図 4、5) および CDR (図 6) の両者において、年齢因子補正後も末梢血中血管血球系幹細胞数の低下が認知機能低下と関連していることが明らかになった。

## 2. 末梢血中血管血球系幹細胞と認知症の病態の関連に関する小規模断面研究

### 1) 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(図7)。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。

### 2) 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8)。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。

一方、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(図9)。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10, 11)。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。

## 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。さらに、本研究の臨床研究

実施チーム（a組）による分担研究である「脳血管障害における血管血球系幹細胞投与の影響」の検討から、血管血球系幹細胞投与が脳梗塞後の脳灌流領域を拡大させることが明らかとなっている。

本研究では、MMSE や Clinical Dementia Rating により評価された脳梗塞後の認知機能と末梢血中血管血球系幹細胞数との関連の検討を行った結果、MMSE および CDR の両者において、末梢血中血管血球系幹細胞数の低下が認知機能低下と関連していることから、血管血球系幹細胞数測定が認知機能低下の予測手段となる可能性も示唆された。しかし、アルツハイマー型認知症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と考えられる。実際、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量的な変化以外に機能的低下があり、これ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末梢血中血管血球系幹細胞の減少と脳血管性認知症や脳血管障害の発症との関連をさらに明らかにすることにより、患者予備軍のスクリーニングや早期診断、予後の予測が可能になり、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。

## 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、脳灌流領域の拡大とともに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認知症および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。

## 健康危険情報

特になし。

## 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<sup>+</sup> cells post-stroke enhances angiogenesis and neurogenesis in a murine model. *J Clin Invest* 114: 330-389.

## 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
- 2) 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

## 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

### 成果発表会開催

- 1) 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年度研究成果等普及啓発事業発表会(長寿科学総合研究), 平成17年11月19日, 兵庫医科大学平成記念会館, 西宮

### 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

### 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

厚生労働科学研究費補助金（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血管血球系幹細胞投与の影響

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、実際に EPC が脳血管障害後の脳血管床、脳血流分布に与える影響を検証することが必要となる。その目的を果たすために、本研究では国立循環器病センター田口らと共に、EPC を含む骨髄単核球投与後に脳灌流領域が拡大することを Spring-8 を用いた高感度血管造影により証明した。本研究により、骨髄単核球移植による血管新生が強く示唆され、血管再生による脳血管障害治療法確立のための基礎データが得られた。

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動物実験データがないのが現状である。本研究では我々が開発した再現性の極めて高いマウス脳梗塞モデルを用い、血管系幹細胞を含む骨髄単核球移植が血管再生を介して脳梗塞後の脳灌流領域の拡大に寄与するかどうかを Spring-8 を用いた高感度血管造影により検討することを目的とした。

## 研究方法

成熟 SCID マウス(17-20g)の左側中大脳動脈を閉塞することにより大脳皮質梗塞を作成した。脳梗塞作成後 2 日目に CB17 マウスの骨髄単核球 (50 万個) を静脈内投与し (治療群)、コントロールとしては PBS を投与した (未治療群)。脳梗塞後 9 日目に両側頸動脈から 5  $\mu$  m 径の filter で濾過したバリウム溶液 0.7ml を注入し脳をホルマリン固定した。放射光は太陽光の約 1 億倍の明るさ(光子)を持ち、また放射される電磁波(光子)がほぼ平行であることからより微少な造影剤を検出可能となっている。本件球では単色 x 線を使用し脳標本を尾側方向から頭側方向に放射光を照射し、4.5mm 四方の範囲を 7-8 枚撮影した。画像は Jpeg で保存し合成するために画像処理ソフトを用い、適正な処置を施した。

## 研究結果

中大脳動脈閉塞により作成される脳梗塞は大脳皮質領域に限局していた。正常血管解剖としては脳表に分布する動脈から大脳灰白質を栄養する Perforator が明瞭に描出され、放射光で Perforator の撮影に今回初めて成功した (図 1 2)。脳梗塞後の未治療群では脳梗塞大脳半球は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 (図 1 3)。治療群では脳実質の萎縮はあまり認められず、対側と比較してやや拡張や蛇行があるものの Perforator が撮像されており、機能血管が残存していた (図 1 4)。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 (図 1 5)。これら再生血管が梗塞巣への側副路となり、梗塞巣へ血液を供給していることが示唆された。

## 考察

血管系幹細胞を含む骨髄単核球移植は脳梗塞周囲に血管新生をもたらし、梗塞巣への側副血行路を促進することが示唆された。

## 結論

本研究により、骨髄単核球細胞の脳梗塞後移植が脳梗塞治療法となる可能性が示された。今後は骨髄細胞と神経幹細胞の相互作用や、これら幹細胞の分化誘導因子や生着維持因子などの組織環境因子を検討することにより、さらに効率のよい再生療法を考案する必要があると思われる。



文献

- 1) Taguchi A, Soma T, Nishimura H, Yoshikawa H, Matsuyama T, et al. (2004)  
Administration of CD34<sup>+</sup> 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血管血球系幹細胞との関連性

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。その結果、末梢血中血管血球系幹細胞の減少が、①Barthel Index や modified Rankin Scale、NIHSS など脳梗塞による機能障害の程度とは相関を示さないものの、②MMSE により評価された認知機能の低下や、③Clinical Dementia Rating による認知症評価との相関を示した。また、認知症患者群の解析では、脳血管性認知症における血管血球系幹細胞の量的な減少とは対照的に、アルツハイマー型認知症患者群では質的な低下を示唆する結果を得、アルツハイマー型認知症の病態解明に結びつく可能性の高い知見として探索的な検討を開始している。

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。

## 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（資料 1）。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 (Table 1-2)。

### 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

## 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(表1)。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(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、