

第 17 回近畿老年期痴呆研究会

田口 明彦. 『脳梗塞の幹細胞治療』

大阪, 2008. 7

第 22 回老年期痴呆研究会

田口 明彦.

『急性期心原性脳塞栓患者に対する自己骨髄単核球静脈投与に関する臨床試験』

東京, 2008. 7.

日本医科大学医学会第 18 回公開シンポジウム

田口 明彦. 『骨髄細胞を用いた 脳血管障害に対する治療法の開発』

東京, 2008. 6.

第 9 回循環器再生医療研究会

田口 明彦. 『脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療』

東京, 2008. 5.

成富 博章

1. 論文発表

Toratani N, Moriwaki H, Hyon B, Naritomi H: Isolated Hemifacial Sensory Impairment with Onion Skin Distribution Caused by Small Pontine Hemorrhage.

*Eur Neurol*, 59: 192-194, 2008.

Yin T, Hanada H, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Osubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Tomoike H, Miyata T: No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population.

*Thrombosis Research* 122: 179-184, 2008.

Sato S, Toyoda K, Uehara T, Toratani N, Yokota C, Moriwaki H, Naritomi H, Minematsu K: Baseline NIH Stroke Scale Score predicting outcome in anterior and posterior circulation strokes.

*Neurology* 70: 2371-2377, 2008.

Ogata J, Yutani C, Otsubo R, Yamanishi H, Naritomi H, Yamaguchi T, Minematsu K: Heart and Vessel Pathology Underlying Brain Infarction in 142 Stroke Patients.

*Ann Neurol* 63: 770-781, 2008.

Uno H, Taguchi A, Oe H, Nagano K, Yamada N, Moriwaki H, Naritomi H: Relationship between detectability of ischemic lesions by diffusion-weighted imaging and embolic sources in transient ischemic attacks.

*Eur Neurol*, 59: 38-43, 2008.

Ohara T, Toyoda K, Otsubo R, Nagatsuka K, Kubota Y, Yasaka M, Naritomi H, Minematsu K: Eccentric stenosis of the carotid artery associated with ipsilateral cerebrovascular events.

*AJNR*, 29: 1200-1203, 2008.

Yanamoto H, Miyamoto S, Nakajo Y, Nakano Y, Hori T, Naritomi H, Kikuchi H: Repeated application of an electric field increases BDNF in the brain, enhances spatial learning, and induces infarct tolerance.

*Brain Research*, 1212: 79-88, 2008.

Okazaki S, Moriwaki H, Minematsu K, Naritomi H: Extremely early computed tomography signs in hyperacute ischemic stroke as a predictor of parenchymal hematoma.

*Cerebrovasc Dis*, 25: 241-246, 2008.

Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, D.M. Stern, Naritomi H: Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment.

*J Cereb Blood Flow Metab*, 28, 445-449, 2008.

Nagakane Y, Naritomi H, Oe H, Nagatsuka K, Yamawaki T: Neurological and MRI Findings as Predictors of Progressive-Type Lacunar Infarction.

*Eur Neurol*, 60: 137-141, 2008.

Yin T, Maekawa K, Kamide K, Saito Y, Hanada H, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Horio T, Takiuchi S, Kawano Y, Minematsu K, Naritomi H,

Tomoike H, Sawada J, Miyata T: Genetic variations of CYP2C9 in 724 Japanese individuals and their impact on the antihypertensive effects of losartan. *Hypertens Res* 31: 1549-1557, 2008.

Naritomi H, Fujita T, Ito S, Ogihara T, Shimada K, Shimamoto K, Tanaka H, Yoshiike N: Efficacy and safety of long-term losartan therapy demonstrated by a prospective observational study in Japanese patients with hypertension: The Japan Hypertension Evaluation with Angiotensin II Antagonist Losartan Therapy (J-HEALTH) study. *Hypertens Res*, 31:295-304, 2008.

Shimamoto K, Fujita T, Ito S, Naritomi H, Ogihara T, Shimada K, Tanaka H, Yoshiike N: J-HEALTH Study Committees: Impact of blood pressure control on cardiovascular events in 26,512 Japanese hypertensive patients: the Japan Hypertension Evaluation with Angiotensin II Antagonist Losartan Therapy (J-HEALTH) study, a prospective nationwide observational study. *Hypertens Res*, 31:469-78, 2008.

Nagano K, Yamagami H, Tsukamoto Y, Nagatsuka K, Yasaka M, Nagata I, Hori M, Kitagawa K, Naritomi H: Quantitative evaluation of carotid plaque echogenicity by integrated backscatter analysis: correlation with symptomatic history and histologic findings. *Cerebrovasc Dis* 26: 578-583, 2008.

Kawano H, Toyoda K, Miyata S, Yamamoto H, Okamoto A, Kakutani I, Walenga JM, Naritomi H, Minematsu K: Heparin-induced thrombocytopenia: a serious complication of heparin therapy for acute stroke. *Cerebrovasc Dis* 26: 641-649, 2008.

Yoshimura S, Toyoda K, Ohara T, Nagasawa H, Ohtani N, Kuwashiro T, Naritomi H, Minematsu K: Takotsubo cardiomyopathy in acute ischemic stroke. *Ann neurol* 64: 547-554, 2008.

Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, Stern DM, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, Naritomi H: Increase in circulating CD34-positive cells in patients with angiographic evidence of moyamoya-like vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1086-1089, 2008.

Taguchi A, Nakagomi N, Matsuyama T, Kikuchi-Taura A, Yoshikawa H, Kasahara Y, Hirose H, Moriwaki H, Nakagomi T, Soma T, Stern DM, Naritomi H: Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab*29:34-38, 2009.

## 2. 学会発表

6<sup>th</sup> World Stroke Congress.

“Circulating CD34-positive cells provide a marker of progress of vascular type cognitive impairment.

Taguchi A, Nakagomi N, Kasahara Y, Matsuyama T, Nakagomi T, Naritomi H.  
Vienna, Austria. 2008. 9. 24-27.

6<sup>th</sup> World Stroke Congress.

“Telmisartan suppresses reperfusion injury in a murine focal cerebral ischemia.

Kasahara Y, Taguchi A, Nakagomi T, Matsuyama, T, Naritomi H.  
Vienna, Austria. 2008. 9. 24-27.

## 松山 知弘

### 1. 論文発表

Taguchi, A., Matsuyama, T., Nakagomi, T., Shimizu, Y., Fukunaga, R., Tatsumi, Y., Yoshikawa, H., Kikuchi-Taura, A., Soma, T., Moriwaki, H., Nagatsuka, K., Stern, D., Naritomi, H. (2008) Circulating CD34-Positive cells provides a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28:445-449.

Yoshihara, T., Taguchi, A., Matsuyama, T., Shimizu, Y., Kikuchi-Taura, A., Soma, T.M., Stern, D.M., Yoshikawa, H., Kasahara, Y., Moriwaki, H., Nagatsuka, K., Naritomi, H. (2008) Increase in circulating CD34-Positive cells in patients with angiographic evidence of Moyamoya-like vessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 28:1086-1089.

Taguchi, A., Nakagomi, N., Matsuyama, T., Kikuchi-Taura, A., Yoshikawa, H., Kasahara, Y., Hirose, H., Moriwaki, H., Nakagomi, T., Soma, T., Stern, D.M., Naritomi, H. (2009) Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 29:34-38.

## 2. 学会発表

Taguchi, A., Nakagomi, N., Kasahara, Y., Matsuyama, T., Nakagomi, T., Naritomi, H. (2008) Circulating CD34-positive cells provide a marker of progress of vascular type cognitive impairment. 6<sup>th</sup> World Stroke Congress, 9.24-27, Vienna, Austria.

Matsuyama, T., Nakagomi, T., Saino, O., Nakano, A., Fujikawa, M., Taguchi, A. (2008) Depletion of CD4-positive T lymphocytes enhances neurogenesis with functional recovery after stroke. 6<sup>th</sup> World Stroke Congress, 9.24-27, Vienna, Austria.

Kasahara, Y., Taguchi, A., Nakagomi, T., Matsuyama, T., Naritomi, H. (2008) Telmisartan suppresses reperfusion injury in a murine focal cerebral ischemia. 6<sup>th</sup> World Stroke Congress, 9.24-27, Vienna, Austria.

中山大輔, 田口明彦, 植田初江, 盛英三, 松山知弘 (2008) 脳梗塞患者における血管新生、神経再生に関する経時的検討. 第33回日本脳卒中学会総会, 3.20-22, 京都.

藤川昌敏, 中込隆之, 中野亜紀子, 斉野織恵, 松山知弘, 中山大輔, 廣瀬遥香, 田口明彦 (2008) 脳梗塞後における骨髄単核球投与の脳微小循環及び神経機能改善効果の検討. 第20回日本脳循環代謝学会総会. 11.6-7, 東京.

中野亜紀子, 中込隆之, 藤川昌敏, 斉野織江, 松山知弘, 中山大輔, 田浦映恵, 田口明彦 (2008) 脳梗塞後における骨髄単核球投与の脳微小血管内皮細胞保護効果の検討. 第20回日本脳循環代謝学会総会. 11.6-7, 東京.

斉野織江, 中込隆之, 金岡伸一, 中野亜紀子, 田片将士, 松山知弘, 笠原由紀子, 田口明彦 (2008) 免疫不全が脳梗塞後の組織損傷と修復に与える影響の検討. 第20回日本脳循環代謝学会総会. 11.6-7, 東京.

笠原由紀子, 中込隆之, 松山知弘, 田口明彦 (2008) テルミサルタン投与による PPAR $\gamma$ 作用を介した脳虚血再灌流障害抑制効果. 第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 7.10-11. つくば.

笠原由紀子, 田口明彦, 中込隆之, 松山知弘 (2008) テルミサルタン投与による PPAR $\gamma$ 作用を介した脳虚血再灌流障害抑制効果. 第31回日本高血圧学会総会. 10.9-10. 札幌.

### 3. その他

Matsuyama, T. (2008) A role of immune cells in post-stroke neurogenesis. Special Seminar, Department of Physiology, Anatomy and Genetics, Le Gros Clark Building, University of Oxford, 10.1., Oxford, UK.

松山知弘 (2008) A role of immune cells in post-stroke neurogenesis. 4<sup>th</sup> SSSR, 12. 23, 東京.

松山知弘 (2008) 脳卒中の神経再生免疫療法. 第10回 ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ, 9.5-6, 宮崎.

松山知弘 (2008) 脳卒中の再生医療. 大阪大学医学部保健学科講義, 6. 18, 吹田.

### 4. 特許登録

特許第4064569号

発明の名称 小胞輸送蛋白ミントの測定法

特許権者 独立行政法人科学技術振興機構

発明者 松山知弘, 岡本昌也, 杉田 實

平成20年1月11日

### 相馬 俊裕

#### 1. 論文発表

Taguchi A, Nakagomi N, Matsuyama T, Kikuchi-Taura A, Yoshikawa H, Kasahara Y, Hirose H, Moriwaki H, Nakagomi T, Soma T., Stern DM, Naritomi H. Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction.

*J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2009 ; 29 : 34-38.

Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kikuchi-Taura A, Soma T., Taguchi A, Yoshimasa Y. Decreased circulating CD34 positive cells are associated with the progression of diabetic nephropathy.

*Diabetic Medicine.* 2009 in press.

Maruyama S, Taguchi A, Iwashima S, Ozaki T, Yasuda K, Kikuchi-Taura A, Soma T, Ishii H, Murohara T, Takahashi H, Kasuga H, Kumada Y, Toriyama T, Ito Y, Kawahara H, Yuzawa Y, Matsuo S. Low circulating CD34-positive cells is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients.

*Kidney International*. 2008;74:1603-1609.

Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern D. M, Naritomi H. Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment.

*J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2008;28:445-449.

Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Taura K.A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients.

*Diabetes Res Clin Pract*. 2008 ;81(3):327-330.

Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-taura A, Soma T, Stern.D. M, Yoshikawa H, Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.

*J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2008 ; 28 : 1086-1089.

Okada S, Makino H, Ayako Nagumo A, Sugisawa T, Muneya Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetes patients.

*Diabetes Care*. 2008 ; 31:157-158.

## 大門 貴志

### 1. 論文発表

Hayashi, H., Fujimaki, C., Daimon, T., Tsuboi, S., Matsuyama, T. and Itoh, K. (2008). Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes as a possible marker for predicting the outcome of methotrexate therapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (accepted).

Fuwa, N., Kodaira, T., Tachibana, H., Nakamura, T., Tomita, N. and Daimon, T. (2008). Long term observation of 64 patients with roentgenographically occult lung cancer treated with external irradiation and intraluminal irradiation using low-dose-rate iridium. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 38, 581-588.

Daimon, T. (2008). Predictive checking for Bayesian interim analyses in clinical trials. *Contemporary Clinical Trials* 29, 740-750.

Daimon, T., Yoshikawa, T., Kobayashi, T. and Goto, M. (2008). Relative curvature measure for non-normal or heteroscedastic nonlinear regression. *Communications in Statistics, Theory & Methods* (in print).

Daimon, T. and Goto, M. (2008). A note on parameterizations in pharmacokinetic compartment models. *Behaviormetrika* 35 1-14.

Fuwa, N., Kodaira, T., Furutani, K., Tachibana, H., Nakamura, T., Nakahara, R., Tomoda, T., Inokuti, H. and Daimon, T. (2008). Arterial chemoradiotherapy for locally advanced tongue cancer: Analysis of a retrospective study of therapeutic results in 88 cases. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 4(15), 1090-1100.

Fuwa, N., Daimon, T., Mitsudomi, T., Yatabe, Y., Kodaira, T., Tachibana, H., Nakamura, T., Kato, T. and Sato, Y. (2008). Identifying patients with peripheral-type early non-small cell lung cancer (T1N0M0) for whom irradiation of the primary focus alone could lead to successful treatment. *The British Journal of Radiology* 81(970) 815-820.

Hayashi, T., Miyake, M., Fukui, T., Sugaya, N., Daimon, T., Itoh, S., Oku, T., Tsuji, T., Toyoshima, S. and Imai, Y. (2008). Exclusion of actin-binding protein p57/coronin-1 from bacteria-containing phagosomes in macrophages infected with *Legionella*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31(5) 861-865.

Hayashi, H., Fujimaki, C., Tsuboi, S., Matsuyama, T., Daimon, T., Itoh, K. (2008).



Determination of methotrexate-polyglutamates using fluorescence polarization immunoassay and clinical application in rheumatoid arthritis patients. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 215(1) 95-101.

Daimon, T. and Goto, M. (2008). The mean squared error optimum design criterion for parameter estimation in nonlinear regression models. *Communications in Statistics, Theory & Methods* 37(4) 508-519.

Fuwa, N., Kodaira, T., Furutani, K., Tachibana, H., Nakamura, T., Nakahara, R., Tomoda, T., Inokuchi, H. and Daimon, T. (2008). Intraarterial chemoradiotherapy for locally advanced oral cavity cancer: Analysis of therapeutic results in 134 cases. *British Journal of Cancer* 98 1039-1045.

Daimon, T. (2008). Bayesian sample size calculations for a non-inferiority test of two proportions in clinical trials. *Contemporary Clinical Trials* 29 507-516.

清水雅之・進士三三・松本圭司・吉川俊博・大門貴志・梅垣敬三・山田浩(2008) 健康食品と医薬品の併用における有害事象の因果関係判定のための評価分類基準の検討. *臨床薬理*, 39, 169-172.

## 2. 学会発表

Tsujino T. Ezumi A. Wakabayashi K. Naito Y. Lee-Kawabata M. Nakao S. Goda A. Otsuka M. Yoshida C. Matsumoto M. Akahori H. Sakata Y. Yamamoto K. Daimon T. and Matsuyama T. (2009). Strict Blood Pressure Control is Useful for Preventing the Progression of Mild Aortic Stenosis in Hypertensive Patients. *Proceedings of the 17th Asian Pacific Congress of Cardiology, Kyoto, Japan, May 20-23* [査読つき].

Daimon T. (2008). Model-switching Bayesian approaches to dose-finding cancer clinical trials. *Proceedings of Joint Meeting of the Fourth World Conference of the International Association for Statistical Computing and 6th Conference of the Asian Regional Section of the International Association for Statistical Computing on Computational Statistics & Data Analysis, 368-376, Yokohama, Japan, December 5-8* [査読つき(招待講演)].

Mori, E., Hashimoto, M., Kuwana, N., Ishikawa, M., and for the SINPHONI group (2008). Disproportionately enlarged subarachnoid-space hydrocephalus (DESH) is a major feature of idiopathic normal pressure hydrocephalus: study of idiopathic normal

pressure hydrocephalus on neurological improvement (SINPHONI). Proceedings of the Second International and Interdisciplinary of Hydrocephalus 2008, Hannover, Germany, September 17-20 [査読つき].

Uchida, S., Kimura, M., Takeda, K., Etoh, N., Ukishima, T., Daimon, T., Yamada, H., Watanabe, H., Ohashi, K., and Yamada, S. (2008). Influence of mu-opioid receptor polymorphism on adverse drug effect of oxycodone and fentanyl in Japanese lung cancer patients. Proceedings of the IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Quebec, Canada, July 27-August 1 [査読つき].

Yamada, H., Daimon, T., Matsuda, K., Yoshida, M., Takuma, N., and Hara, Y. (2008). Gargling with tea catechin extracts for the prevention of influenza infection. Proceedings of the IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Quebec, Canada, July 27-August 1 [査読つき].

Saito, S., Kiba, T., Aoki, M., Ito, K., Koga, H., Yamashita, T., Kitagawa, S., Daimon, T., Dokiya, T., and Yamanaka, H. (2008). Japanese prostate cancer outcome study of permanent I-125 seed implantation (J-POPS study): Interim results of a prospective cohort study assessing efficacy, safety and QOL. Proceedings of American Society of Clinical Oncology 44th Annual Meeting 2008 (Journal of Clinical Oncology 26 suppl), Abs.No.16137, Chicago, May 30-June 3 [査読つき].

Mio, T., Kawahara, M., Yoshioka, H., Yanagihara, K., Daimon, T., Furuse, K., and The Japan-Multinational Trial Organization. (2008). A phase II study of weekly irinotecan and carboplatin for previously untreated extensive disease small cell lung cancer. Proceedings of American Society of Clinical Oncology 44th Annual Meeting 2008 (Journal of Clinical Oncology 26 suppl), Abs.No.19078, Chicago, May 30-June 3 [査読つき].

Kawahara, M., Kubo, A., Komuta, K., Fukushima, M., Daimon, T., Furuse, K., and Mio, T. (2008). A phase I study of amrubicin (AMR) and irinotecan (CPT-11) in relapsed small cell lung cancer (SCLC). Proceedings of American Society of Clinical Oncology 44th Annual Meeting 2008 (Journal of Clinical Oncology 26 suppl), Abs.No.13548, Chicago, May 30-June 3 [査読つき].

Sakakibara, R., Uchida, Y., Ishii, K., Kazui, H., Hashimoto, M., Ishikawa, M., Uchiyama, T., Yamamoto, T., Takahashi, H., Shirai, K., Hattori, T., and SINPHONI

Members. (2008). Urinary dysfunction and right frontal hypoperfusion in idiopathic normal pressure hydrocephalus; an [<sup>123</sup>I]-IMP SPECT study. Proceedings of the Annual Meeting of the International Continence Society 2007, 8, Rotterdam, Netherlands, August 20-24 [査読つき].

小野孝彦・上村和秀・大塚秀隆・北村久代・吉川俊博・大門貴志・山田浩・伊藤正樹(2008). アンジオテンシンII 受容体過剰発現マウスの塩分負荷による血圧変動と性差・組織障害. 日本高血圧学会第31回総会, 札幌, 講演要旨集, 266, 2008年10月9-11日.

大塚秀隆・上村和秀・北村久代・吉川俊博・大門貴志・山田浩・伊藤正樹・小野孝彦(2008). アンジオテンシンII 受容体過剰発現マウスの血圧に対する塩分負荷および性差の影響. 日本腎臓学会第51回学術総会, 福岡, 日本腎臓学会誌, 50(3), 335, 2008年5月30-31日, 6月1日.

大門貴志(2008). Bayes 流中間モニタリングに対する予測点検接近法. 日本計算機統計学会第22回大会, 秋田, 論文集, 70-77, 2008年5月22-23日(招待講演).

### 3. その他

大門貴志(2008). 臨床統計入門講座: 臨床試験における統計的考え方と実務ポイント. 技術情報協会資料集, 東京, 2008年4月18日(招待講義).

後藤貴裕・大門貴志・賀川義之・山田静雄・石川智久・小野孝彦・中野眞汎・奥直人・今井康之・山田浩. (2008). 治験・臨床開発を担うスタッフの養成のための薬学系大学院夜間講座: 4年間の状況(Post-graduate course for the clinical research professionals at the University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences: the four years' status).

日本薬学会第128回年会, 横浜, 講演要旨集, Vol. 2, 217, 2008年3月26-28日.

大門貴志(2008). 入門者のための生物統計学講座: 臨床試験における統計解析の基礎. 情報機構セミナー資料集, 川崎, 2008年1月25日(招待講義).

大門貴志(2008). 臨床試験における統計的考え方. 社会福祉法人聖隷福祉事業団聖隷浜松病院がん専門薬剤師研修会, 浜松, 2008年1月22日(招待講義).

心原性脳塞栓症患者に対する細胞治療の臨床試験とその発展

分担研究者 秦 龍二

愛媛大学大学院医学系研究科 生体機能解析学講座 機能解析学分野

研究要旨

前年度、我々は骨髄単核球を用いた細胞治療が脳虚血障害を軽減させる効果があるかどうかを、老齢（1年齢）の脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHR-SP）を用いて検討した。そして骨髄単核球移植によりラットの死亡率が有意に（ $p < 0.05$ ）改善することを報告した。そこで本年度はその病態機構を解明するために、骨髄単核球移植による造血幹細胞数や各種サイトカインの変化を検討した。その結果、若年ラットの骨髄単核球を移植した骨髄では反対側の骨髄に比して有意に造血幹細胞が増加していた。更に脳、脾臓、血液のサイトカイン（IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ）の脳虚血後の変化を検討したところ、梗塞部位の大脳皮質では IL-1 $\beta$  と IL-6 が虚血後3日目で上昇していた。そこで、脳虚血3日目の脳、脾臓、血液のサイトカイン（IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1）を骨髄単核球移植群と vehicle 投与群とで比較検討した。その結果、虚血巣の大脳皮質では IL-1 $\beta$  と MCP-1 が、骨髄単核球移植群でコントロール群に比して有意（\*： $P < 0.05$ ）に上昇しており、また虚血巣近傍の大脳皮質では IL-1 $\beta$  が骨髄単核球移植群で有意（\*： $P < 0.05$ ）に上昇していた。上記の結果は骨髄単核球移植により、造血幹細胞が活性化され脳虚血後のサイトカインの反応に変化が生じた可能性を示唆した。今後造血幹細胞の活性化が脳虚血に及ぼす影響を検討し、骨髄単核球移植による死亡率改善効果の病態機構を解明する予定である。

A. 研究目的

虚血性脳血管障害に対する細胞治療の試みに関しては、動物実験レベルでは既に多くの報告がなされている。例えば神経幹細胞の脳室内移植が脳虚血の治療に有効（Ann Neurol, 53, 259-63, 2003）であり、骨髄幹細胞の脳実質内移植が虚血性神経障害を軽減する事（Exp Neurol, 174, 11-20, 2002）が報告されている。これらの知見は虚血性神経障害の治療に細胞療法が有効である事を示している。しかしながら臨床治験レベルでは、米国で行われた脳梗塞患者に対する胎生期脳由来神経幹細胞移植やヒト腫瘍細胞由来神経細胞移植治療に関する臨床治験では十分な治療効果が認められておらず、脳梗塞後の神経機能の改善には単なる神経幹細胞移植ではほとんど効果がないことが明らかにされつつある。

一方、自己骨髄単核球細胞を用いた細胞療法に関しては、欧米を中心に心筋梗塞患者に対する亜急性期の細胞投与に関する臨床研究が行われており、虚血障害に対する内因性自己修復機構の促進を介した治療効果が報告されると共に、他の虚血性疾患への適応の拡大が示唆されている（Am J Cardiol. 98:597-602, 2006）。骨髄単核球には造血幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮幹細胞等の種々の幹細胞を含むと考えられ、これらの骨髄系幹細胞の移植により、虚血領域での血管新生の促進、細胞再生や栄養因子の分泌による

虚血障害の改善効果があることが示唆されている。そこで本研究では骨髄単核球を用いた細胞治療が脳虚血障害を軽減させる効果があるかどうかを、老齢ラット脳局所虚血モデルを用いて検討した。前年度我々は、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) の中大脳動脈閉塞モデルを用いて、骨髄単核球移植により死亡率が有意に ( $p < 0.05$ ) 改善することを報告した。そこで本年度はその病態機構を解明するために、骨髄単核球移植による造血幹細胞数や各種サイトカインの変化を検討した。

## B. 研究方法

対象として老齢 (約 1 年齢) の脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) を用いた。本実験に必要な動物実験計画書はそれぞれ愛媛大学大学院医学研究科動物実験管理委員会に提出し承諾を得ている。

(倫理面への配慮)

動物実験は愛媛大学大学院医学研究科実験動物取り扱い指針を遵守し、動物の愛護と苦痛の軽減に努めた。

### 1). 骨髄由来単核球の分離:

4-6 週齢の幼若な SHR-SP の骨髄単核球を採取した。

骨髄由来単核球の分離には以下のプロトコールに従い実施した。

1. シリンジに針を付け、PBS+2%FCS を 2ml 吸う。50ml tube に 5ml 入れる。

2. ラットを sacrifice する。

腹部の皮膚に横に切開を入れ、上下をつまんで皮膚を剥ぐ。

3. 大腿骨、腓骨を関節部から外す。

筋肉を剥がして、骨だけにする。

腓骨を外す時に足関節の前の方で切り不潔にならないようにする。

大腿骨を股関節をから亜脱臼させて外し切り離す。

腓骨、大腿骨の近位端、遠位端をハサミで切断する。

4. ラット: 腓骨: 22G、大腿骨: 18G の針を用いる。

一方の端に針を突き刺し、内部の骨髄を PBS で押し流す。

最後にシリンジに吸い込み内容物を取り込む。

逆の端にも同様に行う。最後にシリンジに吸い込み内容物を取り込む。

5. 23G 針で trituration を行う。その際針先を底にまでつけて 2 回 trituration を行う。

6. 次いで 27G 針で 2 回出し入れを行う。これにより細胞塊の粉碎を行う (あまりやりすぎない事)。

7. 5cc のチューブなら Ficoll plus or Premium (Amersham) 1ml にサンプル 2ml を重層する (ゆっくりと、丁寧に)。

12cc のチューブなら Ficoll plus or Premium (Amersham) 3ml にサンプル 4ml を重層する

8. Centrifuge 400g, 35min (or Centrifuge 600g, 20 min)

遠心機のアクセル、ブレーキを切っていることが重要。

9. Ficoll 層の上に 1 層の白色層があるので、これを採取する。

10. 最低 3 倍量 (6ml) の PBS+2%FCS を加えて、Centrifuge 1500rpm, 5min

- 1 1. Remove supernatant & add DMEM+2%FCS(6ml), Centrifuge 1500rpm, 5min
- 1 2. Remove supernatant & add DMEM+2%FCS(6ml)

## 2). 造血幹細胞の測定

### 骨髓細胞の処理

1. Spin down (1500rpm, 5 min, 4° C) して上清を捨てる。
2. NH4Cl を 10ml 入れ、yellow chip で pipetting 後、5 分間待つ。
3. Spin down (1500rpm, 5 min, 4° C) 後上清を捨てる。
4. DNaseI(1mg/ml in PBS) を 50-100ul 加え yellow chip で mix する。
5. PBS+2%FCS を 5ml 加え、mix する。
6. Spin down (1500rpm, 5 min, 4° C)。上清を捨てる。
7. DNaseI(1mg/ml in PBS) を 50-100ul 加え yellow chip で mix する。
8. DMEM(high glucose)+10%FCS に  $\sim 5 \times 10^6$ /ml (500 万個/ml) になるように浮遊させ、4° C で保存する。

### Hoechst 33342 staining

1. Incubater (37° C) のスイッチを入れる。
2. 遠心器のスイッチを入れ、4° C にする。
3. spin down (1500rpm, 5 min, 4° C) 後、上清を捨てる。
4. pellet に DNaseI(1mg/ml) 50-100ul を入れ pipetting して cell clump 形成を防ぐ。  
(各 wash の step で pellet が出来た場合、ルーチンで DNase を用いると細胞同士の clumping が防げる)
5. マウス骨髓細胞を DMEM(high glucose)+2%FCS に  $1 \times 10^6$ /ml (100 万個/ml) になるように浮遊させ、37° C で 30 分 incubate して温める。
6. Hoechst 33342 1mg/ml solution (dH2O にて溶解) を x 1/200 となるように入れる (final 5 ug/ml)。  
i. e. 20ml の water に 100ul の Hoechst33342 を加える。
7. よく pipetting した後、100-200ul を別の falcon tube に入れ、verapamil 5mM solution (PBS 溶解) を 1/100 になる様に入れる (final conc 50uM)。200ul の medium に 2ul の verapamil を入れる。  
両チューブを 37° C の恒温槽に入れて 90 分 (90-120 分) 遮光して incubate する。  
細胞液数が 15ml 以上の時(細胞数が 150 万個/ml 以上の時)は Ho 添加後に複数本の 50ml tube に分注して incubate する。i. e. 20ml  $\rightarrow$  10ml x 2 本 (50ml tube)

待ち時間にチューブの本数分の 2%FCS 加 PBS を準備し、氷上で冷やしておく。

更に 2ug/ml の propidium iodide の入った 2%FCS 加 PBS を作成する。

Stock は 1mg/ml の濃度なので

2%FCS 加 PBS 50ml に PI 100ul を加える。

8. 90 分経過したら、細胞浮遊液に氷冷していた 2%FCS 加 PBS を直接注ぎこんで急速に冷却する。直ぐに on ice として 5-10 分おく。ここで Hoechst の排出が止まる。  
これ以降全ての手技を on ice で行う。

9. spin down (1500rpm, 5 min, 4 ° C)後、上清を捨てる。
10. pelletにDNaseI(1mg/ml) 50~100ul を入れ pipetting して cell clump 形成を防ぐ。
11. PBS+2%FCS を5ml 加え、mix する。複数本の tube がある場合はここで1本に合わせる。
12. Spin down (1500rpm, 5 min, 4 ° C)後、上清を捨てる。
13. pelletにDNaseI(1mg/ml) 50~100ul を入れ pipetting して cell clump 形成を防ぐ。
14. 2ug/ml の propidium iodide (PI) の入った2%FCS 加 PBS を10ml 加え、mix する。

PI の濃度は1~2000 万/ml で使用する。

PI: Stock solution: -20 ° C で保存する場合には半永久的、4 ° C で保存する場合には一ヶ月以内に使用する。Working solution : 4 ° C で保存する。一ヶ月以内に使用する。

15. Spin down (1500rpm, 5 min, 4 ° C)後、上清を捨てる。
16. pelletにDNaseI(1mg/ml) 50~100ul を入れ pipetting して cell clump 形成を防ぐ。
17. 500 万~1000 万/ml になるように2%FCS 加 PBS に浮遊させ mesh で細胞塊を除去後、FACS Sorting を行う。

### 3). 骨髄由来単核球の移植

採取したラット骨髄単核球を骨髄に1000 万個移植した。骨髄単核球の骨髄への移植方法は、ラットの大腿骨に2カ所に小孔を開け、一方の孔から骨髄単核球を1000 万個/(Phosphate buffered saline [PBS] [pH7.0, 0.1ml])で注入した。またコントロール群としては vehicle として用いた PBS を骨髄に0.1ml 注入した。

### 4). ELISA

ラットの脳および脾臓と血液を採取し、重量を測定後、Lysis buffer (1% NP-40, 1% Triton-X, Protease inhibitor cocktail, in PBS) にて組織を溶解した。脳は梗塞部位の大脳皮質、線条体と反対側部位の大脳皮質、線条体の4か所に加え、梗塞辺縁の大脳皮質の5か所を分別し重量を測定後、Lysis buffer にて溶解した。その後 Rat IL-6, IL-1beta, MCP-1, TNF-alpha 特異的 ELISAKit (R&D Systems, Inc.) を用い、Lysate 中の各蛋白質濃度を測定した。

### 5). 中大脳動脈閉塞

Zhan 等の方法に従い (Zhan B et al. J Cereb Blood Flow Metab, 26: 708-721, 2006)、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット側頭筋を切断し、左側頭骨にドリルで小孔を開け、中大脳動脈を露出して焼灼凝固した。

### 5). 統計処理

各群間の比較は2群に関してはT検定を、3群以上の比較は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を施行し、その後 Dunnet の多重比較試験による検定をおこなった。

### C. 研究結果

#### 1). 骨髄単核球移植による造血幹細胞の変化

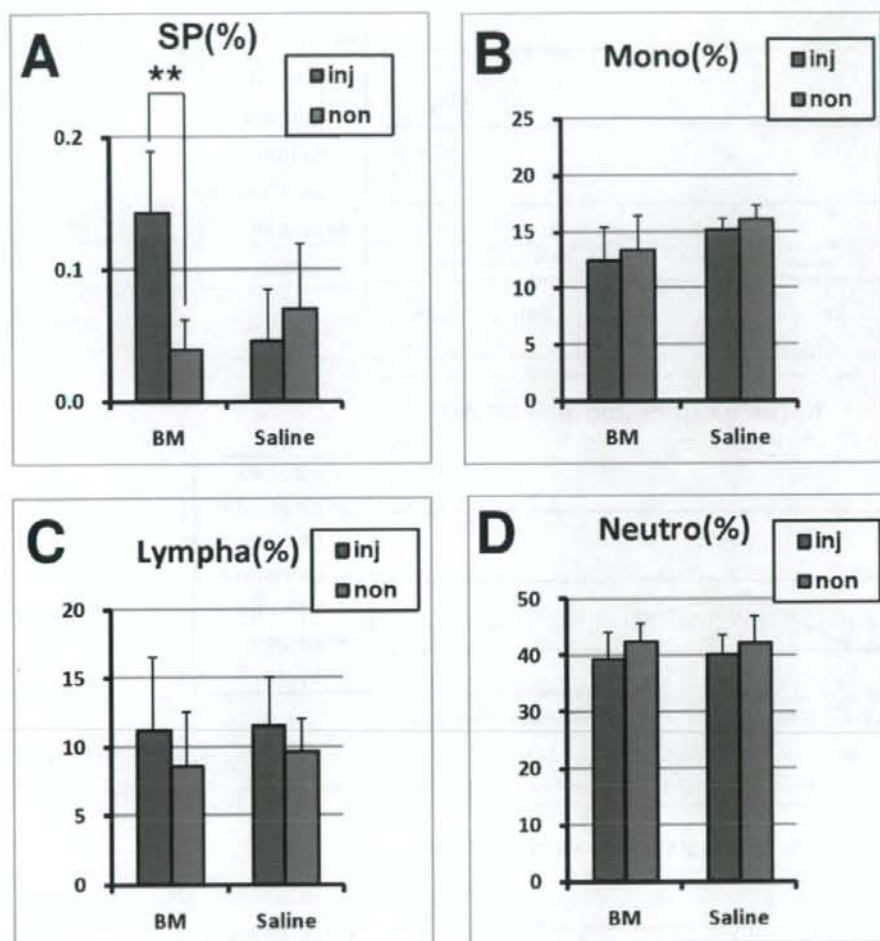
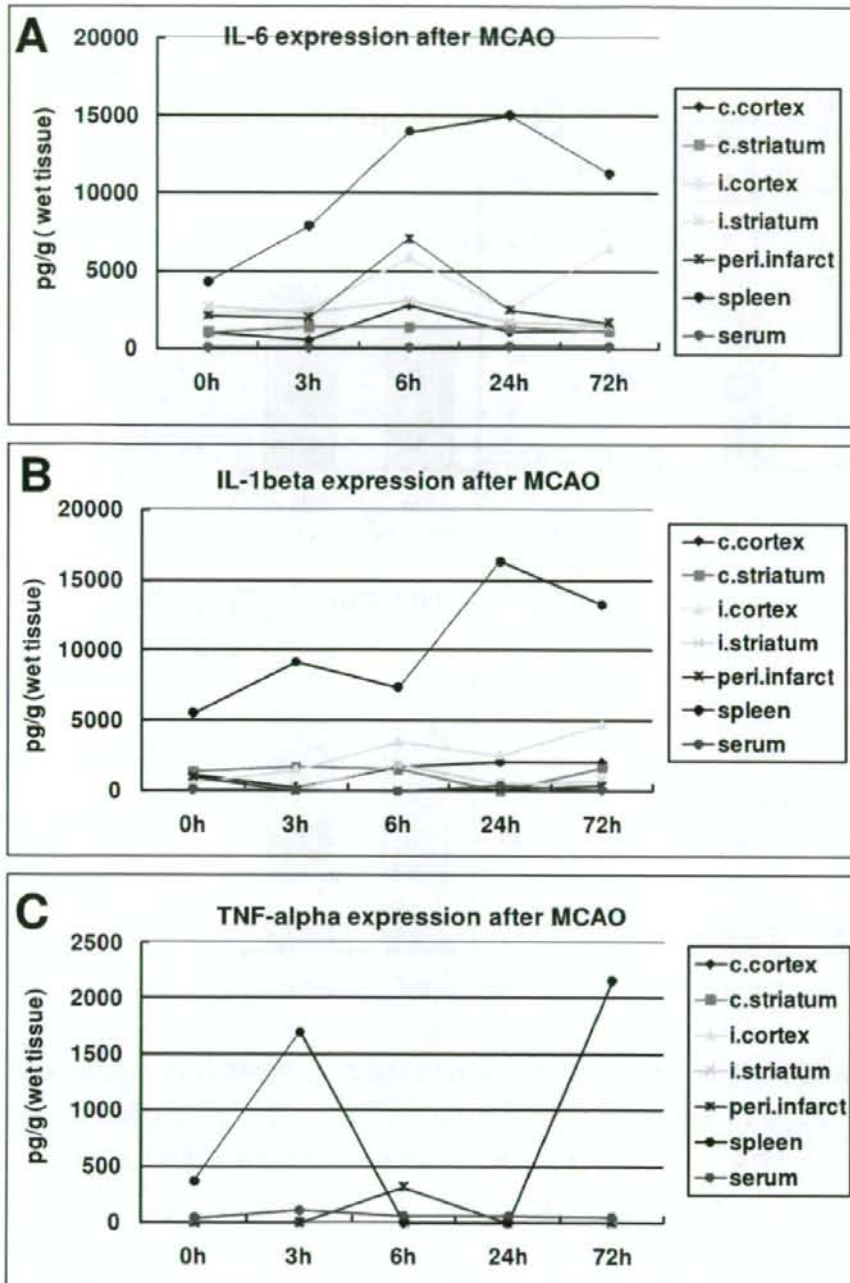


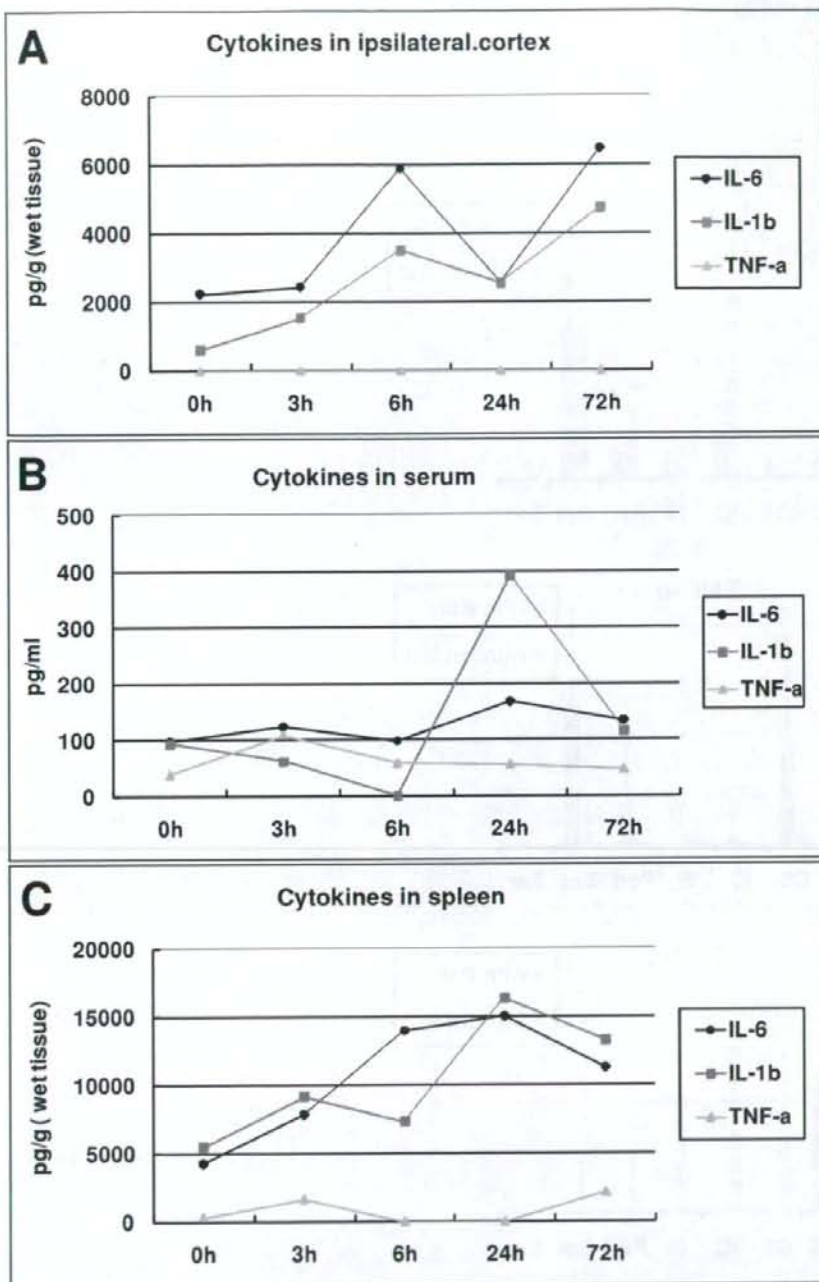
図 A に示す様に、骨髄単核球移植群 (BM 群 : n=8) では単核球移植により、移植側 (inj) は非移植側 (non) に比して有意に ( $p < 0.01$ ) 造血幹細胞 (SP) の比率が上昇した。一方 Vehicle である Saline 移植群 (Saline 群 : n=7) では移植側と非移植側で造血幹細胞の比率に有意な変化を認めなかった。また骨髄細胞のうち、Monocyte 系 (図 B)、リンパ系 (図 C)、顆粒球系 (図 D) の比率は、骨髄単核球移植による変化を認めなかった。



2). 脳虚血後のサイトカインの経時的变化



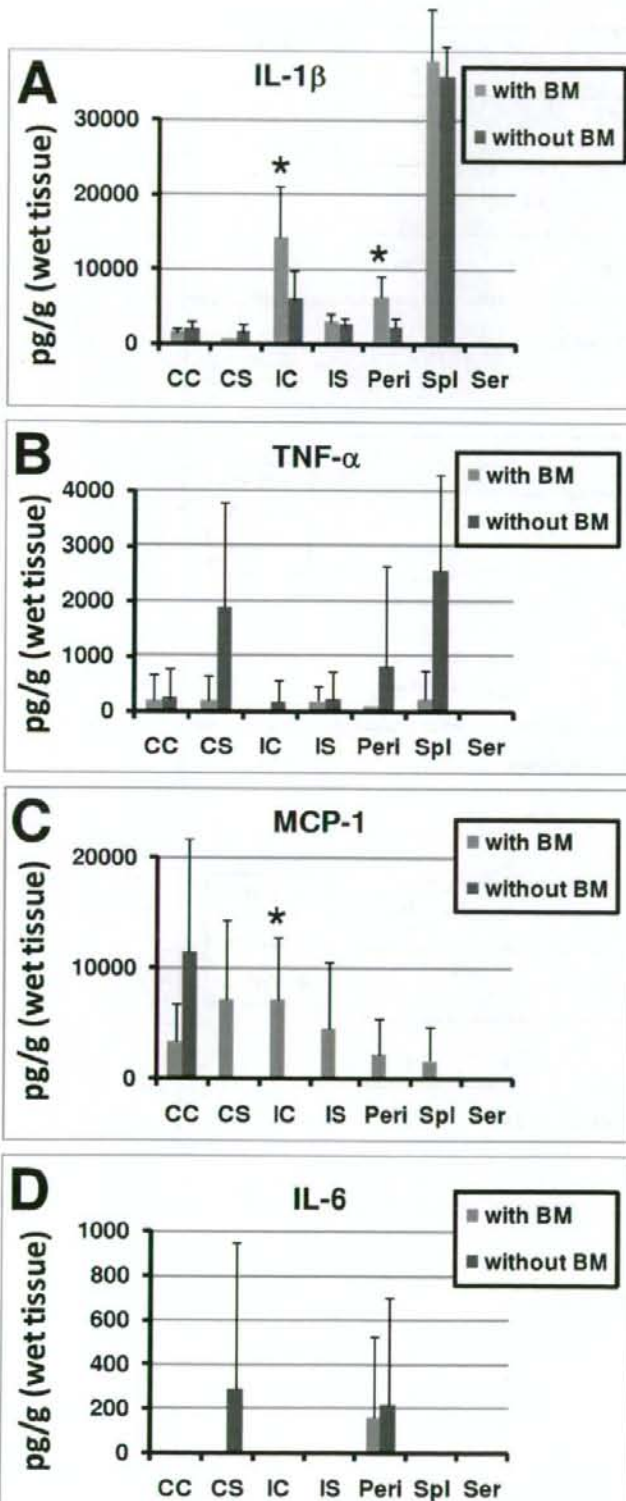
脳虚血直前 (0 h) から72時間後 (72 h) までのサイトカインの各領域での経時的变化(各群 n=2)を示す。i.cortex, i.striatumは虚血巣の大脳皮質、線条体を示し、c.cortex, c.striatumは反対側の大脳皮質、線条体を示す。また peri.infarctは梗塞の近傍の大脳皮質を示し、spleen, serumはそれぞれ脾臓、血清を示す。図A, B, CはそれぞれIL-6, IL-1beta, TNF-alphaの変化を示した。上記の領域のうち、特に虚血巣の大脳皮質、脾臓、血清に注目した。



虚血巣大脳皮質(図A)ではIL-6とIL-1betaが虚血後6時間目に最初のpeakがありその後24時間目に一度低下した後、再度上昇し72時間目で最も高い値を示した。一方血清(図B)及び脾臓(図C)は24時間目にpeakが見られ、72時間目には低下傾向が見られた。この結果より脳虚血による炎症反応は脾臓で先行して出現し、脳では72時間以降にpeakがあることが推測された。そこで、骨髓単核球移植群とvehicle移植群で、脳虚血72時間後での各種サイトカインの部位別の変化を検討した。

3). 脳虚血72時間目の骨髄単核球移植によるサイトカイン量の変化

脳虚血後のサイトカインが、骨髄単核球移植により変化を受けるかどうかを、脳虚血72時間目で検討した。



図中で IC, IS は虚血巣の大脳皮質、線条体を示し、CC, CS は反対側の大脳皮質、線条体を示す。また Peri は梗塞の近傍の大脳皮質を示し、Spl, Ser はそれぞれ脾臓、血清を示す。上から IL-1beta (図 A), TNF-alpha (図 B), MCP-1 (図 C), IL-6 (図 D) の脳虚血 7 2 時間目の各領域でのサイトカインの値を骨髄単核球移植群 (with BM: n=5) とコントロール群 (without BM: n=5) で測定し比較した。図 A に示すように、虚血巣及び虚血巣近傍の大脳皮質では、コントロール群に比して、単核球移植群で有意 (\* : P<0.05) に IL-1beta の上昇が見られた。また図 C に示すように、虚血巣の大脳皮質でコントロール群に比して、単核球移植群で有意 (\* : P<0.05) に MCP-1 の上昇が見られた。一方 TNF-alpha と IL-6 に関しては両群で有意な差のある領域は認めなかった。

#### D. 考察

骨髄単核球を用いた細胞治療が脳虚血障害を軽減させる効果があるかどうかを、老齢 (1 年齢) の脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) を用いて検討した。前年度我々は、中大脳動脈閉塞モデルを用いて、骨髄単核球移植により死亡率が有意に ( $p < 0.05$ ) 改善することを報告した。そこで本年度はその病態機構を解明するために、骨髄単核球移植による造血幹細胞数や各種サイトカインの変化を検討した。その結果、骨髄単核球移植により、非移植側に比して有意に ( $p < 0.05$ ) 移植した側の大腿骨で造血幹細胞 (SP) の比率が上昇した。一方脳虚血 7 2 時間目での各種サイトカイン値を測定し、骨髄単核球移植群と vehicle コントロール群とで比較検討した。そして虚血巣及び虚血巣近傍の大脳皮質では、コントロール群に比して、単核球移植群で有意 (\* : P<0.05) に IL-1beta の上昇が見られた。また虚血巣の大脳皮質ではコントロール群に比して、単核球移植群で有意 (\* : P<0.05) に MCP-1 の上昇が見られた。従って骨髄単核球移植により、移植した大腿骨での造血幹細胞が反対側に比して有意に増大し、虚血後のサイトカイン量が脳梗塞巣で異なることが明らかとなった。以上の結果は骨髄単核球移植により、造血幹細胞が活性化され脳虚血後のサイトカインの反応に変化が生じた可能性が示唆され、造血幹細胞の活性化が脳虚血障害を改善するという仮説が考えられた。従って次年度は造血幹細胞の活性化が脳虚血に及ぼす影響を検討し、骨髄単核球移植による死亡率改善効果の病態機構を解明する予定である。

#### E. 結論

骨髄単核球を用いた細胞治療が脳虚血障害を軽減させる効果があるかどうかを、老齢 (1 年齢) の脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) を用いて検討した。その結果、骨髄単核球移植により、非移植側に比して有意に ( $p < 0.01$ ) 造血幹細胞 (SP) の比率が上昇した。また虚血巣の大脳皮質では、コントロール群に比して、単核球移植群で有意 (\* : P<0.05) に IL-1beta や MCP-1 の上昇が見られた。以上により、骨髄単核球移植により、移植した大腿骨での造血幹細胞が増加することと、虚血巣大脳皮質でのサイトカイン量が骨髄移植により変化することが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

無し