

Fig. 2. [Exp. 1] Effects of PROG (10 mg/kg) and ALLO (10 mg/kg) administration in P7 rats. The neuropathological injury score 7 days after HI in each region (A). PROG administration exacerbated HI-induced brain injury in all four regions examined. The number of pups that died or were severely injured (i.e., an injury score greater than 10) was significantly higher in both the PROG and the ALLO groups when compared with the vehicle group (B). There was no sex difference in the effects of PROG or ALLO on total injury score (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (vehicle $n = 20$; PROG $n = 22$; ALLO $n = 18$).

treatment difference in hemispheric volumes. Post hoc tests showed statistical significance only for the comparison of ipsilateral hemispheric volumes between the vehicle- and the ALLO-treated groups and between the bicuculline- and the ALLO-treated groups (Fig. 3). Ipsilateral hemispheric volumes in the bicuculline + ALLO-treated group ($312 \pm 13 \text{ mm}^3$) were not significantly different from those of the vehicle-treated group. In other words, ALLO treatment exacerbated ipsilateral hemispheric volume loss from 16.3% in control to 26.6%, and bicuculline co-administration partially mitigated it to 18.6%. Ipsilateral hemispheric volume loss was calculated as follows: $(1 - (\text{ipsilateral volume} / \text{contralateral volume})) \times 100\%$. The lack of any statistically significant difference between the ALLO- and the bicuculline + ALLO-treated groups may result from the relatively higher mortality rate in the ALLO-treated group (11/42) compared with that in the bicuculline + ALLO-treated group (1/20) ($P = 0.08$). Detrimental effects of ALLO may be underestimated, as only the surviving

pups were analyzed. Likewise, the mitigating effects of bicuculline may be underestimated in comparison with ALLO. The number of pups that died or were severely injured, with a neuropathological score greater than 10, was significantly lower in the bicuculline + ALLO-treated groups (8/20) compared with that in the ALLO-treated group (27/39); because a few P7 pups were killed by their stressed dams, only the number of pups that died during the hypoxia and the 1 h recovery period was analyzed.

PROG and ALLO are less detrimental in P14 and P21 rats

The effects of PROG (10 mg/kg $\times 3$) and ALLO (10 mg/kg $\times 3$) on HI-induced brain injury in more mature rats, i.e., those at P14 [Exp. 4] and P21 [Exp. 5], were examined. In rats subjected to HI-induced injury at P14, ipsilateral hemispheric volume was significantly reduced in the PROG- ($346 \pm 8 \text{ mm}^3$) and ALLO-treated ($348 \pm 10 \text{ mm}^3$) groups

Table 1

Mortality rates and the numbers of rats analyzed. The number of rats that died/the number of rats subjected to hypoxia are indicated in the upper rows. The mortality rate differed significantly between the allopregnanolone (ALLO; 10 mg/kg)-treated group and other two groups in experiment 1 [Exp. 1] using postnatal day 7 (P7) rats. Two males and five females out of 28 pups died in ALLO-10 mg group in Exp.1. Because a few P7 pups were killed by their stressed dams, only the number of pups that died during the hypoxia and the 1 h recovery period was analyzed. The number of males:females analyzed are indicated in the lower rows.

Exp.	Exp.	Exp.	Exp.	Exp.
1	2	3	4	5
P7	P7	P7	P14	P21
Vehicle	0/22	Vehicle	0/9	Vehicle +
				vehicle
				1/15
				Vehicle
				1/14
				0/12
PROG	1/25	ALLO	0/10	Bicuc +
10 mg	11:11	3 mg	5:5	vehicle
				10:9
				10 mg
				6:5
				5:6
ALLO	7/28*	ALLO	0/10	Vehicle +
10 mg	9:9	1 mg	5:5	ALLO
				4/14
				ALLO
				1/13
				10 mg
				5:7
				6:4
				Bicuc +
				ALLO
				1/20
				10:9

PROG: progesterone, Bicuc: bicuculline.

* $P < 0.05$.

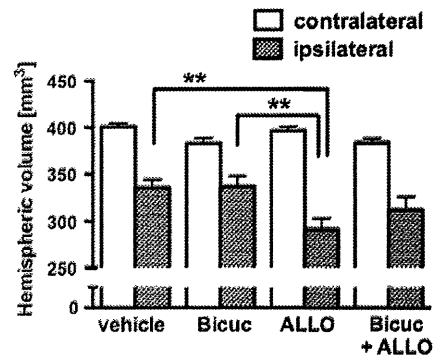


Fig. 3. [Exps. 1–3] Effects of the co-administration of a GABA_A receptor antagonist, bicuculline (Bicuc; 2 mg/kg), with ALLO in P7 rats. Data from three experiments (Exps. 1–3) were pooled and analyzed together. Co-administration of the GABA_A receptor antagonist partially mitigated the effect of ALLO. Two-way analysis of variance and post hoc tests showed statistical significance only for the comparison of ipsilateral hemispheric volumes between the vehicle- and the ALLO-treated groups and between the bicuculline- and the ALLO-treated groups. The ipsilateral hemispheric volumes in the bicuculline + ALLO-treated group were not significantly different from those of the vehicle-treated group. ** $P < 0.01$. (vehicle $n = 42$; Bicuc $n = 19$; ALLO $n = 28$; Bicuc + ALLO $n = 19$).

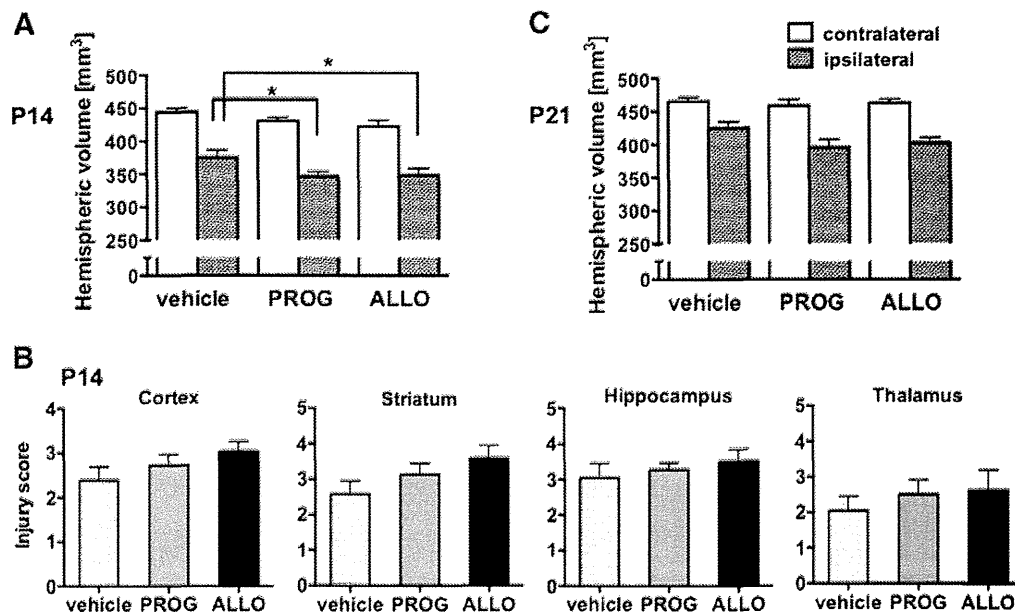


Fig. 4. [Exps. 4, 5] Effect of PROG (10 mg/kg) and ALLO (10 mg/kg) administration in more mature rats. PROG and ALLO reduced the ipsilateral hemispheric volume in P14 rats (A) but did not significantly alter the neuropathological injury score in any regions examined (B). * $P < 0.05$. (vehicle $n = 13$; PROG $n = 11$; ALLO $n = 12$). PROG and ALLO did not significantly alter the hemispheric volume in P21 rats (C). (vehicle $n = 12$; PROG $n = 11$; ALLO $n = 10$).

compared with that of the vehicle-treated group ($375 \pm 10 \text{ mm}^3$) (Fig. 4A). There was no difference in the neuropathological scores among the three groups in any of the four regions examined (Fig. 4B).

In rats subjected to HI-induced injury at P21, two-way ANOVA showed no difference in hemispheric volumes between treatment groups ($P = 0.109$) (Fig. 4C).

Body temperature and weight

Rectal temperatures did not differ between the groups at any time point before or up to 7 h after HI in any age group (data not shown).

Body weights on the day of HI did not differ significantly between the treatment groups for each age group. The weight gain until the day of perfusion (7 days after HI) was significantly smaller in the P7 PROG-treated group than in the other P7 groups (table 2). The weight gain did not differ among treatment groups in the P14 or P21 age groups.

Discussion

Contrary to our initial hypothesis, our results clearly showed that PROG and its metabolite, ALLO, can worsen HI-induced brain injury in immature rats. To our knowledge, no study in brain injury models has shown a consistent detrimental effect of either PROG or ALLO using either immature or mature animals, with the exception of one study using ovariectomized rats (Murphy et al., 2000). The

exacerbating effects in the present study were demonstrated by a reduction of hemispheric volume and determined using the neuropathological evaluation of four brain regions, i.e., the cortex, striatum, hippocampus, and thalamus, in P7 rats. We previously reported that ipsilateral hemispheric areas correspond well with the results of behavioral tests (Mishima et al., 2005). The effects of these neurosteroids were both dose- and age-dependent. In particular, PROG and ALLO were detrimental in P14 rats to a lesser degree than in P7 rats and were not detrimental in P21 rats. A GABA_A receptor antagonist, bicuculline, partially mitigated the effects of ALLO. PROG is also a sex steroid, and sex differences in neonatal HI-induced brain injury have recently been reported on the effects of the treatment (Tsuji et al., 2010), and of the brain injury itself (Hill et al., 2011). However, in the present study, we did not find any statistically significant differences according to gender.

Exacerbating mechanisms: progesterone

The effects of PROG and ALLO were quite similar in the present study. In particular, each neurosteroid demonstrated the same age-dependent exacerbating effects on HI-induced brain injury. Based on this similarity, we speculate that PROG accentuated neuronal injury mainly via the activity of its metabolite, ALLO. PROG exerts its action via both its classical receptor and the activity of its metabolite, ALLO, and it has multiple effects on neurons and the brain (Gibson et al., 2009). We cannot exclude other mechanisms of action that

Table 2

Body weights. The body weight gain (grams) over a 7-day period, from the day of hypoxia-ischemia (HI) to the day of perfusion, was significantly smaller in the PROG (10 mg/kg)-treated group than in the other four groups using postnatal day 7 (P7) rats. Data from three experiments [Exps. 1–3] were pooled and analyzed together. There were no other statistical differences in either the weight before HI or the weight gain until the day of perfusion among the treatment groups for each age group.

	P7 [Exps. 1–3]		P14 [Exp. 4]		P21 [Exp. 5]	
	Before HI	Gain	Before HI	Gain	Before HI	Gain
Vehicle	9.7 ± 0.1	7.7 ± 0.4	18.2 ± 0.4	8.5 ± 0.7	29.8 ± 0.7	25.1 ± 0.5
PROG 10 mg	9.4 ± 0.2	5.5 ± 0.4 ^{***}	18.3 ± 0.4	7.0 ± 0.5	29.5 ± 0.7	20.9 ± 2.2
ALLO 10 mg	9.3 ± 0.2	6.4 ± 0.4	18.6 ± 0.4	5.7 ± 0.6	29.9 ± 0.9	22.9 ± 0.7
Bicuc	9.6 ± 0.2	6.7 ± 0.4				
Bicuc + ALLO	9.8 ± 0.1	5.9 ± 0.4				

*** $P < 0.001$.

may have contributed to the detrimental effects observed in the present experiments. A few studies, however, have reported that PROG has negative effects in injured nervous systems. These negative results are mostly minimal and are inconsistent with those from other studies. Only one previous report demonstrated a detrimental effect of PROG in an animal model of stroke: Murphy et al. (2000) demonstrated that the daily administration of PROG for a week before ischemia exacerbated brain injury in ovariectomized rats. The authors speculated that this detrimental effect was due to modulation of the GABA system by a sharp decline in PROG levels after the pre-stroke treatment (Murphy et al., 2000), and they later reported that PROG administration both before ischemia and during reperfusion decreased brain injury (Murphy et al., 2002). The treatment of ovariectomized rats with PROG exacerbated the cerebrovascular inflammatory response (inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2) to lipopolysaccharide (Sunday et al., 2006). PROG suppressed the proliferation of progenitor cells but enhanced the survival of new neurons in adult male rats with ischemia (Zhang et al., 2010). These actions of PROG are unlikely to be the main mechanism responsible for the detrimental effect of PROG in the present study. Studies have shown that PROG is beneficial for transient middle cerebral artery occlusion in adult male rats (Jiang et al., 1996), in spontaneously hypertensive adult male rats (Kumon et al., 2000), in reproductively senescent female rats (Alkayed et al., 2000), for permanent middle cerebral artery occlusion in adult male rats (Sayeed et al., 2007), for four vessel occlusion in adult male rats (Morali et al., 2005), and for traumatic brain injury in adult male rats (VanLandingham et al., 2008). Therefore, PROG may be detrimental only in immature subjects with HI, probably due to the effects of its metabolite, ALLO.

Exacerbating mechanisms: allopregnanolone

We suggest that the detrimental effect of ALLO was, at least in part, mediated via GABAergic neurotransmission because a GABA_A receptor antagonist, bicuculline, partially mitigated this effect. Another result supporting this idea is the age-dependent effect of ALLO, in which it became less detrimental with development. The effects of GABA_A receptor activation are also age-dependent. Neurons have a higher intracellular chloride concentration at an early stage, leading to an efflux of chloride and the excitatory actions of GABA in immature neurons. The progressive reduction of the intracellular Cl⁻ concentration during early development causes the developmental switch from the excitatory (depolarizing) to inhibitory (hyperpolarizing) action of GABA (Ben-Ari et al., 2007). The timing of this shift depends on the species, sex, brain structure, and neuronal type. It occurs at around P8–12 in the Wistar rat hippocampus (Ben-Ari et al., 2007). Although ALLO became less detrimental with age in the present study, it was not neuroprotective in P21 rats, by which age GABA action reportedly becomes inhibitory, i.e., neuroprotective against excitotoxicity. We speculate that HI-induced injury may alter and delay the developmental switch or that exacerbating mechanisms in addition to the GABA-mediated action may occur in immature animals.

Given that the reversal effect of bicuculline on the ALLO-induced brain injury was not complete, additional mechanisms may be in play to worsen ischemic brain injury in immature animals. ALLO has been understudied in ischemic brain injury, and to our knowledge, no *in vivo* study has shown or suggested that ALLO has negative effects other than those on GABA-mediated neurotransmission in nervous system disease models. There are only three studies examining the effects of the administration of ALLO in stroke, all of which demonstrated beneficial results (Sayeed et al., 2006, 2009; Ishrat et al., 2010). ALLO has been shown to be beneficial in other neurological disease models, such as traumatic brain injury (VanLandingham et al., 2008), Niemann–Pick type C disease (Griffin et al., 2004), and Alzheimer's disease (Wang et al., 2010).

Evidence from *in vitro* studies has suggested that a high concentration of ALLO may be harmful. High concentrations of ALLO (>100 μmol/L) significantly repressed proliferation of neural progenitor cells (Wang et al., 2005). In addition, relatively high concentrations of ALLO (1–3 μmol/L, approximately 320–960 μg/L) induced the regression of neurite outgrowth (Brinton, 1994) and caused the death of rat hippocampal neurons via a GABA_A receptor-dependent mechanism (Xu et al., 2000). Our protocol is not only based on protocols reported to be neuroprotective in adult rats (Sayeed et al., 2006), but was also chosen to reproduce the steroid levels found in the fetal brain in the brains of immature rats. Previous studies demonstrated that the administration of PROG and ALLO (8–10 mg/kg) at doses similar to those used in this study increases the plasma or cortical levels to the ranges observed in rodent fetuses (Jiang et al., 1996; Grobin et al., 2003). Cortical ALLO levels in a rat fetus at late gestation are almost 20 ng/g (Grobin et al., 2003), and a 10-mg/kg dose of ALLO results in a mean cortical level of 22 ng/g in mice (Wang et al., 2010). We do not consider the ALLO levels in our study to be as high as those shown to be harmful in the *in vitro* studies.

GABA is involved in the mechanism of thermoregulation in the preoptic area of the hypothalamus (Osaka, 2004). As neither ALLO nor PROG treatment altered the body temperature, we do not consider that GABA-mediated thermoregulation plays a role in the detrimental effects of these neurosteroids.

Translating the results into practice

PROG and ALLO are not always detrimental to immature animals and human neonates. A single injection of 25 mg/kg of ALLO at P7, P10, or P17 increased survival and delayed neurological impairments in a mouse model of Niemann–Pick type C disease (Griffin et al., 2004). Pilot studies on postnatal estradiol and PROG replacement for extremely preterm infants demonstrated no adverse effects on growth and psychomotor development (Trotter et al., 2001). Because HI increases excitability in neurons, PROG and ALLO may enhance HI-induced hyperexcitability and the associated excitotoxicity in immature brains. Caution should be exercised when interpreting our results and translating them into practice when dealing with neonates and infants. It was previously mentioned that in long-gestation species such as humans and sheep, as opposed to altricial species, such as rodents, GABAergic currents become inhibitory by the last third of gestation (Hirst et al., 2009). In contrast, other authors mentioned that Cl⁻ transport in the perinatal human cortex is as immature as that seen in the rat, suggesting GABA-mediated excitation (Dzhala et al., 2005).

The fact that the treatments turned out to be detrimental, contrary to our initial hypothesis and to data obtained in adult models, is meaningful. Thus, it is clear that speculations that a certain treatment could be beneficial to a similar but different group of subjects just because the treatment was beneficial to a group of tested subjects must be carefully reexamined. This is especially true when applying a treatment to neonates; at a stage when the brain is going through dramatic developmental changes. Considering the dramatic transitions of the central nervous system from the fetal to neonatal period, even a treatment proven to be neuroprotective in term neonates, such as hypothermia, may be of no benefit or could even be detrimental in preterm babies or infants beyond the neonatal period.

Conclusions

Our study shows that both PROG and its metabolite, ALLO, have adverse effects on hypoxic–ischemic brain injury in immature rats. The results presented herein represent a prime example of the dramatic difference between immature and mature brains. Studies are still required to clarify the uncertainties of the effects of PROG and ALLO in immature subjects. For the future development of

neuroprotectants in neonatal brain injury, the maturity, or immaturity, of the brain should be carefully and fully taken into consideration.

Disclosure/conflict of interest

None.

Sources of funding

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (JSPS KAKENHI 22890254) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Acknowledgments

We thank Manami Sone for excellent technical assistance with histological preparations. We also thank Shinichi Sugiyo from Department of Oral Anatomy and Neurobiology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Japan, and Donald Stein from Department Emergency Medicine, Emory University, for technical advice to drug preparations.

References

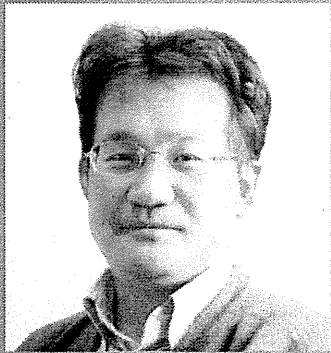
- Alkayed, N.J., Murphy, S.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., 2000. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* 31, 161–168.
- Belelli, D., Lambert, J.J., 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 565–575.
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., Tyzio, R., Khazipov, R., 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215–1284.
- Brinton, R.D., 1994. The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 14, 2763–2774.
- Clancy, B., Finlay, B.L., Darlington, R.B., Anand, K.J., 2007. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 28, 931–937.
- Dobbing, J., Sands, J., 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79–83.
- du Plessis, A.J., 2009. Cerebral blood flow and metabolism in the developing fetus. *Clin. Perinatol.* 36, 531–548.
- Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., Staley, K.J., 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* 11, 1205–1213.
- Galanopoulou, A.S., 2008. Dissociated gender-specific effects of recurrent seizures on gaba signaling in ca1 pyramidal neurons: role of gaba(a) receptors. *J. Neurosci.* 28, 1557–1567.
- Gibson, C.L., Coomber, B., Rathbone, J., 2009. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke? *Neuroscientist* 15, 324–332.
- Griffin, L.D., Gong, W., Verot, L., Mellon, S.H., 2004. Niemann–Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat. Med.* 10, 704–711.
- Grobin, A.C., Heenan, E.J., Lieberman, J.A., Morrow, A.L., 2003. Perinatal neurosteroid levels influence gabaergic interneuron localization in adult rat prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 23, 1832–1839.
- Hill, C.A., Threlkeld, S.W., Fitch, R.H., 2011. Early testosterone modulated sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia in rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 381–388.
- Hill, M., Parizek, A., Bicikova, M., Haviikova, H., Klak, J., Fait, T., Cibula, D., Hampl, R., Cegan, A., Sulcova, J., Starka, L., 2000. Neuroactive steroids, their precursors, and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 1. Identification and simultaneous determination of pregnanolone isomers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 237–244.
- Hirst, J.J., Walker, D.W., Yawno, T., Palliser, H.K., 2009. Stress in pregnancy: a role for neuroactive steroids in protecting the fetal and neonatal brain. *Dev. Neurosci.* 31, 363–377.
- Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F., Hua, F., Stein, D.G., 2010. Progesterone and allopregnanolone attenuate blood–brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp. Neurol.* 226, 183–190.
- Jiang, N., Chopp, M., Stein, D., Feit, H., 1996. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res.* 735, 101–107.
- Johnston, M.V., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Hagberg, H., 2005. Models of cerebral palsy: which ones are best? *J. Child Neurol.* 20, 984–987.
- Juul, S.E., 2000. Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate. *Clin. Perinatol.* 27, 527–541.
- Kumon, Y., Kim, S.C., Tompkins, P., Stevens, A., Sakaki, S., Loftus, C.M., 2000. Neuroprotective effect of postischemic administration of progesterone in spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg.* 92, 848–852.
- Lindstrom, K., Lagerroos, P., Gillberg, C., Fernell, E., 2006. Teenage outcome after being born at term with moderate neonatal encephalopathy. *Pediatr. Neurol.* 35, 268–274.
- Luisi, S., Petraglia, F., Benedetto, C., Nappi, R.E., Bernardi, F., Fadalti, M., Reis, F.M., Luisi, M., Genazzani, A.R., 2000. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2429–2433.
- McPherson, R.J., Juul, S.E., 2010. Erythropoietin for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Curr. Opin. Pediatr.* 22, 139–145.
- Mishima, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., Ikenoue, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2005. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci. Lett.* 376, 194–199.
- Morali, G., Letechipia-Vallejo, G., Lopez-Loeza, E., Montes, P., Hernandez-Morales, L., Cervantes, M., 2005. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 382, 286–290.
- Murphy, S.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., Duckles, S.P., 2000. Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke* 31, 1173–1178.
- Murphy, S.J., Littleton-Kearney, M.T., Hurn, P.D., 2002. Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 1181–1188.
- Nguyen, P.N., Billiards, S.S., Walker, D.W., Hirst, J.J., 2003. Changes in 5alpha-pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep. *Pediatr. Res.* 53, 956–964.
- Osaka, T., 2004. Cold-induced thermogenesis mediated by gaba in the preoptic area of anesthetized rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R306–R313.
- Rice 3rd, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141.
- Romijn, H.J., Hofman, M.A., Gramsbergen, A., 1991. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum. Dev.* 26, 61–67.
- Sayeed, I., Guo, Q., Hoffman, S.W., Stein, D.G., 2006. Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion. *Ann. Emerg. Med.* 47, 381–389.
- Sayeed, I., Wali, B., Stein, D.G., 2007. Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Restor. Neurol. Neurosci.* 25, 151–159.
- Sayeed, I., Parvez, S., Wali, B., Siemen, D., Stein, D.G., 2009. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone. *Brain Res.* 1263, 165–173.
- Sunday, L., Tran, M.M., Krause, D.N., Duckles, S.P., 2006. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E261–E267.
- Trotter, A., Bokelmann, B., Sorgo, W., Bechinger-Kornhuber, D., Heinemann, H., Schmucker, G., Oesterle, M., Kohntop, B., Brisch, K.H., Pohlandt, F., 2001. Follow-up examination at the age of 15 months of extremely preterm infants after postnatal estradiol and progesterone replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 601–603.
- Tsuji, M., Wilson, M.A., Lange, M.S., Johnston, M.V., 2004. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Exp. Neurol.* 189, 58–65.
- Tsuji, M., Aoo, N., Harada, K., Sakamoto, Y., Akitake, Y., Irie, K., Mishima, K., Ikeda, T., Fujiwara, M., 2010. Sex differences in the benefits of rehabilitative training during adolescence following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 226, 285–292.
- VanLandingham, J.W., Cekic, M., Cutler, S.M., Hoffman, S.W., Washington, E.R., Johnson, S.J., Miller, D., Stein, D.G., 2008. Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1786–1794.
- Wang, J.M., Johnston, P.B., Ball, B.G., Brinton, R.D., 2005. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J. Neurosci.* 25, 4706–4718.
- Wang, J.M., Singh, C., Liu, L., Irwin, R.W., Chen, S., Chung, E.J., Thompson, R.F., Brinton, R.D., 2010. Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6498–6503.
- Xu, W., Cormier, R., Fu, T., Covey, D.F., Isenberg, K.E., Zorumski, C.F., Mennerick, S., 2000. Slow death of postnatal hippocampal neurons by GABA_A receptor overactivation. *J. Neurosci.* 20, 3147–3156.
- Zhang, Z., Yang, R., Cai, W., Bai, Y., Sokabe, M., Chen, L., 2010. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. *Neuropharmacology* 58, 930–939.

脳卒中に対する再生医療の現状とその未来像

脳卒中に対する再生医療を神戸から世界に!

先端医療振興財団
再生医療研究部
部長

田口 明彦



略歴

1989年大阪大学医学部卒業。大阪大学医学部附属病院(第一内科)、星ヶ丘厚生年金病院(脳卒中内科)、米国コロンビア大学(博士研究員)、国立大阪南病院(循環器科)、国立循環器病研究センター(脳神経内科/再生医療部)を経て、2011年10月より現職。その間、脳卒中患者に対する再生医療開発に関して、厚生労働省循環器病研究委託費や厚生労働科学研究費補助金の主任研究者を歴任。

所属学会は、日本脳卒中学会、日本内科学会、日本神経学会、日本再生医療学会、日本循環器病学会など。

Akihiko Taguchi

はじめに

わが国は急激な高齢化社会を迎えており、それに伴う身体障害者の増加が深刻な社会問題となっている。2008年度の厚生労働白書によると、要介護3以上のほぼ全介助が必要な患者数は全国に169万人であり、そのうちの約1/3に相当する55万人は脳血管障害が原因疾患とされている。過去30年間、脳卒中に対する新規治療法開発が進められてきたが、発症3時間以内における血栓溶解療法以外には、ほとんど進歩がみられなかった。我々は脳梗塞患者において脳梗塞周囲に神経幹細胞が誘導されること、またそれらの神経幹細胞の生存・機能には血管再生が必要不可欠であることを示しており、それらの知見に基づき脳梗塞患者に対する血管再生を介した神経再生治療の臨床試験を、国立循環器病研究センター(大阪府吹田市)および先端医療センター(兵庫県神戸市)で開始している。本稿では我々が取り組んでいる脳卒中患者に対する再生医療の現状およびその未来について概説する。

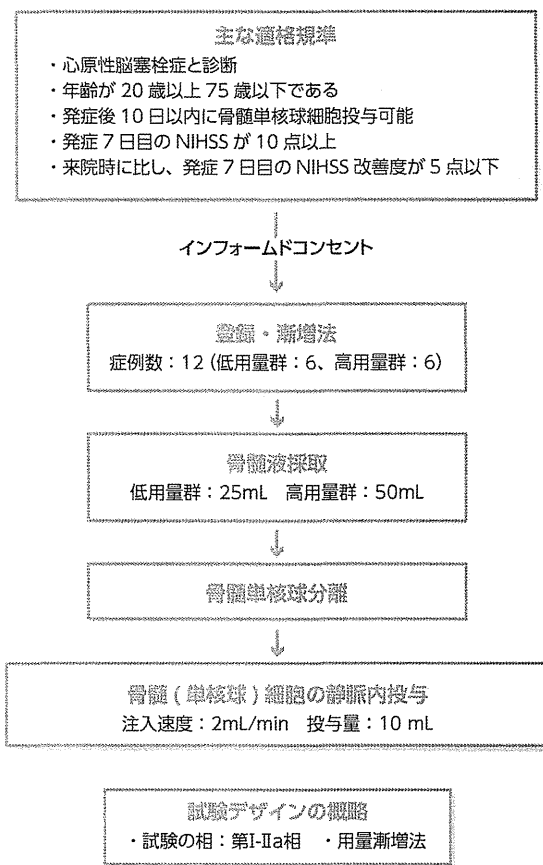
脳梗塞患者に対する 自己骨髄細胞を用いた臨床試験

自己骨髄細胞を用いた微小血管再生・組織修復促進を目的とした治療法は、2000年ごろよりわが国において四肢虚血性疾患患者に対して開始され、その有効性は我々の研究グループを含む多くの施設により示されてきた^{1,2)}。また、虚血性心疾患についても欧州での二重盲検試験を含む多くの臨床試験において、すでにその有効性が報告されている^{3,4)}。我々は国内外での細胞治療に関する臨床試験の知見、および前臨床試験でのデータをもとに、脳梗塞患者に対する細胞医療に関するプロトコルを作成し、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」による認可を受けた後、臨床試験を国立循環器病研究センターおよび先端医療センターにて開始している。

臨床試験のプロトコルの概略を図1に示す。主なエントリークライテリアは、①心原性脳塞栓症、②20歳以上75歳以下、③発症後7日目の時点でNIHSSが10点以上、④来院時に比し、

図1 心原性脳塞栓症患者に対する細胞治療

臨床試験の概略を示す。予後不良が予想される重症心原性脳塞栓症患者を対象に、発症7～10日後に骨髓細胞を採取し、単核球分離後静脈内投与を行う。



発症7日後のNIHSS改善度が5点以下であり、重症の心原性脳塞栓症症例で、かつ脳梗塞1週間後においても神経機能回復が十分でない患者群を対象としている。国立循環器病研究センターにおける過去の臨床データより、これらのエントリークリテリアに合致する患者群は、ほとんど内頸動脈閉塞や中大脳動脈起始部の閉塞による脳梗塞であり、その予後は極めて悪く、また脳梗塞に伴う合併症が高頻度で起こることが明らかになっているが、今回の臨床試験は、これらの最重症患者群における安全性を検証・確認することを主目的としている。

細胞治療の概略は、①脳梗塞発症7～10日目に、局所麻酔下で骨髓細胞の採取(低用量群は25mL、高用量群は50mL)、②国立循環器病センターあるいは先端医療センターセルプロセッシングセンターにて、比重遠心法を用いて単核球分離、③静脈内に5分間で全量投与という、非常にシンプルな手技で構成されており(図2)、本臨床試験において、その安全性およびある程度以上の有効性を示すことができれば、多くの病院・施設でも実施可能であると考えている。

プライマリエンドポイントは、①脳梗塞7日後と比し投与1ヵ月後におけるNIHSS悪化症例の頻度(安全性)、②脳梗塞7日後と細胞投与1ヵ月後におけるNIHSSの改善度(有効性)であり、比較

対照群としては国立循環器病研究センター脳卒中内科データベースに含まれる症例で、本臨床試験の適格基準に合致する患者群をHistorical Controlとして用いる。

2010年には6症例の低用量治療群が終了したが、第1症例、第2症例および低用量群終了後に独立症例委員会(委員長：大阪大学医学部附属病院臨床試験部 山本洋一准教授)を開催し、それぞれの症例における問題の検討を行った。その結果、細胞治療プロトコルや細胞治療に伴う有害事象に関して、特に問題となるものがないとの判断で、高用量群のエントリー患者の募集を開始し、現在高用量群3症例のエントリーが終了している。細胞治療の治療効果に関しては、入院時・細胞治療時における神経機能予後の予想よりかなり良好な経過を辿った症例や、細胞治療後に明らかに脳循環・脳代謝が改善した症例などがあるが、統計学的な検討に関しては、全12症例終了時に臨床研究グループとは独立した臨床統計家(兵庫医科大学医学部 大門貴志講師)により解析を進めていく予定である。

図2 細胞治療の実際

局所麻酔下で骨髓細胞を採取し、セルプロセッシングセンターで比重遠心法を用いて骨髓単核球の分離を行う。精製された骨髓幹細胞をシリンジに移し、病室で静脈内投与を行う。

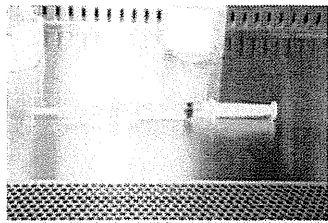
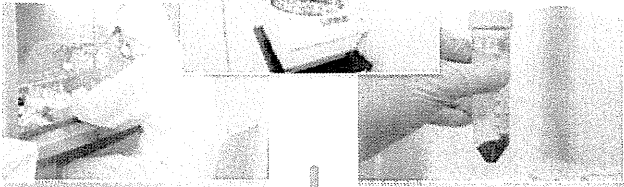
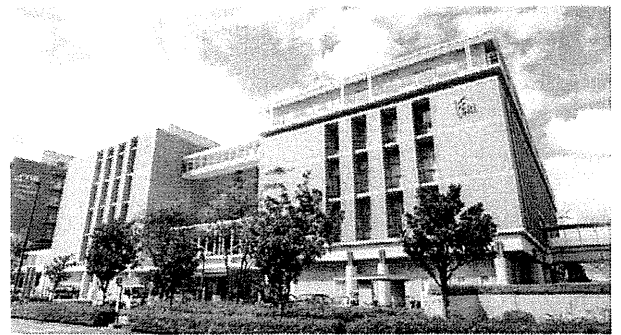


図3 先端医療振興財団

神戸医療都市産業構想を具現化することをミッションに2000年に設立された。産学官の連携による先端医療の臨床研究や技術開発を行い、次世代の医療システムの構築を通じて、医療サービス水準の向上と医療関連産業の集積形成を目指している。



脳梗塞患者に対する再生医療を、神戸医療産業都市から世界へ!

現在我々が推進している臨床試験の主眼は、重症脳梗塞患者群における安全性の検証で、今回の研究(Phase1/2a臨床試験)によりそれを実証できると考えている。また、本治療法は脳梗塞周辺領域における内因性神経機能修復機構の活性化を目的としているため、その治療機序から神経障害がより軽度の患者群において、更に強い治療効果が期待できると考えており、現在、治療対象群を拡大した多施設共同臨床試験(Phase2b試験)に向けたプロトコールを作成中である。

神戸では、先端医療技術の研究開発拠点を整備し、産学官

連携により、21世紀の成長産業である医療関連産業の集積を図る「神戸医療産業都市」を推進している。1998年にプロジェクトの検討を開始し、現在、「先端医療財団(図3)」、「理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター」など14の中核施設を中心に、医療機器、医薬品、再生医療等200を超える医療関連企業が集積している。我々は、セルプロセッシングセンターが不要で、かつ操作が非常に簡単な細胞治療用骨髓単核球精製デバイス開発を行っており、このようなデバイスの臨床試験も並行して行っていくことにより、脳梗塞・循環器疾患に対する骨髓単核球細胞を用いた治療法を、より効果的で、より普遍的な医療技術/医療産業として全世界に発信していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Taguchi A, et al. Intravenous autologous bone marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 25:276-278, 2005.
- 2) Tateishi-Yuyama, et al. The safety and efficacy of patients with and ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Circulation* 114:2414-2421, 2007.
- 3) Schächinger V, et al. Inhibition of left ventricular remodeling by intravenous administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final results of the BAMI-2 trial. *Circ Res* 102:2775-2783, 2008.
- 4) Zhang C, et al. Effects and safety of intracoronary autologous bone marrow-derived cell transplantation in patients with acute myocardial infarction: insights from the first long-term follow-up study 24 months follow-up. *Chin Cardiol* 33:353-360, 2010.

6 脳梗塞と体性幹細胞

い は ら ま さ ふ み た ぐ ち あ き ひ こ
猪原 匡史・田口 明彦

公益財団法人先端医療振興財団
 先端医療センター 再生医療研究部



猪原 匡史

1995年 京都大学医学部卒
 西神戸医療センターでの内科・神経内科
 研修後、京大大学院（脳統御医学系）
 大学院修了後、先端領域融合医学研究機
 構助手、日本学術振興会特別研究員、英
 国留学（ニューカッスル大学）、京大神経
 内科助教・病棟医長を経て現職。
 専門は脳卒中、神経内科学

Key words : 脳梗塞, 細胞治療, 血管再生, 神経再生,
 骨髄単核球

Abstract

体性幹細胞は、連続的な自己再生能と適切な誘導下で様々な細胞種への分化能を示す。なかでも骨髄中の造血系幹細胞、間葉系幹細胞は、広範囲の細胞種に分化する能力を持っていることが判明している。こうした体性幹細胞を含む骨髄単核球による細胞治療は、げっ歯類や霊長類の脳血管障害モデルにおいて、血管再生・神経再生を誘導することが証明されており、脳梗塞における臨床試験も開始された。脳梗塞の再生治療がいよいよ現実味をおびつつある。

はじめに

高齢者における寝たきりの1/3以上が脳血管障害によるものであり、脳血管障害に対する新規治療法の開発は超高齢社会を迎えた我が国の存亡にかかわりかねない極めて重大な課題である。その治療はtPA時代を迎えて変貌を遂げているとはいえ、その恩恵を得るのは短いtime windowの問題からわずか3%の患者にとどまる。残念ながら多くの患者に後遺症が残り、一旦症状が平衡状態に達すれば発症前の機能を取り戻すことは甚だ困難であるといわざるを得ない。したがって、神経保護療法も未だ実現していないこの閉塞状況を打破する手段と

して、脳卒中治療におけるパラダイムシフトが切望されている。本稿では脳卒中からの回復を促進する細胞治療に焦点を当てて論じる。

1. 細胞治療 — 概説

幹細胞研究は医学・医療を根底から覆すインパクトを与え続けている。生物には生来の可塑性と柔軟性が備わっており、その貯蔵庫が体性幹細胞であることから、脳卒中の細胞治療における究極のゴールは、死滅したニューロンの置換や神経回路の修復 (cell/circuit replacement) であろう。しかし、当面の目標は、栄養因子の放出による内因性の神経再生機構の賦活化 (molecular repair) であるとも考えられており、細胞治療による血管新生がそこに果たす役割は大きい。

循環器疾患に対する自己骨髄幹細胞 (単核球細胞) を用いた細胞治療は、四肢虚血¹⁾ および虚血性心疾患²⁾ に対してはほぼ有効性が確認されており、脳血管障害に対してもアメリカの研究グループがその有効性を発表³⁾ しているとともに、我々の研究グループも治療効果および安全性を明らかにしている。世界では、ここ2、3年で脳梗塞に対する細胞療法を用いた臨床試験が急増してきている。我々の臨床試験を含め、現時点で少なくとも19件の臨

Cerebral infarction and somatic stem cells : Masafumi Ihara, Akihiko Taguchi,
 Department of Regenerative Medicine Research Institute of Biomedical Research and Innovation

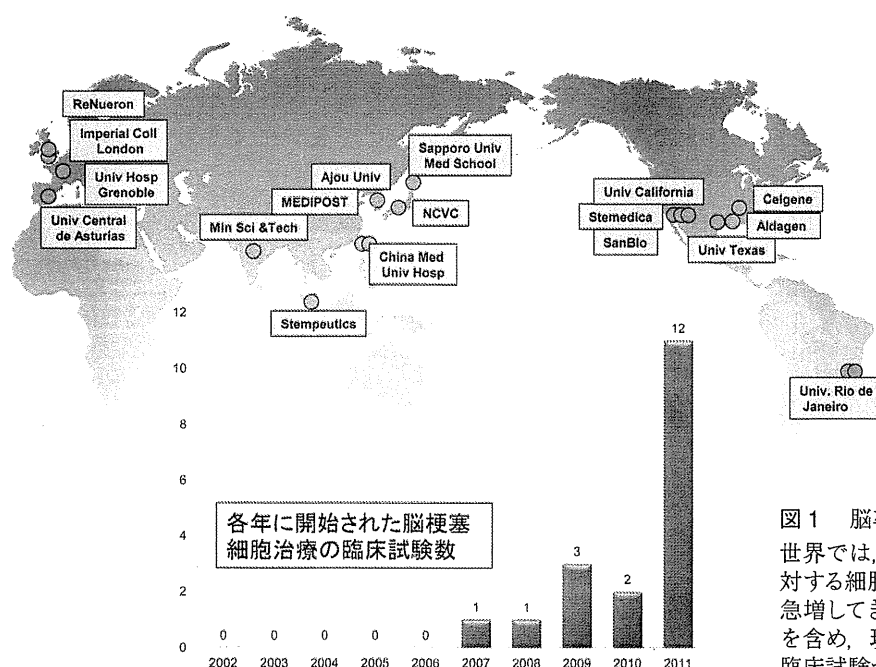


図1 脳卒中の細胞治療

世界では、ここ2、3年で脳梗塞に対する細胞療法を用いた臨床試験が急増してきている。我々の臨床試験を含め、現時点で少なくとも19件の臨床試験が行われている。

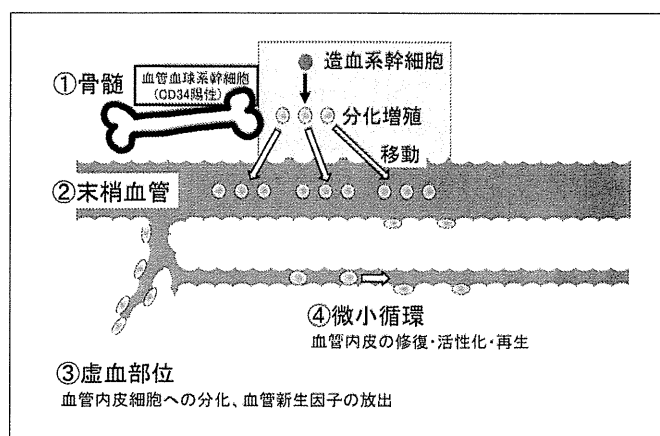


図2 骨髄由来血管血球系幹細胞と血管のメンテナンス

骨髄中に存在する造血・血管系幹細胞は末梢血中に動員され、虚血部位において、血管内皮細胞への分化や血管新生因子の放出だけでなく、既存の血管内皮細胞の修復にも関与していると考えられている。

床試験が行われた事実がある(図1)。

したがって、骨髄単核球細胞を用いた細胞治療は、現状では治療法が存在しない脳血管障害患者に対する再生医療を、“より有効に”かつ“より安全で”かつ“より多くの患者群に”普及させる可能性を有している。

2. 細胞治療による脳梗塞予防法の開発

脳血管など全身の血管網の恒常性維持には、

末梢血中に存在する骨髄由来血管血球系幹細胞(CD34陽性細胞など)の関与が明らかにされている(図2)。われわれは、末梢血中血管血球系幹細胞の動態と、患者病態との関連について共同研究を展開してきた⁴⁾。その結果、①脳梗塞急性期において全身的な組織修復反応として末梢血中へ骨髄由来血管血球系幹細胞の動員が行われ⁵⁾、②慢性期における末梢血中血管血球系幹細胞が脳循環代謝と関連し⁵⁾、③血管血球系幹細胞の減少が、慢性期の認知機能の異常と関連しており⁶⁾、逆

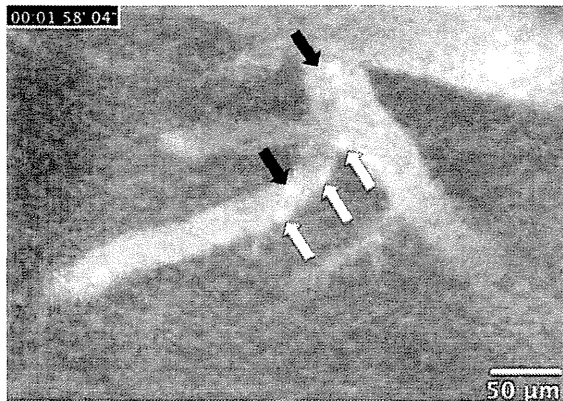


図3 低灌流侵襲負荷後に脳血管を循環する骨髄単核球細胞
マウスの尾静脈から GFP 陽性骨髄単核球細胞を注入した後、その一部が脳血管を循環していることを示す動画の一コマ。光ファイバレーザ走査共焦点顕微鏡により、血管壁をローリングしている細胞や(黒矢印)、血管壁に接着した細胞(白矢印)がリアルタイムに観察された。

に、脳血管再生が促進されている病態では、末梢血中血管血球系幹細胞が増加していること⁷⁾が明らかとなった。さらに興味深いことに、高齢慢性脳血管障害動物モデルにおいて、血管血球系幹細胞移植(造血系幹細胞の入れ替え)が脳血管内皮細胞機能を改善させることを明らかにするなど⁸⁾、血管血球系幹細胞と微小循環障害・再生機転に関するさまざまな知見を報告している。

3. 細胞治療による脳梗塞治療法の開発

1) マウス脳梗塞モデルを用いた

骨髄系血管血球系細胞の投与効果

われわれが独自に開発した再現性の高い動物モデルを用いて、脳梗塞48時間後に、骨髄系血管血球系幹細胞を尾静脈より単回投与したところ、①脳梗塞後の血管血球系幹細胞投与は梗塞周囲における血管再生を促進し、血流の再建を誘導するこ

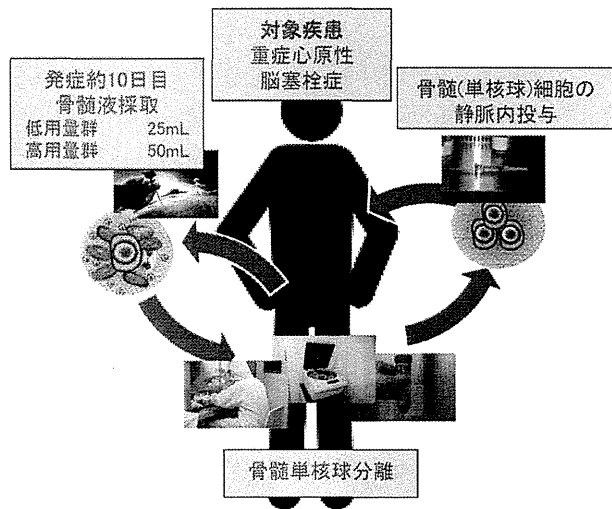


図4 脳梗塞患者を対象とする自己骨髄細胞を用いた臨床試験

対象患者群を重症心原性脳塞栓症患者(NIHSS 10点以上かつ入院時からの回復が5点以下)とし、脳梗塞発症7-10日後に局所麻酔下において自己骨髄細胞を採取し、骨髄単核球分画を精製後に静脈内への投与を行う。

と、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導するだけでなく、その生着に必須であること、③血管血球系幹細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織の再生と脳機能の再生を誘導することを明らかにした⁹⁾。これらの知見は、骨髄単核球など血管血球系幹細胞の血管内移植による血管再生(あるいは微小循環保護)が、内因性の神経再生に必要不可欠であることを示唆するとともに、脳梗塞亜急性期患者に対する新しい細胞治療の可能性を示すものであると考えている。さらに、骨髄単核球との比較検討のため、ほかの細胞群の治療効果における検討を行ったが、骨髄由来間葉系幹細胞投与では一定の治療効果を認めるものの、血管血球系幹細胞を骨髄から動員する作用のあるG-CSFの投与においては、逆に脳萎縮や神経機能が低下することを明らかにしており⁹⁾、顆粒球を中心とした炎症系の活性化は、神経機能回復過程に負の影響を与えることを示唆していると考えている。

さらに治療時期に関する検討では、脳梗塞後 2-14 日後のマウス骨髄単核球細胞投与によって、脳梗塞巣の減少および行動の改善を認めたが、脳梗塞後 1 日および 21 日後においてはこれらの改善効果を認めなかった。これらの結果は、内因性の神経幹細胞の動員など組織修復機構が活性化されている時期においては細胞投与による効果が期待できるものの、脳梗塞発生直後や脳梗塞慢性期においては骨髄単核球細胞移植による効果が期待できないことを示している。

2) マウス血管性認知症モデルを用いた

骨髄単核球細胞の投与効果

われわれが開発した脳循環不全を再現するマウスモデル^{10,11)}においても、骨髄単核球細胞の効果を検討した。

マウスの両側総頸動脈狭窄処置後 24 時間の時点で、高感度緑色蛍光タンパク質で標識を行った脾臓由来の単核球細胞、骨髄単核球細胞 (5×10^6 細胞)、または陰性コントロールとして溶媒の経尾静脈投与を行い、処置後 1 日、30 日の時点で解析を行った¹²⁾。蛍光実体顕微鏡による直視下の脳表血管の観察により、高感度緑色蛍光タンパク質陽性細胞が脳表血管内の循環血液中に観察され、一部の標識細胞は血管壁に接着し、また血管壁をローリングしていた (図 3)。その結果、①骨髄単核球細胞投与 6 時間後の早期に脳血流の顕著な増加がみられ、脾臓由来の単核球細胞投与群や溶媒投与群では血流増加はみられないこと、②この現象は、血管新生が観察される時期に先行すること、③骨髄単核球細胞投与後 1 日経過すると、血管内皮増殖因子の上昇と eNOS の活性化が観察されること、④投与したドナー骨髄単核球細胞の一部は、血管壁の周皮細胞に分化していたこと、⑤総頸動脈処置後慢性期に生じる脳白質病変は骨髄単核球細胞投与によって有意に軽減すること、⑥ NOS 阻害薬 L-NAME を投与することにより、上記保護効

果はいずれも消失することがわかり、骨髄単核球細胞投与による脳血流改善作用や血管新生作用は eNOS 活性化や VEGF 上昇を介していることが示唆された。一部の細胞が周皮細胞へ分化・生着しており、血管新生との関連で注目される。

以上、灰白質と白質を病変の主座とする、二つの脳血管障害モデルマウスを用いて骨髄単核球細胞の有用性を示したことは、幹細胞治療を脳卒中に応用するための提言である STEPS (Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke)¹³⁾ が推奨するように、臨床応用への可能性を強く示唆するものである。

3) 霊長類における脳梗塞後の自己骨髄単核球細胞投与

次にわれわれは、霊長類における脳梗塞後の骨髄採取、およびその静脈内投与に関する検討を行った。ヒトにおける臨床試験では、対象疾患を心原性脳塞栓症患者としているため、当動物実験モデルにおいてもヒト病態に近い自己血栓によるカニクイザル塞栓モデルを国立循環器病センター研究所放射線医学部とともに作製した。超選択的カテーテル法により自己血栓を中大脳動脈遠位部より投与し、PET による血流評価を併用して中大脳動脈領域の脳梗塞を作製した。脳梗塞の確認は MRI を用いて行い、脳梗塞後には主に左上肢を中心とした機能障害を確認した。脳梗塞作製後 7 日後に、腸骨骨髄より骨髄液 (10ml) を採取し、臨床プロトコルに基づき Ficoll を使った単核球細胞の精製を行い、静脈より自己骨髄由来単核球細胞の投与を行った。

投与骨髄単核球の体内分布の検討においては、骨髄単核球細胞の FDG ラベルを行い、細胞投与 3 時間目における FDG 陽性細胞の分布を観察した。投与された細胞群の一部は頭部への集積が観察された。さらに、骨髄単核球投与後の末梢血中血管血球系幹細胞は、細胞投与 1 時間後にベースラインの約 2.5 倍の増加が観察された。脳梗塞後の経

時的神経学的評価において、細胞投与後に順調な機能回復が観察され、神経症状の悪化や脳出血は認められなかった。

4) 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植

自己骨髄単核球を用いた血管再生、あるいは組織修復促進を目的とした治療法は、四肢虚血性疾患だけでなく、虚血性心疾患に対する数百症例規模の double blind placebo – control study においてその有効性が報告されている。

われわれが行う脳梗塞患者を対象とする自己骨髄細胞を用いた臨床試験では、対象患者群を重症心原性脳塞栓症患者 (NIHSS 10 点以上かつ入院時からの回復が 5 点以下) とし、脳梗塞発症 7 – 10 日後に局所麻酔下において自己骨髄細胞を採取し、骨髄単核球分画を精製後に静脈内への投与を行うものである (図 4)。一次エンドポイントは、①投与 1 カ月後の NIHSS の改善度 (有効性)、② NIHSS 悪化症例の頻度 (安全性) であり、平成 19 年 10 月 “厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針” による認可を経て、臨床試験を開始している。予定症例数は低用量群 (骨髄採取 25ml) 6 名と高用量群 (骨髄: 採取 50ml) 6 名であり、過去に国立循環器病センターに重度心原性脳塞栓症で入院した患者群をヒストリカルコントロールとして用いている。すでに 10 名の患者のエントリーを終えており、自己骨髄単核球移植治療を心原性脳塞栓症の新しい治療法として確立したいと考えている。

おわりに

脳梗塞においては、神経細胞だけでなく血液脳関門・血液脳脊髄液関門を形成する細胞群などが障害されるため、脳の組織修復および脳神経機能の改善にはこれらの支持細胞群を含む神経組織全体の再構築が望まれている。われわれは脳梗塞後の神経再生には血管の再生が必要不可欠であるこ

とを明らかにしてきたが、神経幹細胞の生着、成熟のための新生血管床の形成、その血管床への神経幹細胞移植、および薬剤などを用いた移植神経幹細胞の分化、成熟、機能の促進、さらにはこれらの再生機転に対する内因性阻害因子の抑制など、生理的なメカニズムに基づいた治療法の発展・開発を現在進めており、脳梗塞により誘導・動員される神経幹/前駆細胞の同定・分離¹⁴⁾、またそれらの神経幹/前駆細胞の新生血管床への移植による機能回復・治療効果¹⁵⁾など、血管新生を基盤としたより効果的、かつ安全な治療法開発に向けた研究を継続している。

また、血管血球系幹細胞を用いた治療法は急性期脳梗塞など急性虚血性疾患に対する有効な治療法となるだけでなく、血管性認知症、糖尿病性腎症における微小循環障害や心不全など、生活習慣病に伴う幅広い疾病群に対する根治的・普遍的な予防法として発展させることができると考えている。基礎・前臨床研究および臨床的疫学研究、病理解析、症例検討など多方面からの研究を継続しながら、臨床試験を行っている。

文 献

- 1) Tateishi-Yuyama E, *et al.*: Lancet 2002;360 (9331) :427-35.
- 2) Zhang C, *et al.*: Clin Cardiol 2010;33 (6) :353-60.
- 3) Savitz SI, *et al.*: Ann Neurol 2011;70 (1) :59-69.
- 4) Kikuchi-Taura A, *et al.*: Tex Heart Inst J 2006;33 (4) :427-9.
- 5) Taguchi A, *et al.*: Circulation 2004;109 (24) :2972-5.
- 6) Taguchi A, *et al.*: J Cereb Blood Flow Metab 2008;28 (3) :445-9.
- 7) Yoshihara T, *et al.*: J Cereb Blood Flow Metab 2008;28 (6) :1086-9.
- 8) Taguchi A, *et al.*: J Cereb Blood Flow Metab 2011;31 (3) :855-67.
- 9) Taguchi A, *et al.*: Eur J Neurosci 2007;26 (1) :126-33.
- 10) Shibata M, *et al.*: Stroke 2004;35 (11) :2598-603.
- 11) Ihara M, *et al.*: J Aging Res 2011;2011:978761.
- 12) Fujita Y, *et al.*: Stroke 2010;41 (12) :2938-43.
- 13) Savitz SI, *et al.*: Stroke 2011;42 (3) :825-9.
- 14) Nakagomi T, *et al.*: Eur J Neurosci 2009;29 (9) :1842-52.
- 15) Nakagomi N, *et al.*: Stem Cells 2009;27 (9) :2185-95.

分子脳血管病

別刷

発行：株式会社 先端医学社
〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 KDX浜町ビル

細胞移植療法による神経機能回復

猪原匡史, 笠原由紀子, 田口明彦

IHARA Masafumi, KASAHARA Yukiko, TAGUCHI Akihiko
先端医療振興財団先端医療センター再生医療研究部

幹細胞は、連続的な自己再生能と適切な誘導下でさまざまな細胞種への分化能を示す。骨髄中の造血系幹細胞、間葉系幹細胞は、広範囲の細胞種に分化する能力をもっていることが判明している。これらの幹細胞を含む骨髄単核球による細胞治療は、げっ歯類や霊長類の脳血管障害モデルにおいて、血管再生・神経再生を誘導することが証明されており、脳卒中における臨床試験も開始された。脳卒中の再生治療が現実味を帯びつつある。

Key Words

脳梗塞, 細胞治療, 血管再生, 神経再生, 骨髄単核球

はじめに

高齢者における寝たきりの3分の1以上が脳血管障害によるものであり、脳血管障害に対する新規治療法の開発は超高齢社会を迎えたわが国の存亡にかかわりかでないきわめて重大な課題である。その治療はt-PA時代を迎えて変貌を遂げているとはいえ、その恩恵を得るのは短いtime windowの問題からわずか3%の患者にとどまる。残念ながら多くの患者に後遺症が残り、いったん症状が平衡状態に達すれば発症前の機能を取り戻すことは甚だ困難であるといわざるを得ない。したがって、神経保護療法もいまだ実現していないこの閉塞状況を打破する手段として、脳卒中治療におけるパラダイムシフトが切望されている。さまざまなニューロリハに加えて「神経再生」治療が注目されており、本稿では脳卒中からの

回復を促進する細胞治療に焦点を当てて論じる。

1 細胞治療—概説

幹細胞研究は医学・医療を根底から覆すインパクトを与えつつけている。生物には生来の可塑性と柔軟性が備わっており、その貯蔵庫が幹細胞であることから、脳卒中の細胞治療における究極のゴールは、死滅したニューロンの置換や神経回路の修復 (cell/circuit replacement) であろう。しかし、当面の目標は、栄養因子の放出による内因性の神経再生機構の賦活化 (molecular repair) であるとも考えられており、細胞治療による血管新生がそこに果たす役割は大きい。

循環器疾患に対する自己骨髄幹細胞 (単核球細胞) を用いた細胞治療は、四肢虚血¹⁾および虚血性心疾患²⁾に対

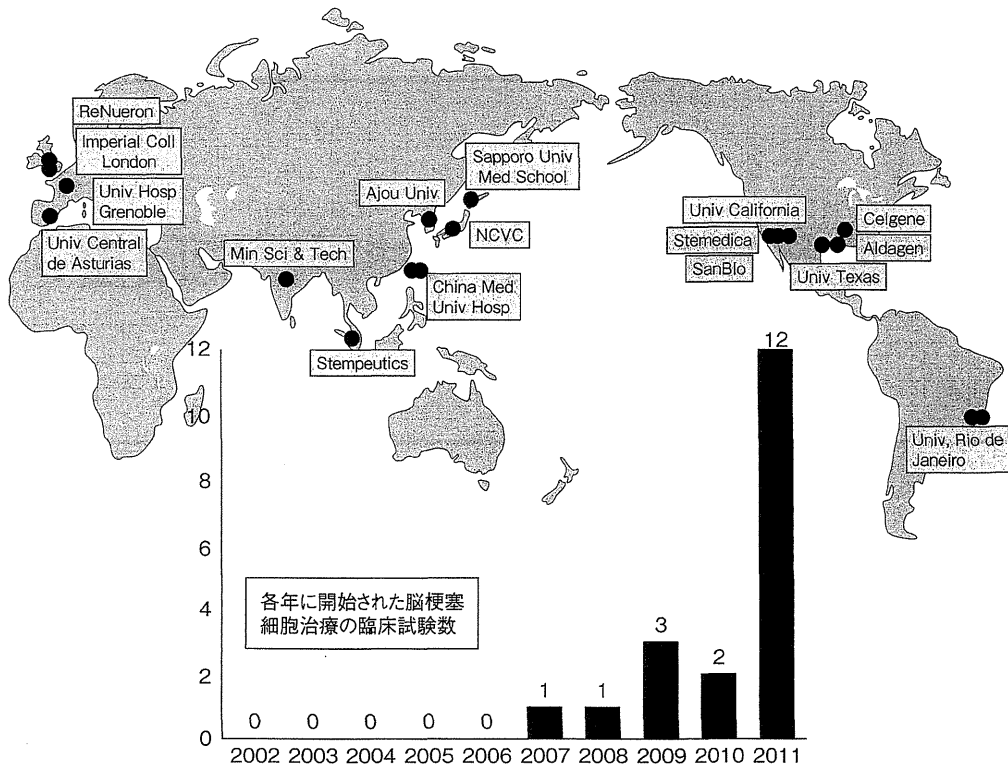


図1 脳卒中中の細胞治療
世界では、ここ2、3年で脳梗塞に対する細胞療法を用いた臨床試験が急増してきている。われわれの臨床試験を含め、現時点で少なくとも19件の臨床試験がおこなわれている。

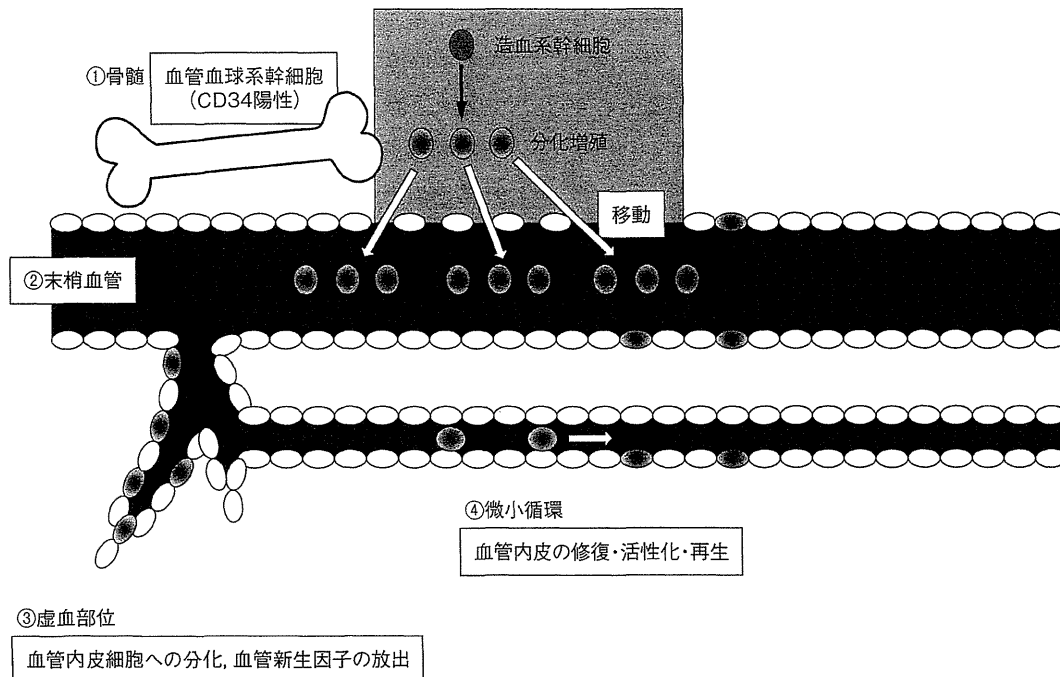
してはほぼ有効性が確認されており、脳血管障害に対しても米国の研究グループがその有効性を発表³⁾しているとともに、われわれの研究グループも治療効果および安全性を明らかにしている。世界では、ここ2、3年で脳梗塞に対する細胞療法を用いた臨床試験が急増してきている。われわれの臨床試験を含め、現時点で少なくとも19件の臨床試験がおこなわれた事実がある(図1)。

したがって、骨髄単核球細胞を用いた細胞治療は、現状ではニューロリハ以外にはまったく治療法が存在しない脳血管障害患者に対する再生医療を、“より有効に”かつ“より安全で”かつ“より多くの患者群に”普及させる可能性を有している。

2 細胞治療による脳梗塞予防法の開発

脳血管など全身の血管網の恒常性維持には、末梢血中に存在する骨髄由来血管血球系幹細胞(CD34陽性細胞など)の関与が明らかにされている(図2)⁴⁾。われわれは、末梢血中血管血球系幹細胞の動態と、患者病態との

関連について共同研究を展開してきた⁵⁾。その結果、①脳梗塞急性期において全身的な組織修復反応として末梢血中へ骨髄由来血管血球系幹細胞の動員がおこなわれること⁶⁾、②慢性期における末梢血中血管血球系幹細胞が、脳循環代謝と関連していること⁶⁾、③血管血球系幹細胞の減少が、認知機能の異常と関連していること⁷⁾、④前向き検討においても、血管血球系幹細胞の減少が認知機能の経時的な低下と関連していること⁸⁾、⑤脳血管障害の関与が弱いアルツハイマー型認知症においては、末梢血中血管血球系幹細胞の減少はみられないこと⁹⁾、さらに、⑥脳血管再生が促進されている病態では、末梢血中血管血球系幹細胞の増加がみられること¹⁰⁾、また脳血管障害以外の病態においても、末梢血中血管血球系幹細胞の減少が、⑦糖尿病性心筋障害¹¹⁾、⑧糖尿病性腎症の経時的な悪化¹²⁾、さらに、⑨透析患者における死亡率の上昇や、循環器疾患の発症¹³⁾とも関連していること、また、⑩末梢血中血管血球系幹細胞の増加と高感度C反応蛋白(C-reactive protein: CRP)の減少・アディポネクチンの増加が関連していること¹⁴⁾など、末梢血中血管血球系



図② 骨髄由来血管血球系幹細胞と血管のメンテナンス (田口明彦ほか, 2009⁴⁾より引用)

骨髄中に存在する造血・血管系幹細胞は末梢血中に動員され、虚血部位において、血管内皮細胞への分化や血管新生因子の放出だけでなく、既存の血管内皮細胞の修復にも関与していると考えられている。

幹細胞と微小循環障害・再生機転に関するさまざまな知見を報告している。

またわれわれは、バジャー病患者に対する自己骨髄単核球移植においては、慢性微小循環障害に対する血管血球系幹細胞を含む骨髄単核球の治療をおこない、その治療効果を明らかにするとともに¹⁵⁾、高齢慢性脳血管障害動物モデルにおいて、血管血球系幹細胞移植（造血系幹細胞の入れ替え）が脳血管内皮細胞機能を改善させることを明らかにしている¹⁶⁾。現在われわれは、これらの臨床的観察研究、介入試験、および基礎研究による知見をもとに、自己血管血球系幹細胞やiPS細胞を用いた脳血管障害・血管性認知症の予防の開発に向けて精力的な研究をおこなっている。

3 細胞治療による脳梗塞治療法の開発

● 1. マウス脳梗塞モデルを用いた骨髄由来血管血球系細胞の投与効果

われわれが開発した再現性の高い動物モデルを用いて、脳梗塞 48 時間後のマウスに対し、骨髄由来血管血球系

幹細胞を尾静脈より単回投与し、血管再生の促進効果、内因性の神経再生促進効果、脳組織再生効果および神経機能再生効果に関して検討をおこなった。その結果、①脳梗塞後の血管血球系幹細胞投与は梗塞周囲における血管再生を促進し、血流の再建を誘導すること、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導するだけでなく、その生着に必須であること、③血管血球系幹細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織の再生を誘導すること、④脳梗塞後の血管再生による脳組織再生は脳機能の再生をもたらすことを明らかにした¹⁷⁾。これらの知見は、骨髄単核球など血管血球系幹細胞の血管内移植による血管再生（あるいは微小循環保護）が、内因性の神経再生に必要不可欠であることを示唆するとともに、脳梗塞亜急性期患者に対する新しい細胞治療の可能性を示すものであると考えている。さらに、骨髄単核球との比較検討のため、ほかの細胞群の治療効果における検討をおこなったが、骨髄由来間葉系幹細胞投与では一定の治療効果を認めるものの、血管血球系幹細胞を骨髄から動員する作用のある顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF）の投与においては、

逆に脳萎縮や神経機能が低下することを明らかにしており¹⁷⁾、顆粒球を中心とした炎症系の活性化は、神経機能回復過程に負の影響を与えることを示唆していると考えられている。

さらに治療時期に関する検討では、マウス骨髄単核球細胞を脳梗塞 1, 2, 4, 7, 10, 14 日および 21 日後に投与し、その効果を検討した。その結果、脳梗塞後 2, 4, 7, 10 日および 14 日後の投与において、脳梗塞巣の減少および行動の改善を認めたと、脳梗塞後 1 日および 21 日後においてはこれらの改善効果を認めなかった。これらの結果は、内因性の神経幹細胞の動員など組織修復機構が活性化されている時期においては細胞投与による効果が期待できるものの、脳梗塞発生直後や脳梗塞慢性期においては骨髄単核球細胞移植による効果が期待できないことを示している。

●2. マウス血管性認知症モデルを用いた骨髄単核球細胞の投与効果

われわれが開発した脳循環不全を再現するマウスモデル¹⁸⁾¹⁹⁾においても、骨髄単核球細胞の効果を検討した。

マウスの両側総頸動脈狭窄処置 (bilateral common carotid artery stenosis : BCAS) 後 24 時間の時点で、高感度緑色蛍光蛋白質で標識をおこなった脾臓由来の単核球細胞、骨髄単核球細胞 (5×10⁶ 細胞)、または陰性コントロールとして溶媒の経尾静脈投与をおこない、処置後 1, 30 日の時点で解析をおこなった²⁰⁾。蛍光実体顕微鏡による直視下の脳表血管の観察により、高感度緑色蛍光蛋白質陽性細胞が脳表血管内の循環血液中に観察され、一部の標識細胞は血管壁に接着し、また血管壁をローリングしていた。その結果、①骨髄単核球細胞投与 6 時間後の早期に脳血流の顕著な増加がみられ、脾臓由来の単核球細胞投与群や溶媒投与群では血流増加はみられないこと、②この現象は、FITC-デキストラン灌流解析法で血管新生が観察される時期に先行すること、③骨髄単核球細胞投与後 1 日経過すると、血管内皮増殖因子と Ser1177 リン酸化 eNOS の上昇が観察されること、④投与したドナー骨髄単核球細胞が内皮細胞やオリゴデンドロサイトに直接分化・生着はしないが、ごく一部は血管壁の周皮細胞に分化していたこと、⑤BCAS によって 30 日後に誘導される脳白質病変は骨髄単核球細胞投与によって有意に軽減すること、⑥NOS 阻害薬 L-NAME を

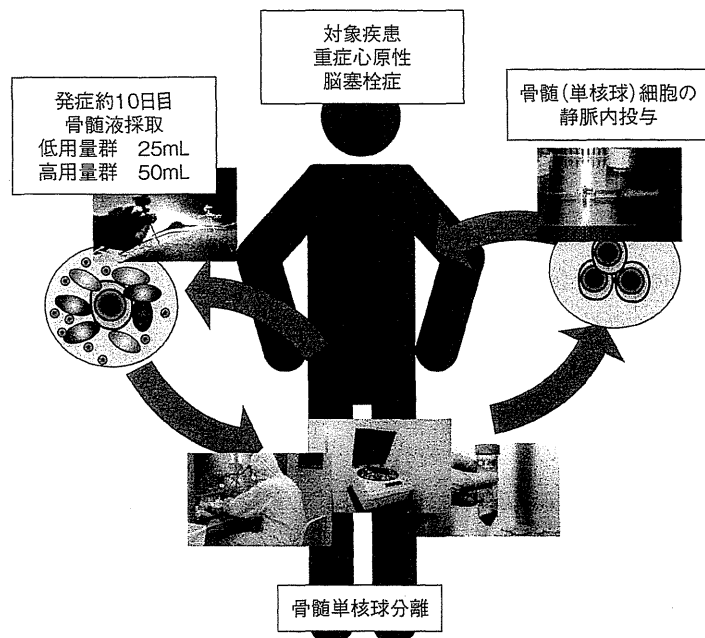
投与することにより、骨髄単核球細胞投与による早期の脳血流回復効果や後期の血管新生作用や白質保護効果はいずれも消失することがわかり、骨髄単核球細胞投与による脳血流改善作用や血管新生作用はいずれも eNOS、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) を一部介していることが示唆された。また、一部の細胞が周皮細胞へ分化・生着しており、血管新生との関連で注目される。

以上、灰白質と白質を病変の主座とする、二つの脳血管障害モデルマウスを用いて骨髄単核球細胞の有用性を示したことは、幹細胞治療を脳卒中に応用するための提言である Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS)²¹⁾が推奨するように、臨床応用への可能性を強く示唆するものである。

●3. 霊長類における脳梗塞後の自己骨髄単核球細胞投与

つぎにわれわれは、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球移植の臨床試験として、霊長類における脳梗塞後の骨髄採取、およびその静脈内投与に関する検討をおこなった。ヒトにおける臨床試験では、対象疾患を心原性脳塞栓症患者としているため、当動物実験モデルにおいてもヒト病態に近い自己血栓によるカニクイザル塞栓モデルを国立循環器病研究センター研究所放射線医学部とともに作製した。カニクイザルを用い、全身麻酔下に血管撮像装置を使用し、超選択的カテーテル法により自己血栓を中大脳動脈遠位部より投与し、PET による血流評価を併用して中大脳動脈領域の脳梗塞を作製した。脳梗塞の確認は MRI を用いておこない、脳梗塞後にはおもに左上肢を中心とした機能障害を確認した。脳梗塞作製後 7 日後に、腸骨骨髄より骨髄液 (10 mL) を採取し、臨床プロトコルに基づき Ficoll を使った単核球細胞の精製をおこない、静脈より自己骨髄由来単核球細胞の投与をおこなった。

投与骨髄単核球の体内分布の検討においては、骨髄単核球細胞の FDG ラベルをおこない、細胞投与 3 時間目における FDG 陽性細胞の分布を観察した。投与された細胞群は脾臓に多くの集積がみられるものの、肺にはほとんど集積がみられなかった。また一部は頭部における集積も観察された。さらに、骨髄単核球投与前後における末梢血中血管血球系幹細胞の定量的評価をおこなった



図④ 脳梗塞患者を対象とする自己骨髄細胞を用いた臨床試験
対象患者群を重症心原性脳塞栓症患者（NIHSS 10 点以上かつ入院時からの回復が 5 点以下）とし，脳梗塞発症 7～10 日後に局所麻酔下において自己骨髄細胞を採取し，骨髄単核球分画を精製後に静脈内への投与をおこなう。

ところ，細胞投与 1 時間後においても末梢血中 CD34 陽性細胞数の約 2.5 倍の増加が観察された。現在のところ，再現性の十分高い霊長類の心原性脳塞栓症モデルは存在せず，われわれのモデルにおいても個体間の神経機能および脳梗塞領域に関する変動性が統計解析を妨げるものの，脳梗塞後の経時的神経学的評価においては，細胞投与後に順調な機能回復が観察された。また，細胞投与に伴う神経症状の悪化や脳出血は認められなかった。

● 4. 脳梗塞患者における神経再生に関する病理的検討

脳損傷後において，マウスなどげっ歯類だけでなく，脳梗塞患者においても神経再生機構が活性化されることが報告されている。われわれは脳梗塞患者における神経再生に関する病理的検討をおこない，血管再生および神経再生のピークはそれぞれ脳梗塞数日後，および 2～3 週間後であり，マウスにおける脳梗塞後の再生過程と類似していることを明らかにしている。これらの所見は，ヒトにおいても，脳梗塞急性期～亜急性期に内因性神経幹細胞誘導が起こることを示しており，ヒトにおける血管再生療法の可能性を示す重要な所見であると考えている。

● 5. 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植

自己骨髄単核球を用いた血管再生，あるいは組織修復促進を目的とした治療法は，四肢虚血性疾患だけでなく，虚血性心疾患に対する数百症例規模の double blind placebo-controlled study においてその有効性が報告されている。

われわれがおこなう脳梗塞患者を対象とする自己骨髄細胞を用いた臨床試験では，対象患者群を重症心原性脳塞栓症患者 [NIH Stroke Scale (NIHSS) 10 点以上かつ入院時からの回復が 5 点以下] とし，脳梗塞発症 7～10 日後に局所麻酔下において自己骨髄細胞を採取し，骨髄単核球分画を精製後に静脈内への投与をおこなうものである (図④)。一次エンドポイントは，①投与 1 ヶ月後の NIHSS の改善度 (有効性)，②NIHSS 悪化症例の頻度 (安全性) であり，2007 年 10 月“厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針”による認可を経て，臨床試験を開始している。予定症例数は低用量群 (骨髄液採取 25 mL) 6 名と高用量群 (骨髄液採取 50 mL) 6 名であり，過去に国立循環器病研究センターに重度心原性脳塞栓症で入院した患者群をヒストリカルコントロール

として用いる。すでに 10 名の患者のエントリーを終えており、自己骨髄単核球移植治療を心原性脳塞栓症の新しい治療法として確立したいと考えている。

おわりに

脳梗塞においては、神経細胞だけでなく血液脳関門・血液脳脊髄液関門を形成する細胞群などが障害されるため、脳の組織修復および脳神経機能の改善にはこれらの支持細胞群を含む神経組織全体の再構築が望まれている。われわれは脳梗塞後の神経再生には血管の再生が必要不可欠であることを明らかにしてきたが、神経幹細胞の生着、成熟のための新生血管床の形成、その血管床への神経幹細胞移植、および薬剤などを用いた移植神経幹細胞の分化、成熟、機能の促進、さらにはこれらの再生機転に対する内因性阻害因子の抑制など、生理的なメカニズムに基づいた治療法の発展・開発を現在進めており、脳梗塞により誘導・動員される神経幹/前駆細胞の同定・分離²²⁾、またそれらの神経幹/前駆細胞の新生血管床への移植による機能回復・治療効果²³⁾など、血管新生を基盤としたより効果的、かつ安全な治療法開発に向けた研究を継続している。

また、脳血管障害・血管性認知症の予防に関しては、末梢血中の CD34 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や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われわれは示してきたが、血管血球系幹細胞を用いた治療法は急性期脳梗塞など急性虚血性疾患患者に対する有効な治療法となるだけでなく、血管性認知症や糖尿病性腎症における微小循環障害、糖尿病性心不全患者など、生活習慣病に伴う幅広い疾病群に対する根治的・普遍的な予防法として発展させることができるとわれわれは考えており、基礎・前臨床研究および臨床的疫学研究、病理解析、症例検討などの多方面からの研究を継続しながら、臨床試験をおこなっている。

●文 献●

- 1) Tateishi-Yuyama E *et al*: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* **360**: 427-435, 2002
- 2) Zhang C *et al*: Efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow-derived cell transplantation in patients with acute myocardial infarction: insights from randomized controlled trials with 12 or more months follow-up. *Clin Cardiol* **33**: 353-360, 2010
- 3) Savitz SI *et al*: Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. *Ann Neurol* **70**: 59-69, 2011
- 4) 田口明彦ほか: 脳血管障害に対する幹細胞治療法の開発. *Clinical Neuroscience* **27**: 112-113, 2009
- 5) Kikuchi-Taura A *et al*: A new protocol for quantifying CD34 (+) cells in peripheral blood of patients with cardiovascular disease. *Tex Heart Inst J* **33**: 427-429, 2006
- 6) Taguchi A *et al*: Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* **109**: 2972-2975, 2004
- 7) Taguchi A *et al*: Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 445-449, 2008
- 8) Taguchi A *et al*: 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
- 9) Taguchi A: Vascular factors in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16**: 859-864, 2009
- 10) Yoshihara T *et al*: Increase in circulating CD34-positive cells in patients with angiographic evidence of moyamoya-like vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 1086-1089, 2008
- 11) Okada S *et al*: Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **31**: 157-158, 2008
- 12) Makino H *et al*: Decreased circulating CD34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabet Med* **26**: 171-173, 2009
- 13) Maruyama S *et al*: Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* **74**: 1603-1609, 2008
- 14) Makino H *et al*: Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* **81**: 327-330, 2008
- 15) Taguchi A *et al*: Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **25**: 276-278, 2003
- 16) Taguchi A *et al*: Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**: 855-867, 2011
- 17) Taguchi A *et al*: Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur*

- J Neurosci* **26** : 126-133, 2007
- 18) Shibata M *et al* : White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35** : 2598-2603, 2004
- 19) Ihara M *et al* : Lessons from a mouse model characterizing features of vascular cognitive impairment with white matter changes. *J Aging Res* **2011** : 978761, 2011
- 20) Fujita Y *et al* : Early protective effect of bone marrow mononuclear cells against ischemic white matter damage through augmentation of cerebral blood flow. *Stroke* **41** : 2938-2943, 2010
- 21) Savitz SI *et al* : Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke* **42** : 825-829, 2011
- 22) Nakagomi T *et al* : Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in

mice. *Eur J Neurosci* **29** : 1842-1852, 2009

- 23) Nakagomi N *et al* : Endothelial cells support survival, proliferation, and neuronal differentiation of transplanted adult ischemia-induced neural stem/progenitor cells after cerebral infarction. *Stem cells* **27** : 2185-2195, 2009

いはら・まさふみ

猪原匡史 先端医療振興財団先端医療センター再生医療研究部
副部長

1970年、奈良県生まれ。

1995年、京都大学医学部卒業。2003年、京都大学大学院医学研究科にて医学博士を取得。2004年、日本学術振興会特別研究員。2006年、英国ニューカッスル大学に留学。2008年、京都大学神経内科助教を経て、2012年より現職。専門は脳卒中学、臨床神経学。研究テーマは、脳血管障害の再生医療と神経変性疾患における虚血の役割について。
