

All statistical tests were two-tailed and reported at $P < 0.05$. Bonferroni correction was applied to avoid type I errors due to the multiplicity of statistical analyses. Statistical analysis of the data was performed using SPSS for Windows 19.0 (IBM Japan Inc., Tokyo, Japan).

RESULTS

Demographic and clinical data

Table 1 summarizes the demographic and clinical characteristics of the study subjects. Patients did not differ significantly from healthy control subjects with regard to age, sex, and MMSE scores. As to the history of disease, the ratio of the history of hyperlipidaemia and hypertension was significantly higher in the patients than in the healthy controls. mRS and NIHSS score, anticoagulant or anti-platelet medication, and the location and volume of the infarction among the patients are also shown in Table 1. Patients showed some disability from the stroke at the time of the examination. All of the patients took anticoagulant and/or anti-platelet medicine. Infarctions were located in the basal ganglia (61.1%), subcortical white matter (33.3%), and thalamus (5.6%). There was no significant laterality of hemisphere infarcts.

Comparisons of FA values between groups

In the voxel-based analysis of FA values, the patient and healthy control groups differed in white matter FA values in the left and right anterior limbs of the internal capsule (left anterior limb of internal capsule: $(x, y, z) = (-26, 12, 18)$, cluster voxel size = 831, T value = 5.20; right anterior limb of internal capsule: $(x, y, z) = (26, 16, 4)$, cluster voxel size = 487, T value = 5.24) (Fig. 1a). Figure 1b shows the scatter diagrams of the FA values of the anterior limb of the internal capsule. Table 2 shows the quantification of the differences in FA values and radial/axial diffusivity in these affected regions. These regions revealed decreased axial diffusivity but no change in radial diffusivity.

No patients had lesions in the location of the anterior limbs of the internal capsule. Using Pearson's correlation analysis, we found no significant relationship ($P > 0.05$) between the FA value in the anterior limb of the internal capsule and the volume of infarcts or the severity of stroke shown with mRS and NIHSS scores.

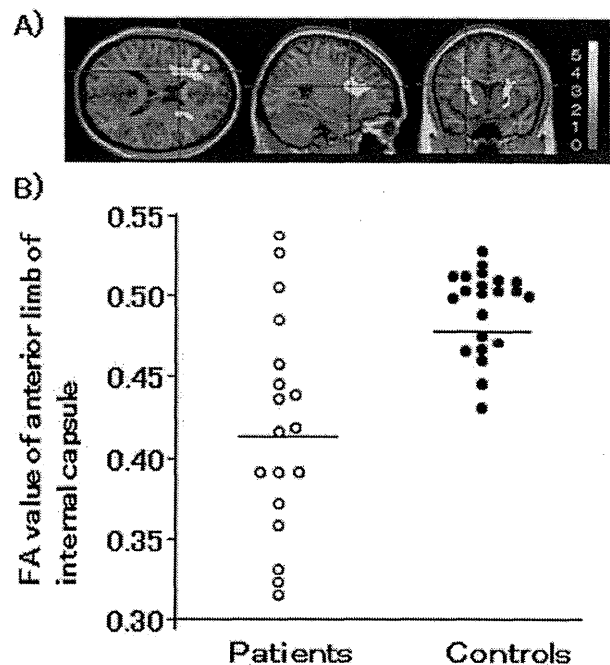


Figure 1 (a) White matter fractional anisotropy (FA) differences in voxel-based analysis comparisons between stroke patients ($n = 18$) and control subjects ($n = 22$). Images are presented in radiological orientation. Statistical parametric mapping projections were superimposed on a representative magnetic resonance image ($x = -26, y = 12, z = 18$). Patients showed reduced FA in the right and left anterior limbs of the internal capsule. Statistical inferences were made with a voxel-level statistical threshold ($P < 0.001$), uncorrected, with a minimum cluster size of 100 voxels. (b) Scatter plots of FA values in the region of FA reduction of patients and control subjects. Patients' FA values were lower than those of healthy subjects in the bilateral anterior limb of the internal capsule ($P < 0.01$).

Change in FA values of patients after 6 months

Patients showed significantly increased FA values in the anterior limb of the internal capsule 6 months after the infarction (Table 3, Fig. 2a).

There were no significant changes in MMSE and HAM-D scores for either group 6 months after the initial examination (Table 3). There was no significant relationship between FA values and depressive symptoms at the first assessment and at the assessment performed 6 months later. However, we found a significant negative correlation between the increased ratio of the FA values and the change in the scores of depression scales of HAM-D at follow-up 6 months later ($r = -0.67, P = 0.02$) (Fig. 2b).

When multiple regression analysis was used to evaluate whether the increased ratio of FA values was

Table 2 Differences in values of FA and axial/radial diffusivity in VOI between patients and healthy control subjects

FA and axial/radial diffusivity	Stroke patients (<i>n</i> = 18)	Healthy control subjects (<i>n</i> = 22)	ANCOVA [†]	
			<i>F</i> _{1,36}	<i>P</i> -value
Left anterior limb of internal capsule				
FA	0.41 ± 0.08	0.48 ± 0.03	16.4	<0.001**
Axial diffusivity (×10 ⁻³)	4.16 ± 0.32	4.37 ± 0.30	4.24	0.05*
Radial diffusivity (×10 ⁻³)	3.96 ± 0.30	4.04 ± 0.29	0.48	0.49
Right anterior limb of internal capsule				
FA	0.43 ± 0.06	0.50 ± 0.03	23	<0.001**
Axial diffusivity (×10 ⁻³)	4.14 ± 0.33	4.35 ± 0.30	4.03	0.05
Radial diffusivity (×10 ⁻³)	3.93 ± 0.31	4.01 ± 0.30	0.46	0.50
Bilateral anterior limb of internal capsule				
FA	0.42 ± 0.07	0.49 ± 0.03	20.6	<0.001**
Axial diffusivity (×10 ⁻³)	4.15 ± 0.32	4.36 ± 0.30	4.15	0.05*
Radial diffusivity (×10 ⁻³)	3.95 ± 0.30	4.02 ± 0.29	0.47	0.50

[†]Age and gender are entered as covariates. Data are mean ± SD. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. FA, fractional anisotropy; VOI, volume of interest.

Table 3 Change in psychometry scores, FA values, and axial/radial diffusivity over 6 months in patients (*n* = 12)

	10–28 days after stroke	6 months after first exam	Paired <i>t</i> -test	<i>P</i> -value
Patients				
mRS score	1.9 ± 0.5	1.6 ± 0.5	<i>t</i> ₁₁ = 2.35	0.04*
NIHSS score	2.8 ± 1.0	1.8 ± 0.7	<i>t</i> ₁₁ = 4.00	0.002**
MMSE score	29.0 ± 1.5	29.7 ± 0.5	<i>t</i> ₁₁ = 1.54	0.15
HAM-D score	3.7 ± 2.9	2.3 ± 3.0	<i>t</i> ₁₁ = 1.13	0.28
Anterior limb of internal capsule				
FA	0.40 ± 0.06	0.43 ± 0.06	<i>t</i> ₁₁ = 2.26	0.04*
Axial diffusivity (×10 ⁻³)	4.22 ± 0.30	4.13 ± 0.2	<i>t</i> ₁₁ = 0.74	0.48
Radial diffusivity (×10 ⁻³)	4.01 ± 0.26	3.87 ± 0.25	<i>t</i> ₁₁ = 1.50	0.16

Data are mean ± sd. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01.

FA, fractional anisotropy; HAM-D, Hamilton Rating Scale for Depression; MMSE, Mini-Mental State Examination; mRS, modified Rankin scale; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale.

related to the change in depression scale scores (HAM-D) after 6 months, the ratio of FA values was found to be negatively related to the change in the HAM-D scores ($\beta = -0.46$, *P* = 0.04).

Lymphocyte subsets and their relation to FA values in patients

Patients showed significantly decreased numbers of T_{reg} compared with healthy controls (Table 4, Fig. 3a). We also found a significant positive relationship between the level of circulating T_{reg} and the FA value in the anterior limb of the internal capsule in the patients (*r* = 0.50, *P* = 0.04) (Fig. 3b). There was no significant relationship between the level of circulating T_{reg} and the HAM-D scores.

When multiple regression analysis was used to evaluate whether the level of circulating T_{reg} was related to the FA value in the anterior limb of the

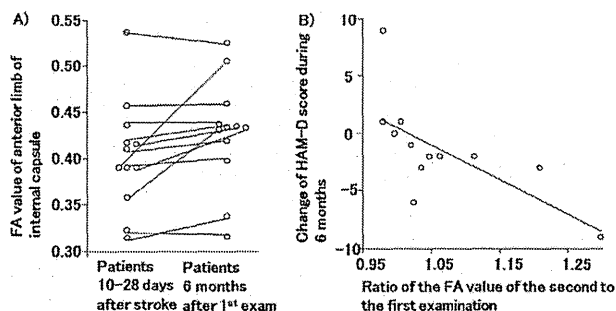


Figure 2 (a) Scatter plots of fractional anisotropy (FA) values in the region of FA reduction among stroke patients (*n* = 12) at 10–28 days after the stroke and at the 6-month follow-up. A significant FA increase was observed in the patients at the 6-month follow-up (*P* < 0.05). (b) Scatter plots showing the relationship between the ratio of the FA values of the second to the first examination and the change in depression scale scores among patients (*n* = 12). Significant correlations were observed between the ratio of the FA values of the second to the first examination and the changes in depression scale scores (*r* = -0.67, *P* = 0.02). HAM-D, Hamilton Rating Scale for Depression.

Table 4 Differences in percentage of lymphocytes in the circulation between patients and healthy control subjects

	Stroke patients (n = 18)	Healthy control subjects (n = 22)	ANCOVA [†]	
			F _{1,36}	P-value
Helper T lymphocyte	67.2 ± 15.1	61.5 ± 12.0	1.00	0.32
Cytotoxic T lymphocyte	27.9 ± 13.5	33.2 ± 10.6	0.92	0.35
B lymphocyte	17.7 ± 8.3	12.2 ± 7.8	5.42	0.03
NK cell	21.6 ± 11.3	27.5 ± 10.4	1.78	0.19
Regulatory T lymphocyte	2.1 ± 1.6	3.8 ± 2.3	7.89	0.008*

[†]Age and sex are entered as covariates. Data are mean ± SD. *Significant after correction for multiple statistical tests to avoid type I errors ($P < 0.01$ (0.05/5)). NK, natural killer.

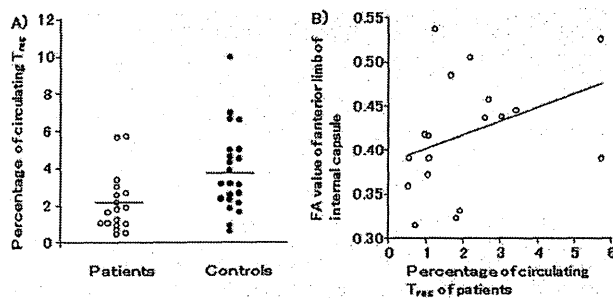


Figure 3 (a) Scatter diagrams showing the differences in circulating T_{reg} between patients and controls. A significant difference in the percentage of T_{reg} was observed between groups ($F_{1,36} = 7.89$, $P = 0.008$). (b) The relationship between the percentage of circulating T_{reg} and FA values of the anterior limb of the internal capsule in patients. A significant correlation was observed between the percentage of T_{reg} and FA values ($r = 0.50$, $P = 0.04$). FA, fractional anisotropy; T_{reg} , regulatory T lymphocytes.

internal capsule, the T_{reg} level was found to be positively related to the FA values ($\beta = 0.59$, $P = 0.02$).

DISCUSSION

Our findings showed that stroke patients had lower FA in the bilateral anterior limb of the internal capsule relative to healthy control subjects. Six months after initial assessment, a significant increase in FA was noted, and it revealed an association with a reduction in depression scale scores. Our findings are not the result of direct neuronal damage caused by the infarction located on the internal capsule, as no patients had a lesion in this location. Also, there was no direct relationship between the FA value in this region and the volume of infarcts or the severity of stroke.

Reduced FA level was associated with decreased axial diffusivity. Axonal damage leads to a marked decrease in axial diffusivity, while demyelination leads to an increase in radial diffusivity.¹³ Therefore, our finding was not a result of demyelination but of gross

reduction in axonal number and/or size, possibly reflecting Wallerian degeneration secondary to neuronal loss due to stroke.¹⁴ From an anatomical perspective, the anterior limb of the internal capsule represents the intercept point in the course of the frontal-subcortical circuits,¹⁵ and it has extensive connectivity with the cortical and subcortical areas. Its reduced FA may reflect the conjunctive focus of degeneration due to stroke in the spatially different sites of cortical and subcortical areas.

The frontal-striatal-thalamic-cortical circuits, connected by the anterior limb of the internal capsule, play an important role in behavioural regulation,¹⁶ and based on MRI, microstructural change of the anterior limb of the internal capsule is related to the severity of depressive symptoms in adults with major depressive disorder.¹⁷ Degeneration in this region may relate to a loss of white matter integrity of these neural circuits,¹⁸ and this abnormality might trigger the onset of negative mood change. Our findings on the association between the change in FA values of the internal capsule and depression scale scores might reflect an association between axonal damage of the internal capsule and depressive mood in stroke patients.

Our findings demonstrate that patients had reduced amounts of circulating T_{reg} , with the degree of reduction being related to the decrease in FA value in the internal capsule. This may indicate that a decrease in T_{reg} is related to the axonal damage of the internal capsule in stroke patients. Our findings showed no direct relationship between T_{reg} level and depression scale scores, but T_{reg} may indirectly affect post-stroke depressive symptoms via its effect on the cerebral damage.

An ischemic stroke caused T lymphocytes to become activated, infiltrate the brain, and then function as sources of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic substances.¹⁹⁻²¹ However, not all T-cell

subtypes are detrimental to acute stroke outcome, and recent evidence indicates a novel role of T cells in promoting brain tissue repair and regeneration. T_{reg} cell is an important T-cell subtype, and it supports brain tissue repair and regeneration.²² T_{reg} cells act to limit the immune response by releasing transforming growth factor- β and interleukin-10,²³ and they have also been reported to be required for neurogenesis.²⁴ Infarct volume and neuronal dysfunction were significantly increased in mice treated with an anti-CD25 monoclonal antibody to neutralize T_{reg} compared with controls.²³ Furthermore, this protection was observed only 7 days after a modest ischemic insult.²³ These findings of the brain-protecting and outcome-improving effects of T_{reg} were also confirmed by Li *et al.* using post-stroke T_{reg} cell therapy.²⁵

One possible explanation for our results of T_{reg} is that people with lower circulated T_{reg} are more likely to develop stroke and tend to have severe axonal damage after stroke. Another possibility is that the reduction in circulated T_{reg} after stroke might be induced by the consumption of T_{reg} to repair cerebral neuronal injuries, including axonal damage. Our findings of lower circulated T_{reg} are based on cross-sectional data, which provide limited ability to infer which explanation is right. In any case, our results are consistent with previous reports of the brain-protecting and outcome-improving effects of T_{reg}. In principle, our findings showed the possibility of improving stroke outcome by targeting the role of T_{reg} in protecting brain tissue damage after a stroke.

Ren *et al.* and Kleinschnitz *et al.* respectively demonstrated no role or an opposite role for T_{reg} in exacerbating brain injury early after transient ischemia.^{26,27} The animal model they used was different from that of the Liesz study in several aspects, including the duration of ischemia and methods for T_{reg} depletion. Furthermore, the late stage effect of T_{reg} depletion was not addressed in their studies. In our study, stroke patients were predominantly of modest ischemic insult, and their circulating lymphocytes were studied after 10–28 days. There is a possibility that the differences in the severity and stage of the ischemic insult caused different results regarding the role of T_{reg} in their studies and ours.

Our study has some limitations. First, patients with significant comprehension deficits were excluded because clinical verbal interviews could not be con-

ducted. Second, all of the patients took anticoagulant or anti-platelet medicine. Specifically, 13 patients took acetylsalicylic acid, which has an anti-inflammatory effect, and this may have affected our results. However, the extent to which our findings relate to medication remain uncertain. Further analysis, inclusive of considerations of these points, is needed to confirm our present findings.

In conclusion, the present study suggests that FA reduction in the bilateral anterior limb of the internal capsule is evident in stroke patients. This regional damage relates to abnormality of neuroanatomical pathways in frontal-subcortical circuits and renders a biological vulnerability, which then gives rise to the onset of depressive symptoms. Our findings also demonstrate that patients have reduced amounts of circulating T_{reg}, with the degree of reduction being related to the decrease in FA value in the internal capsule. T_{reg} cells might have a role in improving post-stroke white matter tissue damage by limiting the immune response and promoting neurogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Japan Society for the Promotion of Science, Grant-in-Aid for Scientific Research (C), 24591740.

REFERENCES

- 1 Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008; **371**: 1612–1623.
- 2 Whyte EM, Mulsant BH. Post stroke depression: epidemiology, pathophysiology, and biological treatment. *Biol Psychiatry* 2002; **52**: 253–264.
- 3 Magnus T, Wiendl H, Kleinschnitz C. Immune mechanisms of stroke. *Curr Opin Neurol* 2012; **25**: 334–340.
- 4 Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; **17**: 796–808.
- 5 Macrez R, Ali C, Toutirais O *et al.* Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 2011; **10**: 471–480.
- 6 Craft TK, DeVries AC. Role of IL-1 in poststroke depressive-like behavior in mice. *Biol Psychiatry* 2006; **60**: 812–818.
- 7 Brait VH, Arumugam TV, Drummond GR, Sobey CG. Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; **32**: 598–611.
- 8 Brott T, Adams HPJ, Olinger CP *et al.* Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989; **20**: 864–870.
- 9 Goldstein LB, Samsa GP. Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial. *Stroke* 1997; **28**: 307–310.
- 10 Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; **12**: 189–198.

- 11 Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; **23**: 56–62.
- 12 Kim DH, Adalsteinsson E, Glover GH, Spielman DM. Regularized higher-order *in vivo* shimming. *Magn Reson Med* 2002; **48**: 715–722.
- 13 Song SK, Yoshino J, Le TQ *et al.* Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 2005; **26**: 132–140.
- 14 Thomalla G, Glauche V, Koch MA *et al.* Diffusion tensor imaging detects early Wallerian degeneration of the pyramidal tract after ischemic stroke. *Neuroimage* 2004; **22**: 1767–1774.
- 15 Axer H, Keyserlingk DG. Mapping of fiber orientation in human internal capsule by means of polarized light and confocal scanning laser microscopy. *J Neurosci Methods* 2000; **94**: 165–175.
- 16 Duran FL, Hoexter MQ, Valente AAJ *et al.* Association between symptom severity and internal capsule volume in obsessive-compulsive disorder. *Neurosci Lett* 2009; **452**: 68–71.
- 17 Zou K, Huang X, Li T *et al.* Alterations of white matter integrity in adults with major depressive disorder: a magnetic resonance imaging study. *J Psychiatry Neurosci* 2008; **33**: 525–530.
- 18 Budde MD, Kim JH, Liang HF *et al.* Toward accurate diagnosis of white matter pathology using diffusion tensor imaging. *Magn Reson Med* 2007; **57**: 688–695.
- 19 Jander S, Kraemer M, Schroeter M *et al.* Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; **15**: 42–51.
- 20 Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 2006; **113**: 2105–2112.
- 21 Brait VH, Jackman KA, Walduck AK *et al.* Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; **30**: 1306–1317.
- 22 Zouggari Y, Ait-Oufella H, Waeckel L *et al.* Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation* 2009; **120**: 1415–1425.
- 23 Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C *et al.* Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009; **15**: 192–199.
- 24 Saino O, Taguchi A, Nakagomi T *et al.* Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *J Neurosci Res* 2010; **88**: 2385–2397.
- 25 Li P, Gan Y, Sun BL *et al.* Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol* 2013; **74**: 458–471.
- 26 Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA *et al.* CD4+FoxP3+ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 2011; **26**: 87–90.
- 27 Kleinschnitz C, Kraft P, Dreykluft A *et al.* Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood* 2013; **121**: 679–691.

脳梗塞患者に対する再生医療開発

田口 明彦

要 旨

脳梗塞予防に関しては、降圧薬、抗血小板薬、抗凝固薬などの多くの有効な薬剤が存在し、また脳梗塞超急性期における脳組織の壊死の防止に関しても、血栓溶解療法や血管内治療など有効な治療法の開発が進んでいる。しかし、超急性期以降の脳組織壊死が生じた後の脳機能の再生に関しては、現状でもリハビリテーション以外には確立された治療法がなく、新規治療法開発が切望されている。我々は基礎研究において、脳梗塞後に誘導/動員される神経幹細胞の生着・機能には血管再生が必要不可欠であり、造血幹細胞投与で血管再生・神経機能回復が促進することを世界に先駆けて報告し、さらにこれらの知見に基づき、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球細胞移植の臨床試験を実施してきた。本稿ではそれらの概要とともに、今後の研究の方向性についても言及する。

(脳循環代謝 25:105~107, 2014)

キーワード: 脳梗塞, 再生医療, 細胞治療, 神経再生, 血管再生

はじめに

脳梗塞治療を目的に神経幹細胞移植を中心とした様々な基礎研究・臨床試験が行われてきたが、単なる神経幹細胞移植では脳梗塞後の機能回復に対してはほとんど治療効果がないことが示されてきた。一方、脳梗塞後には神経幹細胞が障害部位に誘導/動員されるものの、それらのほとんどは生着できず機能回復にも寄与しないことも知られていた。我々は鳴き鳥(Songbird)において神経再生には血管再生が必須であることに注目し、脳梗塞後の血管再生と神経再生および神経機能再生の関連についての基礎的/臨床的研究を行っている。

脳梗塞モデルマウスを用いた 幹細胞治療効果の検証

我々は、四肢虚血患者に対する造血幹細胞を含む自己骨髄単核球移植の臨床試験を実施し、虚血性疾患患者に対する造血幹細胞移植が血管再生を促進し臓器機能も回復させることを示してきた¹⁾。しかし脳梗塞後の神経機能再生に関しては治療効果を正確に定量するための実験評価系が存在していなかったため、兵庫医科大学松山教授と共同で、長期生存率がほぼ100%で脳梗塞サイズ・領域の再現性が極めて高かつ作成が比較的容易な非常に優れた脳梗塞モデルマウスを新たに開発し²⁾、その実験系を活用した研究を行ってきた。その結果、①脳梗塞後の造血幹細胞静脈内投与は梗塞周囲における血管再生を促進すること、②脳梗塞後の血管再生は脳梗塞により誘導/動員された神経幹細胞の生着に必須であること、③造血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もたらすこと、④脳梗塞後の脳組織再生は脳機能の再生をもたらすこと、など血管再生と機能再生に関する重要な知見を明らかにした^{3,4)}。また、⑤造血幹細胞投与の治療時期に関する検討では、脳梗塞後2, 4, 7, 10日およ

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
〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町2-2
TEL: 078-304-5772 FAX: 078-304-5263
E-mail: Taguchi@fbri.org

び14日後の骨髄単核球投与においては治療効果はあるものの、脳梗塞発症24時間後の急性期や21日後以降の慢性期においては治療効果が弱いことを明らかにし⁵⁾、さらに、⑥造血幹細胞を末梢血中に動員する作用のあるG-CSFの投与では、予想に反し骨髄からの顆粒球動員に伴い脳萎縮や神経機能の低下が引き起こされることを明らかにした⁶⁾。これらの基礎研究の成果は神経幹細胞の誘導/動員など、内因性の組織修復機構が活性化されている時期においては造血幹細胞移植/血管再生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治療効果が低いこと、またG-CSFでは代用不可であることを示していると考えている。

心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植の臨床試験

以上の成果を基に国立循環器病研究センター病院および先端医療センター病院において“急性期心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球静脈内投与に関する臨床研究”のPhase1/2a臨床試験を実施してきた。主な適格基準は、①心原性脳塞栓症と診断されている。②年齢が20歳以上75歳以下である。③発症後7日目の時点でNIHSSが10点以上である。④来院時に比し、発症7日後のNIHSS改善度が5点以下である。であり、重症の心原性脳塞栓症症例で、かつ脳梗塞発症1週間後においても神経機能回復が十分でない患者群のみを対象としている。国立循環器病研究センター脳神経内科における過去のデータより、これらの適格基準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に起こることが判っている。治療プロトコルの概略は、①脳梗塞発症7～10日目に、局所麻酔下で骨髄液を採取、②低用量群6例は25mlの骨髄液採取、高用量群6例は50mlの骨髄液採取、③採取日に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画の分離、④採取日に静脈内に5分間で全量投与、⑤プライマリエンドポイントとして、脳梗塞7日後と比し投与1カ月後におけるNIHSS悪化症例の頻度(安全性)および脳梗塞7日後と細胞投与1カ月後におけるNIHSSの改善度(有効性)を設定、⑥検査可能な症例では細胞治療1カ月後および6カ月後にPETを用いた脳循環代謝測定を行う、である。

臨床試験は既に終了し、安全性および有効性に関しても十分なデータが得られ、論文作成もほぼ終了している。高用量群は低用量群に比し良好な機能回復がみ

られており、また安全性に関しても特別な問題はないことが明らかになっており、それらの臨床試験結果の詳細は論文上で発表予定である。

脳梗塞患者に対する再生医療開発の課題

脳梗塞後の新規機能再生療法開発における最大の特徴は、“いまだかつて全世界で成功例が1例もない”，という点であり、その原因として下記の問題が指摘されている。

①脳梗塞モデル動物が不適當：脳梗塞患者とは関連のない一過性脳虚血モデルや、再現性がなく長期生存もできない脳梗塞モデルの使用をしたため、治療効果判定が著しく困難であった。

②治療ターゲットが脳梗塞患者病態から乖離：神経細胞をターゲットにした細胞死抑制やapoptosis防止が研究の主流であったが、脳梗塞では血流がなくなると脳組織そのものが壊死に陥るため、神経細胞の生存にのみ焦点を当てた治療法開発は、そもそも実際の病態から乖離している部分が多いと考えられている。

③臨床試験設計の精度が低い：機能再生療法のための治療有効期間(therapeutic time window)は、急性期から亜急性期が最も有効性が期待できると考えられているが、その時期においては患者の予後予測が困難であり、また治療効果を反映するサロゲートマーカーが見つからないため、治療効果を正確かつ高感度に判定する臨床試験設計が困難であった。

我々はこれらの現状を打破するため、①再現性/長期生存率が高い脳梗塞モデル開発を行い、さらに、②微小血管再生の促進や脳虚血領域の炎症制御による神経機能再生促進をターゲットにした治療法開発を行っている。また、③臨床試験設計に関しても、国立循環器病研究センター等と共同でMRIトラクトグラフィや経頭蓋磁気刺激を用いて解剖学的・電気生理的な損傷/再生の定量的評価法を開発しており、脳梗塞治療法開発に関する問題点を一つずつ解決することにより、新規機能再生療法の確立につなげていくことができると考えている。

脳梗塞患者に対する新規治療法開発には、これからも非常に多くの技術や要素が必要不可欠であると考えておりますので、共同研究のお誘いも是非よろしくお願いたします。

文 献

- 1) Taguchi A, Ohtani M, Soma T, Watanabe M, Kinoshita N: Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow

- transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 25: 276–278, 2003
- 2) Taguchi A, Kasahara Y, Nakagomi T, Stern DM, Fukunaga M, Ishikawa M, Matsuyama T: A reproducible and simple model of permanent cerebral ischemia in CB-17 and SCID mice. *J Exp Stroke Transl Med* 3: 28–33, 2010
 - 3) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T: Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114: 330–338, 2004
 - 4) Nakano-Doi A, Nakagomi T, Fujikawa M, Nakagomi N, Kubo S, Lu S, Yoshikawa H, Soma T, Taguchi A, Matsuyama T: Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells* 28: 1292–1302, 2010
 - 5) Uemura M, Kasahara Y, Nagatsuka K, Taguchi A: Cell-based therapy to promote angiogenesis in the brain following ischemic damage. *Curr Vasc Pharmacol* 10: 285–288, 2012
 - 6) Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T: Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur J Neurosci* 26: 126–133, 2007

Abstract

Cell-based therapy for patients after stroke

Akihiko Taguchi

Institute of Biomedical Research and Innovation, Hyogo, Japan

We had demonstrated that intravenous administration of bone marrow derived mononuclear cells or hematopoietic stem cells improves functional recovery through enhanced angiogenesis in experimental stroke model. Based on these observations, we started phase 1/2a clinical trial of cell-based therapy for patients with cardiogenic cerebral embolism (ClinicalTrials.gov ID: NCT01028794). The results of clinical trial indicated that autologous bone marrow cell transplantation at day 7–10 after onset of stroke is feasible and safe in patients with severe stroke, and patients with cell therapy had better neurological outcomes, compared with historical control group. Our results encouraged us next randomized clinical trials to confirm the effect of cell therapy for patients after stroke.

Key words: stroke, regenerative medicine, cell-based therapy, neurogenesis, angiogenesis

脳梗塞患者に対する 機能再生治療法の開発

すずき いくひろ まえだ みつよ たぐちあきひこ
鈴木育浩, 前田光代, 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研究所 再生医療研究部 (〒650-0047 神戸市中央区港島南町2丁目2番)
E-mail: i-suzuki@fbri.org

SUMMARY

脳梗塞後には内因性神経幹細胞が梗塞周辺部に誘導されることが知られているが、著者らはその生着や機能には血管再生が必要不可欠であり、造血幹細胞や骨髄単核球投与で血管再生・神経機能回復が促進することを明らかにし、これらの知見を基に脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球細胞移植治療の臨床試験を実施してきた。本稿では脳梗塞患者に対する機能再生治療法の開発に関する著者らの基礎研究および臨床試験の成果、さらにはその未来に関して概説する。

はじめに

現在日本では、急速な高齢化社会を迎えており、それに伴う要介護者の急激な増加はきわめて深刻な社会問題となっている。脳梗塞の予防に関しては降圧薬や抗血小板薬、抗凝固薬などの治療が広く行われ、また脳血管閉塞後超急性期の再開通治療に関しても血栓溶解療法や血管内治療の進歩がみられるものの、脳梗塞による神経細胞死/脳組織壊死が生じた後は、リハビリ以外には治療法は存在せず、そのため脳血管障害はいまだに要介護者および寝たきり者の発生原因の第一位である。脳梗塞後の機能再生に関する治療法開発において、現状では世界でも成功例が一例もないが、その原因として、①不適切なモデル動物、②不適切な治療ターゲット、③不適切な臨床試験プロトコール、があると著者らは考えており、これらの問題点を打破するための研究を行っている。

KEY WORDS

再生医療
神経再生
血管再生
細胞治療
脳梗塞

I. 脳梗塞モデルマウスを用いた 骨髄単核球細胞の治療効果

脳梗塞の基礎研究においては、実際の脳梗塞患者病態とは関連の薄い一過性脳虚血再灌流障害モデルや再現性がなく長期生存もできない脳梗塞モデルが頻用されてきた。そこで著者らは、再現性および長期生存率が非常に高い脳梗塞モデル（永久閉塞モデル）を兵庫

医大松山グループと確立し^{1,2)}、種々の治療法の効果を検証してきた。その結果、①脳梗塞後の造血幹細胞(あるいは造血幹細胞を含む骨髄単核球細胞)の静脈内投与は脳における血管再生を促進すること、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導し、かつその生着に必須であること、③造血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神経組織再生は脳機能の再生をもたらすことなど、脳障害における血管再生が神経再生・神経機能再生に必要不可欠であることを世界に先駆けて明らかにした^{3,4)}。また、幹細胞を骨髄から動員する作用のあるG-CSFの投与では、骨髄からの顆粒球動員に伴い逆に脳萎縮促進作用や神経機能の低下がみられることを報告し⁵⁾、さらに、造血幹細胞の最適な投与時期に関する検討では、脳梗塞後2, 4, 7, 10日および14日後の細胞投与において、脳梗塞巣の減少および行動の改善を認めるが脳梗塞後1日および21日後においては有意な改善効果を認めないことを

示してきた⁶⁾。これらの結果は内因性の血管再生や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移植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治療効果が低いことを示していると考えられている。

II. 脳梗塞患者に対する自己骨髄幹細胞を用いた細胞治療の臨床試験

以上の知見を基に、先端医療センター病院および国立循環器病研究センター病院において“急性期心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球静脈内投与に関する臨床研究”を「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、実施した(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01028794)。

臨床試験のプロトコルの概略を図1に示す。主な適格基準は、

- ①心原性脳塞栓症と診断
- ②年齢が20歳以上75歳以下である

試験デザインの概略

- ・試験の相: 第I-IIa相
- ・用量漸増法

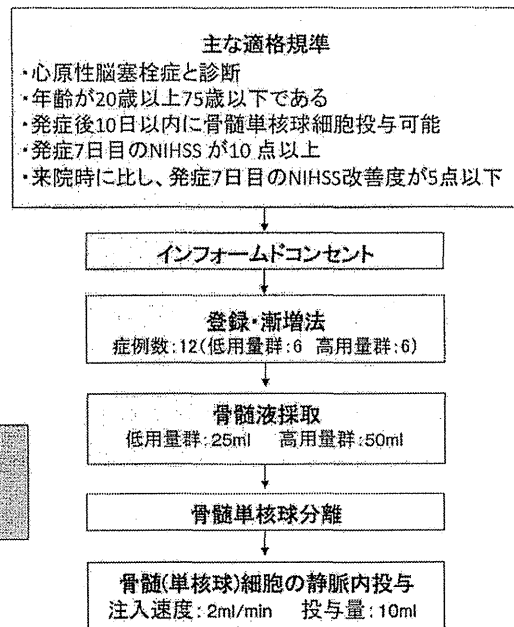
primary endpoint

- ① 安全性
脳梗塞7日後と比し投与1か月後におけるNIHSS悪化症例の頻度
- ② 有効性
投与1か月後のNIHSSの改善度

比較対象

historical control
(エントリー基準を満たす症例、N=59)

NIHSS(national institute of health stroke scale)
脳卒中神経学的重症度の評価スケールとして世界的に広く利用されている評価法
0点が正常で点数が高いほど重症(最大で42点)



(2009年ヒト幹細胞指針承認: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01028794)

図1 心原性脳梗塞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梗塞症患者を対象に、発症7～10日後に骨髄細胞を採取し、単核球分離後静脈内投与を行った。

- ③発症後 10 日以内に骨髄単核球細胞投与可能
- ④発症 7 日目の NIHSS が 10 点以上
- ⑤来院時に比し、発症 7 日目の 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のみを対象としている。国立循環器病研究センターにおける過去のデータより、これらの適格基準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、その予後はきわめて悪く、また脳梗塞に伴う合併症が高頻度に起こることが知られている。

細胞治療の概略は、

- ①脳梗塞発症 7～10 日目に、局所麻酔下で骨髄細胞の採取（低用量群は骨髄 25 ml、高用量群は骨髄 50 ml）
- ②国立循環器病研究センターあるいは先端医療センターの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画の分離

③静脈内に 5 分間で全量投与と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 ヶ月後における NIHSS 悪化症例の頻度（安全性）
- ②脳梗塞 7 日後と細胞投与 1 ヶ月後における 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（合計 59 症例）をヒストリカルコントロール群として用いた。

現在、予定していた 12 症例のすべての follow up が終了しており、安全性に関しては問題がなく、低用量群と高用量群の比較検討や、治療群とヒストリカルコントロール群との比較検討においても有望な結果が出ており、その詳細に関しては論文で発表予定である。

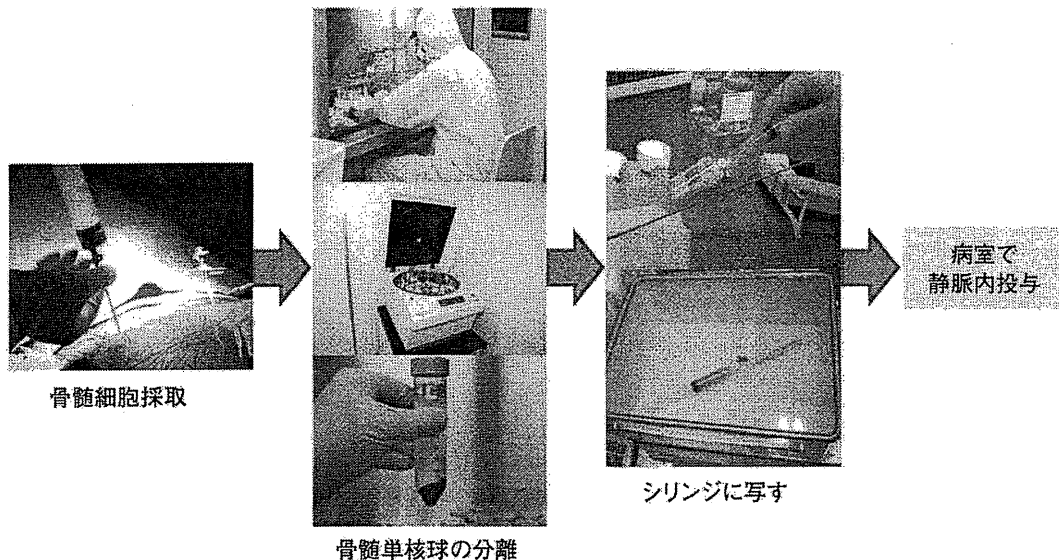


図 2 細胞治療の実際

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

III. 脳梗塞後の機能回復治療法開発の今後

過去の脳梗塞治療法開発に関する研究は、神経細胞死あるいは神経細胞の apoptosis 防止を中心に研究が進められてきたが、患者病態においては血流が遮断された部位においては神経細胞死だけでなく脳組織全体の壊死が生じるため、神経細胞にのみ照準を合わせた治療法はその効果が非常に限定されていた可能性があると考えている。著者らは脳梗塞後の微小血管再生による神経機能再生促進を中心に研究を進めてきたが、間葉系幹細胞などを用いた炎症制御などによっても神経機能再生が促進される可能性が示唆されており、今後はさまざまな手法を用いた治療法開発が進められると考えられている。

また、臨床試験の設計においても、現状では治療効果の客観的指標が存在しないが、その確立は感度の高い臨床試験の実施には必須である。脳梗塞後の機能回復療法の最適な治療時期は脳梗塞急性期から亜急性期であると著者らは考えており、その時点における解剖学的・電気生理的な損傷/再生の定量的評価法の確立に向け、MRI トラクトグラフィーや経頭蓋磁気刺激法を用いた研究を国立循環器病研究センターや神戸中央市民病院とともに実施している。

おわりに

脳梗塞患者に対する機能再生治療法の開発においては、非常に多くの要素が必要であるが、それらの課題を解決することにより、脳梗塞治療のパラダイムシフトを起こすことができると著者らは考えている。

参考文献

- 1) Taguchi A, et al : A reproducible and simple model of permanent cerebral ischemia in CB-17 and SCID mice. *J Exp Stroke Transl Med* 3 : 28-33, 2010.
- 2) 松山知弘, 他 : 「脳梗塞疾患モデルマウス」特許第 4481706 号, 2010.
- 3) Taguchi A, et al : Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114 : 330-338, 2004.
- 4) Nakano-Doi A, et al : Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells* 28 : 1292-1302, 2010.
- 5) 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.
- 6) Uemura M, et al : Cell-based therapy to promote angiogenesis in the brain following ischemic damage. *Curr Vasc Pharmacol* 10 : 285-288, 2012.

神経解剖学 入門書の新定番!

カラー図解

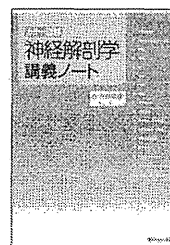
神経解剖学講義ノート

著 寺島俊雄 神戸大学教授

神戸大学から全国へ広まった、人気の講義資料が書籍化。難解な神経解剖を、超簡略化した模式図と講義感覚のテキストで明快に解説。

A4判・251頁 本体価格 4,600 円 (税別)

ISBN978-4-7653-1506-7



株式会社金芳堂

京都市左京区藤ヶ谷西寺ノ前町 34 番地 〒606-8425
Tel 075-751-1111 Fax 075-751-6858

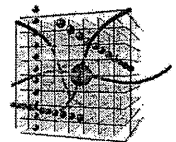
E-mail (営業部) : eigyo@kinpodo-pub.co.jp
<http://www.kinpodo-pub.co.jp/>

脳血管をターゲットにした 再生医療による認知症治療戦略

Akihiko Taguchi ◎ 田口明彦*

Kenichi Yamahara ◎ 山原研一†

*先端医療振興財団先端医療センター研究所再生医療研究部
†国立循環器病研究センター研究所再生医療部



Summary

脳血管性認知症や老年期アルツハイマー型認知症において脳血管病変が強く関与していることが知られており、多くの認知症に共通する治療ターゲットは脳血管であるとわれわれは考えている。本稿では、われわれが研究してきた造血幹細胞と脳神経機能に関する基礎的および臨床的知見について概説するとともに、造血幹細胞や間葉系幹細胞を用いた再生医療による認知症治療法開発の可能性・将来像を紹介する。

Key words

- ◎脳血管性認知症
- ◎アルツハイマー型認知症
- ◎脳血管
- ◎造血幹細胞
- ◎間葉系幹細胞
- ◎再生医療

はじめに

神経変性に伴う認知機能障害は多くの高齢者に発症するが、その根本的な原因は神経細胞自体の障害ではなく、神経細胞を取り巻く環境の老化・悪化であるとわれわれは考えている。われわれは、①脳血管障害患者の末梢血中に存在する造血幹細胞(CD34陽性細胞)の減少が脳微小循環障害や認知機能障害に相関していること¹⁾²⁾、②急性期脳血管障害後の造血幹細胞移植が血管再生・血管保護を介して神経機能回復を促進すること³⁾、③慢性脳微小循環障害に対する造血幹細胞移植が微小循環動態改善効果や脳梗塞後機能回復促進作用があること⁴⁾、さらに④虚血脳における血管新生が末梢血中造血幹細胞の増加と関連していること⁵⁾、など、造血幹細胞・血管再生と脳神経機能に関する新しい知見を次々と世界に先駆けて示してきた。本稿では、われわれが明らかにしてきた造血幹細胞と脳神経機能に関する知見について概説するとともに、われわれが現在進めている造血幹細胞と間葉系幹細胞を用いた再生医療による認知症治療戦略を紹介する。

造血幹細胞の減少と血管障害

骨髄から末梢血中に動員される造血幹細胞は、各種成長因子や血管新生因子の放出とともに血管内皮や周皮細胞への分化能を有し、血管再生や微小血管維持に重要な役割を果たしていることが知られている(図1)。われわれは循環器疾患患者における末梢血中の造血幹細胞と病態との関連を検討し、その結果、末梢血中造血幹細胞の減少が、①脳梗塞の発症や脳循環代謝の低下と関連していること¹⁾、②認知機能低下と関連していること²⁾⁶⁾、③前向き検討においても認知機能の経時的な低下と関連していること³⁾、また、脳血管障害患者以外においても末梢血中造血幹細胞の減少が、④糖尿病性心筋障害と関連していること⁹⁾、⑤透析患者における心血管障害発症リスクの増加と関連していること¹⁰⁾¹¹⁾、⑥末梢糖尿病性腎症の悪化と関連していること¹²⁾、さらには、⑦末梢血中造血幹細胞の増加が、脳血管新生と関連していること⁷⁾、など、循環器疾患患者における末梢血中の造血幹細胞と微小循環障害・再生機転に関する重要なさまざまな臨床的な知見を発見・報告しており、骨髄造血幹細胞の疲弊・枯渇が脳血管障害や神経機能低下を引き起こす重要な因子であ

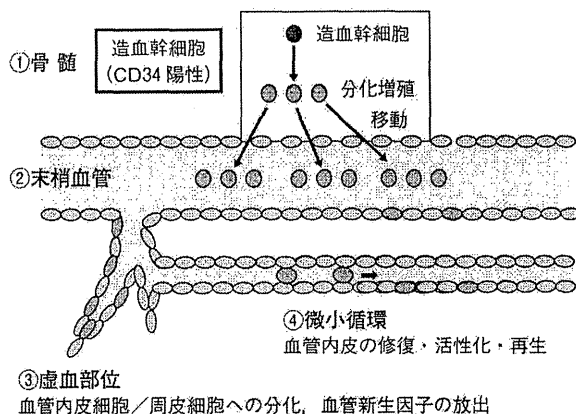


図1 骨髄造血幹細胞と血管再生/血管維持

骨髄造血幹細胞は末梢血中にも存在し、血管内皮細胞への分化や血管新生因子の分泌を介して、血管再生や血管維持に重要な役割を果たしている。

ることを示してきた(図2)。

造血幹細胞移植による血管再生治療

造血幹細胞を用いた血管再生治療に関して、われわれは四肢虚血患者における造血幹細胞移植により著明な治療効果を示してきたが¹³⁾(図3)、脳梗塞に関して、脳梗塞動物モデルにおける前臨床試験において、①亜急性期における造血幹細胞投与が梗塞周囲における血管再生を促進すること、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生に必須であること、③脳梗塞後の血管再生は脳機能の再生をもたらすことなど、血管再生と神経機能再生に関する知見を世界に先駆けて明らかにするとともに¹⁴⁾⁵⁾(図4)、それらの知見に基づき国立循環器病研究センターおよび先端医療センター病院において、脳梗塞患者を対象とした自己骨髄造血幹細胞を用いた機能回復促進に関する臨床試験を実施してきた(図5)。2013年2月には予定されていた12症例のすべてのエントリーが終了しており、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たどった症例や、細胞治療後に明らかに脳循環・脳代謝が改善した症例

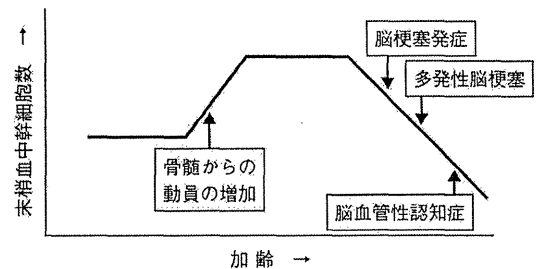


図2 造血幹細胞の枯渇と脳血管障害

微小循環障害がほとんどない若年者では、骨髄からの造血幹細胞(CD34陽性細胞)の動員は低いレベルであるが、加齢とともに徐々に上昇が認められ、造血幹細胞レベルが高い値に維持されている間は明らかな血管イベントは認められないが、骨髄からの造血幹細胞動員が十分なレベルを保てなくなることにより、血管疾患・認知機能障害発症リスクが高くなると考えている。

などがあるが、統計学的な検討に関しては、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・太門貴志准教授)が現在解析を進めている。

細胞治療による認知症治療

脳血管障害患者における病態と末梢血中に存在する

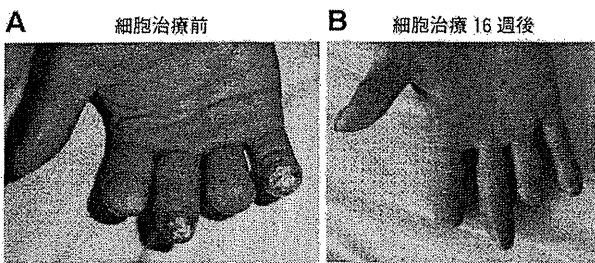


図3 四肢虚血患者に対する造血幹細胞移植による血管再生
Burger病患者における難治性潰瘍(A)が、自己骨髄由来造血幹細胞の筋肉内移植治療後には完全に治癒した(B)。

(文献13より引用)

造血幹細胞動態に関する臨床的な知見より、造血幹細胞の枯渇・疲弊が脳血管障害を介して認知機能障害と関連していることをわれわれは示してきたが、さらにそれを検証するため、下記の手法を用いて、造血幹細胞を補充することによる微小循環改善作用、脳神経機能回復促進作用の検討を行ってきた⁹⁾。

脳微小循環が老化により著明に障害されるモデルとして、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSPラット)を用いた。SHRSPラットの高塩分負荷時における平均的な寿命は約60~80週であり、研究においては50週齢以降のラットを骨髄移植のレシピエントとして、またドナーとしては8週齢以前の同系繁殖で飼育している若齢SHRSPラットを使用した。造血幹細胞移植方法に関しては、放射線照射や化学療法などの前処置をせずに、静脈内投与に加え左脛骨骨髓内への投与(図6)を併用し、若齢造血幹細胞投与30日後には中大脳動脈の永久閉塞による脳梗塞を作成した。造血幹細胞の補充・若返りによる評価項目として、①

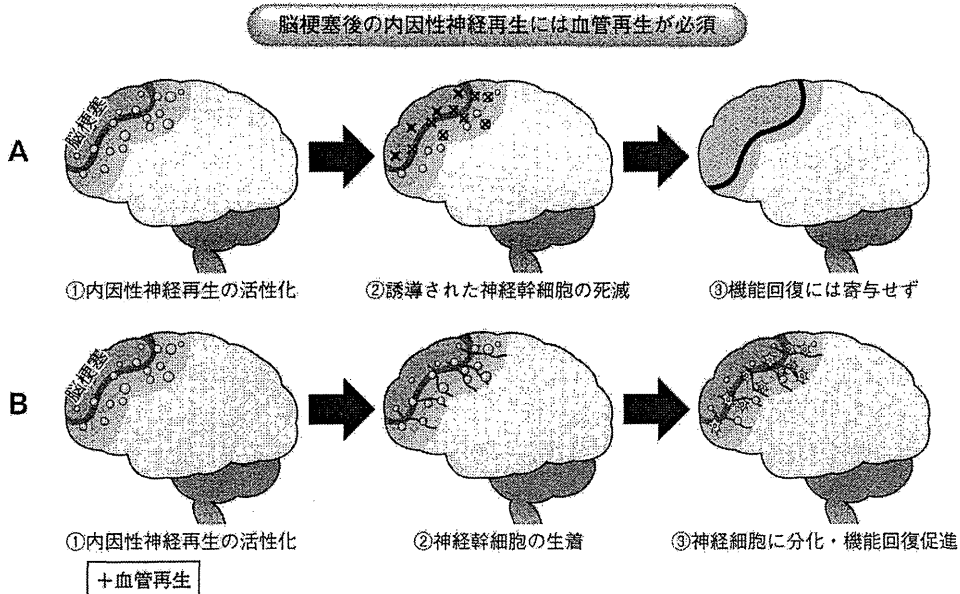


図4 脳梗塞後の内因性神経再生と血管再生

脳梗塞後には内因性の神経再生が活性化されるが、血管再生がなければ誘導されてきた神経幹細胞はほとんど死滅する(A)。一方、造血幹細胞投与などにより血管再生を活性化すると、これらの誘導されてきた神経幹細胞は生着、成熟、機能し、神経機能向上に寄与する(B)。

(文献4より引用)

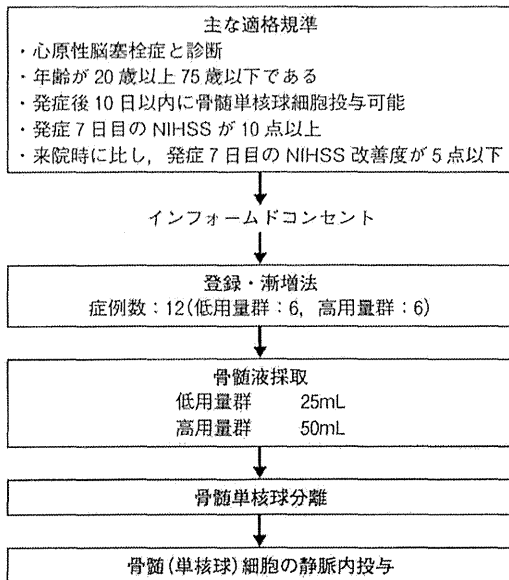


図5 脳梗塞患者に対する造血幹細胞移植による血管再生治療プロトコール

国立循環器病研究センターおよび先端医療センター病院において、重症心原性脳塞栓症患者を対象にした臨床試験を実施してきた。

末梢血中白血球分画の変化、②中大脳動脈閉塞時における脳梗塞体積の変化、③脳梗塞誘導後の神経機能に与える影響、④微小循環の構造的変化に関する免疫組織学的評価、⑤血中および脳虚血周囲におけるIL-1、IL-6、MCP-1、TNF濃度変化の定量、などを行った。その結果、①移植後も末梢血中の各白血球分画の変化はないものの、②移植30日後における移植細胞のキメラ率は5%であり、若齢造血幹細胞移植による治療効果として、③造血幹細胞移植後60日間(移植30日後に脳梗塞作成)での高齢ラット死亡率の低下、④中大脳動脈閉塞による梗塞体積の減少、⑤脳梗塞後の大脳皮質機能の改善効果、⑥皮膚損傷後の毛細血管活性化促進、を認めた。また、若齢造血幹細胞移植の障害された微小血管に与える効果の組織学的な変化として、⑦脳梗塞周囲の毛細血管密度の上昇、⑧血液脳関門を構成する血管内皮細胞と周細胞の乖離の抑制、⑨血管内皮細胞の細胞死の抑制、が観察された。また、サイトカイン評価に関しては、若齢造血幹細胞移植に

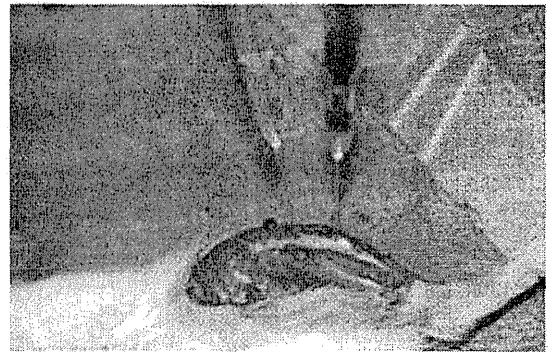


図6 造血幹細胞の骨髄内移植
造血幹細胞の静脈内移植に加え、骨髄内移植を併用することにより、末梢血中の移植細胞キメラ率が上昇する。
(文献6より引用)

より、⑩脳梗塞部におけるIL-1 β 、MLP-1の上昇、が認められた。さらにこれらの知見を裏付けるため、ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)と若齢/老齢SHRSP由来造血幹細胞を用いた*in vitro*共培養の実験系においては、若齢SHRSP由来造血幹細胞は老齢由来細胞に比し、⑪HUVECのeNOS活性化作用が強いこと、⑫アポトーシス誘導に関連するp38 MAPキナーゼのリン酸化抑制作用が強いこと、などを明らかにした。脳梗塞患者においても若齢者は老齢者に比し、①末梢血中白血球分画には大きな違いはないものの、②中大脳動脈閉塞時においても側副血行路が発達しているため脳梗塞体積が比較的小さくて済む症例が存在し、また、③脳梗塞後の神経機能回復の良好な症例が多いこと、などより、老齢SHRSPに対する若齢SHRSP由来造血幹細胞移植は、実際の脳血管障害患者の病態をかなり忠実に再現できており、臨床的にも造血幹細胞の補充は脳血管病変を劇的に改善する可能性が高いと考えている。

おわりに

われわれは脳微小循環改善効果や β アミロイド排泄

促進作用を有するシロスタゾール(プレタール[®])が、高齢の軽度認知障害(mild cognitive impairment : MCI)患者の認知機能を向上させることを最近発見し報告した¹⁴⁾。神経変性に伴う認知機能障害は多くの高齢者に発症するが、その根本的な原因は神経細胞自体の障害ではなく神経細胞を取り巻く環境の老化に問題があり、造血幹細胞や薬剤を用いた脳血管病変をターゲットにした再生治療により、認知症の予防やMCI患者における神経機能再生療法を開発・確立することが可能であると考えている。

さらにより効果的な認知症予防法/治療法の開発には、①エネルギー供給の源である脳微小循環、とともに②老廃物排出システムである血管周囲ドレナージ経路(血管網と並行して存在し、脳内のリンパ系システムとも言える脳間質流)¹⁵⁾、③神経細胞の活動・生存に大きな影響を与えることが知られている慢性炎症/免疫系、が重要であり(図7)、これらの要素すべてを再生/制御する必要がある。近年、間葉系幹細胞は強力な免疫調整作用を持つことが示され、海外では移植

片対宿主病(graft-versus-host disease : GVHD)に対する治療薬としてすでに認可されているが、老化に伴う自己免疫関連の慢性炎症も間葉系幹細胞を用いることによりそのコントロールが可能になるとわれわれは考えており、造血幹細胞/薬剤による脳微小循環や脳間質流の機能維持・再生と併用することにより、適切な神経細胞環境の再生が可能となると考えている。不可逆的な神経変性/神経細胞死が神経組織全体に及んでいる症例での神経機能再生は現時点では非常に困難であるが、MCI患者などでは認知機能の向上・再生は可能であり、“認知症への先制医療を神戸から世界へ”広げていくことを目標に、多くの環境因子が関与している認知症に対して、造血幹細胞、間葉系幹細胞、薬剤などを適切に組み合わせた研究を今後も続けていく予定である。

◎References

- 1) Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, et al : Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109 : 2972-2975, 2004
- 2) Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, 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
- 3) Taguchi A, Nakagomi N, Matsuyama T, 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
- 4) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al : Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114 : 330-338, 2004
- 5) Nakano-Doi A, Nakagomi T, Fujikawa M, et al : Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells* 28 : 1292-1302, 2010
- 6) Taguchi A, Zhu P, Cao F, et al : Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 31 :

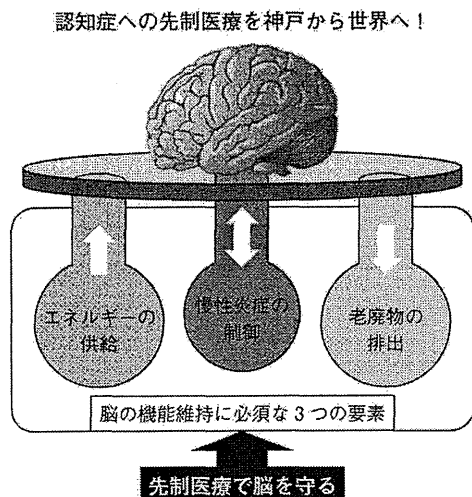


図7 脳の機能維持・再生に不可欠な要素

脳や神経細胞の機能の維持には、エネルギーの供給、老廃物の排出、慢性炎症の制御が必要不可欠であり、これらの要素をコントロールすることにより、神経細胞変性に伴う認知症に対する先制医療が達成できると考えている。

- 855-867, 2011
- 7) Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama 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
 - 8) Taguchi A : Vascular factors in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16** : 859-864, 2009
 - 9) Okada S, Makino H, Nagumo A, 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
 - 10) Maruyama S, Taguchi A, Iwashima S, et al : Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* **74** : 1603-1609, 2008
 - 11) Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, et al : Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification : a pooled analysis. *PLoS One* **5** : e11488, 2010
 - 12) Makino H, Okada S, Nagumo A, et al : Decreased circulating CD34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabet Med* **26** : 171-173, 2009
 - 13) Taguchi A, Ohtani M, Soma T, et al : Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **25** : 276-278, 2003
 - 14) Taguchi A, Takata Y, Ihara M, et al : Cilostazol improves cognitive function in patients with mild cognitive impairment : a retrospective analysis. *Psychogeriatrics* **13** : 164-169, 2013
 - 15) 猪原匡史, 田口明彦 : β -アミロイドの血管周囲リンパ排液路を介したクリアランス. *細胞工学* **31** : 1113-1118, 2012

心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療とその発展

田口 明彦¹⁾

要旨：脳梗塞後には内因性神経幹細胞が梗塞周辺部に誘導されるが、我々はその生着・機能には血管再生が必要不可欠であり、造血幹細胞や骨髄単核球投与で血管再生・神経機能回復が促進することを報告してきた。これらの知見に基づき、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球細胞移植の臨床試験を実施中である。

Key words: stroke, cell-based therapy, neurogenesis, angiogenesis

はじめに

脳梗塞は要介護者発生原因の第1位であり、脳梗塞後遺症に苦しむ非常に多くの患者が存在する。脳梗塞患者の機能予後改善を目的に、神経系幹細胞を用いた様々な基礎研究・臨床試験が行われてきたが、単なる神経幹細胞移植では脳梗塞後遺症に対しては治療効果がほとんどないことが、基礎研究および臨床試験の両者より明らかにされている。一方、微小血管の再生/保護作用を有する造血幹細胞移植や骨髄単核球細胞移植は、心筋梗塞患者や四肢虚血患者において、その臨床的な治療効果が既に明らかにされている。我々は脳梗塞モデルマウスにおいて、脳梗塞後に大量に誘導/動員される内因性神経幹細胞の生着やその機能には血管再生が必要不可欠であり、造血幹細胞投与で血管再生・神経機能回復が著明に促進することを世界に先駆けて明らかにしてきた¹⁾。現在それらの知見を基に、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球移植治療の臨床試験を、国立循環器病研究センターおよび先端医療振興財団病院において実施している。

脳梗塞患者に対する自己骨髄幹細胞を用いた細胞治療の臨床試験

本臨床試験は、脳梗塞発症7~10日後の重症心原性脳塞栓症患者に対し、自己骨髄細胞を採取し、骨髄単核球分画を精製後静脈内への投与を行い、その安全性および神経機能回復効果を明らかにすることを目的としたものであり、「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、臨床試験を実施中である(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01028794)。

臨床試験のプロトコルの概略を Fig. 1 に示す。主な適格

基準は、①心原性脳塞栓症と診断されている、②年齢が20歳以上75歳以下である、③発症後7日目の時点でNIHSSが10点以上である、④来院時に比し、発症7日後のNIHSS改善度が5点以下である、⑤コントロールされていない糖尿病性網膜症を有さない、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はない患者群のみを対象としている。国立循環器病研究センターにおける過去のデータより、これらの適格基準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起こることが知られている。

治療プロトコルの概略は、①脳梗塞発症7~10日目に、局所麻酔(あるいは全身麻酔)下で骨髄細胞の採取(低用量群: 骨髄25ml採取, 高用量群: 骨髄50ml採取)、②国立循環器病研究センター/先端医療振興財団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画の分離、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、本臨床試験において、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。なお低用量群および高用量群とも各6症例である。

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カ月後におけるNIHSS悪化症例の頻度(安全性)、②脳梗塞7日後と細胞投与1カ月後における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。

臨床試験開始時は国立循環器病研究センター(大阪府吹田市)入院患者のみであったが、2011年より先端医療振興財団病院(兵庫県神戸市)での患者受け入れも開始しており、2013年2月には予定されている12症例の全てのエントリーが終

¹⁾公益財団法人先端医療振興財団再生医療研究部
(2013年10月30日受付, 2013年10月31日受理)

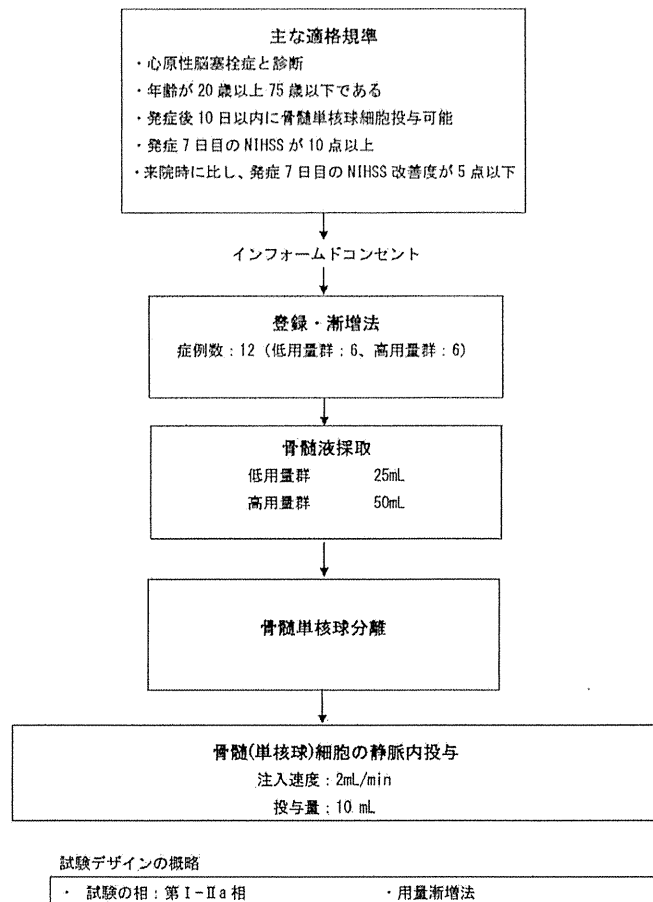


Fig. 1 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植治療の概略
回復の見込みの低い重症の心原性脳塞栓症患者を対象にした臨床試験を実施している。

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たどった症例や、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、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。

脳梗塞に対する今後の再生医療

脳梗塞においては、神経細胞だけでなく脳脊髄関門を形成する微小血管系なども障害されるため、脳の組織修復および脳神経機能のさらなる改善には神経組織全体の再構築が必要である。我々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たい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・開発を現在進めている。また、脳梗塞患者の予後予測が臨床試験には必須であるため、現在 MRI トラクトグラフィーおよび電気生理学的手法を用いた予後予測アルゴリズムの開発を並行して実施中であり、さらに、より直接的な治療効果を得るため、虚血再開通後の中大脳動脈内に CD133 陽性細胞を投与する臨床試験の準備を行っている。

参考文献

- 1) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al: Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. J Clin Invest 114: 330-338, 2004