様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　１４　日現在

機関番号：　１２１０２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ１０２９１

研究課題名（和文）徐放性DDSと未分化細胞を用いた脳虚血に対する再生医療の基礎的研究

研究課題名（英文）Combined therapy for brain infarction with slow releasing drug delivery system and immature cells.

研究代表者

鶴嶋　英夫（Tsurushima, Hideo）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：５０３１５４７０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：１）脂肪細胞由来幹細胞(ACSC)を使用し、脳虚血ラットの脳梗塞を治療した。ACSCを動脈注射により投与した。結果：脳梗塞ラットの死亡率はPBS投与の対照群に対してACSC投与群では低く、生き残った脳梗塞ラットの梗塞領域面積もACSC投与群で有意差に減少していた。神経機能評価ではACSC投与群で有意に神経機能が改善しおり、組織学的には脳梗塞領域にACSCが生存していることが確認された。
２）頭蓋内へサイトカインを持続的に投与するDrug Delivery Systemを開発した。脳表面に置いたバーホールボタンにサイトカインを担持させ、体内へ入れると、サイトカインが徐放されることが確認された。

研究成果の概要（英文）：1)Brain infarction rats were treated using adipose-cell derived stem cells (ACSC), which were injected intra-arterially. Results: The mortality of ACSC-treated rats was lower than that of control rats. In survived brain infarction rats, infarction area of ASCS-treated rats was significantly decreased than that of control rats. Neurological examination was also improved in ASCS-treated rats. Hitological examination showed the existence of ACSC in brain infarction area.
2)Drug delivery system slowly releasing cytokines to central nervous system was developed. Cytokines were loaded on burr hole button that was used in cranioplasty as bone filling biomaterials. In-vivo slow releasing of cytokines was recognized from this burr hole button.

研究分野：　脳神経外科

キーワード：　脳梗塞　幹細胞治療　Drug delivery system

１．研究開始当初の背景

未分化細胞を脳梗塞巣へ移植する再生治療では、移植された一部の細胞しか生着せず、治療効果が不十分であることが問題である。また移植した未分化細胞は体内で分化する必要があるが、これらの分化の効率は不明であるものの、それほど高いものとは考えられない。将来的に移植される未分化細胞の生着率、分化率を外的にコントロールできるシステムの研究は有用であると考えられる。

２．研究の目的

今回の研究では脂肪細胞由来幹細胞(ACSC)の脳梗塞巣への移植治療に、これまで当研究室で開発してきた頭蓋内へのFGF-2 徐放性 drug delivery system (DDS)の治療を加えて、移植細胞の脳内生着率を改善し、神経分化・血管新生に関与する細胞数を増加させることで、治療効果を改善した治療システムの基礎的研究を行う。

３．研究の方法

ラット脳梗塞モデルへのACSCの移植により神経組織の再生を図った動物治療モデルを確立した。現在までの研究でラットの中大脳動脈を一時的に閉塞して部分脳虚血ラットを作製することには成功している。具体的には外頸動脈からシリコンゴムをコーティングした糸を内頸動脈へ挿入し、中大脳動脈起始部で閉塞させる方法である（Nakamura K, Tsurushima H, et al. 2012）。
ACSCはGFP遺伝子トランスジェニックラットを購入して、その脂肪組織から採取した。ACSCの投与経路は内頸動脈から経動脈的に動注することとした。脳梗塞作製後シリコンゴムコーティング糸は抜かれ、その後内頸動脈へサーフローを挿入してACSCを動注する。上記までで脳梗塞巣へ細胞が移植される。脳梗塞ラットに動脈注射されたことで病巣部へACSCを到達させ、細胞投与だけの治療効果を検証した。またこの実験系におけるACSCの残存状態も組織学的に検証した。対照群になるラットにはACSC の代わりに同量のPBSを動脈注射して作製した。

評価項目としては脳梗塞作製後２週間以内のラットの死亡率、２週間後まで生き延びたラットの脳梗塞領域の測定が行われた。これはbrain sliceを作製し脳梗塞領域の面積として測定した。また神経機能（Rogers Scale, Rotarod test）の評価を行った。上記brain sliceから組織切片を作製して移植したACSCの脳内の分布を評価した。

頭蓋内へサイトカインを持続的に投与するDrug Delivery Systemの開発を行った。これまでの研究でアパタイト膜内にサイトカインを担持させ、体内へ入れるとサイトカインが徐放されることが確認されているが、サイトカインの担持条件等の再検討を行った。

４．研究成果

GFPトランスジェニックラットより採取した脂肪細胞をフラスコの天井に張り付かせる方法でACSCを採取、採取されたACSCの分化誘導能力を確認した。これと並行して脳虚血ラットモデルを作成する方法を確立した。

脳梗塞ラットへGFPトランスジェニックラットから分離精製したACSCを動脈注射により投与して、脳梗塞に対する治療効果を検証した。対照群へはPBSの動脈注射を行った。結果：脳梗塞ラットの死亡率はPBS投与群では64%(18/28匹)、ACSC投与群では32%(8/25匹)であった。生き残った脳梗塞ラットの脳を取り出し、脳のcoronal sliceの梗塞領域をcoronal slice（大脳半球を100%とする）の面に対する%面積で評価した。PBS投与群では脳梗塞領域は60%であり、ACSC投与群では脳梗塞領域は51%で、統計的に有意差があった(図１)。

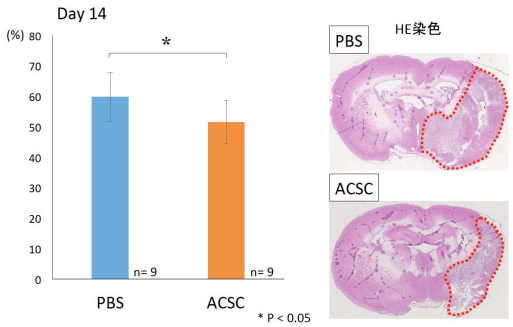


図１：脳梗塞の面積の比較

またその他神経機能の評価（Rogers Scale, Rotarod test）でもACSC投与群で統計的に優位に神経機能が改善していた。組織学的には脳梗塞領域にGFP陽性細胞が観察され、投与したACSCが梗塞領域内で生存していることが確認されたが（図２）、その数は投与後次第に減少していった。

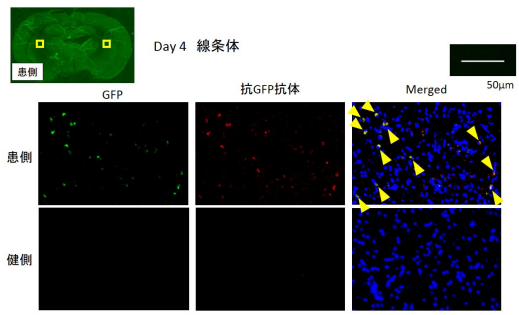


図２：動脈注射されたACSCの脳内分布
患側の脳梗塞部にGFP陽性細胞(arrow heads)が確認された。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Hosoo H, MarushimaA, Nagasaki Y, Hirayama A, Ito H, Puentes S, Mujagic A, Tsurushima H, Tsuruta W, Suzuki K, Matsui H, Matsumaru Y, Yamamoto T, Matsumura A. Neurovascular unit protection from cerebral ischemia-reperfusion injury by radical-containing nanoparticle in mice. Stroke. 査読有 2017;48(8): 2238-2247.
2. Shubhra QTH, Oyane A, Nakamura M, Puentes S, Marushima A, Tsurushima H, Rapid one-pot fabrication of magnetic calcium phosphate nanoparticles immobilizing DNA and iron oxide nanocrystals using injection solutions for magnetofection and magnetic targeting. Materials Today Chemistry 査読有 2017; 6: 51-61.
3. Shubhra QTH, Oyane A, Araki H, Nakamura M, Tsurushima H. Calcium phosphate nanoparticles prepared from infusion fluids for stem cell tramsfection: process optimization and cytotoxicity analysis. Biomater Sci. 査読有 2017 May 2;5(5):972-981.
4. Oyane A, Araki H, Nakamura M, Shimizu Y, Shubhra QT, Ito A, Tsurushima H, Controlled superficial assembly of DNA-amorphous calcium phosphate nanocomposite spheres for surface-mediated gene delivery. Colloids Surf. B Biointerfaces. 査読有 1(141): 519-527, 2016.
5. Yazaki Y, Oyane A, Sogo Y, Yamazaki A, Tsurushima H, Area-specific cell stimulateon via surface-mediated gene transfer using apatite-based composite layers. Int. J. Mol. Sci. 査読有 2015;16(4): 8294-8309.

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 鶴嶋英夫、水上昌文、永田博司、河野豊、河本浩明、中井啓、松下明、松村明、山海嘉之、脳卒中片麻痺に対するロボットスーツHAL治療とリハビリの比較試験、医師主導治験のためのパイロット試験、Clinical trial of HAL treatment for the patients with hemiparesis due to stroke. Stroke2017 2017, 3, 16-19、大阪国際会議場

2. 鶴嶋英夫、鶴田和太郎、兵藤一行、豊川弘之、松村明、可視不能な体内植え込み型医療機器のリアルタイム可視化装置の開発、Real-time imaging detector to visualize the implanted medical devices. 第75回日本脳神経外科学術総会、2016, 9, 29-10, 1　福岡
3. 鶴嶋英夫、水上昌文、永田博司、河本浩明、中井啓、丸島愛機、松下明、五月女康作、松村明、山海嘉之、脳卒中片麻痺歩行障害に対するロボットスーツHALを用いたリハビリ臨床試験　医師主導治験を目指した群間比較パイロットスタディー　Pilot study of HAL rehabilitation for the patients with hemiparesisi due to stroke. 第74回日本脳神経外科学術総会、2015, 10, 14-16 札幌.
4. Tsurushima H, Clinical trial of HAL treatment for the patients with stroke. As the pilot study for clinical trial for the approval of HAL. Rehabiliterings Medicinska Veckan 2015, 5, 20 Stockholm. 招待講演.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：分散性リン酸カルシウムナノ粒子
発明者：中村真紀、大矢根綾子、カジ　タンミヌル　ハク　スラブ、鶴嶋英夫、小菅寿徳
権利者：産業技術総合研究所、筑波大学
種類：特許出願
番号：2017-167176
出願年月日：H29/08/30
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
鶴嶋　英夫（Tsurushima Hideo）
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：50315470