

○ 論文題目

Subpopulation of endothelial progenitor cells with low aldehyde dehydrogenase

activity attenuate acute ischemic brain injury in rat

(低アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性血管内皮前駆細胞はラット急性期虚血性

脳損傷を改善させる)

○ 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 松村 明 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻

(氏 名) 中村 和弘

目 次

第1章 本研究の背景と目的	p
1.1 背景	6
1.1.1 脳梗塞の現状	6
1.1.2 脳梗塞と再生医療	8
1.1.3 脳梗塞と血管内皮前駆細胞	9
1.2 虚血治療効果の高い血管内皮前駆細胞の単離法の新規開発	11
1.2.1 背景	11
1.2.2 ALDH 活性による血管内皮前駆細胞の単離	12
1.2.3 Alde-Low EPC の特徴	12
1.3 本研究の目的	14
第2章 血管内皮前駆細胞による脳梗塞抑制効果	15
2.1 背景と目的	15
2.2 方法	16
2.2.1 投与細胞の準備	16
2.2.1.1 血管内皮前駆細胞(EPC)の単離	16

2.2.1.2 Alde-Low EPC の分取	17
2.2.1.3 ヒト臍帯静脈血管内皮(HUVEC)の準備	17
2.2.2 ラット一過性脳虚血モデルの作成	18
2.2.3 細胞投与	20
2.2.4 脳梗塞の評価	21
2.2.4.1 神経症状の評価	21
2.2.4.2 局所脳血流の測定	22
2.2.4.3 脳梗塞体積の測定	22
2.2.5 統計	23
2.3 結果	24
2.3.1 神経症状の評価	24
2.3.2 局所脳血流の評価	26
2.3.3 Alde-Low EPC による脳梗塞体積の抑制	29
2.4 考察	31
2.4.1 EPC の細胞供給源としての臍帯血	31
2.4.2 急性期脳梗塞細胞治療と細胞の投与経路について	32
2.4.3 本研究の実験計画について	34
2.4.4 Alde-Low EPC の急性期脳梗塞抑制効果	37
2.5 小括・結論	38

第3章 急性期脳梗塞に対する血管内皮前駆細胞の治療機序の解析	39
3.1 背景と目的	39
3.1.1 背景	39
3.1.2 目的	41
3.2 方法	42
3.2.1 投与細胞の可視化	42
3.2.2 摘出脳の病理組織学的検討と免疫組織化学的検討	43
3.2.3 投与細胞の脳内における検出と定量	45
3.2.4 Alde-Low EPC の梗塞巣への集積機序の解析	46
3.2.4.1 SDF-1/CXCR4 系と Alde-Low EPC の集積	46
3.2.5 Alde-Low EPC による神経保護作用の解析	47
3.2.6 統計	48
3.3 結果	49
3.3.1 梗塞巣の病理所見	49
3.3.2 投与細胞の脳内における分布と定量	54
3.3.3 SDF-1/CXCR4 系と Alde-Low EPC の集積	62
3.3.4 Alde-Low EPC による神経保護作用の解析	67
3.4 考察	68
3.4.1 TTC 染色所見と病理学的所見による脳梗塞抑制効果の検討	68
3.4.2 GFP 導入による投与細胞への影響	69

3.4.3 Alde-Low EPC の虚血巣への集積機序	70
3.4.4 Alde-Low EPC の神経保護作用	71
3.5 小括・結論	73
第4章 総括	74
参考文献	76
謝辞	89

第1章 本研究の背景と目的

1.1 背景

1.1.1 脳梗塞の現状

動脈硬化を背景とする虚血性疾患は、現代の先進諸国においても罹患率や死亡率が高い[1]。脳卒中(脳梗塞、脳出血、くも膜下出血)による死亡者数は世界全体の9%を占め、虚血性心疾患に次ぐ2位の多さであり、脳卒中のうち60-80%が脳梗塞といわれている[1]。2007年の厚生労働省人口動態統計年間推計によると、我が国の脳卒中死亡者数は年間約13万人であり、国内死因の第3位を占め、その60%が脳梗塞によると報告されている。近年の食文化の欧米化や人口の急激な高齢化が進行する我が国においては、脳梗塞の発症数、総患者数、死亡者数や要介護者数は今後ますます増加することが予想される。

脳梗塞の原因として、動脈硬化により脳血管に狭窄・閉塞をきたす血栓症と、多くは心房細動を原因とする心内血栓などの塞栓子が脳血管に流入して脳血管を閉塞する塞栓症の2つに大別される。いずれの場合も、脳血流の途絶から48-72時間で脳梗塞は完成するといわれ[2]、再生能力の乏しい中枢神経系では一旦完成した脳梗塞による運動麻痺、感覚障害、認知機能障害などの後遺障害は甚大であり、介護を要することや寝たきりの原因となり、患者個人や家族の負担は大きく、社会的・医療経済的にも重要な問題となっている。

近年の医学の進歩により、脳梗塞の病態は徐々に解明されつつあるが、治療方法は非常に限られている。我が国の脳卒中治療ガイドライン 2009 においては、推奨レベルグレード A、すなわち「行うよう強く勧められる」脳梗塞に対する治療法は非常に少ない。最も有効なのは、遺伝子組み換え組織プラスミノゲンアクチベーター (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA; アルテプラゼ) の静脈投与による急性期血栓溶解療法で、発症から 3 時間以内に治療可能な脳梗塞で慎重に適応判断された患者に対して一定の効果を上げている[3,4]。本邦におけるアルテプラゼ 0.6 mg/kg の静注療法を 103 人に行った臨床試験では、3 ヶ月後に 36.9% の患者がほとんど後遺症のない状態まで改善している。しかし、5.8% に頭蓋内出血を発症しており[3]、このような重篤な出血性合併症のリスクにより、治療可能時間帯や症例が限られているのが現状である。脳保護作用のある薬剤として、脳梗塞に対して唯一臨床的根拠があるのが、本邦で開発された活性酸素スカベンジャーであるエダラボンである[5,6]。発症から 72 時間以内の脳梗塞患者について実薬投与群 125 例とプラセボ投与群 125 例において、実薬群にはエダラボンを 2 週間投与した結果、発症から 3 ヶ月後の臨床症状がエダラボン群のほうが有意に良かった。しかし、ほとんど症状のない状態まで改善した症例が、プラセボ群で 47 例だったのが、エダラボン投与群で 63 例という結果であり、認可されているのは発症 24 時間以内の急性期脳梗塞のみで、脱水状態では致命的な転機を辿る症例や、投与中の重篤な肝機能障害や腎機能障害が同時に発現する症例が報告されており、治療効果や投与可能症例が限られているのが現状である。したがって、脳梗塞に対する新たな治療法の開発が求められている。

1.1.2 脳梗塞と再生医療

近年の細胞工学や再生医療の発達により、細胞治療(cell therapy)が脚光を浴びるようになってきた。再生医療とは、病気や損傷により機能低下や機能不全に陥った組織・臓器に対して、細胞の機能・再生機能を有効に活用して、組織・臓器の機能を再生させる医療と定義されている。中枢神経系は再生能力に乏しく、一度に広範な領域が障害される脳梗塞においては、損傷された神経組織を新しい細胞・組織によって置換し、喪失した機能の回復を目指す細胞治療は新規治療法として注目されてきた。現在までに、胚性幹細胞(Embryonic stem cells; ES 細胞)、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPS 細胞)、骨髄幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞や、血管内皮前駆細胞などの前駆細胞や組織幹細胞が細胞治療の細胞供給源として研究されており、脳梗塞モデルを使用した基礎研究が数多く報告されている[7,8,9,10,11,12,13,14]。米国では、ヒトの奇形腫(テラトカルシノーマ)より確立した細胞株(hNT 細胞株)から作成した神経細胞を、実際の慢性期脳梗塞患者(発症から5-77ヶ月)12例の梗塞巣に定位的手術により移植した臨床試験が行われ、神経症状の改善と脳代謝の改善所見が報告されている[15,16,17]。本邦においても、札幌医科大学において、自己骨髄間葉系幹細胞を発症から36-113日目の亜急性期脳梗塞患者12例に静注した臨床試験が行われ、症状の改善とMRIでの脳梗塞体積の縮小が報告されている[18]。これらの結果は脳梗塞再生医療の可能性を示唆しているが、その反面、いずれの基礎研究・臨床研究の報告でも梗塞巣内に残存する移植細胞は部分的で、どのような機序で神経症状を改善させるのかについて明らかになっていない部分が多く、どの細胞をどのように移植するのが最適かは、未だ明確になっていないのが現状である[7,19]。

1.1.3 脳梗塞と血管内皮前駆細胞

1997年に浅原らにより、成人末梢血中に血管内皮細胞に分化し得る血管内皮前駆細胞(Endothelial progenitor cell; EPC)が存在することが報告された[20]。生体の血管形成メカニズムは、これまで既存血管の構成要素のうちの一つである内皮細胞が増殖・遊走して新たな血管を作り出す血管新生(angiogenesis)という概念が中心であった。しかし、EPCが発見されて以来、胎生期にのみ認められるとされていた血管発生(vasculogenesis)という現象が生体においても同様に認められ、局所でEPCが増殖・分化し血管新生に関わっていることが明らかになった[21]。EPCは虚血部位や悪性腫瘍などの組織損傷部位から放出されるサイトカインや成長因子、ホルモンなどの効果により骨髄で分化・増殖し、末梢血中に動員され走化する。末梢血中のEPCは虚血部位に接着し、間質内に遊走して増殖、分化しながら既存の血管内皮とともに血管新生の機能を果たすと考えられている[22]。EPCの虚血部位における血管新生能力や神経細胞保護作用に着目し、下肢閉塞性動脈硬化症や虚血性心疾患に対するEPCの臨床研究が開始され始めており[23]、脳梗塞の治療においてもEPCの臨床応用が期待されている[24]。

しかし、脳梗塞に対するEPC療法についてはその報告は限られている[24]。その理由の一つとして、EPCの単離方法が確立しておらず、各施設によってEPCの定義が一定しないことが挙げられる[25]。EPCは元来、CD34やCD133、血管内皮増殖因子受容体-2(vascular endothelial growth factor-2; VEGFR-2)などを表面抗原として発現する細胞を末梢血骨髄単核球細胞から分取する方法で単離された[20,26,27]。その後の解析で、これらの細胞はCD31やVEカドヘリン(vascular endothelial-cadherin)などの血管内皮細胞マーカーも同時に発現し、分化が進むと血

管内皮増殖因子-1(VEGF-1)、E-セレクチンなども発現するようになり、表面抗原や分取する細胞の分化の程度でその機能も異なると考えられる。さらに、EPCの細胞供給源として、骨髄から動員した末梢血単核球細胞の他に、末梢血[28]や、骨髄[29]、脾臓[30]、脂肪組織[31,32]、ES細胞[8,33]、臍帯血[34,35]からも分取が可能であることが最近までの研究でわかってきたが、どの状態のEPCが最も脳梗塞治療に適しているかは明らかではないのが現状であり、本学でも臨床応用を視野に入れたEPCの分取方法や保存方法、機能解析等の研究が進行中である。

1.2 虚血治療効果の高い血管内皮前駆細胞の単離法の新規開発

1.2.1 背景

再生医療に用いる細胞の選択には、ES 細胞や神経幹細胞、骨髄幹細胞の持つ分化能力を最大限に利用するアプローチと、ある程度分化し血管内皮細胞への分化が規定された EPC などの前駆細胞を使用し、その機能を純化することにより治療効果や治療効率を上げるアプローチがある。ES 細胞や神経幹細胞、骨髄幹細胞は EPC と比較して未分化で、血管内皮細胞だけでなく、神経細胞やグリア細胞などに分化して治療効果を発揮する一方、治療に関係のない細胞やその効果を抑制する細胞が含まれている可能性があり、それらの細胞が腫瘍化する危険性もはらんでおり、一概に多能性であることが治療効果を上げるとは限らず、治療効率も悪い。

一方、これまでの知見より、増殖能・分化能の高い EPC が、治療効果・効率の良い細胞であると推測され、EPC 内のこれらの細胞群を同定することが临床上必要であると思われるが、現時点でそのような EPC の細胞群は不明である[25]。さらに、EPC にも階層性があり、治療に適した細胞と適さない細胞が存在し、糖尿病のような二次的に虚血性疾患を惹起する病態において、通常の抗体を用いて回収した EPC による治療効果が著しく悪いことが最近の研究で指摘され、細胞治療に使用する細胞の分取を見直す必要があった[21]。

1.2.2 アルデヒドロゲナーゼ活性による血管内皮前駆細胞の単離

最近、本学再生医学・幹細胞生物学研究室では、治療効果の高い EPC の単離方法を新規に開発することに成功した。臍帯血から単離した EPC を アルデヒドデヒドロゲナーゼ(aldehyde dehydrogenase; ALDH)活性により 2 つの集団に分けると、ALDH 活性の低い集団 (Alde-Low EPC)のみが高い増殖能と遊走能を持ち、虚血部位に対する治療効果を有することを突き止めた[34]。マウスの有茎皮弁による虚血性皮膚壊死実験モデルへ Alde-Low EPC と Alde-High EPC を投与すると、Alde-Low EPC 投与群のみで投与 1 週間後の壊死面積を有意に抑制した。

1.2.3 Alde-Low EPC の特徴

アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)は、細胞内のアルデヒド基を酸化する酵素で、体内でエタノールやビタミン A、シクロフォスファミドの代謝に関与している[36,37,38,39]。ALDH は造血幹細胞などで発現が高いことが知られており[40]、臍帯血などから治療に必要な細胞を効率的に分取するために利用されている[41]。また、Alde-Low EPC の表面抗原を Alde-High EPC と比較すると、血管内皮細胞マーカーである CD31、CD105、VEGFR2、VE-cadherin はともに陽性で、血球マーカーである、CD14、CD45 はともに陰性だった。前駆細胞分化マーカーについては、CD166、c-kit の発現は同様で、CD34 においては Alde-Low EPC で発現が軽度亢進していた。この結果より、Alde-High と比較して、Alde-Low EPC の方が未分化な細胞を多く含むことが示唆された[34]。さらに最近の本学の研究では、糖尿病を合併した閉塞性動脈硬化症の末梢血から分取した EPC から ALDH 活性により Alde-Low EPC を分離

すると、臍帯血由来の EPC と同様にマウス虚血性皮膚壊死に対して治療効果を発揮することが確認された(研究中)。しかし、ALDH 活性の低い EPC が、どのような機序で特異的に虚血改善効果を発揮しているのかは現時点で不明であり、今後の解析の結果が待たれる。

以上の知見より、本学で開発された虚血治療効果の高い血管内皮前駆細胞の細胞群(Alde-Low EPC)は、虚血性疾患に対する治療戦略となり得ると考えられ、細胞レベルでの機能解析が行われており、様々な虚血性疾患モデルに Alde-Low EPC を投与する実験が行われている。

1.3 本研究の目的

本研究では、この治療効果・効率の高い血管内皮前駆細胞の特定の細胞群 (Alde-Low EPC)の脳梗塞に対する治療効果を、ラット一過性脳虚血モデルを用いて明らかにし、その機序を解析することにより、血管内皮前駆細胞を用いた脳梗塞の再生医療の臨床応用・発展に寄与することを目的とする。

第2章 血管内皮前駆細胞による脳梗塞抑制効果

2.1 背景と目的

本章では、マウスの虚血性皮膚壊死実験において皮膚壊死の抑制効果のあった血管内皮前駆細胞の特定の細胞群(Alde-Low EPC)が、脳梗塞においても治療効果を発揮することを確認することを目的として、ラット一過性脳虚血モデルにAlde-Low EPCを投与する実験を行い、脳梗塞抑制効果を検証した。

2.2 方法

2.2.1 投与細胞の準備

本研究に使用した EPC(Alde-Low EPC と Alde-High EPC)とヒト臍帯静脈血管内皮 (HUVEC; human umbilical vein endothelial cells)は、下記の如く分取したものを本学再生医学・幹細胞生物学教室より提供を受けた[34]。

2.2.1.1 血管内皮前駆細胞(EPC)の単離

国立大学法人筑波大学倫理規則の厳守のもと、ヒト臍帯血より血球細胞を除き、単核細胞を単離し、高栄養培地 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium: Invitrogen, Carlsbad, CA)に 10%ウシ胎児血清(Fatal bovine serum; FBS: Hyclone, South Logan, UT)および繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; b-FGF: Peprotech, London, United Kingdom)10 ng/ml を添加した培地を用い、37°C、5%CO₂ の培養条件下で培養した。蛍光励起細胞分取装置(FACS Vantage: BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて、CD45(-)/CD31(+)の細胞をフローサイトメトリー(flowcytometry)で分離し、アセチル化 LDL(PE-conjugated low-density lipoprotein from human plasma acetylated, DiI complex: DiI-Ac-LDL: Molecular Probes, Eugene, OR)の取り込みがあり、増殖能が高く(培養すると敷石上構造(cobble stone appearance)あり)、マトリゲルアッセイで管腔構造(tube formation)を認めるものを EPC と同定した。

2.2.1.2 Alde-Low EPC の分取

EPC の細胞集団を、細胞内のアルデヒドを酸化してカルボン酸やアシル基に変換するアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aldehyde dehydrogenase; ALDH)の活性によって分離した。細胞内のアルデヒドデヒドロゲナーゼと反応することにより細胞内に留まる形態を呈する光学的に検出可能な BAAA (BODIPY®-aminoacetaldehyde)を基質とする Aldefluor 試薬 (StemCell technologies, Vancouver, BC)を用い、EPC を染色した後、蛍光励起細胞分取装置にかけ、前方散乱光(FSC)を横軸にして側方散乱光(SSC)を縦軸にしたスキャッタグラムを作成し、EPC の細胞集団領域に対するゲート設定を行い、細胞の蛍光強度と細胞数の関係をヒストグラムに展開して細胞集団の蛍光強度の分布を調べ、蛍光強度を横軸(Aldefluor)にして細胞数を縦軸(Relative cell number)にした凸状の分布からアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の高い細胞群(Alde-High EPC)と低い細胞群(Alde-Low EPC)を分取した。

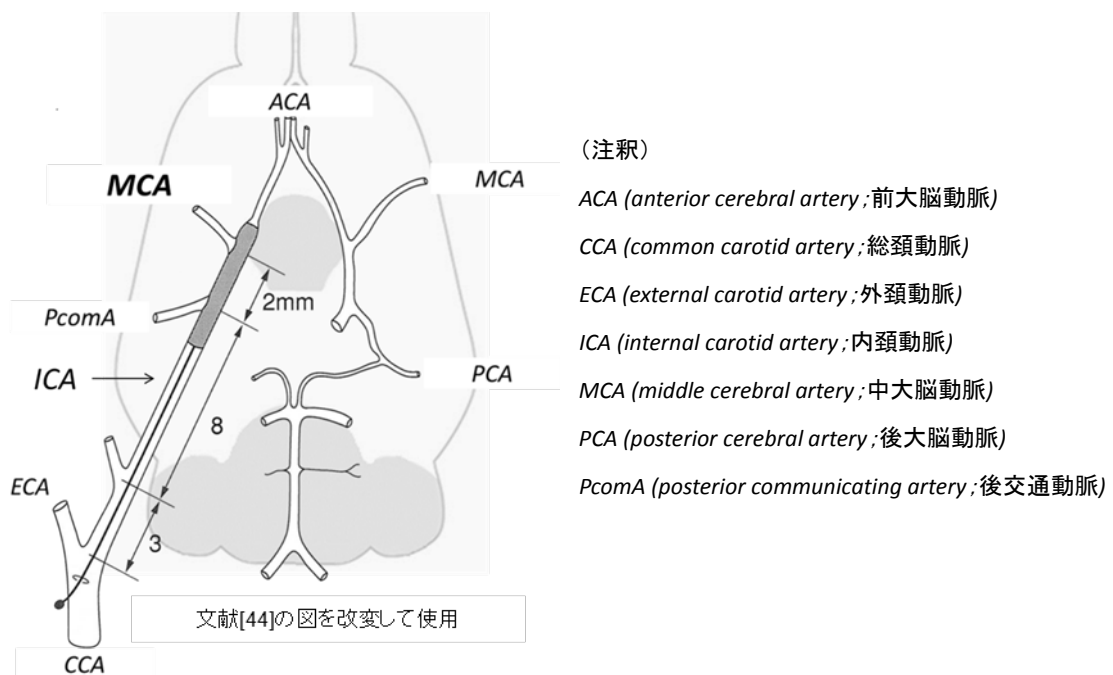
2.2.1.3 ヒト臍帯静脈血管内皮(HUVEC)の準備

ヒト臍帯静脈血管内皮(HUVEC)は、成熟した血管内皮としてコントロールに使用した[42]。HUVEC は Cambrex (Walkersville, MD)から購入し、endothelial cell basal medium 2 (EBM-2; Cambrex)内で保存した。HUVEC、Alde-Low EPC、Alde-High EPC は、Cell Banker (ZENOAQ, Koriyama, Japan) に懸濁したのち、液体窒素内で凍結保存し、投与時に解凍して使用した。

2.2.2 ラット一過性脳虚血モデルの作成

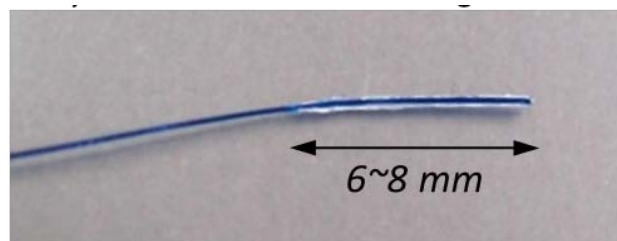
すべての動物実験は、国立大学法人筑波大学動物実験委員会の許可を得て、国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程を順守して行った。

280-320 g の雄性 SD ラットを Charles River (Yokohama, Japan)から購入し使用した。中大脳動脈の閉塞(middle cerebral artery occlusion; MCAo)は、本学脳神経外科研究室で以前から行っている方法を採用した[43,44](図 1)。有効な中大脳動脈の閉塞を得るためには中大脳動脈を選択的に閉塞する必要があり、下記の方法で行った。



(図 1) ナイロン糸による中大脳動脈閉塞モデルの作成法(模式図):

4%のイソフルランで全身麻酔を導入し、フェイスマスクを使用して 2%のイソフルランで維持した。ラットの体温は、ヒーティングパッド上で37°Cから38°Cに維持した。ラットを仰臥位にし、頸部正中切開を行い、右の総頸動脈(common carotid artery; CCA)を露出して近位部でこれを結紮閉塞した。外頸動脈(external carotid artery; ECA)を露出して結紮閉塞した後、先端をシリコンコーティングした 4-0 ナイロン糸(図 2)を総頸動脈から前大脳動脈(anterior cerebral artery; ACA)に挿入することで中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)を選択的に閉塞した。側副血行の発達により、一側総頸動脈の結紮や内頸動脈の閉塞のみでは脳梗塞を発症しないことが以前より知られており、この方法で中大脳動脈を選択的に閉塞した。挿入部で塞栓糸を結紮固定して閉創した。60 分間の閉塞ののちに挿入した糸を数センチ引き戻すことにより中大脳動脈を再灌流した。同側総頸動脈は結紮されているため、梗塞巣へは対側内頸動脈や椎骨動脈からの側副血行により灌流される。塞栓糸は総頸動脈の刺入部で結紮固定してあるため、シリコンコーティング部が引っ掛かり、総頸動脈内に塞栓糸は残る形となり、再灌流時に出血は起こさない。

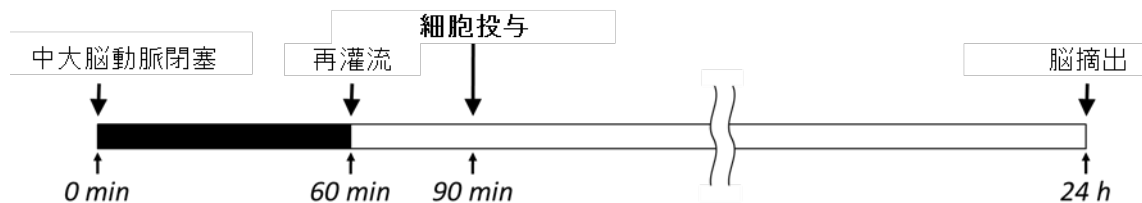


(図 2) 塞栓糸:

先端 6~8 mm の先端をシリコンでコーティングした塞栓糸を作製した。全長は 7 cm で、中大脳動脈を塞栓後に閉創した後、創部より 2~3 cm 出た状態となり、これをセンチ引き抜くことで再開創しなくても再灌流が可能となる。

2.2.3 細胞投与

再灌流から30分後(中大脳動脈閉塞から90分後)に、4%のイソフルランで再度全身麻酔を導入し、フェイスマスクを使用して2%のイソフルランで麻酔維持しつつ再開創した。内頸動脈を動脈瘤用のクリップで一時遮断したのち、総頸動脈に塞栓系を固定した系を解き、塞栓系を抜去した。総頸動脈からコントロールのPBS(phosphate-buffered saline;リン酸緩衝生理食塩水)0.5 mlと各細胞を投与した(n=10)。細胞は、HUVEC、Alde-High EPC、Alde-Low EPCを各 5×10^5 cellsを0.5 mlのPBSに懸濁させ、1分以上かけて投与した(各 n=10)(図3)。総頸動脈近位部と外頸動脈は結紮閉塞してあるため、投与した細胞はすべて内頸動脈に流入することとなる。



- Cells (5x10⁵ cells in 0.5 ml PBS)
 - Alde-Low EPC n= 10
 - Alde-High EPC n= 10
 - HUVEC n= 10
- Control (0.5 ml)
 - PBS n= 10

(図3) 投与スケジュールと投与細胞:

中大脳動脈を60分間閉塞後、再灌流した。再灌流後30分で細胞を内頸動脈から投与した。

他家移植に対する免疫抑制は、シクロスポリン-A(cyclosporine-A; Wako, Osaka, Japan)の腹腔内投与により施行した(10 mg/kg/BW)。シクロスポリン-A の投与は、細胞投与前日、当日、翌日の3回、24時間おきに脳組織採取日まで継続した。

2.2.4 脳梗塞の評価

2.2.4.1 神経症状の評価

左片麻痺やホルネル徴候を含む神経学的症状は modified Neurological Examination Grading System[45](表 1)を使用して評価した。中大脳動脈閉塞直後、再灌流後、細胞投与後 24 時間に評価した。

(表 1) Modified Neurological Examination Grading System :

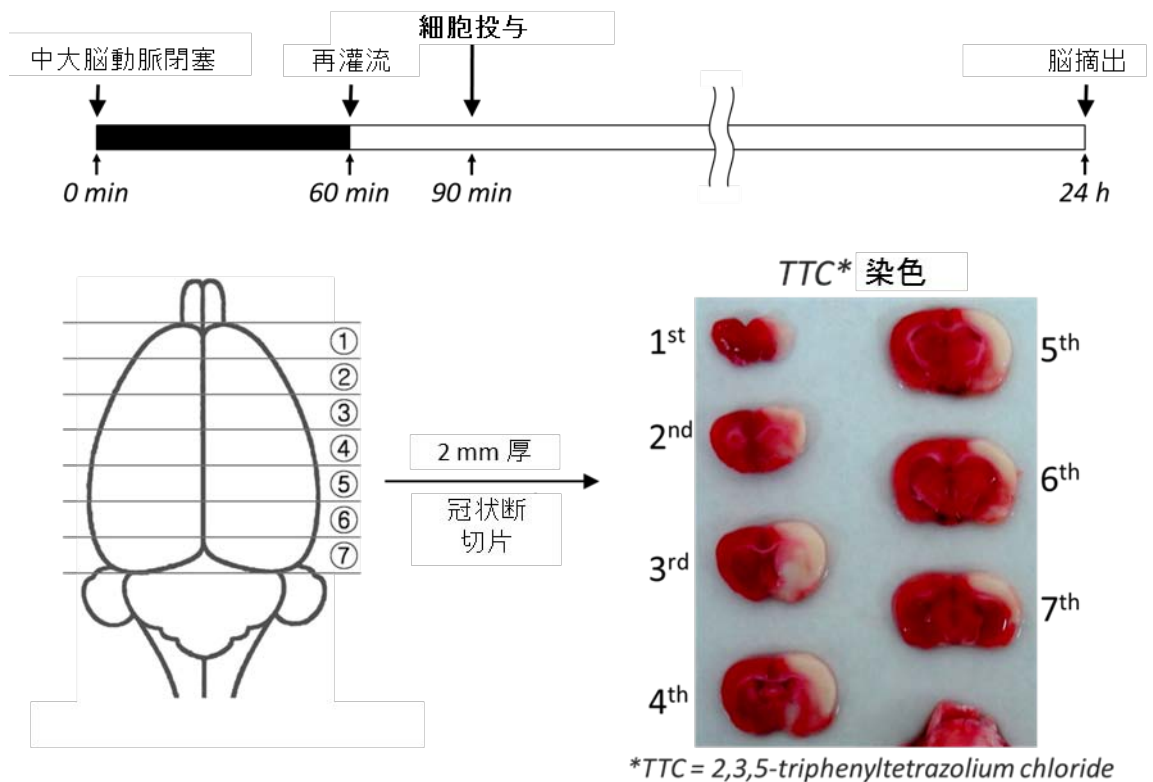
grade	Symptom
0	<i>Both forelimbs are extended, no deficit</i>
1	<i>Left forelimb is attached to the breast and right forelimb is extended</i>
2	<i>Resistance is decreased to lateral push in addition to the grade 1 without circling</i>
3	<i>Circling in addition to the grade 2</i>
4	<i>Upper half of the Body is twisted in addition to the grade 3</i>
5	<i>Dead</i>

2.2.4.2 局所脳血流の測定

局所脳血流(regional cerebral cortical blood flow; rCoBF)は、Ohtaらの方法[29]を改変して測定した。頭皮を切開後、帽状腱膜と骨膜を剥離し、矢状縫合と冠状縫合の合流点(bregma)の2 mm 外側、2 mm 後方で、レーザードップラー血流計(Laser Doppler flowmeter; ADVANCE, Kyoto, Japan)のプロローベを頭蓋骨に対して垂直にあてて経頭蓋的に測定した。この部分の測定により、中大脳動脈閉塞による梗塞周囲の血流が評価できるとされている[46]。細胞投与前(再灌流後)、細胞投与後 24 時間に局所脳血流の測定を行った。各細胞投与群において、梗塞側の脳血流値(ml/100g/ml)と、梗塞側脳血流比(梗塞側脳血流/正常側脳血流)で梗塞側局所脳血流の評価を行った。

2.2.4.3 脳梗塞体積の測定

細胞投与から 24 時間後、致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し、上行大動脈経由で PBS による灌流を行った。ラット脳を摘出後、前頭葉先端から連続 7 スライスの 2 mm 厚冠状断切片を作成し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)で染色し(37°C、20 分)、デジタルカメラで撮影した。SCION image (SCION Corporation, Frederick, MD)を使用して各断面の脳梗塞面積を計測した。7 スライスの脳梗塞面積の和を脳梗塞体積とし、正常側半球体積との比を脳梗塞体積比(% infarct volume)として算出することで、脳浮腫による影響を補正した(図 4)。



(図 4) 脳梗塞体積の測定:

前頭葉先端から連続 7 スライス of 脳梗塞面積の和を脳梗塞体積とし、対側の
 大脳半球面積の和を正常側半球体積として、その比を脳梗塞体積比(% infarct
 volume)として算出した。

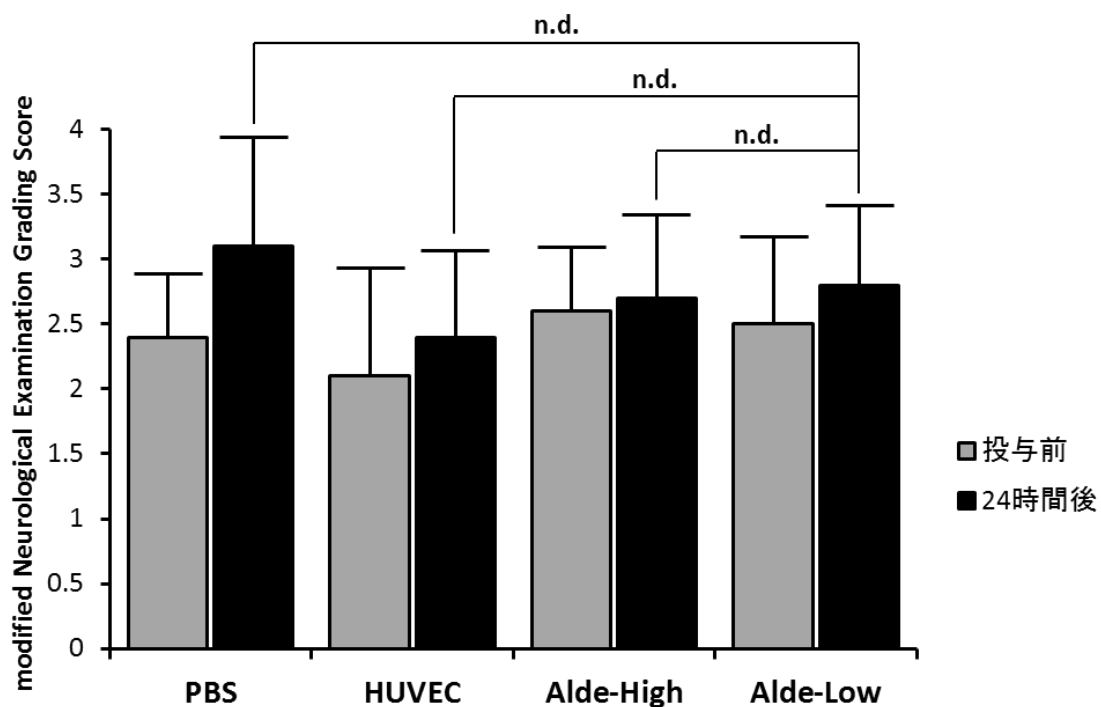
2.2.5 統計

数値の統計学的解析は、Student *t* 検定を行い、数値は平均値と標準偏差を用
 いて表示した。

2.3 結果

2.3.1 神経症状の評価

細胞投与実験を施行した全ラット(n=72)で modified Neurological Examination Grading System を使用した神経症状のスコアリングを施行できた。細胞投与前(再灌流後)と細胞投与後 24 時間における、PBS 投与、HUVEC 投与、Alde-High EPC 投与、Alde-Low EPC 投与の各群の神経症状を比較検討した。死亡や脳梗塞のできなかつたラットを除外し、各群 10 例、全 40 例で検討した。各群の神経症状スコアは、PBS 投与群で細胞投与前が 2.4 ± 0.49 、投与 24 時間後が 3.1 ± 0.83 で、HUVEC 投与群; 投与前 2.1 ± 0.83 、24 時間後 2.4 ± 0.66 、Alde-High EPC 投与群; 投与前 2.6 ± 0.49 、24 時間後 2.7 ± 0.64 、Alde-Low EPC 投与群; 投与前 2.5 ± 0.67 、24 時間後 2.8 ± 0.60 であった(図 5)。細胞投与前と比較して、細胞投与後 24 時間では、全群で神経症状が若干悪化する傾向があった。細胞投与後 24 時間における各群の神経症状の比較を行ったが、Alde-Low EPC の投与における神経症状の有意な改善は認められなかった(図 5)。



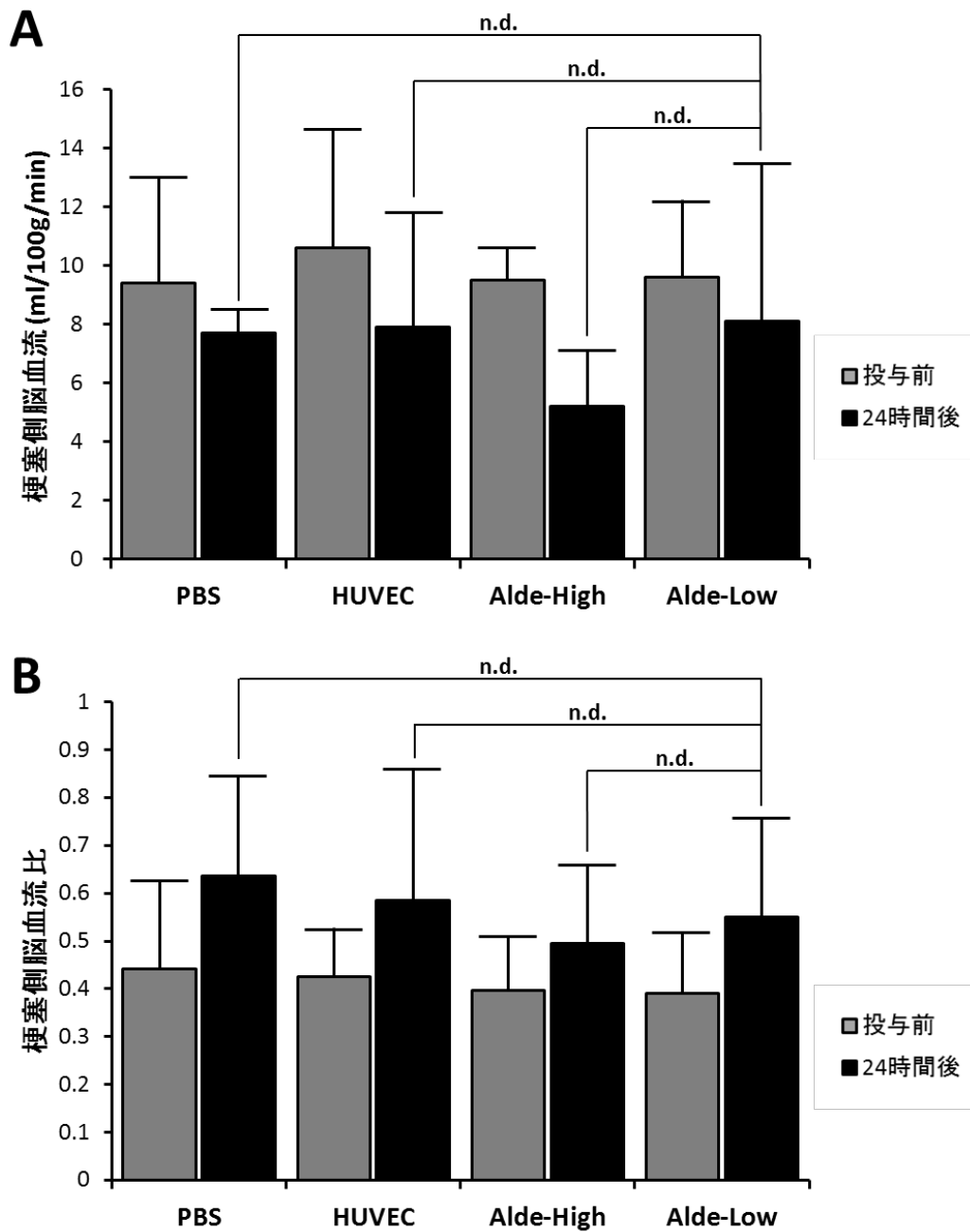
(図5) 神経症状の評価:

脳梗塞を作製した全73例のうち、死亡や脳梗塞のできなかったラットを除外し、各群10例の40例で細胞投与前の神経症状と細胞投与後24時間の神経症状を比較した。細胞投与前と比較して、細胞投与後24時間では、全群で神経症状が若干悪化する傾向があった。細胞投与後24時間における各群の神経症状の比較を行ったが、Alde-Low EPCの投与における神経症状の有意な改善は認められなかった。

2.3.2 局所脳血流の評価

局所脳血流についても、脳梗塞を作製した全例(n=73)で測定することができた。神経症状の評価と同様に、死亡や脳梗塞のできなかったラットを除外し、各群 10 例、全 40 例で検討した。各群の梗塞側の局所脳血流は、PBS 投与群で細胞投与前が 9.4 ± 3.6 ml/100g/min、投与 24 時間後が 7.7 ± 0.8 ml/100g/min で、HUVEC 投与群; 投与前 10.6 ± 4.1 ml/100g/min、24 時間後 7.9 ± 3.9 ml/100g/min、Alde-High EPC 投与群; 投与前 9.5 ± 1.1 ml/100g/min、24 時間後 5.2 ± 1.9 ml/100g/min、Alde-Low EPC 投与群; 投与前 9.6 ± 2.7 ml/100g/min、24 時間後 8.1 ± 5.4 ml/100g/min であった(図 6; A)。全投与群で、細胞投与 24 時間後に梗塞側の局所脳血流が低下する傾向があった。細胞投与 24 時間後の梗塞側局所脳血流の比較を行ったが、Alde-Low EPC 投与による局所脳血流の有意な増加は認められなかった(図 6; A)。

細胞投与後 24 時間での全体的な局所脳血流の低下の影響を除外するため、梗塞側脳血流を、正常側との比である脳血流比で算出して検討した。各群の梗塞側の脳血流比は、PBS 投与群で細胞投与前が 0.44 ± 0.19 、投与 24 時間後が 0.64 ± 0.21 で、HUVEC 投与群; 投与前 0.43 ± 0.10 、24 時間後 0.59 ± 0.28 、Alde-High EPC 投与群; 投与前 0.40 ± 1.9 、24 時間後 0.49 ± 0.16 、Alde-Low EPC 投与群; 投与前 0.39 ± 0.12 、24 時間後 0.55 ± 0.21 であった(図 6; B)。中大脳動脈の閉塞と再灌流によって、梗塞巣の局所脳血流は正常側と比較して約 60% 減少した。細胞投与 24 時間後の梗塞側脳血流比の比較を行ったが、局所脳血流の比較と同様に Alde-Low EPC 投与による脳血流比の有意な増加は認められなかった(図 6; B)。



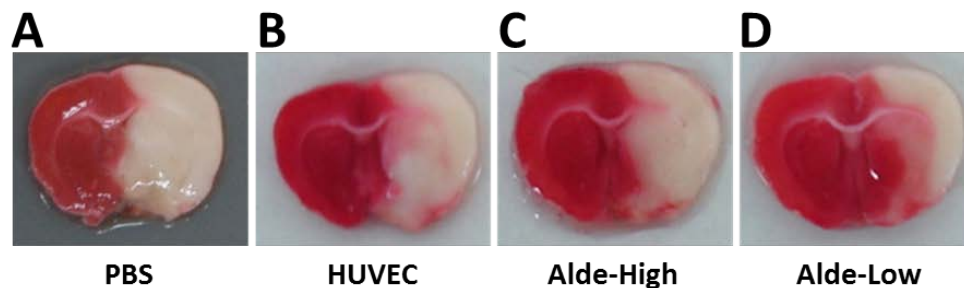
(図 6) 局所脳血流の評価:

脳梗塞を作製した全 73 例のうち、死亡や脳梗塞のできなかったラットを除外し、各群 10 例の 40 例で細胞投与前の梗塞側局所脳血流と細胞投与後 24 時間の梗塞側局所脳血流を比較した。(A)全投与群で細胞投与 24 時間後に梗塞側の局所脳血流が低下する傾向があった。Alde-Low EPC 投与による局所脳血流の有意な増加は認められなかった。(B) 細胞投与後 24 時間で全体的な局所脳血流の低下の影響を除外するため、脳血流比で算出して検討したが、Alde-Low EPC 投与による脳血流比の有意な増加は認められなかった。

本実験では、表示される脳血流は不安定で、脳血流の定量値の信憑性は低いと考えられた。別のシリーズで、頭蓋骨に穴を穿ち、脳表で脳血流を測定したが、同様に脳血流の測定値は不安定であった。結果として、神経症状や局所脳血流の変化によって、Alde-Low EPC の治療効果を判定することはできなかったが、本研究では他の MCAo モデルを使用した研究と同様に、脳梗塞を作製した際に脳梗塞が発症した確認として利用することはできた。

2.3.3 Alde-Low EPC による脳梗塞体積の抑制

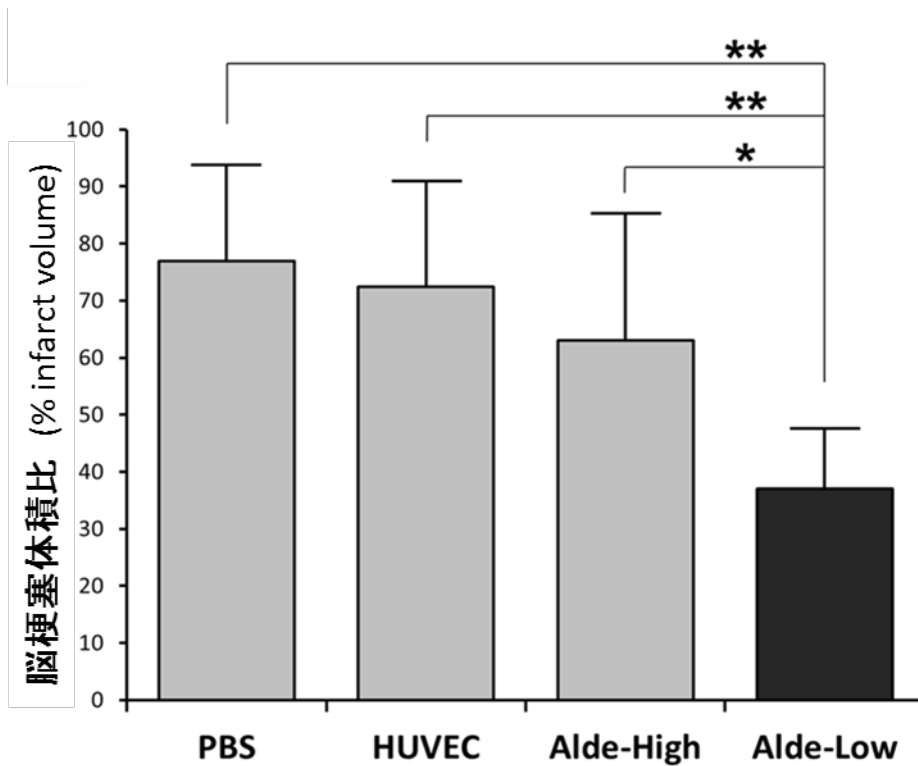
細胞投与後 24 時間における各細胞投与群の代表的な冠状断切片を示す(図 7; A-D)。これらは 4 スライス目の切片であり、基底核(線条体)や中大脳動脈領域の皮質が観察できる。TTC 染色では、脳梗塞領域が未染の白い領域として観察され、中大脳動脈の閉塞により線条体や前頭頭頂葉皮質に広範な脳梗塞が形成されている。



(図 7) TTC 染色(細胞投与 24 時間後)

前頭葉先端より4スライス目(前頭極より6 mm)の冠状断を示す(A-D)。TTC 染色では脳梗塞領域が未染の白い領域として観察される。中大脳動脈の閉塞により線条体や前頭頭頂葉皮質に広範な脳梗塞が形成されている。Alde-Low EPC 投与群では、PBS 投与群や他細胞投与群と比較して、梗塞面積が少なく、浮腫性変化も軽度であった(D)。

Alde-Low EPC 投与群では、PBS 投与群や他細胞投与群と比較して、梗塞面積が少なく、浮腫性変化も軽度であった(図 7; D)。各群の脳梗塞体積比(% infarct volume)は、PBS 投与群で $77.0 \pm 16.9\%$ 、HUVEC 投与群; $72.4 \pm 18.2\%$ 、Alde-High EPC 投与群; $63.1 \pm 22.0\%$ 、Alde-Low EPC 投与群; $37.1 \pm 10.4\%$ であった。Alde-Low EPC 投与群では、他群と比較して有意に脳梗塞体積が抑制されていた(PBS、または HUVEC と Alde-Low EPC 投与群間で $P < 0.0005$ 、Alde-High と Alde-Low EPC 投与群間で $P < 0.005$ の有意差あり) [n=10] (図 8)。



(図 8) Alde-Low EPC による脳梗塞抑制効果

各投与群(各 n=10)の脳梗塞体積比 (% infarct volume)を示す。Alde-Low EPC 投与群では脳梗塞体積比が他群と比較して有意に抑制されていた。*P< 0.005、** P< 0.0005。

2.4 考察

2.4.1 EPC の細胞供給源としての臍帯血

本研究では、臍帯血より分取した EPC を急性期脳梗塞ラットに投与する実験を行った。前述のように、EPC は様々な細胞供給源より採取されているが、どの細胞供給源より採取した EPC が最も急性期脳梗塞に適しているかは明らかではない。

末梢血や骨髄から単離される EPC の量は少数であるため、細胞治療に使用するために単離した EPC を長時間かけて培養・増殖させる必要があり、EPC の臨床利用が制限されることが指摘されている[23]。臍帯血は、末梢血や骨髄と比較して、採取が容易であり、EPC を多く含むため、EPC の細胞供給源として注目されている[47]。さらに、Ingram らの報告によると、臍帯血由来の EPC は成人末梢血由来の EPC と比較して、細胞の寿命が長く、増殖能力が高く、細胞分裂時間は約半分で、血管新生関連因子である VEGF (vascular endothelial growth factor; 血管内皮増殖因子) や b-FGF (basic-fibroblast growth factor; 塩基性線維芽細胞増殖因子) に対する反応性も高いとされている[35]。また、臍帯血は、白血病や再生不良性貧血などの難治性血液疾患の根本的治療のひとつである造血幹細胞移植において、幹細胞の供給源として使用されており、ドナーの負担がほとんどなく、臨床的使用の安全性についても確立されている。

しかし、脳梗塞に臍帯血由来の EPC を使用する問題点としては、成人に投与する場合、同種他家移植となるために免疫抑制剤の使用が必要であり、場合によっては HLA の適合も必要となる可能性がある。さらに、急性期に投与するためには、HLA

を適合させないで投与する場合にも EPC を常時大量保存しておく必要があり、HLA を適合させるには常に数千種類の EPC を準備しておく必要があり、脳梗塞の発症人口も考慮すると、急性期脳梗塞への臨床応用は現時点では難しいと考えられる。

2.4.2 急性期脳梗塞細胞治療と細胞の投与経路について

脳梗塞の治療は、実際の臨床において、虚血性脳損傷を最小限にすることを目的とした、血栓溶解療法や抗酸化療法、抗血小板療法などの急性期治療と、脳梗塞が完成し神経症状が固定するまでのリハビリテーションや、再発防止のための抗血小板・抗凝固薬の内服、高血圧や高脂血症などのリスクファクターの管理などの慢性期治療に大別される。一方、脳梗塞に対する再生医療・細胞治療の研究では、発症 24 時間以降の亜急性期や慢性期に細胞を投与する研究が多く[7]、発症 24 時間以内の急性期に細胞を投与する実験は非常に少ない[29,48,49,50,51]。

Iihoshi らは、自己骨髄間葉系幹細胞を発症 3-72 時間でラット脳梗塞に静注し、投与時期による治療効果を検討しているが、投与時期が早ければ早いほど 14 日目に測定した脳梗塞体積が小さかったと報告している[51]。一方、Borlongan らは、ヒト骨髄由来 CD133 陽性細胞をマウス脳梗塞発症直後に静注、および脳内に直接移植する実験を行っているが、静注した群では脳梗塞縮小効果はなく、神経症状の改善は脳内移植群より軽微であったと報告している[49]。さらに、発症 3 日目に細胞を投与した群と比較して投与時期による治療効果の違いを検討しているが、発症 3 日目に細胞を静注した群では脳梗塞縮小効果も神経症状の改善もなかったと報告しており、軽微ではあるが、発症から投与が早いほうが治療効果は高い可能性を示唆している。

Ohta らの報告では[29]、自己骨髄由来の EPC をラット脳梗塞に動注する実験を行い、再灌流直後に細胞を投与した群では脳梗塞抑制効果を認めたが、再灌流後 2 時間投与群では脳梗塞抑制効果はなかったと報告している。

このように、脳梗塞急性期の細胞治療に関する報告が限られ、その治療効果が限定的である理由として、投与した細胞の生存期間や脳梗塞急性期の脳内環境の問題が挙げられる。Kawada らや、Takizawa の検討では[52,53]、脳梗塞に対するサイトカイン療法の研究において、脳梗塞急性期には炎症性サイトカインや腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor- α ; TNF- α)、マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloprotease; MMP)、カスパーゼ(caspase)などの細胞障害因子が脳組織で増加するため再生細胞の生存に不利であるが、亜急性期では急性炎症が一段落し、いくつかの神経増殖・神経栄養因子が増加するため再生細胞の生存に有利な状況になることを考察している。これらの知見や、移植した再生細胞が実際に神経細胞や血管に分化するまでに数日以上を要することが、脳梗塞の再生医療の研究が、急性期に少なく、亜急性期や慢性期に多い理由と考えられる。しかし、脳梗塞発症直後の急性期をターゲットにした細胞治療の研究においては、その治療効果は限定的ではあるが、発症からできる限り早く細胞を投与した方が効果は高く、移植細胞が分泌する液性因子による脳保護作用(後述)は急性期脳梗塞に有効と考えられる。従って本研究では Alde-Low EPC の脳梗塞に対する治療効果を急性期も含めて検討することとした。

投与経路については、細胞のデリバリーの観点から考えると脳内直接移植が最も効果的と考えられるが、侵襲が大きい。細胞治療の臨床応用では、細胞の投与は静脈注射が最も現実的で安全・簡便と考えられるが、細胞のデリバリーや治療効果の面で問題が残る。

2.4.3 本研究の実験計画について

本研究の実験デザインは、Ohta らの方法を参考に構築した[29]。Ohta らは、ラットの自家骨髄より採取した単核球細胞を、フィブロネクチンでコートした培養皿で VEGF とともに培養し、非接着細胞を除去した細胞を EPC と定義し[54]、ラットの中大脳動脈をナイロン糸を導入する方法で 90 分間閉塞し、再灌流直後 (early EPC group) と再灌流 2 時間 (delay EPC group) で内頸動脈より EPC を投与している。EPC の投与量は 2.5×10^5 cells で、0.3ml の PBS に懸濁して使用している。細胞投与から 24 時間と 48 時間に神経症状や局所脳血流を測定して脳を摘出し、脳梗塞体積を脳梗塞体積比 (% infarct volume) で算出している。神経症状は Rotarod (回転する棒の上にラットをのせて徐々に速度を上げ、マウスが落下するまでの回転数を測定する) を用いて測定し、梗塞巣の局所脳血流はレーザードップラーを使用して測定している。コントロールとして、PBS と A10 (ラット胎児胸部大動脈平滑筋細胞) を投与している。結果、再灌流直後に EPC を投与した群で、24 時間後と 48 時間後に脳梗塞体積の減少と神経学的症状の改善を観察しているが、再灌流後 2 時間で投与した群では脳梗塞体積の抑制効果はなかったと報告している。しかし、神経症状は両群とも 24 時間後と 48 時間後での改善を報告している。梗塞巣の局所脳血流は、24 時間後では改善を認めなかったが、48 時間後に改善を認めている。

以上の知見を参考に、ラットの中大脳動脈閉塞 (MCAo) モデルに Alde-Low EPC を投与して解析する実験を行った。特に本研究では、ALDH 活性が EPC の分化度に関与している可能性が考えられ (前述)、成熟した血管内皮である HUVEC をコントロールとして投与した。まずは、Alde-Low EPC の脳梗塞抑制効果を確認するため、急性期より実験を開始し、その後、亜急性期や慢性期の投与に移行する予定とした。

有効な脳梗塞を作製するため、閉塞時間は 60 分間とし、30 分間の再灌流の後に各細胞を投与した。再灌流させない、いわゆる永久閉塞モデルでは、梗塞範囲は大きくなるものの、死亡率が高くなるため(Koizumi らの糸上げモデル原法では 32 時間以内にすべて死亡[44])、再灌流モデルを採用している。再灌流モデルの閉塞時間については、Memezawa らの報告[55]では、2 日目までの死亡率は 60 分以内の閉塞では 0%、90 分閉塞で 11%、120 分閉塞で 63%であった。再灌流モデルの脳梗塞範囲については、Memezawa らの報告[55,56]で、30 分閉塞で線条体に小梗塞、60 分閉塞で皮質梗塞が認められはじめ、120 分以上の閉塞では 24 時間永久閉塞と同程度の梗塞であった。よって、60 分間の閉塞で、有効な脳梗塞が作成され、死亡率も低いと考えられた。

しかし、本研究では、73 例に脳梗塞を作製したが、33 例(45.2%)では、脳梗塞が全く発症しないか、線条体のみの脳梗塞で、皮質には脳梗塞ができなかった。死亡も多く、10 例に 1 例の割合で 24 時間以内に死亡が認められ、特に、麻痺を発症したラットについては、72 時間以内にほとんどが死亡し、細胞投与後 24 時間を超える長期間の観察が困難であった。

一方、再灌流の状態では再灌流障害によって病態は複雑になると考えられる [57]。臨床的にも、脳梗塞発症後に血栓・塞栓の融解により血流再開が生じることが知られているが、血流再開までの閉塞時間がある閾値を超えると、脳浮腫の増悪、脳内出血、梗塞範囲の増大などの再灌流障害が生じ、死亡に至る症例もある。動物実験モデルにおいても再灌流障害の発症は報告されているが [58,59,60,61]、ラット MCAo モデルの場合、ヒトと異なり側副血行が発達しているため、120 分間以内の閉塞時間では再灌流障害は生じないと報告されており [55,59]、60 分間の閉塞時間を採用した本研究においては再灌流障害の影響は軽微であると考えられた。実際、脳梗塞を作製した全例で、脳内出血は観察されなかった。

また、再灌流を行った頸動脈からの細胞投与は、細胞の delivery には有利と考えられるが、実際の臨床応用を考えると、動脈投与はカテーテルによる血管内治療や動脈の直接穿刺などの特殊な手技を要するため現実的ではなく、安全で簡便な静脈投与による実験を追加する必要がある。

2.4.4 Alde-Low EPC の急性期脳梗塞抑制効果

本研究では、Alde-Low EPC 投与群でのみ脳梗塞体積抑制効果が認められ、ALDH 活性により分取した EPC の特定の細胞群が、急性期脳梗塞に対して治療効果を発揮することが確認された。しかし、神経症状や局所脳血流において、Alde-Low EPC の治療効果を確認することはできなかった。Bliss らの脳梗塞に対する細胞治療の review[7]によると、梗塞領域の縮小が報告された研究のほとんどが神経症状の何らかの改善を報告しており、脳梗塞の病態から考えても、脳梗塞が縮小すれば神経症状の改善があるはずであり、今後の研究においては神経症状の評価方法を再検討する必要があると考える。今回は、modified Neurological Examination Grading System を使用したが、評価が死亡を除くと 5 段階であり、さらに詳細な grading が必要と考える[62]。また、Ohta らの Rotalod を使用した方法(前述)などで、運動機能を定量化する方法も検討していく予定である[62,63]。

局所脳血流においては、前述の Ohta らの実験結果より、細胞投与後 24 時間では脳血流の増加は認められず、48 時間後以降で脳血流増加作用がでてくることも考えられるが、本研究では Alde-Low EPC による細胞投与後 24 時間での局所脳血流の改善作用は確認できなかった。今後は、細胞投与後 24 時間以降の局所脳血流を評価する必要もあり、また、局所脳血流測定機器や測定方法に問題がある可能性があり、今後検討・改善していく予定である。

2.5 小括・結論

本章では、Alde-Low EPC が急性期脳梗塞に対しても、虚血性皮膚壊死と同様に治療効果を発揮することを確認した。このことは、従来主に表面抗原で分取していた EPC の中で、ALDH 活性で分取して虚血改善能を純化させた Alde-Low EPC という亜集団が脳梗塞に対しても治療効果を発揮することの立証であり、このことは、今後 EPC の機能解析や治療機序の解析、治療効果・治療効率を上げる研究、さらには臨床応用に向けた今後の研究の一助になると考えられる。

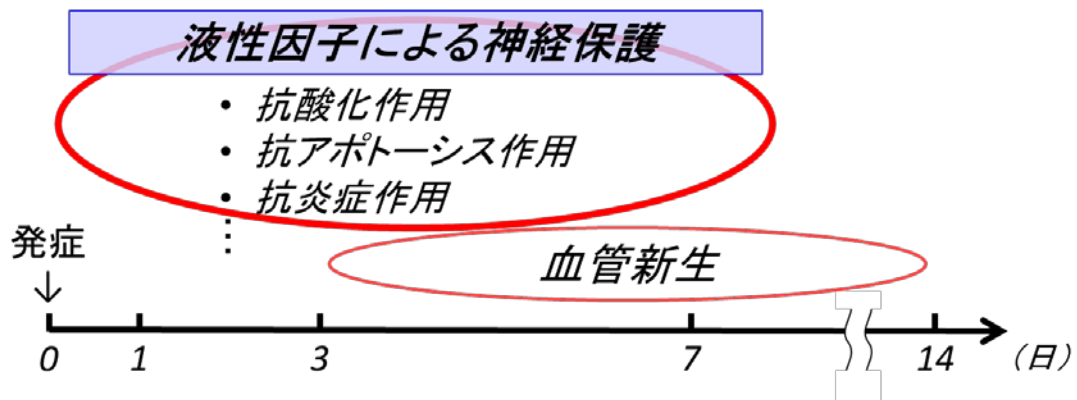
しかし、今回の研究では、限られた時期(急性期)に細胞を投与し、限られた時期(発症 24 時間後)の治療効果を判定したのみであるので、今後は、投与時期(亜急性期、慢性期)や、投与経路(静脈投与)、至適投与量、さらには、急性期に投与した細胞が亜急性期・慢性期にどの程度生存し、血管新生などの効果を発揮するか否かも検討していく必要がある。さらに、また、治療効果の判定についても、脳梗塞体積だけでなく、神経症状をはじめとする機能評価や局所脳血流に対する効果の検討も必要で、治療効果・効率を上げていくための研究をさらに継続する必要と考えている。

第3章 急性期脳梗塞に対する血管内皮前駆細胞の 治療機序の解析

3.1 背景と目的

3.1.1 背景

前章では、血管内皮前駆細胞の中のある特定の細胞群 (Alde-Low EPC) が急性期脳梗塞に対して治療効果を発揮することを確認した。前述のように、EPC は虚血部位から放出されるサイトカインや成長因子、ホルモンなどの効果により骨髄で分化・増殖し、末梢血中に動員され走化する。末梢血中の EPC は虚血部位に接着し、間質内に遊走して増殖、分化しながら既存の血管内皮とともに血管新生の機能を果たすと考えられている[20,21,22]。しかし、現在までの EPC 研究の知見より、移植した EPC が血管内皮に分化してその治療効果を発揮するまでには少なくとも3日以上かかると考えられ、急性期の治療効果は EPC が分泌する何らかの液性因子による脳保護作用によるものと考えられる(図 9)。一方、急性期の脳梗塞では、脳組織が虚血に曝されてから細胞壊死に至るまで、活性酸素の発生や炎症反応などの様々な細胞障害機転が生じる。Garcia らの報告[2]により、虚血脳が不可逆的な壊死に陥るまで 48-72 時間を要することが明らかになり、現在の急性期脳梗塞の臨床現場においても、可逆的な虚血脳、いわゆる「ペナンプラ」領域の保護が急性期治療の中心となっている[3,4,5,6]。



(図9) EPCによる急性期脳梗塞治療機序の仮説:

EPC の治療メカニズムとして、血管新生による効果は、早くても 3 日目以降から認められ、1 週間後には明らかな血流改善作用が発揮されるといわれている。しかし、虚血急性期には血管新生による作用は認められず、EPC が産生する液性因子(trophic factor)による神経保護作用が発揮されていると考えられる。したがって、Alde-Low EPC の治療効果は、細胞が虚血部位に特異的に集積し、何らかの液性因子を産生することにより発揮されているものと考えられる。

3.1.2 目的

以上より、急性期脳梗塞に対する Alde-Low EPC の治療効果のメカニズムとして、虚血領域に集積した Alde-Low EPC が分泌する液性因子によるペナンプラ領域の脳保護作用により発揮されると考えられる。本章では、細胞を投与したラット脳を解析することにより、Alde-Low EPC による脳保護作用に関連する因子を調べ、その治療機序を分析し、より効果的・効率的な脳梗塞 EPC 療法の開発に寄与することを目的とする。

3.2 方法

3.2.1 投与細胞の可視化

Alde-Low EPC、Alde-High EPC と HUVEC は、下記の如く緑色蛍光タンパク質 GFP(Green Fluorescent Protein)を導入されたものを本学再生医学・幹細胞生物学研究室より提供を受けた。

筑波大学遺伝子組み換え実験安全管理規定を順守し、GFP 遺伝子の導入には、MSCV(Murine Stem Cell Virus)レトロウイルス発現システム(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)を使用した。GFP 遺伝子を組み込んだ pMSCV プラスミド(pMSCV-IRES-EGFAP)を大腸菌を用いて増幅し、pMSCV-プラスミドとパッケージング細胞を用いて GFP を組み込んだ改変レトロウイルス(MSCV-IRES-EGFAP)を製作した。このウイルスを各 EPC と HUVEC に感染させ、GFP 安定発現細胞株を樹立した。GFP を導入した細胞は、蛍光顕微鏡で観察が可能となる。

3.2.2 摘出脳の病理組織学的検討と免疫組織化学的検討

前章と同様にラット中大脳動脈閉塞モデルを作製し、中大脳動脈を 60 分間閉塞し、再灌流後 30 分で Alde-Low EPC、Alde-High EPC、HUVEC の各細胞 5×10^5 cells を 0.5 ml の PBS に懸濁させ頸動脈から投与した。細胞投与から 24 時間後、致死量のペントバルビタールを腹腔内投与し、上行大動脈経路で PBS による灌流を行った。ラット脳を摘出後、前頭葉先端から連続 7 スライス の 2 mm 厚冠状断切片を作成し、MCA の灌流領域を含むように前頭葉先端から 6-8 mm 尾側の冠状断切片 (4 スライス目) を組織学的検討に使用した。切片を 4% パラフォルムアルデヒド含有 PBS で 24 時間固定した後、20% ショ糖溶液に 24 時間浸した。脱水固定した冠状断切片を包埋剤 (O.C.T compound; Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋し、液体窒素で凍結して -80°C で保存した。クライオスタットで 10 μm 厚の凍結切片を作製し、各種染色を行った。隣接連続切片の HE 染色による病理組織学的検討と蛍光免疫染色による免疫組織学的検討を行った。

解凍した凍結切片から蒸留水で包埋剤を洗浄除去し、5 分間 PBS で洗浄した後、一次抗体に反応させた。各一次抗体は添付説明書、または 100 倍の希釈濃度から開始し、蛍光観察結果に応じて希釈濃度や反応時間を調整した。ブロッキングは 1% ウシ血清アルブミン (BSA) を PBS で 100 倍に希釈して使用した。一次抗体反応の後、PBS で 5 分間 $\times 3$ 回洗浄し、Alexa 試薬 (Invitrogen) で標識した。蛍光顕微鏡での観察では、GFP 陽性細胞は緑色で観察されるため、各一次抗体はすべて Alexa555 (赤色蛍光抗体) で標識した。同時に、核染色剤 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Roche Diagnostics-Applied Science, Mannheim, Germany) で核を青色で観察できるように標識した。二次抗体反応後、PBS で 5 分間 \times

3回洗浄した。封入後、蛍光顕微鏡(Biozero, BZ8000, KEYENCE Inc. Osaka, Japan)で観察を行った。使用した一次抗体は下記に示す(表2)。

(表2) 一次抗体リスト

抗体		抗原
抗 α SMA抗体	(DAKO)	α SMA (α smooth muscle actin) α 平滑筋アクチン
抗SDF-1抗体	(Santa Cruz)	SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) ストローマ細胞由来因子-1
抗GFP抗体	(Invitrogen)	GFP (Green Fluorescent Protein) 緑色蛍光タンパク
抗NOS3抗体	(Santa Cruz)	eNOS (endothelial nitric oxide synthase) 内皮型一酸化窒素合成酵素

3.2.3 投与細胞の脳内における検出と定量

蛍光免疫染色により、投与した細胞は GFP 陽性細胞として形態学的、空間的に蛍光顕微鏡で観察可能となった。形態学的に GFP 陽性細胞を認識するには $400 \times 300 \mu\text{m}$ の領域を1視野として拡大して観察することが必要であり、この拡大率で正常側と虚血側の全領域を観察し、GFP 陽性細胞の脳内分布や各半球の定量を行った(図 10)。



(図 10) GFP 陽性細胞の観察・検出・定量:
梗塞側、正常側の各半球で、 $400 \times 300 \mu\text{m}$ の倍率で全領域を観察した。

3.2.4 Alde-Low EPC の梗塞巣への集積機序の解析

3.2.4.1 SDF-1/CXCR4 系と Alde-Low EPC の集積

Alde-Low EPC の梗塞巣への集積機序の解析として、梗塞巣で発現するストローマ細胞由来因子-1(SDF-1; Stromal cell-derived factor-1)と、EPC が発現するケモカイン CXCレセプター4(CXCR4; CXC receptor 4)の相互作用に着目し、短鎖二本鎖 RNA(siRNA; short interfering RNA)を用いた RNA 干渉法(RNAi; RNA interference)によりCXCR4の発現を特異的に抑制したAlde-Low EPC(Alde-Low EPC CXCR4si)をラット脳梗塞モデルに投与する実験を行った。

CXCR4 ショートヘアピン型 RNA(CXCR4 shRNA; CXCR4 short hairpin RNA)をレンチウイルスベクターにより Alde-Low EPC に導入し、安定した CXCR4 の発現抑制を得た。CXCR4 shRNA は MISSION TRC-Hs1.0 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; クローン番号: TRCN0000004053, 挿入シーケンス: 5'-CCGGCATC-ATCTTCTTAACTGGCATCTCGAGATGCCAGTTAAGAAGATGATGTTTTT-3')により作製した。Alde-Low EPC を 24 ウェルプレート(住友ベークライト)に播種して 24 時間培養した後、80%コンフルエントの状態ですべてのウェルに 200 μ l に対し 20 μ l のウイルス液 (CXCR4 shRNA) とポリブレイン (Sigma-Aldrich; 最終濃度 8 μ g/ml) を加えた。2 日間培養後、ピュロマイシン (Sigma-Aldrich; 最終濃度 2 μ g/ml) を添加し、ウイルスが導入された EPC のみをセレクトして使用した。

Alde-Low EPC CXCR4si も GFP を導入して可視化し、上記の方法と同様に細胞投与後 24 時間の脳梗塞体積と Alde-Low EPC CXCR4si の梗塞巣への集積を評価した。また、蛍光免疫染色により、SDF-1 の梗塞巣での発現と GFP 陽性細胞の集積の関係を観察した。

3.2.5 Alde-Low EPC による神経保護作用の解析

梗塞巣に集積した Alde-Low EPC による神経保護作用を解析するため、eNOS (endothelial nitric oxide synthase; 内皮型一酸化窒素合成酵素)に着目し、LSAB(Linked Streptavidin-Biotin)法による増感免疫染色を施行した。DAKO LSAB キット(DAKO, Glostrup, Denmark)を使用した。薄切した凍結切片を解凍後、アセトンで固定の上 PBS で洗浄し、Target Retrieval Solution (Dako)を用いて抗原の賦活化処理(121°C、5 分)を行った。蒸留水で洗浄後、内因性ペルオキシターゼ反応抑制のため 0.3%過酸化水素加エタノール溶液で 20 分間処理し、PBS で洗浄した。1%BSA を PBS で 100 倍に希釈してブロッキングし、一次抗体(抗 NOS3 抗体)を 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体としてビオチン標識イムノグロブリン(BIOTINYLATED LINK; DAKO)を室温で 10 分間反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトビアジン(DAKO)を室温で 10 分間反応させた。PBS で洗浄後、DAB(DAKO)をスライドに滴下後、光学顕微鏡で発色を確認しながら反応させた。ヘマトキシリンで核染色した後、封入して顕微鏡 (Biozero, BZ8000, KEYENCE Inc. Osaka, Japan)で観察した。

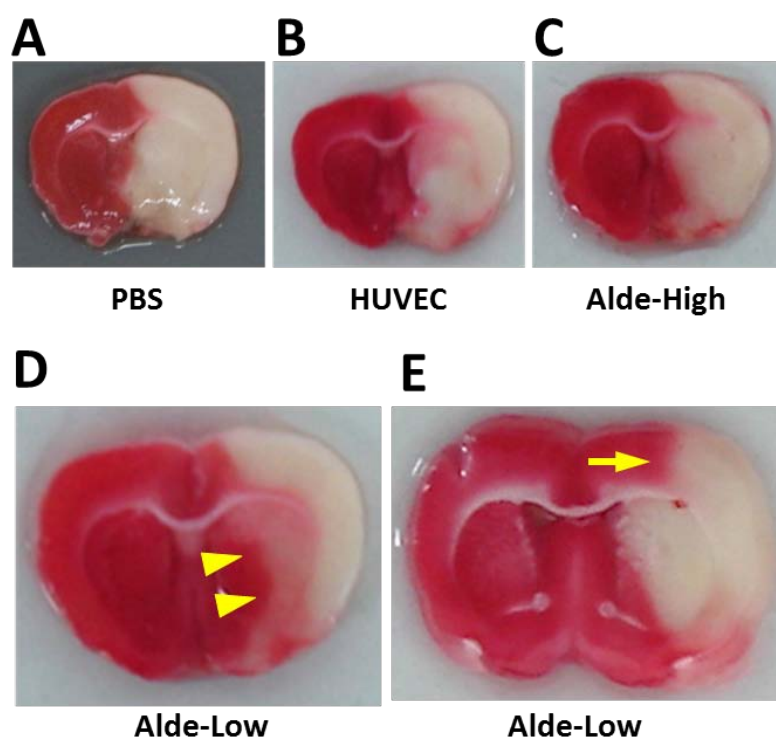
3.2.6 統計

数値の統計学的解析は、Student t 検定を行い、数値は平均値と標準偏差を用いて表示した。

3.3 結果

3.3.1 梗塞巣の病理所見

各細胞投与群の代表的なケースの TTC 染色所見を示す(図 11)。Alde-Low EPC 投与群では梗塞範囲が他群と比較して少なかった(図 11;D, E)。梗塞範囲の縮小効果は、皮質でも認められたが、線条体で縮小効果が大きかった。

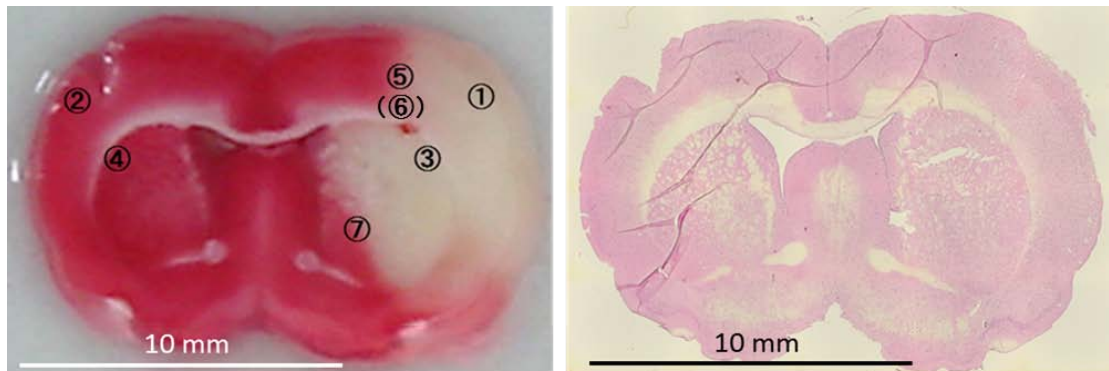


(図 11) Alde-Low EPC による脳梗塞抑制効果(TTC 染色)

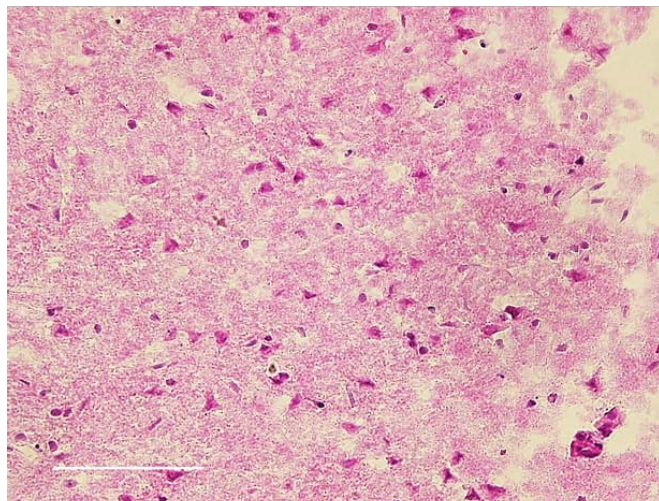
各細胞投与群の代表的ケースの 24 時間後の TTC 染色所見。未染部分(白)が梗塞巣を示す。(A)PBS 投与、(B)HUVEC 投与、(C)Alde-High EPC 投与、(D, E)Alde-Low EPC 投与。Alde-Low EPC 投与群では、線条体(D; 矢頭)や皮質(E; 矢印)で脳梗塞領域の縮小が認められる。

TTC 染色の境界部分に着目して HE 染色による組織学的な観察と TTC 染色所見との比較を行った(図 12)。概観を見ると、TTC 染色と比較して、HE 染色では梗塞巣が同定しにくい。梗塞巣の海綿化による細胞間隙の空胞化に起因する染色性の低下や、ニューロンやアストロサイトの核の染色性や形状の変化に起因する染色性の変化の結果、HE 染色の染色性が低下することが梗塞領域を判定する最良の基準とされているが[2,64]。今回の虚血発症 24 時間での梗塞巣の観察では、虚血中心部(コア)においても海綿化による染色性の低下は軽度であったため(図 12-①, ③)、概観で TTC 染色と比較して梗塞領域の同定が困難な理由と考えられる。TTC 染色での梗塞領域の境界部分の観察では、正常部分や虚血コアで認められなかった神経細胞やアストロサイトの膨化が認められた(図 12-⑤,⑥,⑦)。

(図 12) TTC 染色と HE 染色の比較と梗塞巣の病理学的所見

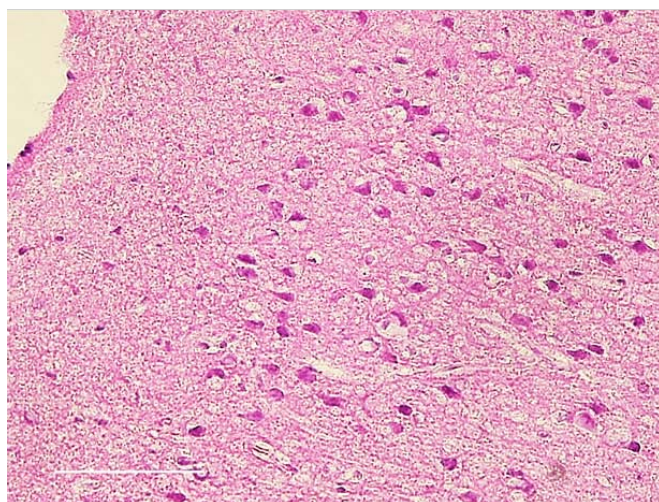


Alde-Low EPC投与の脳切片のTTC染色(左図)と同切片のHE染色所見。概観では、TTC染色で認められる染色の低下はHE染色でははっきりしない。番号は、以下の拡大所見に対応する。



① 皮質梗塞中心部 (コア)

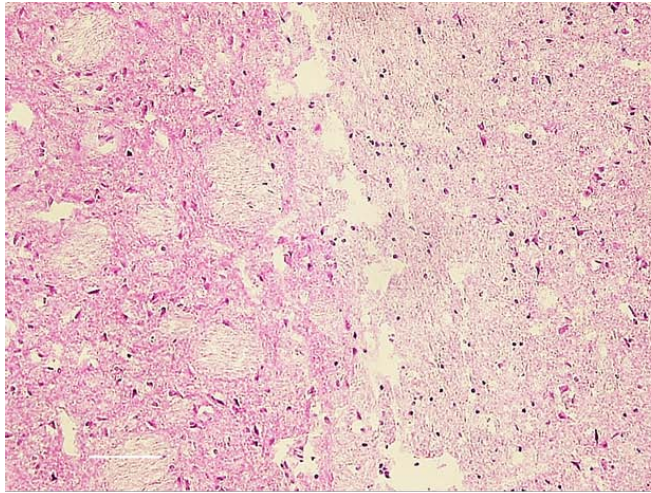
広範な壊死巣となっている。虚血による核の濃染が見られ、細胞間隙の増大による全体的に染色性の低下が認められる。(スケールは100 μ m)



② 正常側皮質

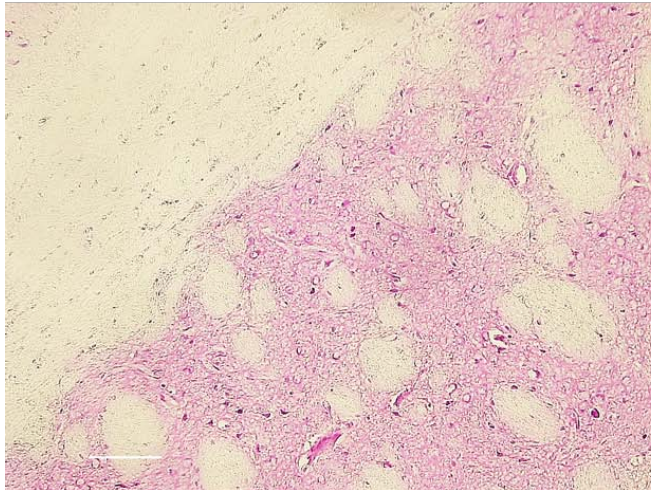
①の対称部位。神経細胞が配列し、正常の構造を保っている。左上部では脳軟膜が保たれている。(スケールは100 μ m)

(図 12) TTC 染色と HE 染色の比較と梗塞巣の病理学的所見(続き)



③ 線条体梗塞中心部(コア)

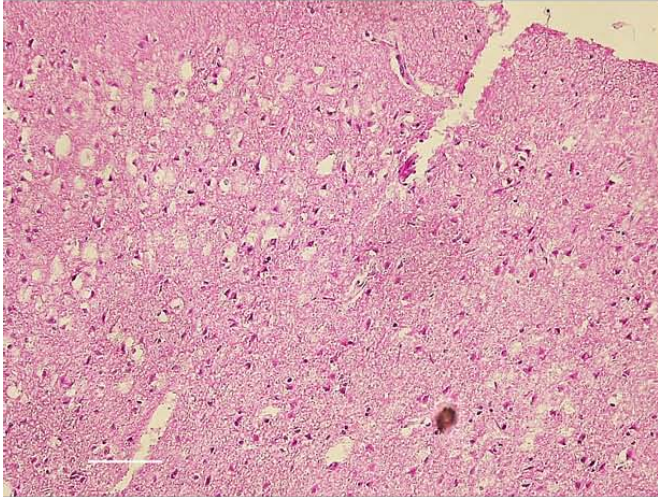
左方が線条体で、右方は灰白質。④の正常側と比較して、広範な壊死巣が拡がり、虚血による核の濃染が見られる。灰白質や線条体には多核白血球の浸潤が認められる。(スケールは100 μm)



④ 正常側線条体

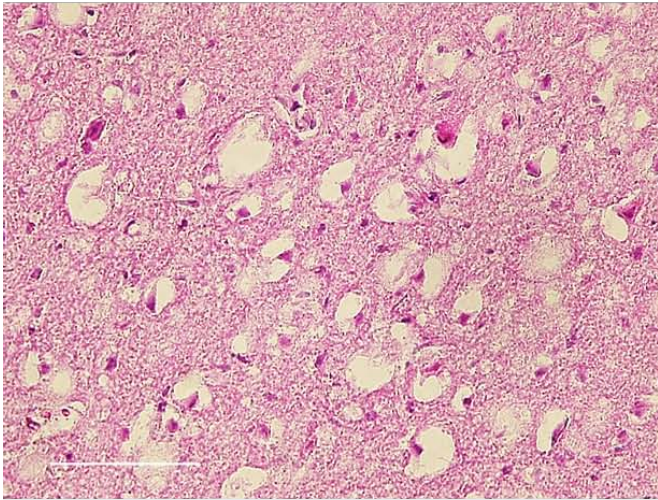
灰白質の神経線維や基底核の構造が保たれている。梗塞側で認められる多核白血球の浸潤や核の濃染はない。(スケールは100 μm)

(図 12) TTC 染色と HE 染色の比較と梗塞巣の病理学的所見(続き)



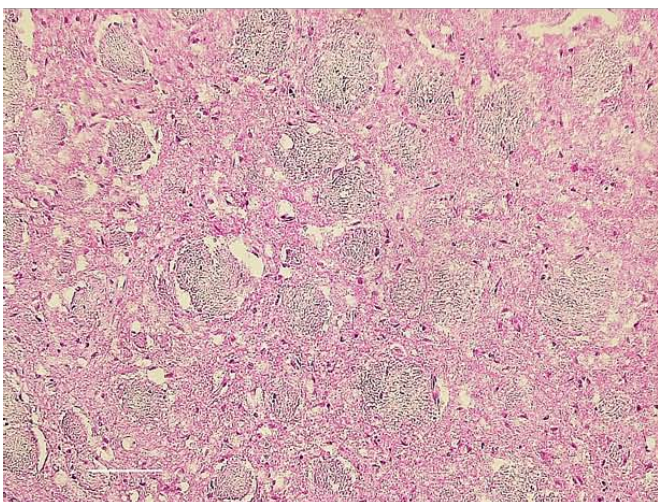
⑤ 皮質梗塞巣境界部分(ペナンプラ)

左方が虚血コアに近い部分。左方では、神経細胞やアストロサイト、血管の周囲にhaloのような空胞化があり、細胞の膨化を示しているが、正常側に近い右方ではこの変化は少ない。これらの細胞の腫大化の有無の境界は⑦の線条体のペナンプラよりははっきりしており、これはTTC染色での染色境界が明瞭であることと関係しているかもしれない。(スケールは100 μm)



⑥ 皮質梗塞巣境界部分(ペナンプラ)

⑤の拡大像。神経細胞やアストロサイトの膨化が認められるが、コアで認められたような核の濃染はあまり認めない。(スケールは100 μm)

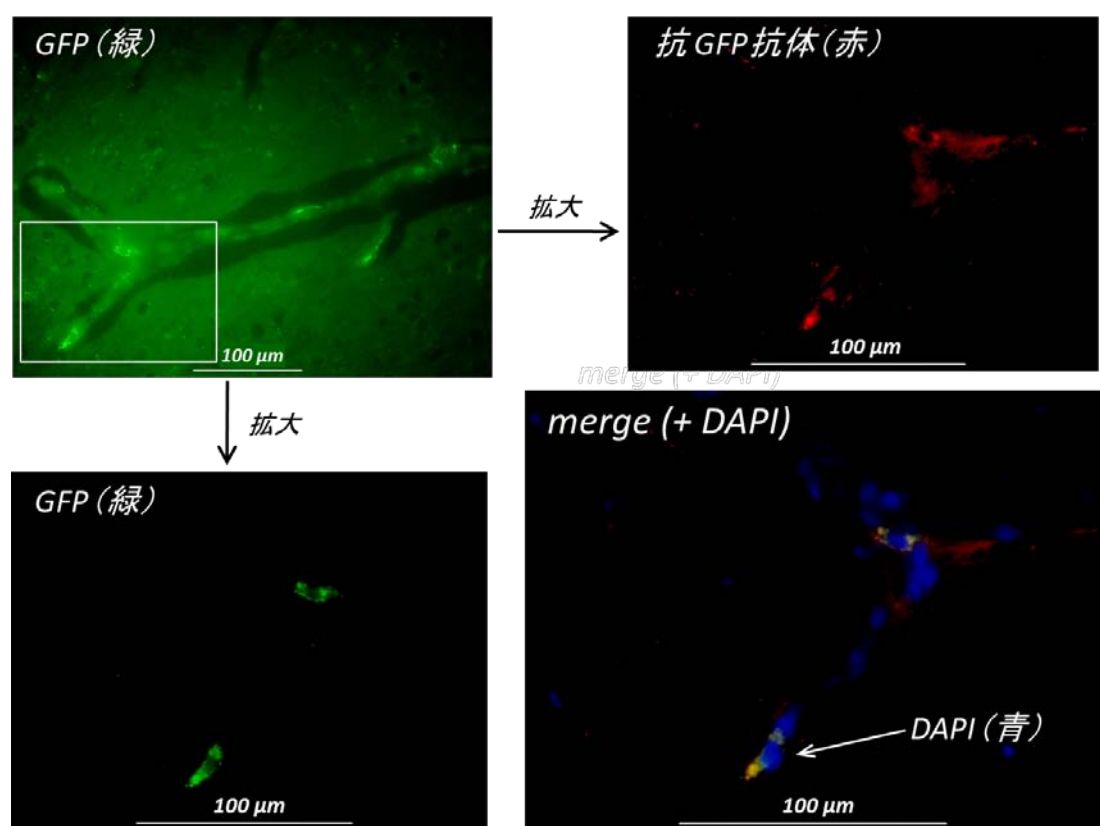


⑦ 線条体梗塞巣境界部分(ペナンプラ)

⑤と同様に、左方が虚血コアに近い部分。神経細胞やアストロサイトに細胞の膨化があるが、正常側に近い右方ではこの変化は少ない。これらの細胞の腫大化の有無の境界は⑤の皮質ペナンプラのものより比較的不鮮明である。(スケールは100 μm)

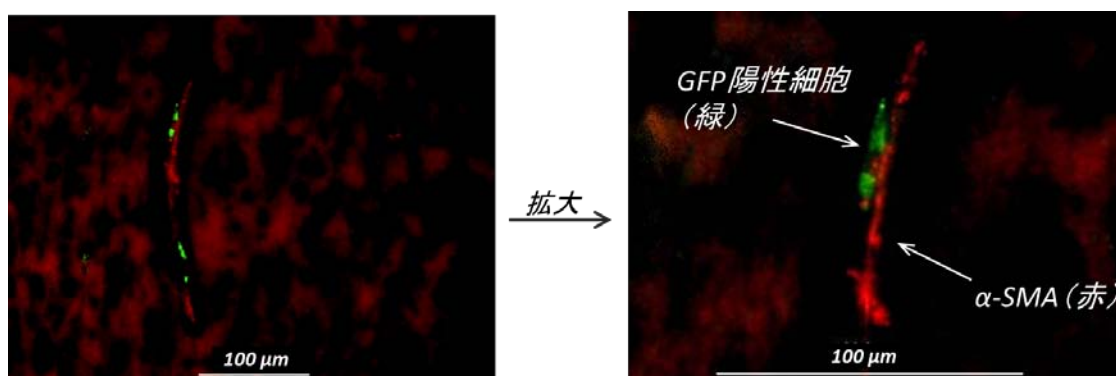
3.3.2 投与細胞の脳内における分布と定量

観察している細胞が投与した細胞であることは、抗ヒトの抗 GFP 抗体を使用し
て確認した(図 13)。投与した細胞は、GFP の蛍光を細胞質に認め、核が円形に欠
損するか、DAPI により核が青く染色される紡錘状の細胞として観察することができ
た(図 13, 14)。



(図 13) 抗 GFP 抗体による染色:

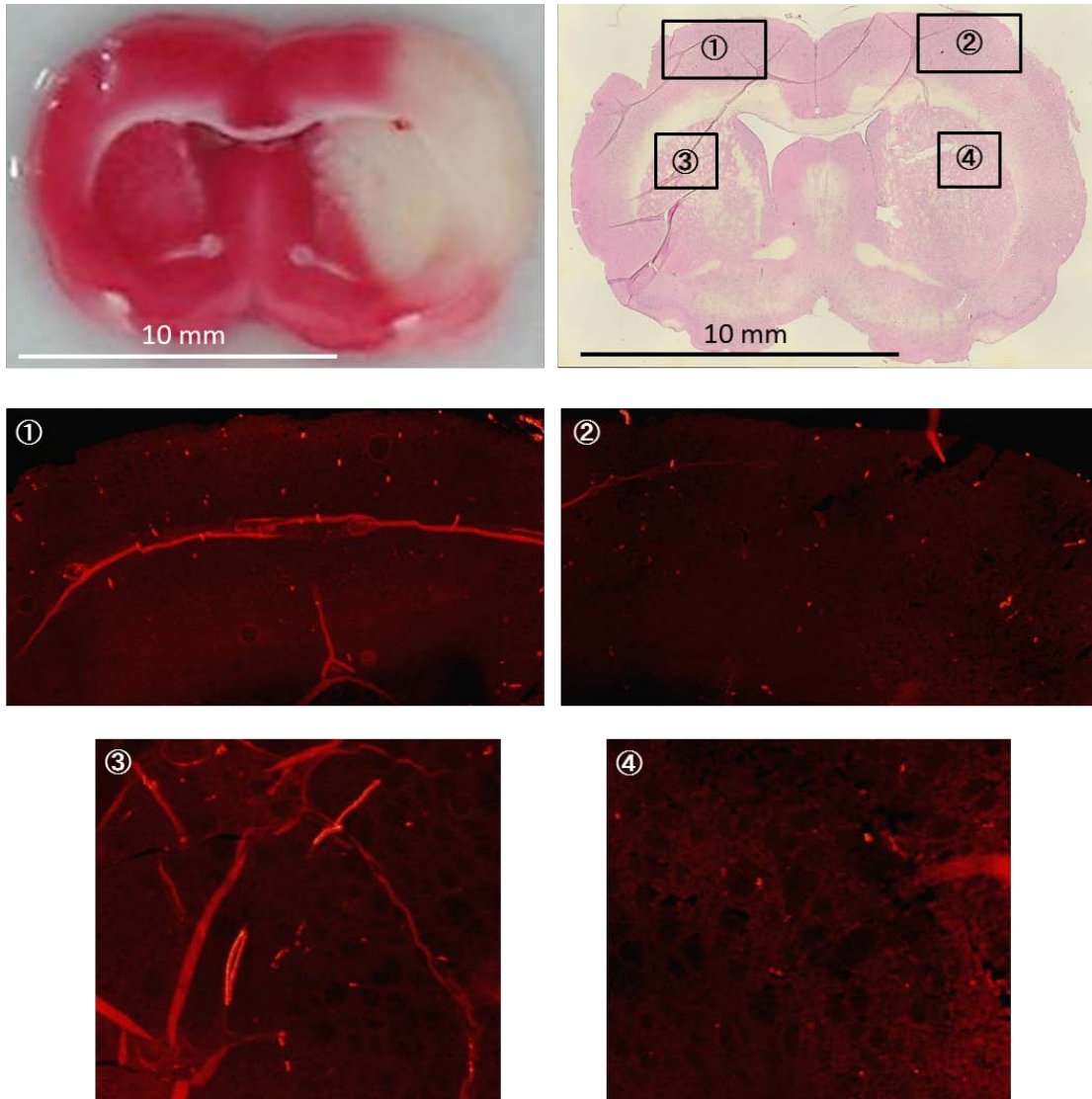
GFP 陽性細胞は紡錘型で、中心部の核の欠損か、DAPI による各染色で形態学的に同定できた。
抗 GFP 抗体(抗ヒト)で染色することにより、観察している細胞が投与した細胞であることを確認した。



(図 14) GFP 陽性細胞の観察

蛍光免疫染色では、GFP 陽性細胞は緑色の紡錘型の蛍光として観察された。各細胞の大きさは 20 μm 程度で、核の部分が抜けるか、DAPI で青色に各染色された。左図は $400 \times 300 \mu\text{m}$ の倍率であるが、これより拡大率が低い場合、GFP 陽性細胞の同定は困難で(他の血球細胞などの自家発光と思われるアーチファクトなどで)、この拡大率で GFP 陽性細胞を同定し観察・計数した。

抗 αSMA 抗体による血管の観察では、虚血コアやペナンプラ、正常側で細動脈の分布に差はなかった(図 15)。特に線条体で細動脈の血管径が細い傾向があったが定量化には至らなかった。虚血性脳損傷による血管の縮小や、滲出による血管の周囲腔の拡大によるものかもしれない。拡大して全領域を観察しても血管新生を確認することはできなかった。



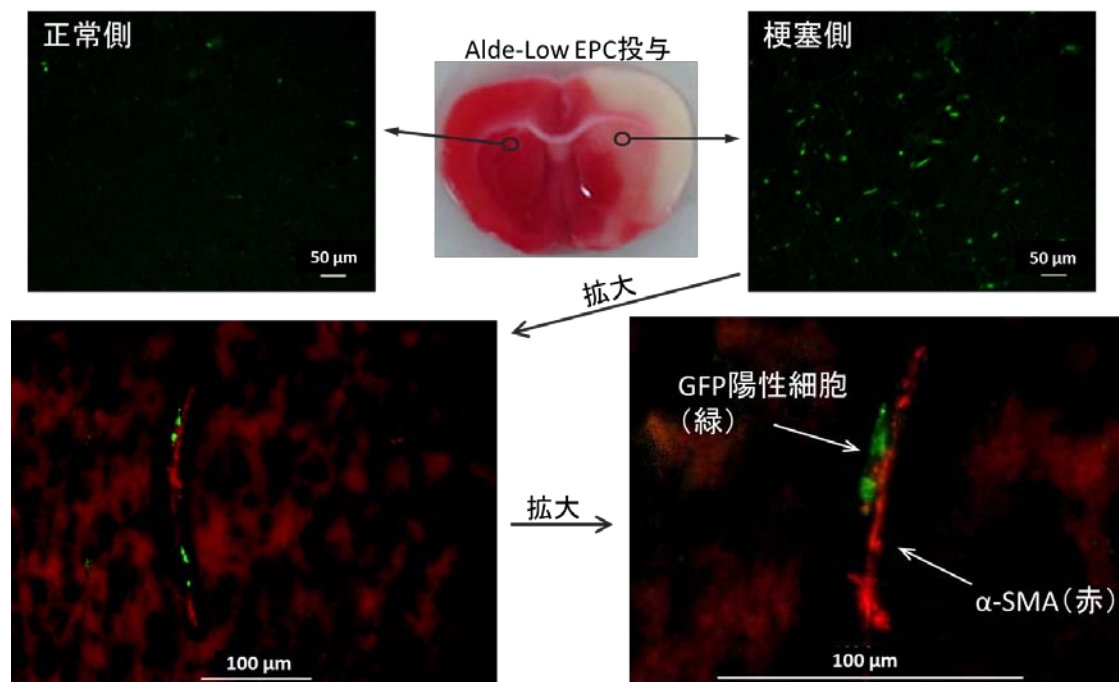
(図 15) 抗 α SMA 抗体染色による梗塞巣の血管分布の観察

Alde-Low EPC 投与脳切片における抗 α SMA 抗体による血管の染色。虚血ペナンプラ部分②や虚血コア④の部分で血管の観察を行った。正常側と比較しても血管の分布に差はなかった。線条体の部分では、正常側③と比較して虚血部で血管径が細い傾向にあった。血管新生は観測されなかった。

続いて、GFP 陽性細胞の分布を観察した(図 16)。弱拡大の観察では、GFP 陽性細胞の検出は困難であったため、拡大することで GFP 陽性細胞の確認をした。Alde-Low 投与群だけでなく、HUVEC や Alde-High EPC 投与群においても、GFP 陽性細胞はほとんどが α SMA 陽性の血管に付着する形で分布していた(図 17)。全領域を観察した結果、血管に付着して存在する GFP 陽性細胞の数は、正常側と梗塞側間や各細胞間であまり変わらなかったが、Alde-Low EPC 投与群の梗塞側線条体の部分では GFP 陽性細胞が間質にも認められた(図 18)。弱拡大の観察においても、Alde-Low EPC 投与群の線条体において緑色の蛍光が多い傾向にあると観察されたが(図 16)、これはほとんどが、間質に認められた GFP 陽性細胞を観察していたものと考えられる。間質に認められた GFP 陽性細胞は、Alde-Low EPC が間質に遊走したものと考えられた。

GFP 陽性細胞の計数による定量を行うと、Alde-Low EPC 投与群の梗塞巣に特異的に GFP 陽性細胞が集積することが確認された(図 19)。各細胞投与群における半球ごとの GFP 陽性細胞数は、HUVEC 梗塞側で 88.7 ± 9.5 cells、Alde-High 梗塞側で 118.3 ± 18.8 cells、Alde-Low 正常側で 132.3 ± 48.0 cells、Alde-Low 梗塞側で 318.7 ± 89.8 cells であった。HUVEC 投与群、または Alde-High 投与群と比較して、梗塞側における Alde-Low 投与群の GFP 陽性細胞数は有意に多かった($P < 0.05$)。Alde-Low 投与群では、正常側と比較して梗塞側で GFP 陽性細胞が有意に多かった($P < 0.05$) [それぞれ $n=3$](図 19)。

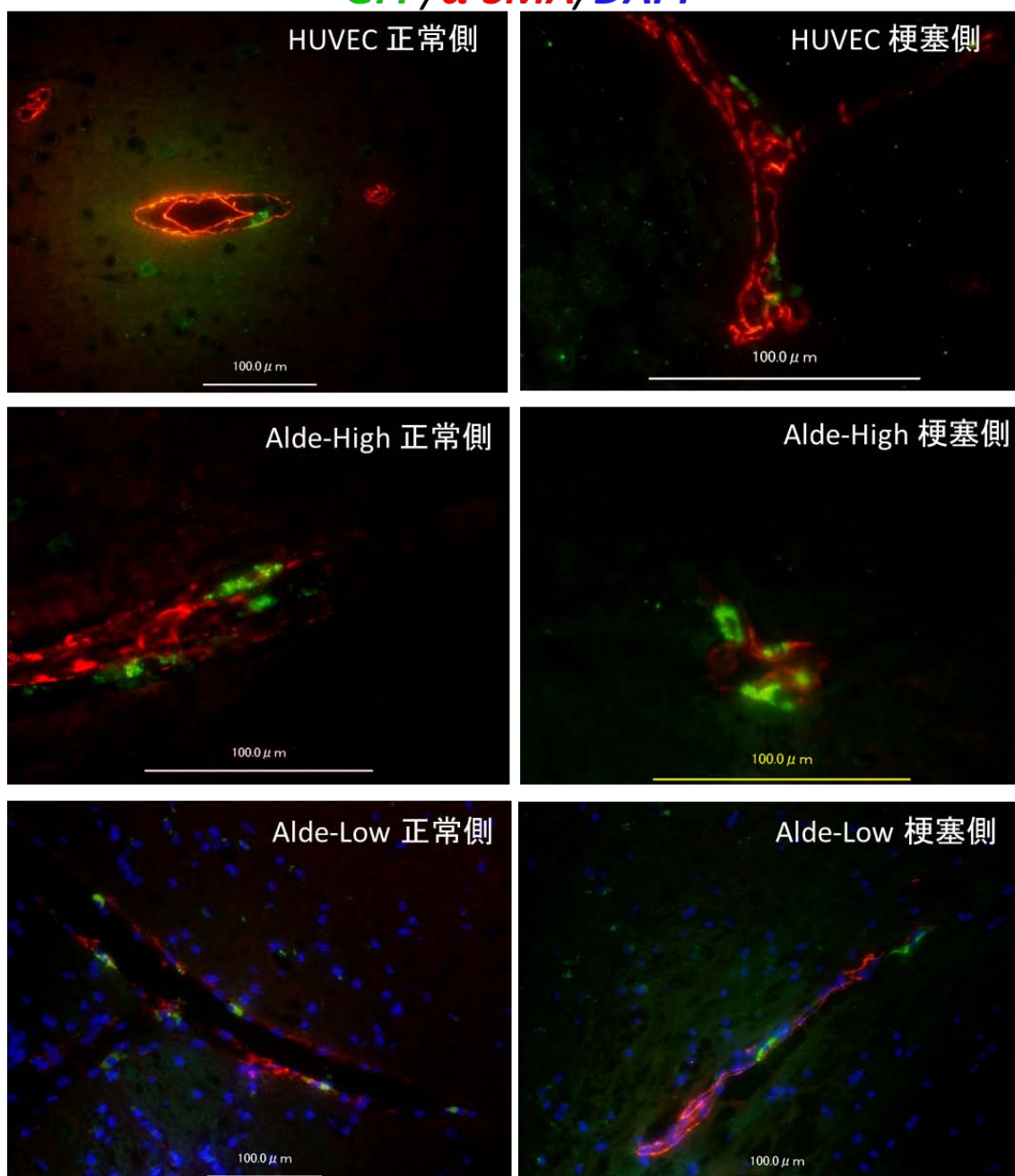
上記の観察により、急性期に投与した Alde-Low EPC が、梗塞巣に集積し、間質へ遊走することで治療効果を発揮していることが示唆された。



(図 16) GFP 陽性細胞の分布-1:

弱拡大の観察では、GFP 陽性細胞の検出は困難であったため、拡大することで GFP 陽性細胞の確認をした。GFP 陽性細胞の多くは、 α SMA 陽性の血管に付着する形で分布していた。弱拡大の観察では、Alde-Low EPC 投与群の線条体において緑色の蛍光が多い傾向にあると観察された。

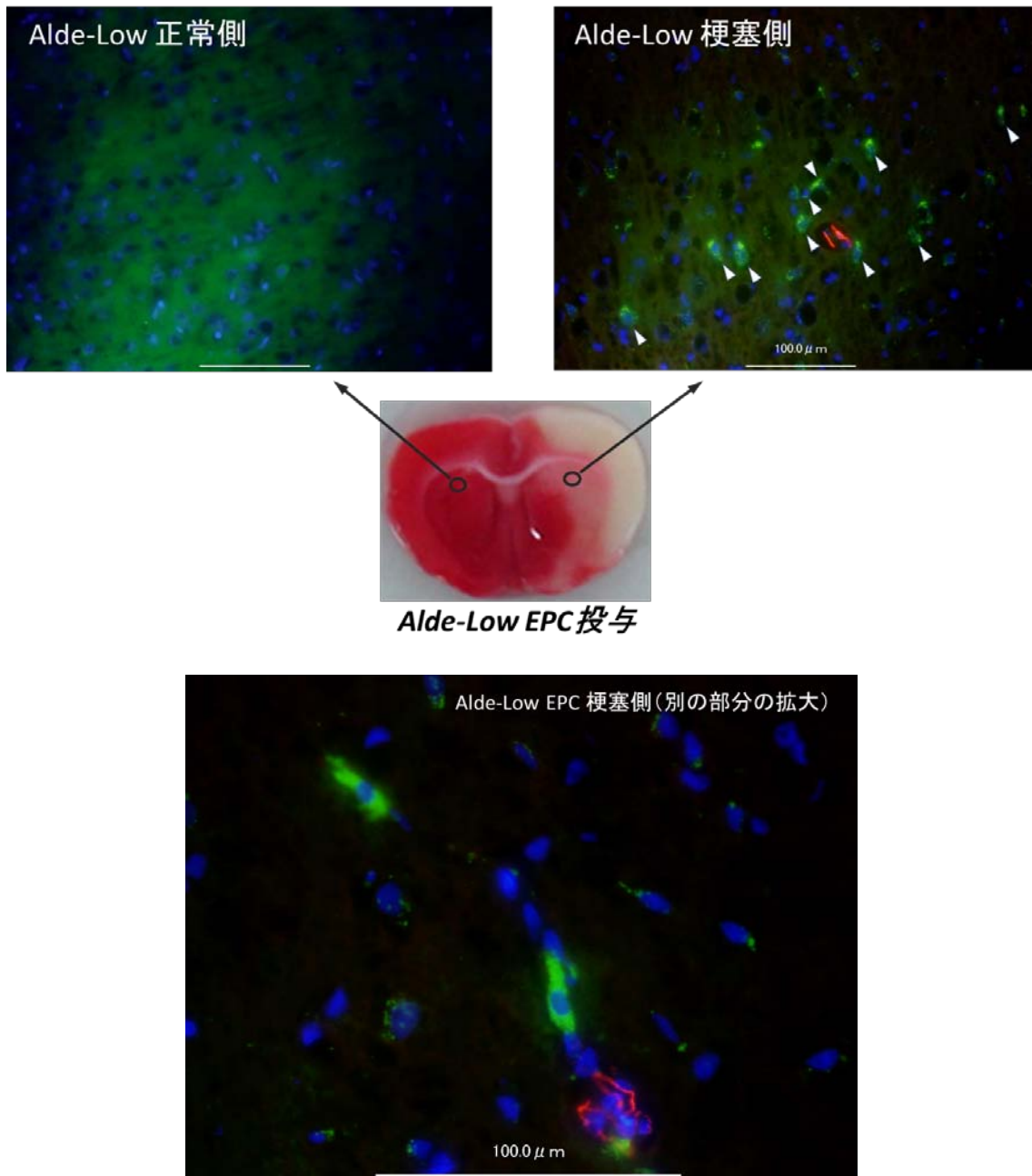
GFP/ α -SMA/DAPI



(図 17) GFP 陽性細胞の分布-2:

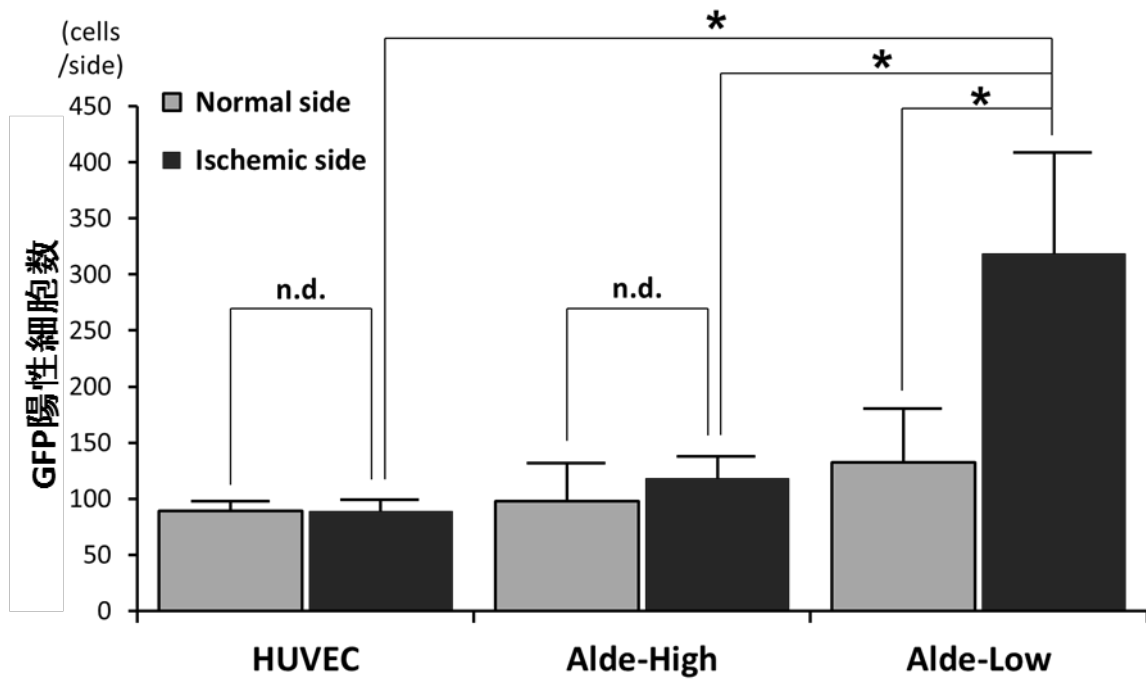
GFP 陽性細胞は、その多くが血管に付着する形で存在した。HUVEC 投与群や Alde-High EPC 投与群においても同様であった。

GFP/ α -SMA/DAPI



(図 18) Alde-Low EPC の間質への遊走

Alde-Low EPC の間質への遊走。いずれの図も Alde-Low EPC 投与群の線條体の虚血辺縁部観察。正常側や他部位、Alde-High EPC 投与群、HUVEC 投与群ではほとんど認めなかった間質への遊走を認める。

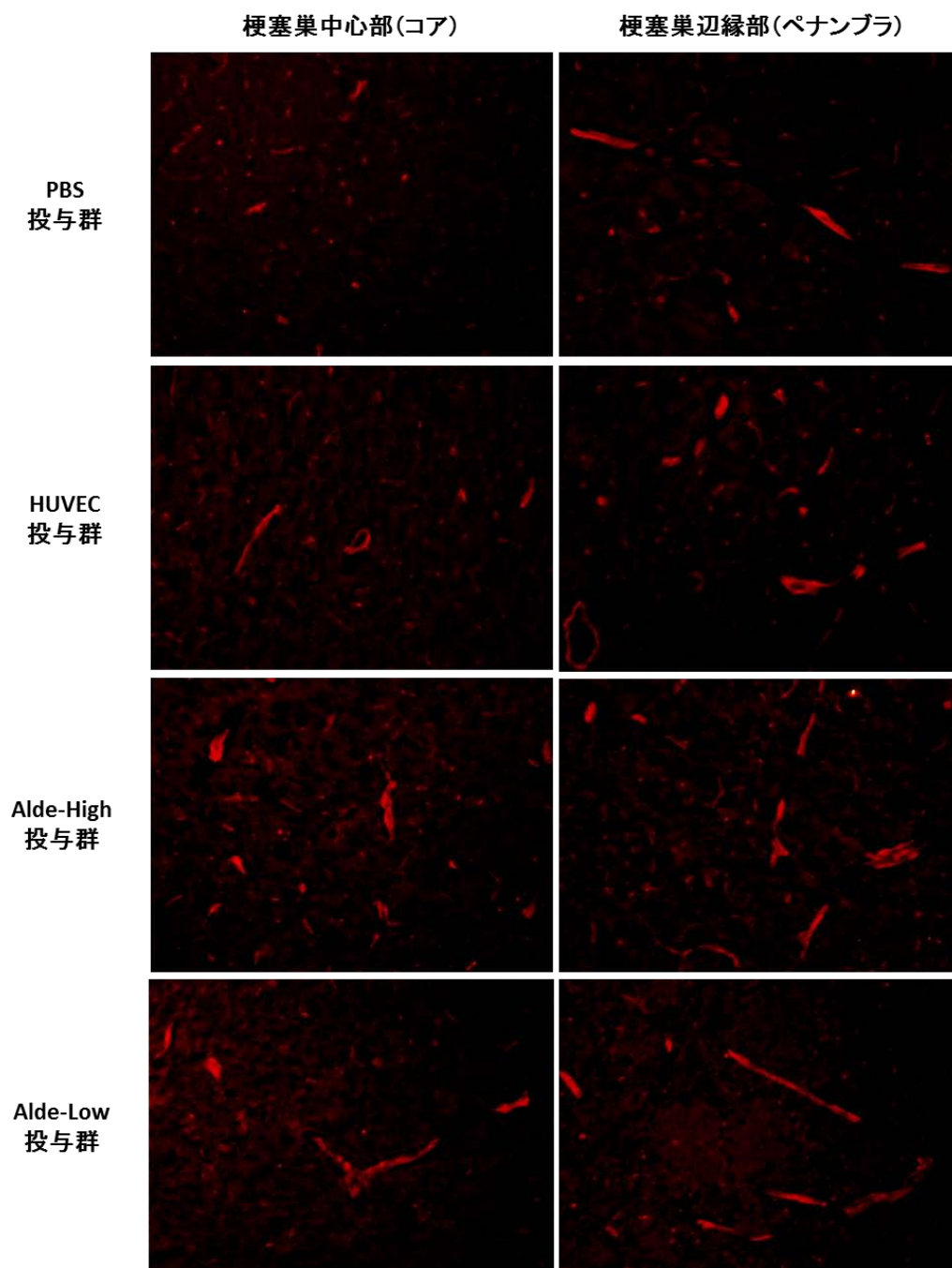


(図 19) GFP 陽性細胞の集積の定量:

投与細胞の虚血領域への集積の定量を行うと、正常側や、他の細胞を投与した群の虚血側と比較して、Alde-Low EPC 投与群で細胞の集積が多く認められ、虚血領域には Alde-Low EPC が特異的に集積することが分かった(* $P < 0.05$)。

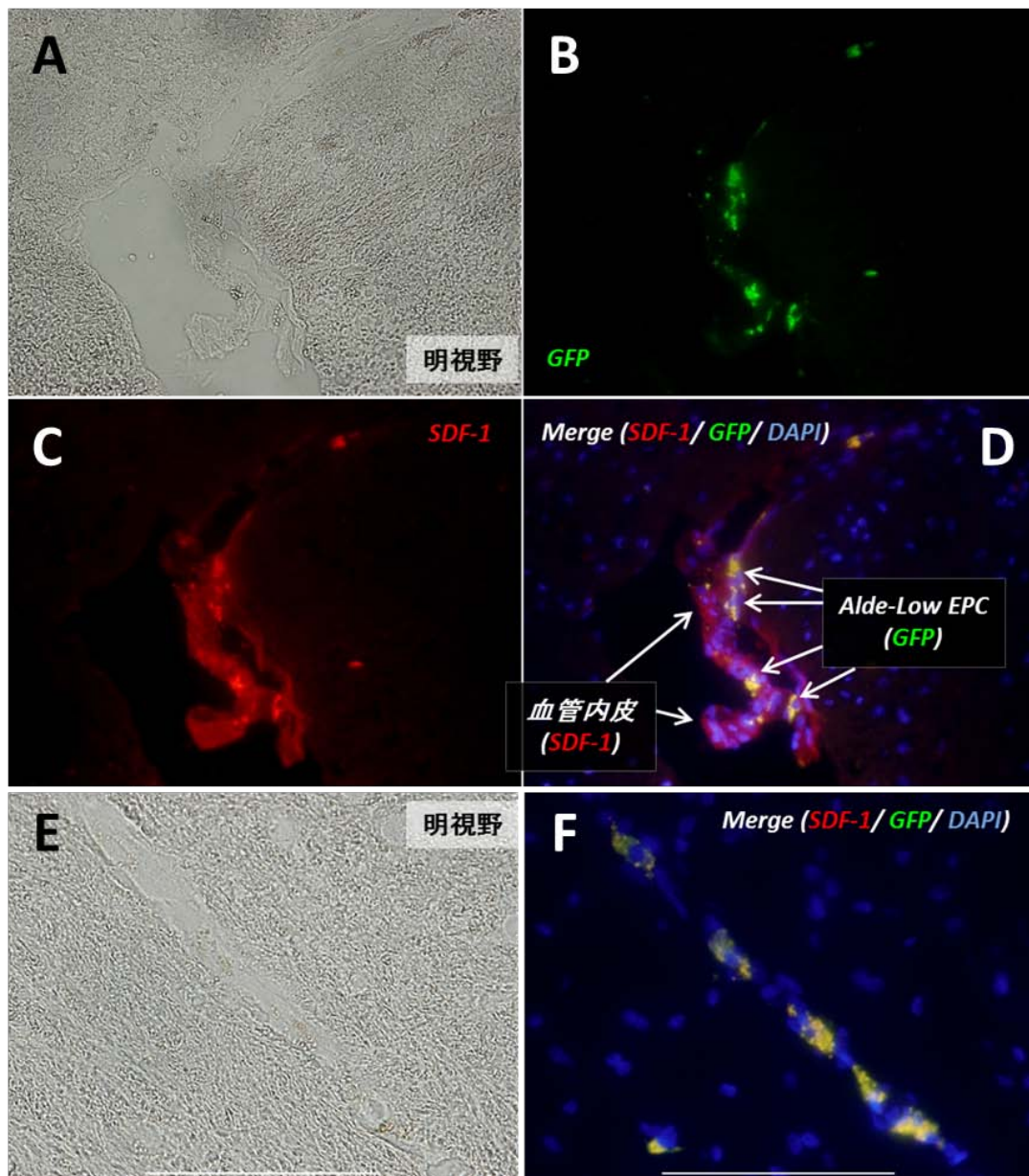
3.3.3 SDF-1/CXCR4 系と Alde-Low EPC の集積

Alde-Low EPC の虚血巣への特異的集積に対する SDF-1/CXCR4 系の関与を検討するため、まずは各投与群での線条体の虚血中心部(コア)と虚血辺縁部(ペナンプラ)における SDF-1 の発現を蛍光染色で調べた(図 20)。その結果、SDF-1 は主に血管に発現しており、その発現は投与細胞間で差を認めなかった。しかし、定量には至らなかったが、SDF-1 の発現は、虚血中心部よりも虚血辺縁部に多い傾向があった。SDF-1 の発現と GFP 陽性細胞の関係を詳細に観察すると、Alde-Low EPC 投与群でのみ、線条体の虚血辺縁部において、SDF-1 陽性の血管に GFP 陽性細胞の集積を認めた。このシリーズでは、SDF-1 の発現は線条体の虚血辺縁部のみで、しかも部分的であり、SDF-1 の発現のない血管も存在した。その周囲で GFP 陽性細胞の間質への遊走は観察できず、さらに、部分的であるが、GFP 陽性細胞自体にも SDF-1 の蛍光が観察された(図 21)。



(図 20) 梗塞巣中心部(コア)と辺縁(ペナンプラ)の SDF-1 の発現:

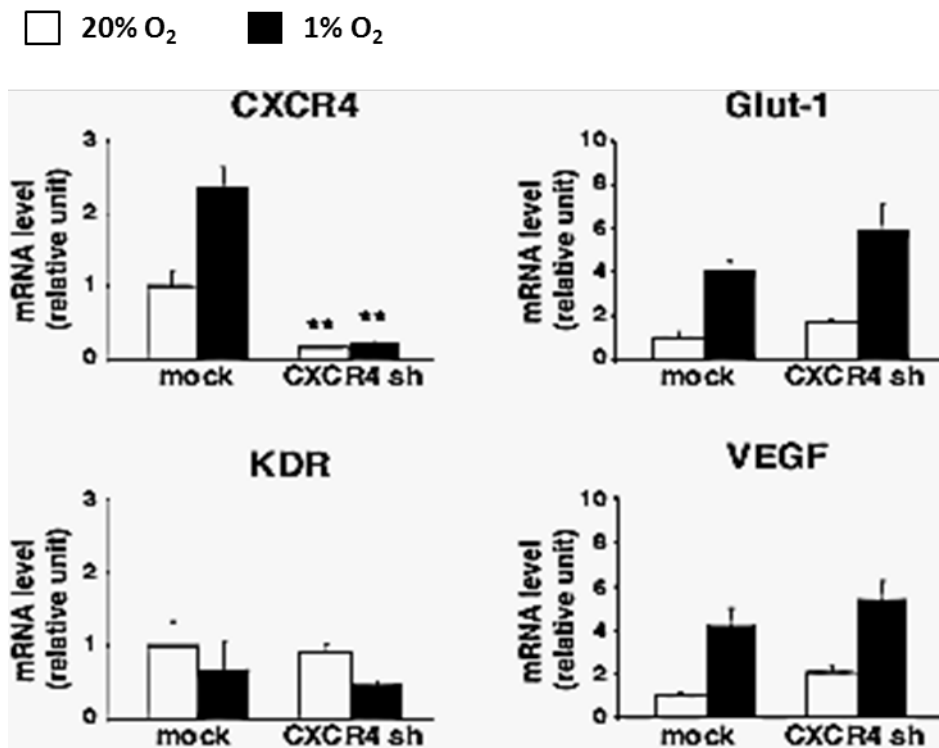
線条体の梗塞巣中心部(コア)と辺縁部(ペナンプラ)における SDF-1(赤)の発現。SDF-1 は主に血管に発現しており、その発現は投与細胞間で差を認めなかった。しかし、定量には至らなかったが、SDF-1 の発現は、虚血中心部よりも虚血辺縁部に多い傾向があった。



(図 21) 虚血部位での SDF-1 の発現と Alde-Low EPC の集積:

SDF-1 の発現と GFP 陽性細胞の関係を詳細に観察すると、Alde-Low EPC 投与群でのみ、線条体の虚血辺縁部において、SDF-1 陽性の血管に GFP 陽性細胞の集積を認めた(A: 明視野、B: GFP(緑)、C: SDF-1(赤)、D: GFP(緑)と SDF-1(赤)、DAPI(青)のマージ)。このシリーズでは、SDF-1 の発現は線条体の虚血辺縁部のみで、しかも部分的であり、SDF-1 の発現のない血管も存在した(E: 明視野、F: GFP(緑)と SDF-1(赤)、DAPI(青)のマージ)。その周囲で GFP 陽性細胞の間質への遊走は観察できず、さらに、部分的であるが、GFP 陽性細胞自体にも SDF-1 の蛍光が観察された。SDF-1 陽性の GFP 陽性細胞はマージすると黄色となる(F)。

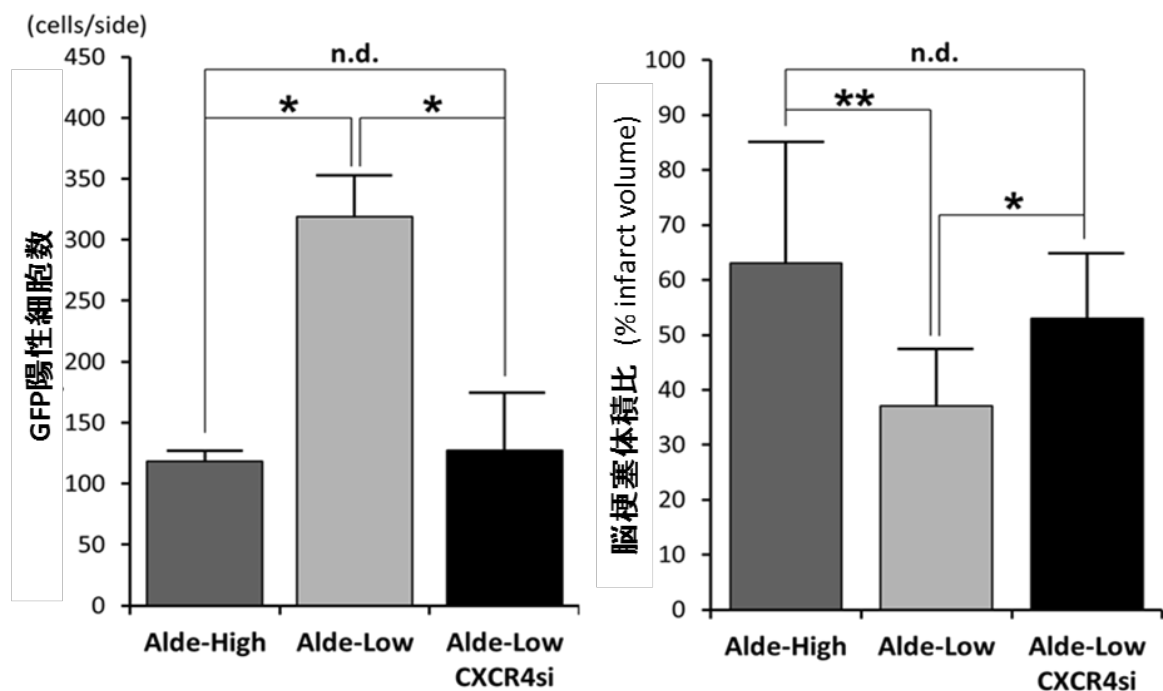
CXCR4 の発現抑制を RT-PCR(Reverse-transcription-polymerase chain reaction) で確認したところ、コントロール EPC(mock)と比較して 20%酸素下で 25%、1%酸素下で 14%に CXCR4 の発現が低下していることを確認した(図 22)。さらに、CXCR4 の発現低下によって、Glut-1(グルコトランスポーター-1)や KDR(VEGF のレセプター)、VEGF(血管内皮増殖因子)などの EPC の機能に関連する因子の発現は抑制されず、低酸素応答性にも影響が見られなかった(図 22)。



(図 22) Alde-Low EPC CXCR4si (CXCR4sh)の遺伝子発現解析:

CXCR4 の発現を低下させた Alde-Low EPC (CXCR4sh)における遺伝子解析を RT-PCR により行った。CXCR4 の発現は、コントロール EPC(mock)と比較して 20%酸素下で 25%、1%酸素下で 14%に抑制されていることを確認した(**p<0.01)。CXCR4 の発現低下によって、Glut-1(グルコトランスポーター-1)や KDR(VEGF のレセプター)、VEGF(血管内皮増殖因子)などの EPC の機能に関連する因子の発現は抑制されず、低酸素応答性にも影響が見られなかった。

さらに、Alde-Low CXCR4si の投与実験では、CXCR4 の発現抑制により、Alde-Low EPC の梗塞巣への集積能が低下したと、脳梗塞に対する治療効果が低下したことを確認した(図 23)。GFP 陽性細胞の定量では、Alde-Low EPC 投与群の梗塞側の半球あたりの細胞数が 318.7 ± 89.0 cells であるのに対し、Alde-Low EPC CXCR4si 投与群では 127.0 ± 6.1 cells で、梗塞巣への集積が有意に低下していた($p < 0.05$, $n = 3$)。GFP 陽性細胞の定量と同時に施行した蛍光染色による細胞分布の観察では、Alde-Low EPC CXCR4si の間質への遊走は認められなかった。さらに、脳梗塞体積の測定では、% infarct volume が Alde-Low EPC 投与群で $37.1 \pm 10.4\%$ だったのに対し、Alde-Low EPC CXCR4si 投与群では $53.0 \pm 11.8\%$ であり、脳梗塞抑制効果も減弱していた($p < 0.05$, $n = 3$) (図 23)。

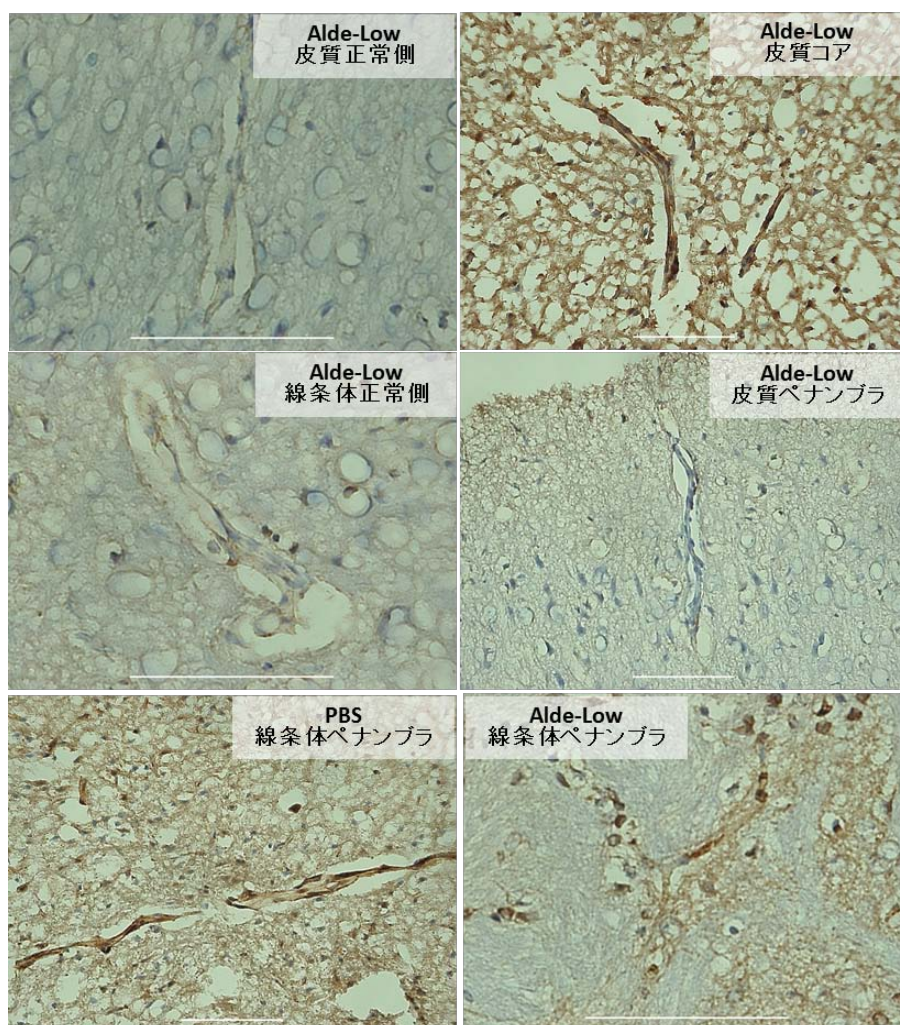


(図 23) CXCR4 の発現抑制による Alde-Low EPC の集積能力の低下:

CXCR4 の発現抑制により、Alde-Low EPC の梗塞巣への集積能力が低下し、脳梗塞に対する治療効果が低下した(* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$)。

3.3.4 Alde-Low EPC による神経保護作用の解析

Alde-Low EPC による神経保護作用に関連する因子として、eNOS に着目して、まずは概観を調査するため、免疫組織学的検討を行ったが、正常側と比較して梗塞側の血管内皮に eNOS の発現が多い傾向を認めただのみで、Alde-Low EPC 投与群に特異的な発現の分布は認められなかった(図 24)。



(図 24) eNOS の発現:

Alde-Low EPC 投与群と PBS 投与群における eNOS の免疫染色。正常側と比較して梗塞側で血管内皮に eNOS の発現が強い傾向があることは確認できたが、Alde-Low EPC に特異的な eNOS の発現や分布は認められなかった。(スケールはすべて 100 μ m)

3.4 考察

3.4.1 TTC 染色所見と病理学的所見による脳梗塞抑制効果の検討

虚血により損傷された神経細胞やアストロサイトが、どの時点でどの状況で不可逆的变化に到達するかは現在も明らかになっておらず、いわゆるペナンブラと呼ばれる可逆的な脳損傷の領域の定義も明らかになっていない[65,66,67]。

TTC 染色は、デヒドロゲナーゼ活性によるミトコンドリアの代謝を反映し、虚血 24 時間程度の染色の消失は、虚血領域と相関するといわれており[68]、脳梗塞の実験モデルにおける梗塞領域の測定に汎用されている。本研究においても、TTC 染色を用いて梗塞体積を計測し、Alde-Low EPC の脳梗塞体積抑制効果を検証した。しかし、TTC 染色が必ずしも不可逆的な神経細胞壊死(梗塞)を表していないことは、TTC 染色の問題点として以前より指摘されており[69]、今回の研究のような比較的短時間の局所脳虚血では、発症 24 時間後には TTC で染色されるが、3 日目以降に梗塞となっていく場合があることが報告されている[70]。従って、TTC 染色では治療効果を梗塞領域の測定によってある程度判定できるが、脳保護効果や治療効果を判定する実験においては、病理学的検討による長期間の観察をする必要があるとされている。同一個体においては、長期間の神経症状や脳血流など、脳梗塞体積以外のパラメータも検討する必要がある。このような遅発性脳梗塞拡大は、動物実験だけでなく臨床的にも知られている[2,71,72,73]。

梗塞巣の継時的な経過を、光顕や電顕で詳細に検討した Garcia らの研究により[2]、この神経細胞とアストロサイトの膨化は、虚血発症 0-12 時間で急速に増加し、48-72 時間後には完全に細胞が壊死に至ることが示された。この研究の大きな点は、6-12 時間で完成し、その後増加することはないと考えられていた梗塞領域が、その後も 72 時間まで徐々に増大することを示した点にあり、継時的な病理所見の解析により、虚血急性期の神経細胞やアストロサイトの膨化が必ずしも細胞死を表すのではないことを示した。今回の TTC 染色境界部分の観察では、やはり神経細胞やアストロサイトの膨化は認められるものの、壊死は軽微か認められず、このことはこの部分の神経組織が可逆的である可能性を示しており、この領域が Alde-Low EPC による治療対象となっている可能性があり、急性期に投与した EPC の治療効果を長期的に追跡する必要があると考えた。

3.4.2 GFP 導入による投与細胞への影響

GFP を導入した細胞を何回か継代培養し、細胞にウイルス由来の遺伝子を含まないことを PCR で確認した。また、EPC や HUVEC の vitro での培養や、GFP の導入によって発現する表面抗原に変化はなく、通常酸素下、低酸素下での遊走能も有しており、マウスの皮膚創部に細胞を投与する実験においても、細胞生存能力と創部への集積を確認している[34]。以上より、GFP の導入による増殖能力、遊走能、虚血治療効果への影響はほとんどないと考えている。

3.4.3 Alde-Low EPC の虚血巣への集積機序

Alde-Low EPC の特異的集積に機序については、SDF-1/CXCR4 系の働きに着目して解析した。CXCR4 は 7 回膜貫通型の G タンパク共有受容体で、EPC を含む様々な前駆細胞や幹細胞、成熟血管内皮細胞に発現することが知られている。SDF-1 はケモカインの一つで、炎症細胞の走化や接着に関与している。SDF-1 は CXCR4 に特異的に結合し、CXCR4 はほかの CXCR ファミリーと異なり、現在まで SDF-1 以外のリガンドは発見されていない[74,75,76,77,78]。SDF-1/CXCR4 系は成長発達過程で EPC の走化・遊走・分化に関与し、血管発生や血管新生を調整していると言われている[77,79,80]。加えて、SDF-1 は亜急性期や慢性期だけでなく、24 時間以内の脳梗塞急性期に虚血領域、とくにペナンブラ領域の血管内皮に発現することが報告されている[81]。本研究においても、定量はできなかったが、蛍光染色により、ペナンブラ領域に SDF-1 が強く発現していることが観察できた(図 20)。さらに、Alde-Low EPC においては、CXCR4 mRNA の発現が Alde-High EPC や HUVEC と比較して、とくに低酸素の環境で亢進していることを細胞レベルで確認している[34]。

本研究では、ラット急性期脳梗塞の虚血巣、特に線条体において、SDF-1 が血管内皮に発現していることを蛍光免疫組織学的に確認し、この血管内皮に Alde-Low EPC が集積することを観察できた(図 20, 21)。さらに、Alde-Low EPC が発現する CXCR4 を抑制することにより、CXCR4 の集積能力が減弱することを検証した。従って、SDF-1/CXCR4 系が急性期における Alde-Low EPC の虚血巣への特異的集積に強く関与していることが示唆された。今後さらに解析を進める予定である。

3.4.4 Alde-Low EPC の神経保護作用

前述のように、亜急性期や慢性期の脳梗塞に対する EPC の治療効果の報告はあるが[7]、投与 24 時間以内の急性期脳梗塞に対する EPC 治療に関する報告は少ない[29,50]。本研究では、Alde-Low EPC が投与後 24 時間以内に虚血巣に特異的に集積し、脳梗塞体積を抑制することを確認したが、発症 24 時間では血管再生は確認できなかった。

急性期脳梗塞に対する細胞治療の治療機序についての報告が散見される[29,50,51]。Ohta らは自己骨髄由来の EPC を、Fan らはヒト末梢血由来の EPC を、Iihoshi らは自己骨髄由来間葉系幹細胞を、それぞれ脳梗塞モデルに投与し、24 時間以内の急性期脳梗塞に対する治療効果を検討しているが、いずれの報告でも投与した細胞は投与後 24 時間以内に梗塞巣に集積し、何らかの液性因子を分泌し、直接あるいは間接的に神経保護作用を発揮したと考察されている。本研究の結果からは、Alde-Low EPC の急性期治療機序として、梗塞巣への特異的集積の他に、何らかの液性因子の分泌による脳保護作用を発揮していることが示唆された。細胞投与による血管新生は、少なくとも投与 3 日目以降に起こるため、急性期の治療効果は血管新生ではなく、何らかの液性因子による神経保護作用(活性酸素スカベンジング、抗アポトーシス作用、抗炎症作用などによる二次的脳損傷の抑制)によるものであろうと考察されている[82,83]。EPC が分泌する液性因子として、VEGF や eNOS、iNOS[84]、IGF-1、SDF-1[85]、HGF、G-CSF[86]などが現在までに報告されており、これらのほとんどが内皮細胞の増殖・遊走に関わっていることが分かっている。しかし、急性期における液性因子の機序についてはいまだ不明な点が多い。

これらの液性因子の中で、本研究では eNOS の急性期脳保護作用に注目した。中枢神経系において、一酸化窒素合成酵素 NOS(nitric oxide synthase)により産生される一酸化窒素 NO は脳虚血においては細胞障害性に働くが、内皮細胞由来の NO は、血管拡張作用、微小循環改善、血小板凝集抑制を介して脳保護的に働くと報告され[87,88,89]、急性期脳梗塞における eNOS の賦活は、血管拡張作用や活性酸素スカベンジング作用により脳保護的に作用すると報告されている[90,91,92,93,94]。Ohta らは、急性期脳梗塞モデルに EPC を投与し、その急性期神経保護作用を蛍光免疫組織学的に解析しているが、EPC の多くは eNOS を発現する領域に分布したが、VEGF や IGF-1 を発現する領域への EPC の分布が少なかったと報告している[29]。最近の報告では、EPC 自身が eNOS を分泌すると報告されており[84,95]、eNOS を強発現させた EPC を移植する研究も行われている[96]。このような知見より、急性期脳梗塞における eNOS の脳保護作用に注目して実験を開始した。しかし、本研究では急性期脳梗塞における eNOS の発現を観察することはできたが、その血管拡張作用や Alde-Low EPC との関係を検討するには至らなかった。今後は、細胞レベルでの Alde-Low EPC による eNOS の発現の確認や、その血管拡張作用や抗酸化作用による脳保護作用の検証を進めていく予定である。

3.5 小括・結論

本章では、Alde-Low EPC が急性期の梗塞巣に特異的に集積し、脳梗塞抑制効果を発揮することを確認した。Alde-Low EPC の梗塞巣への集積の機序については、SDF-1/CXCR4系が強く関与していることが示唆された。集積したAlde-Low EPCの神経保護作用の機序については、液性因子 eNOS に注目して実験を開始したが、今後とも解析を継続し、他の液性因子についても検討を行う。集積の機序についても、SDF-1/CXCR4系以外のパスウェイについても考察する必要があると考えている。

第 4 章 総括

脳梗塞は一度罹患すると多大な後遺障害を残し、患者本人だけでなく家族の生活も逼迫し、社会的損失も大きい。一度損傷を受けるとほとんど再生しない脳組織において、脳梗塞後遺症は急性期での脳損傷の程度により規定されるが、急性期脳梗塞に至っては有効な治療法は少なく、その効果や治療可能時間帯も限られているのが現状である。再生医療は、脳梗塞に対する新規治療法として期待されており、動物実験のデータが集約され、一部では臨床応用も開始されているが、どの細胞をどのように投与するのが最も効果的・効率的で安全かは、他の疾患に対する再生医療と同様、はっきりと分かっていない。

本研究では、本学で新規に開発した虚血に対する治療効果の高い血管内皮細胞 (Alde-Low EPC) を、ラット脳梗塞モデルに投与する実験を行った。その結果明らかになったのは、

- ① Alde-Low EPC の投与は急性期脳梗塞において脳梗塞体積を抑制する。
- ② 投与した Alde-Low EPC は脳梗塞急性期に虚血巣に集積し治療効果を発揮する。
- ③ Alde-Low EPC の虚血巣への集積には、SDF-1/CXCR4 系が強く関与する。

の 3 点であり、Alde-Low EPC の治療効果やその機序を解析するにはさらなる研究の継続が必要と考えられるが、投与した細胞が急性期においても投与後 24 時間という

短期間に梗塞巣に集積し、血管を構築する前に治療効果を発揮することが確認できたことは、今後の脳梗塞に対する再生医療の研究の一端に寄与できたのではないかと考える。また、血管内皮前駆細胞の脳梗塞に対する治療因子を検討することは、必ずしも血管内皮前駆細胞の投与を必要としない脳梗塞治療法の新規開発(サイトカイン療法など)にも寄与できるものと考えている。

参考文献

- [1] G.A. Donnan, M. Fisher, M. Macleod, S.M. Davis, *Stroke*, *Lancet* 371 (2008) 1612-1623.
- [2] J.H. Garcia, Y. Yoshida, H. Chen, Y. Li, Z.G. Zhang, J. Lian, S. Chen, M. Chopp, Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat, *Am. J. Pathol.* 142 (1993) 623-635.
- [3] T. Yamaguchi, E. Mori, K. Minematsu, J. Nakagawara, K. Hashi, I. Saito, Y. Shinohara, Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT), *Stroke* 37 (2006) 1810-1815.
- [4] Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, *N. Engl. J. Med.* 333 (1995) 1581-1587.
- [5] Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters, *Cerebrovasc. Dis.* 15 (2003) 222-229.
- [6] Y. Shinohara, I. Saito, S. Kobayashi, S. Uchiyama, Edaravone (radical scavenger) versus sodium ozagrel (antiplatelet agent) in acute noncardioembolic ischemic stroke (EDO trial), *Cerebrovasc. Dis.* 27 (2009) 485-492.
- [7] T. Bliss, R. Guzman, M. Daadi, G.K. Steinberg, Cell transplantation therapy for stroke, *Stroke* 38 (2007) 817-826.
- [8] N. Oyamada, H. Itoh, M. Sone, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, D. Taura, M. Inuzuka, T. Sonoyama, H. Tsujimoto, Y. Fukunaga, N. Tamura, K. Nakao, Transplantation of vascular cells derived from human embryonic stem cells

- contributes to vascular regeneration after stroke in mice, *J. Transl. Med.* 6 (2008) 54.
- [9] S.J. Chen, C.M. Chang, S.K. Tsai, Y.L. Chang, S.J. Chou, S.S. Huang, L.K. Tai, Y.C. Chen, H.H. Ku, H.Y. Li, S.H. Chiou, Functional Improvement of Focal Cerebral Ischemia Injury by Subdural Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cells with Fibrin Glue, *Stem Cells Dev.* (2010).
- [10] M. Modo, R.P. Stroemer, E. Tang, S. Patel, H. Hodges, Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage, *Stroke* 33 (2002) 2270-2278.
- [11] Z.G. Zhang, Q. Jiang, R. Zhang, L. Zhang, L. Wang, P. Arniego, K.L. Ho, M. Chopp, Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat, *Ann. Neurol.* 53 (2003) 259-263.
- [12] S. Kelly, T.M. Bliss, A.K. Shah, G.H. Sun, M. Ma, W.C. Foo, J. Masel, M.A. Yenari, I.L. Weissman, N. Uchida, T. Palmer, G.K. Steinberg, Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 11839-11844.
- [13] S. Ishibashi, M. Sakaguchi, T. Kuroiwa, M. Yamasaki, Y. Kanemura, I. Shizuko, T. Shimazaki, M. Onodera, H. Okano, H. Mizusawa, Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils, *J. Neurosci. Res.* 78 (2004) 215-223.
- [14] Y. Takagi, M. Nishimura, A. Morizane, J. Takahashi, K. Nozaki, J. Hayashi, N. Hashimoto, Survival and differentiation of neural progenitor cells derived from embryonic stem cells and transplanted into ischemic brain, *J. Neurosurg.* 103 (2005) 304-310.

- [15] D. Kondziolka, L. Wechsler, S. Goldstein, C. Meltzer, K.R. Thulborn, J. Gebel, P. Jannetta, S. DeCesare, E.M. Elder, M. McGrogan, M.A. Reitman, L. Bynum, Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke, *Neurology* 55 (2000) 565-569.
- [16] C.C. Meltzer, D. Kondziolka, V.L. Villemagne, L. Wechsler, S. Goldstein, K.R. Thulborn, J. Gebel, E.M. Elder, S. DeCesare, A. Jacobs, Serial [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke, *Neurosurgery* 49 (2001) 586-591; discussion 591-582.
- [17] P.T. Nelson, D. Kondziolka, L. Wechsler, S. Goldstein, J. Gebel, S. DeCesare, E.M. Elder, P.J. Zhang, A. Jacobs, M. McGrogan, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 1201-1206.
- [18] O. Honmou, K. Houkin, T. Matsunaga, Y. Niitsu, S. Ishiai, R. Onodera, S.G. Waxman, J.D. Kocsis, Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke, *Brain* 134 (2011) 1790-1807.
- [19] K. Miki, S. Ishibashi, H. Mizusawa, Regeneration therapy for ischemic stroke using neural stem cell transplantation, *Nihon Rinsho* 64 Suppl 7 (2006) 660-663.
- [20] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, J.M. Isner, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275 (1997) 964-967.
- [21] T. Asahara, Endothelial progenitor cells for vascular medicine, *Yakugaku zasshi* 127 (2007) 841-845.
- [22] S. Murasawa, T. Asahara, Endothelial progenitor cells for vasculogenesis, *Physiology* 20 (2005) 36-42.

- [23] S. Rafii, D. Lyden, Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration, *Nat. Med.* 9 (2003) 702-712.
- [24] R.P. Rouhl, R.J. van Oostenbrugge, J. Damoiseaux, J.W. Cohen Tervaert, J. Lodder, Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts, *Stroke* 39 (2008) 2158-2165.
- [25] D.A. Ingram, N.M. Caplice, M.C. Yoder, Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells, *Blood* 106 (2005) 1525-1531.
- [26] U.M. Gehling, S. Ergun, U. Schumacher, C. Wagener, K. Pantel, M. Otte, G. Schuch, P. Schafhausen, T. Mende, N. Kilic, K. Kluge, B. Schafer, D.K. Hossfeld, W. Fiedler, In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells, *Blood* 95 (2000) 3106-3112.
- [27] M. Peichev, A.J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W.J. Lane, M. Williams, M.C. Oz, D.J. Hicklin, L. Witte, M.A. Moore, S. Rafii, Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors, *Blood* 95 (2000) 952-958.
- [28] M. Boyer, L.E. Townsend, L.M. Vogel, J. Falk, D. Reitz-Vick, K.T. Trevor, M. Villalba, P.J. Bendick, J.L. Glover, Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood, *J. Vasc. Surg.* 31 (2000) 181-189.
- [29] T. Ohta, K. Kikuta, H. Imamura, Y. Takagi, M. Nishimura, Y. Arakawa, N. Hashimoto, K. Nozaki, Administration of ex vivo-expanded bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, *Neurosurgery* 59 (2006) 679-686; discussion 679-686.
- [30] K.R. Brunt, S.R. Hall, C.A. Ward, L.G. Melo, Endothelial progenitor cell and

- mesenchymal stem cell isolation, characterization, viral transduction, *Methods Mol. Med.* 139 (2007) 197-210.
- [31] T. Murohara, Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis, *J. Cardiol.* 53 (2009) 155-163.
- [32] S. Xue, H.T. Zhang, P. Zhang, J. Luo, Z.Z. Chen, X.D. Jang, R.X. Xu, Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury, *Neurosci. Lett.* 473 (2010) 186-191.
- [33] K. Yamahara, M. Sone, H. Itoh, J.K. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, K. Homma, T.H. Chao, K. Miyashita, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, Y. Fukunaga, N. Tamura, K. Nakao, Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells, *PLoS One* 3 (2008) e1666.
- [34] M. Nagano, T. Yamashita, H. Hamada, K. Ohneda, K. Kimura, T. Nakagawa, M. Shibuya, H. Yoshikawa, O. Ohneda, Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood, *Blood* 110 (2007) 151-160.
- [35] D.A. Ingram, L.E. Mead, H. Tanaka, V. Meade, A. Fenoglio, K. Mortell, K. Pollok, M.J. Ferkowicz, D. Gilley, M.C. Yoder, Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood, *Blood* 104 (2004) 2752-2760.
- [36] R.W. Storms, A.P. Trujillo, J.B. Springer, L. Shah, O.M. Colvin, S.M. Ludeman, C. Smith, Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 9118-9123.

- [37] J.E. Russo, J. Hilton, Characterization of cytosolic aldehyde dehydrogenase from cyclophosphamide resistant L1210 cells, *Cancer Res.* 48 (1988) 2963-2968.
- [38] J. Labrecque, P.V. Bhat, A. Lacroix, Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid, *Biochem. Cell. Biol.* 71 (1993) 85-89.
- [39] J.E. Russo, J. Hilton, O.M. Colvin, The role of aldehyde dehydrogenase isozymes in cellular resistance to the alkylating agent cyclophosphamide, *Prog. Clin. Biol. Res.* 290 (1989) 65-79.
- [40] M.B. Kastan, E. Schlaffer, J.E. Russo, O.M. Colvin, C.I. Civin, J. Hilton, Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells, *Blood* 75 (1990) 1947-1950.
- [41] R.J. Jones, J.P. Barber, M.S. Vala, M.I. Collector, S.H. Kaufmann, S.M. Ludeman, O.M. Colvin, J. Hilton, Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells, *Blood* 85 (1995) 2742-2746.
- [42] D.A. Ingram, L.E. Mead, D.B. Moore, W. Woodard, A. Fenoglio, M.C. Yoder, Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells, *Blood* 105 (2005) 2783-2786.
- [43] N. Kato, K. Yanaka, K. Hyodo, K. Homma, S. Nagase, T. Nose, Stable nitroxide Tempol ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischemia, *Brain Res.* 979 (2003) 188-193.
- [44] J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa, Experimental studies of ischemic brain edema, 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area, *Jap. J. Stroke* 8 (1986) 1-8.
- [45] J.B. Bederson, L.H. Pitts, M. Tsuji, M.C. Nishimura, R.L. Davis, H. Bartkowski,

- Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination, *Stroke* 17 (1986) 472-476.
- [46] E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, *Stroke* 20 (1989) 84-91.
- [47] M. Hristov, W. Erl, P.C. Weber, Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1185-1189.
- [48] D.E. Kim, D. Schellingerhout, K. Ishii, K. Shah, R. Weissleder, Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model, *Stroke* 35 (2004) 952-957.
- [49] C.V. Borlongan, A. Evans, G. Yu, D.C. Hess, Limitations of intravenous human bone marrow CD133+ cell grafts in stroke rats, *Brain Res.* 1048 (2005) 116-122.
- [50] Y. Fan, F. Shen, T. Frenzel, W. Zhu, J. Ye, J. Liu, Y. Chen, H. Su, W.L. Young, G.Y. Yang, Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice, *Ann. Neurol.* 67 (2010) 488-497.
- [51] S. Iihoshi, O. Honmou, K. Houkin, K. Hashi, J.D. Kocsis, A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats, *Brain Res.* 1007 (2004) 1-9.
- [52] H. Kawada, S. Takizawa, T. Takanashi, Y. Morita, J. Fujita, K. Fukuda, S. Takagi, H. Okano, K. Ando, T. Hotta, Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells, *Circulation* 113 (2006) 701-710.
- [53] S. Takizawa, Hematopoietic cytokine therapy for cerebral infarction, *Nihon Rinsho* 64 Suppl 7 (2006) 667-671.
- [54] S. Shintani, T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, K. Sasaki, J. Duan, T. Imaizumi,

Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation, *Circulation* 103 (2001) 897-903.

- [55] H. Memezawa, M.L. Smith, B.K. Siesjo, Penumbral tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats, *Stroke* 23 (1992) 552-559.
- [56] H. Memezawa, H. Minamisawa, M.L. Smith, B.K. Siesjo, Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat, *Exp. Brain Res.* 89 (1992) 67-78.
- [57] B.C. White, J.M. Sullivan, D.J. DeGracia, B.J. O'Neil, R.W. Neumar, L.I. Grossman, J.A. Rafols, G.S. Krause, Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury, *J. Neurol. Sci.* 179 (2000) 1-33.
- [58] Y. Mao, G.Y. Yang, L.F. Zhou, J.D. Stern, A.L. Betz, Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion, *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 63 (1999) 366-370.
- [59] T. Matsui, T. Nagafuji, T. Mori, T. Asano, N omega-nitro-L-arginine attenuates early ischemic neuronal damage of prolonged focal cerebral ischemia and recirculation in rats, *Neurol. Res.* 19 (1997) 192-203.
- [60] J. Aronowski, R. Strong, J.C. Grotta, Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 1048-1056.
- [61] B. Kaplan, S. Brint, J. Tanabe, M. Jacewicz, X.J. Wang, W. Pulsinelli, Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia, *Stroke* 22 (1991) 1032-1039.
- [62] K.L. Schaar, M.M. Brenneman, S.I. Savitz, Functional assessments in the rodent

- stroke model, *Exp. Transl. Stroke Med.* 2 (2010) 13.
- [63] S.H. Lim, J.S. Lee, J.I. Lee, S. Im, Y.J. Ko, H.W. Kim, The quantitative assessment of functional impairment and its correlation to infarct volume in rats with transient middle cerebral artery occlusion, *Brain Res.* 1230 (2008) 303-309.
- [64] K.A. Osborne, T. Shigeno, A.M. Balarsky, I. Ford, J. McCulloch, G.M. Teasdale, D.I. Graham, Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 50 (1987) 402-410.
- [65] P. Lipton, Ischemic cell death in brain neurons, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1431-1568.
- [66] K.F. Liu, F. Li, T. Tatlisumak, J.H. Garcia, C.H. Sotak, M. Fisher, J.D. Fenstermacher, Regional variations in the apparent diffusion coefficient and the intracellular distribution of water in rat brain during acute focal ischemia, *Stroke* 32 (2001) 1897-1905.
- [67] L.J. Martin, Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review), *Int. J. Mol. Med.* 7 (2001) 455-478.
- [68] K. Isayama, L.H. Pitts, M.C. Nishimura, Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts, *Stroke* 22 (1991) 1394-1398.
- [69] T.M. Liszczak, E.T. Hedley-Whyte, J.F. Adams, D.H. Han, V.S. Kolluri, F.X. Vacanti, R.C. Heros, N.T. Zervas, Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain, *Acta Neuropathol.* 65 (1984) 150-157.
- [70] C. Du, R. Hu, C.A. Csernansky, C.Y. Hsu, D.W. Choi, Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis?, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16 (1996) 195-201.
- [71] C. Beaulieu, A. de Crespigny, D.C. Tong, M.E. Moseley, G.W. Albers, M.P. Marks, Longitudinal magnetic resonance imaging study of perfusion and diffusion in

- stroke: evolution of lesion volume and correlation with clinical outcome, *Ann. Neurol.* 46 (1999) 568-578.
- [72] T. Matsui, T. Mori, N. Tateishi, Y. Kagamiishi, S. Satoh, N. Katsube, E. Morikawa, T. Morimoto, F. Ikuta, T. Asano, Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: enhanced astrocytic synthesis of s-100beta in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (2002) 711-722.
- [73] R.L. Zhang, M. Chopp, H. Chen, J.H. Garcia, Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat, *J. Neurol. Sci.* 125 (1994) 3-10.
- [74] A. Bagri, T. Gurney, X. He, Y.R. Zou, D.R. Littman, M. Tessier-Lavigne, S.J. Pleasure, The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells, *Development* 129 (2002) 4249-4260.
- [75] A.F. Schier, Chemokine signaling: rules of attraction, *Curr. Biol.* 13 (2003) R192-194.
- [76] R. Horuk, Chemokine receptors, *Cytokine Growth Factor Rev.* 12 (2001) 313-335.
- [77] T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, T. Kishimoto, Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1, *Nature* 382 (1996) 635-638.
- [78] W. Lu, J.A. Gersting, A. Maheshwari, R.D. Christensen, D.A. Calhoun, Developmental expression of chemokine receptor genes in the human fetus, *Early Hum. Dev.* 81 (2005) 489-496.

- [79] T. Nagasawa, K. Tachibana, T. Kishimoto, A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection, *Semin. Immunol.* 10 (1998) 179-185.
- [80] T. Ara, M. Itoi, K. Kawabata, T. Egawa, K. Tokoyoda, T. Sugiyama, N. Fujii, T. Amagai, T. Nagasawa, A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo, *J. Immunol.* 170 (2003) 4649-4655.
- [81] W.D. Hill, D.C. Hess, A. Martin-Studdard, J.J. Carothers, J. Zheng, D. Hale, M. Maeda, S.C. Fagan, J.E. Carroll, S.J. Conway, SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63 (2004) 84-96.
- [82] M. Hirouchi, Y. Ukai, Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia, *Nihon Yakurigaku Zasshi* 120 (2002) 107-113.
- [83] X.Y. He, Z.Z. Chen, Y.Q. Cai, G. Xu, J.H. Shang, S.B. Kou, M. Li, H.T. Zhang, C.Z. Duan, S.Z. Zhang, Y.Q. Ke, Y.J. Zeng, R.X. Xu, X.D. Jiang, Expression of cytokines in rat brain with focal cerebral ischemia after grafting with bone marrow stromal cells and endothelial progenitor cells, *Cytotherapy* 13 (2011) 46-53.
- [84] M. Ii, H. Nishimura, A. Iwakura, A. Wecker, E. Eaton, T. Asahara, D.W. Losordo, Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity, *Circulation* 111 (2005) 1114-1120.
- [85] C. Urbich, A. Aicher, C. Heeschen, E. Dernbach, W.K. Hofmann, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells, *J. Mol. Cell.*

- Cardiol. 39 (2005) 733-742.
- [86] J. Rehman, J. Li, C.M. Orschell, K.L. March, Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors, *Circulation* 107 (2003) 1164-1169.
- [87] M.W. Radomski, R.M. Palmer, S. Moncada, Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets, *Br. J. Pharmacol.* 101 (1990) 325-328.
- [88] E. Morikawa, M.A. Moskowitz, Z. Huang, T. Yoshida, K. Irikura, T. Dalkara, L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat, *Stroke* 25 (1994) 429-435.
- [89] M. Huang, R.D. Manning, Jr., M.H. LeBlanc, R.L. Hester, Overall hemodynamic studies after the chronic inhibition of endothelial-derived nitric oxide in rats, *Am. J. Hypertens.* 8 (1995) 358-364.
- [90] C. Iadecola, F. Zhang, R. Casey, M. Nagayama, M.E. Ross, Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene, *J. Neurosci.* 17 (1997) 9157-9164.
- [91] C. Iadecola, F. Zhang, S. Xu, R. Casey, M.E. Ross, Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15 (1995) 378-384.
- [92] T. Nagafuji, M. Sugiyama, T. Matsui, Temporal profiles of Ca²⁺/calmodulin-dependent and -independent nitric oxide synthase activity in the rat brain microvessels following cerebral ischemia, *Acta Neurochir. Suppl. (Wien).* 60 (1994) 285-288.

- [93] J.S. Beckman, Y.Z. Ye, J. Chen, K.A. Conger, The interactions of nitric oxide with oxygen radicals and scavengers in cerebral ischemic injury, *Adv. Neurol.* 71 (1996) 339-350; discussion 350-334.
- [94] S. Murphy, Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS, *Glia* 29 (2000) 1-13.
- [95] M. Hristov, C. Weber, Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance, *J. Cell. Mol. Med.* 8 (2004) 498-508.
- [96] D. Kong, L.G. Melo, A.A. Mangi, L. Zhang, M. Lopez-Illasaca, M.A. Perrella, C.C. Liew, R.E. Pratt, V.J. Dzau, Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells, *Circulation* 109 (2004) 1769-1775.

謝辞

本研究をするにあたり、御指導、御協力いただきました皆様に深く御礼を申し上げます。

筑波大学脳神経外科 松村明教授

筑波大学脳神経外科 高野晋吾准教授

筑波大学脳神経外科 鶴嶋英夫准教授

筑波大学脳神経外科 丸島愛樹先生

筑波大学再生医学幹細胞生物学 大根田修教授

筑波大学再生医学幹細胞生物学 山下年晴先生

筑波大学再生医学幹細胞生物学 長野真澄先生

獨協医科大学越谷病院脳神経外科 鈴木謙介准教授