

【報告様式A】

日本医療研究開発機構
再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）脳梗塞に対する造血幹細胞を使った細胞治療の作用機序に基づく最適化
（英語）Study to clarify the mechanism of neurological functional recovery by
hematopoietic stem cell transplantation

研究開発実施期間：令和 2 年 4 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日(予定)

研究開発代表者 氏名：（日本語）田口 明彦
（英語）Taguchi Akihiko

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）神戸医療産業都市推進機構・脳循環代謝研究部・部長
（英語）Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe・Department of Regenerative
Medicine・Professor

II 研究開発の概要

研究目的：脳梗塞患者への幹細胞治療に関する、リバーストランシヨレーショナル研究

世界的に社会の高齢化に伴い脳梗塞や認知症など、脳障害による要介護者は激増している。特に高齢化が著しい日本においては、現状のままでは、社会構造の崩壊に繋がる可能性が高いと指摘されており、障害された脳神経機能の再生を可能とする新規治療法の開発が切望されている。脳梗塞患者に対しては、造血幹細胞や間葉系幹細胞などを用いた幹細胞治療が試みられているが、その作用メカニズムには不明な点が多く、治療効果が示せない臨床試験も続出している。そこで本研究では、脳梗塞に対する幹細胞を用いた再生医療の有効性及び確実性を高めるため、血管再生や脳神経機能再生に広く臨床応用されている造血幹細胞移植に関して、①詳細な作用メカニズムの解明、②主要な効果阻害因子の同定、③脳血管再生と脳神経機能再生の関連の解明、④投与幹細胞の機能向上、に関するリバーストランシヨレーショナル研究を行なった。

研究成果 1：脳梗塞患者に対する造血幹細胞移植治療の詳細な脳血管再生促進作用メカニズムの解明

研究開発代表者らは、造血幹細胞による血管再生促進に関する基本作用メカニズムがギャップ結合を介する直接的な作用世であることを世界に先駆けて発見・発表してきた(Stroke 2020)。本研究では、その詳細な作用メカニズムの研究を進め、その結果、血管内に投与した造血幹細胞の作用の発揮には、①ローリング[造血幹細胞(Sialyl Lewis X)、血管内皮細胞(セレクチン)]、②細胞接着[造血幹細胞(細胞接着因子 A)、血管内皮細胞(細胞接着因子 B)]、③ギャップ結合を介したメタボライト等の移動、④細胞接着を介した細胞間シグナル[造血幹細胞(リガンド A)、血管内皮細胞(レセプター B)]、⑤分泌サイトカインを介した作用が、重要であることを発見した(投稿準備中)。また、ギャップ結合を介したメタボライト等の移動に関しては、当初想定していた解糖系基質と共に、多くのアミノ酸もギャップ結合を介して濃度勾配に従い幹細胞から血管内皮細胞に供与されていることを明らかにした(Cell Transplant. 2022)。

研究成果 2：脳梗塞患者に対する間葉系幹細胞移植治療の再生促進作用メカニズムの解明(評価者からの追加研究指示課題)

脳梗塞患者に対しては間葉系幹細胞移植治療の臨床試験も多く行われている。しかし、基本的な作用メカニズムが不明であるため、投与幹細胞の細胞規格設定や治療プロトコールの最適化が不十分であり、治療効果が示せない臨床試験が続出している。研究開発代表者らは、間葉系幹細胞治療の基本メカニズムが、造血幹細胞と同様に細胞投与直後のギャップ結合を介した細胞-細胞相互作用であることを世界に先駆けて発見報告した(Stem Cells. 2021)。造血幹細胞と間葉系幹細胞の相違点に関しては、造血幹細胞は解糖系基質を障害細胞に供与することにより、障害細胞の再生開始のスイッチを入れるのに対し、間葉系幹細胞は解糖系基質を過剰に活性化した細胞から吸収することにより、過剰に活性化した細胞の安定化や過剰な免疫反応の抑制をもたらすこと、が判明した。

研究成果 3：主要な効果阻害因子の同定

研究開発代表者らは、幹細胞懸濁液に混入する凝血塊由来物質の混入が治療効果を阻害することを既に報告していたが(Stroke 2019)、本研究においては、造血幹細胞上に発現している細胞接着因子 A の不活性化が、治療効果を著しく阻害することを発見した。また、細胞接着因子 A は投与幹細胞の細胞規格の設定には必須であり、投与幹細胞の機能向上における重要な因子であることが判明した。

研究成果 4：脳血管再生と脳神経機能再生の関連の解明

本研究では、①幹細胞による脳血管再生を介した脳神経機能再生促進作用、および、②投与幹細胞による直接的な脳神経機能再生促進作用、の二つの観点からの研究を行なった。幹細胞による脳血管再生においては、ギャップ結合を介したメタボライト供与による低酸素誘導因子 1 α (HIF1 α) 活性化および細胞間シグナルによる、脳

血管新生促進・脳血流改善効果と考えられた。また、投与幹細胞による直接的な脳神経機能再生促進作用に関しては、投与幹細胞の一部が脳血液関門を越えて GFAP 陽性アストロサイトや Nestin 陽性神経幹細胞などの神経系細胞に直接的に接触していることが明らかになった(投稿中)。

研究成果 5：投与幹細胞の機能向上

本研究において、造血幹細胞上に発現している細胞接着因子 A が、投与造血幹細胞の再生促進作用に非常に重要であることが判明している。そこで、細胞接着因子 A の発現増強作用を有する低分子化合物 X を造血幹細胞に作用させ、細胞接着因子 A の発現上昇および幹細胞の機能変化の評価を行った。その結果、①低分子化合物 X は造血幹細胞(CD34 陽性細胞)において活性型細胞接着因子 A の発現を上昇させること、②低分子化合物 X は骨髄由来造血幹細胞に混入する顆粒球細胞の活性型細胞接着因子 A の発現は上昇しないこと、③血管内皮細胞における VEGF 取込促進作用を検証する *in vitro* アッセイ系において、低分子化合物 X を作用させることにより造血幹細胞の再生促進作用が上昇すること、が判明した。本研究の結果は、解明された作用機序を応用することにより、幹細胞を用いた再生医療の効果を向上させることができることを示唆しており、本研究終了後も引き続き研究開発を進めていく予定である。

研究の意義 1：脳梗塞に対する幹細胞を用いた再生医療の有効性及び確実性の向上

脳梗塞に対する間葉系幹細胞を使った臨床試験においても、作用機序に基づき最適化されていない幹細胞治療では有意な治療効果がないことが、続々と報告されている。本研究において、造血幹細胞および間葉系幹細胞の脳神経機能再生メカニズムの共通点および相違点が明らかになったことより、今後は脳梗塞に対する再生医療の有効性及び確実性の向上が期待できる。

研究の意義 2：研究成果の認知症再生医療開発への発展

本研究において、投与した造血幹細胞は血液脳関門を越えて、GFAP 陽性アストロサイトや Nestin 陽性神経幹細胞にも直接接触していることが判明した。研究開発代表者らは、高齢認知症患者のモデルマウスである単純加齢マウスに対する造血幹細胞移植治療が、①海馬神経再生を活性化すること、②新規記憶などの認知機能の再生を促進することを、発見報告しており (Front Aging Neurosci. 2020 および 2022)、脳梗塞患者だけではなく、海馬神経再生が低下し新規記憶能が障害された認知症患者に対する全く新しい治療法の開発にも、本研究の成果が応用・発展できることが明らかとなった。

Purpose: Reverse translational research of stem cell therapy for patients with cerebral infarction.

Stem cell therapies using hematopoietic stem cell (HSC) and mesenchymal stem cell (MSC) have been tried for patients with cerebral infarction, but its mechanism of action remains unclear and a number of clinical trials have failed to show its therapeutic effects. The purpose of this study is to (1) clarify the detailed mechanisms of action of stem cell therapies, (2) identify major inhibitory factors, (3) clarify the relationship between cerebrovascular regeneration and neuronal regeneration, (4) improve the function of administered stem cells, and (5) improve the efficacy and certainty of stem cell therapy for cerebral infarction.

Result 1: Elucidation of the detailed mechanisms of HSC transplantation therapy for stroke.

We have found that the basic mechanism of action of HSC about promoting cerebral angiogenesis is a direct cell-cell interaction via gap junction (Stroke 2020). In this study, we have found that intra-vascular HSC transplantation exert its effect through (1) rolling, (2) cell adhesion, (3) gap junctions, (4) intercellular signaling and (5) secreted cytokines.

Result 2: Elucidation of the mechanism of action of MSC transplantation therapy for stroke.

Clinical trials of MSC transplantation therapy have been tried for stroke patients. However, basic mechanism of action had been unknown and a number of clinical trials have failed to show its therapeutic effect. We have found that the basic mechanism of action of MSC is also a direct cell-cell interaction via gap junction (Stem Cells. 2021). While HSC provides metabolites to injured cell via gap junction, MSC removes metabolites from over-activated cell resulting in stabilization of over-activated cells and releasing of excessive immune responses.

Result 3: Identification of key inhibitors.

We had reported that the contamination of clot-derived substances in stem cell suspensions inhibits therapeutic efficacy (Stroke 2019). In this study, we found that inactivation of cell adhesion factor A significantly inhibited therapeutic effect of HSC transplantation.

Result 4: Elucidation of the relationship between stem cell transplantation and regeneration of neuronal function.

We found that transplanted HSC has a potential to cross blood brain barrier and directly contact to neural cells, such as GFAP-positive astrocytes and Nestin-positive neural stem cells.

Results 5: Improvement of the function of HSC for accelerating regeneration.

We found cell adhesion of transplanted HSC to injured endothelium has a critical role in its mode of action. We enhanced the expression of the cell adhesion molecule with low-molecular-weight compound X and found that treatment HSC with compound X significantly improves the function of HSC for accelerating angiogenesis in vitro.

Significance of this study 1: Improvement of efficacy and certainty of stem cell therapy for stroke

Our findings about basic mechanism of action of stem cell therapies provide significant scientific background to future clinical trials for stroke using HSC and MSC.

Significance of this study 2: Contribution to the development of regenerative medicine for dementia

In this study, we found that the intravascularly transplanted HSC has the potential to cross blood-brain barrier and directly contacted Nestin-positive neuronal stem cells. Combined with our recent finding that activation of Nestin-positive neuronal stem cells is one of the major therapeutic targets of dementia (Front Aging Neurosci. 2020 and 2022), our results in this study indicated that HSC therapy can be a novel therapy for dementia in elderly.