

保護的末梢血単核球移植による脳梗塞に対する機能回復促進療法

畠山公大

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻
分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：小野寺 理教授)

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町
通 1-757 新潟大学脳研究所神経内科学教室
内 畠山公大

Cell transplantation using protective
peripheral blood mononuclear cells against
focal cerebral ischemia

Masahiro HATAKEYAMA

*Niigata University Graduate School of
Medicine and Dental Science/ Course for
Molecular and Cellular Medicine/Molecular
Neuroscience and Brain Disease/ Neurology
(Director: Prof. Osamu ONODERA)*

Reprint request to: Masahiro HATAKEYAMA
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University, 1-757
Asahimachi-dori, Chuoh-ku, Niigata
951-8585, Japan

要 旨

当研究室では，これまでミクログリアに軽度の脳梗塞類似の刺激，すなわち低酸素低糖刺激（OGD）を加えることにより，ミクログリアを保護的な極性に変える技術を開発した．また，OGDミクログリアを，脳梗塞7日後に後遺症を有するラットに，動脈投与することで機能予後を著明に回復させることを示した．しかしながら，ミクログリアは成体から分離することが困難である．そこで，同技術のさらなる臨床応用を目指して，ミクログリアに類似した性質を持ち，簡便に取得できる末梢血単核球（PBMC）に着目した．OGD刺激を加えたPBMCが，ミクログリア同様，脳梗塞治療効果を有するかを検討した．

ラット末梢血からフィコールを用いて，PBMCを遠心分離し，18時間OGD刺激（OGD-PBMC），あるいは18時間通常培養（Normoxic-PBMC）を行った．保護的極性の評価として，培養培地を用いて，強力に血管

新生，軸索進展を誘導する血管内皮増殖因子 VEGF のウェスタンブロッティングを行った．次に一過性局所脳梗塞モデルラットを作成し，脳梗塞 7 日後に OGD-PBMC，あるいは Normoxic-PBMC を投与した．細胞投与 21 日後の標本で VEGF の免疫染色を行った．また，血管内皮のマーカである CD31，神経軸索のマーカである SMI31 についても同様に免疫染色を行い，血管新生，軸索伸展の定量的評価を行った．さらに，コーナーテストを用いて，細胞投与後のラットの神経学的機能評価を行った．VEGF のウェスタンブロッティングでは，OGD-PBMC では VEGF の分泌が認められたのに対し，Normoxic-PBMC では認められなかった．また免疫染色では，Normoxic-PBMC 投与群に比し，OGD-PBMC 投与群では虚血中心部辺縁で，VEGF の発現が亢進していた ($p < 0.001$)．また，Normoxic-PBMC 投与群に比し，OGD-PBMC 投与群では虚血中心部辺縁・ペナンプラにお

ける血管新生，およびペナンプラにおける軸索進展が亢進していた（各 $p < 0.001$ ）．コーナーテストでは，細胞投与 21 日後に，OGD-PBMC 投与群は対照群に比し，機能回復が認められた（ $p = 0.020$ ）．

以上から，18 時間の OGD 刺激は，PBMC を保護的な極性に変え，OGD-PBMC 投与は，血管新生，神経軸索進展を介して，脳梗塞後の機能回復を促進する可能性が示唆された．

キーワード：脳梗塞，細胞移植療法，末梢血単核球，低酸素低糖刺激，血管新生，軸索進展

緒 言

脳血管障害は国内の死亡原因の第3位であり，8.2%を占める（厚生労働省 平成29年人口動態統計（確定数）の概況より）．65歳以上の要介護の原因疾患の17.2%と最多であり（内閣府 平成29年版高齢社会白書（全体版）より），救命できたとしても重度の後遺症が生じる．現在，脳梗塞後遺症の機能回復療法として確立されたものは，リハビリテーションのみであり，さらなる機能回復療法の開発が望まれている．

骨髄由来の細胞を用いた細胞移植療法が，脳梗塞後遺症の回復に有効であることが報告されている¹⁾．しかし，脳梗塞の再発予防治療として，抗血小板療法や抗凝固療法が実施される患者に対し，骨髄穿刺を実施して細胞を回収することは，安全面での懸念が生じる．また，ES細胞を用いた幹細胞療法は，倫理面での問題，iPS細胞を用いた細胞療法は癌化の懸念もあり，細胞療法が一般に普及するた

めには，安全かつ簡便で，自己由来の細胞療法が望ましい．

当研究室ではこれまで，軽度の脳梗塞類似の刺激，すなわち低酸素低糖（oxygen-glucose deprivation, OGD）刺激を加えることにより，ミクログリアを保護的な極性に変える技術を開発した²⁾．ミクログリアには，大別して炎症誘発性のミクログリアと，組織保護的に働く抗炎症性ミクログリアの2つの極性が存在する³⁾．このうち抗炎症性保護的ミクログリアは血管内皮増殖因子（VEGF），プログランニューリンなどの組織修復因子を分泌し，血管新生や神経軸索進展を促すなど組織保護的に作用することが知られている⁴⁾．当研究室では，ミクログリアに18時間OGD刺激を加えることにより，ミクログリアからのVEGF分泌が亢進することを示した．また，OGD刺激を加えたミクログリアを，脳梗塞後遺症を有するラットに，脳梗塞7日後に動脈投与することで機能予後を著明に回復させることを示した

2) .

しかしながら，ミクログリアはヒトの成体から分離することが困難である．同技術のさらなる臨床応用を目指して，より簡便かつ安全に取得できる細胞として末梢血単核球（*peripheral blood mononuclear cells*, *PBMC*）に着目した．単球・マクロファージなどを含む *PBMC* は，ミクログリア類似の性質を持ち，脳梗塞後の病態に関与することが知られている⁵⁾．そこで，本研究では *OGD* 刺激を加えた *PBMC* が，ミクログリア同様，脳梗塞治療効果を有するかを検討した．

材料と方法

本研究は，新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け（＃*SD00931*），新潟大学動物実験指針および *ARRIVE*（*Animal Research: Reporting In vivo Experiments*）ガイドライ

ンに従って実施した⁶⁾。

1. 初代細胞培養

体重 290～320g の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。イソフルラン吸入で麻酔を維持し、開胸下に心腔穿刺を行い、末梢血を採取した。Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare, 17-5446-02) を用いて、PBMC を遠心分離した。

通常培養条件では、分離した PBMC をグルコース濃度 4500 mg/L の培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich) を用いて 37℃ で 19 時間培養した。

OGD 条件では、PBMC とグルコース濃度 1000 mg/L の培地を低酸素チャンバー (Billups-Rothenburg, Del Mar, CA, USA) 内に静置した。95%窒素、5%二酸化炭素の混合ガスを 1 時間充填した後、密封し 37℃ で 18 時間培養した。この刺激で、4 時間後にはチャンバー内は O₂ 濃度 0.1-0.4% に低下する

ことが示されている⁷⁾。

2. ウェスタンブロッティング

OGD 刺激を加えた PBMC (OGD-PBMC) および、通常培養を行った PBMC (Normoxic-PBMC) の培地を採取し、2-メルカプトエタノールを加えて煮沸した。Tris-glycine SDS-PAGE で電気泳動し、その後 PVDF 膜に転写し、5% スキムミルクと 0.1% Tween-20 でブロッキングした。一次抗体はウサギポリクローナル抗 VEGF 抗体 (Abcam, ab46154, 1000 倍希釈) を用いて、4℃で一晩反応させた。PBS で洗浄後、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ抗体を室温で 1 時間反応させ、Enhanced ChemiLuminescence (GE Healthcare) を用いて、VEGF の蛋白バンドを ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Life Science) で撮影した。内部コントロールとして、トランスフェリンを使用し、ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、トランスフェリンに対す

る VEGF の発現強度を半定量した。

3 . 一過性局所脳梗塞モデル

体重 290～320g の雄性 SD ラットを、イソフルラン吸入で麻酔を維持し、手術を実施した。手術中、深部体温を経直腸的に測定し、 $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。手術用顕微鏡の直視下に前頸部を正中切開後、左総頸動脈・外頸動脈・内頸動脈を露出した。外頸動脈を結紮し、切断した。その後、外頸動脈断端にナイロン糸（径 0.148mm）を挿入し、中大脳動脈を閉塞した。90 分後にナイロン糸を引き抜き、血流の再開通を行った⁸⁾。

4 . 細胞移植

5×10^5 個の OGD-PBMC および、Normoxic-PBMC をそれぞれ PBS 200 μl で懸濁した。脳梗塞を作成したラットを無作為に 3 群（OGD-PBMC 投与群，Normoxic-PBMC 投与群，PBS 投与群）に割りつけた。脳梗塞

7 日 後 に 左 外 頸 動 脈 断 端 か ら , 細 胞 懸 濁 液 ,
あ る い は P B S を 緩 徐 に 注 入 し た . 全 て の 群 で
同 量 の P B S を 用 い た .

5. G F P マ ウ ス

大 阪 大 学 遺 伝 情 報 実 験 セ ン タ ー で 作 成 さ れ ,
新 潟 大 学 脳 研 究 所 動 物 資 源 開 発 研 究 分 野 に て
飼 育 さ れ た *green fluorescent protein* (G F P)
マ ウ ス を 用 い て , ラ ッ ト 同 様 に P B M C を 遠 心
分 離 し た . G F P マ ウ ス 由 来 の P B M C を 18 時
間 O G D 刺 激 , あ る い は 通 常 培 養 し た . 脳 梗 塞
7 日 後 に , ラ ッ ト の 左 外 頸 動 脈 断 端 か ら G F P
マ ウ ス 由 来 の O G D - P B M C , N o r m o x i c - P B M C
を 緩 徐 に 注 入 し た . 脳 梗 塞 10 日 後 (細 胞 移 植
3 日 後)の ラ ッ ト を イ ソ フ ル ラ ン 過 剰 投 与 で
安 楽 死 さ せ た 後 , 4℃ 生 理 食 塩 水 , お よ び 4 %
パ ラ ホ ル ム ア ル デ ヒ ド ・ リ ン 酸 緩 衝 液 を 用 い
て 灌 流 後 , 脳 を 摘 出 し た . 摘 出 し た 脳 を
free-float 法 で 50 μ m 厚 に 薄 切 し ⁷⁾ , 二 光 子
顕 微 鏡 (L S M 710; C a r l Z e i s s , O b e r k o c h e n ,

Germany)で観察を行った。

6. 免疫染色

脳梗塞 28 日後（ラット由来 PBMC 移植 21 日後）のラットをイソフルラン過剰投与で安楽死させた後，4℃生理食塩水，および 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて灌流後，脳を摘出した．摘出した脳をパラフィンで包埋し，4 μ m 厚に薄切した．パラフィン標本を，メタノールで処理後，オートクレーブ（121℃，10 分間）による抗原賦活を行った．1%ウシ血清アルブミン-PBS で 30 分ブロッキングした後，一次抗体はウサギポリクローナル抗 VEGF 抗体（Santa Cruz, sc-152, 200 倍希釈），マウスモノクローナル抗 MAP-2 抗体（Sigma Aldrich, M9942, 250 倍希釈）を用いて 4℃で一晩反応させた．蛍光標識された二次抗体（Alexa Fluor）を 100 倍希釈し，室温で 1 時間反応させ，Vectashield 4' , 6' -diamidino-2-phenylindole (DAPI)

(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で封入した。

同様に、血管内皮のマーカである CD31, 神経軸索のマーカである SMI31 についても、一次抗体としてマウスモノクローナル抗 CD31 抗体 (Dianova, DIA-310, 20 倍希釈), マウスモノクローナル抗 SMI31 抗体 (BioLegend, 801601, 500 倍希釈)を用いて, MAP2 との免疫二重染色を行った。

MAP2 陰性の領域を虚血中心, その辺縁の MAP2 陽性の領域をペナンプラと定義し, 二光子顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で観察を行った。

630 倍の強拡大にて, 虚血中心, ペナンプラの各領域につき, 1 サンプルあたり重複のない 7 視野を観察した。データは 0.03-mm^3 の関心領域 (ROI) から定位的に取得した。Z 軸方向に $0.15\text{ }\mu\text{m}$ 間隔でデータを取得し, 3 次元画像を再構成した。IMARIS imaging software (Bitplane AG, Zurich,

Switzerland)を用いて，盲検的にデータの定量的評価を行った⁹⁾．

7. 神経学的機能評価

脳梗塞前及び，脳梗塞後 0 日，1 日，4 日，7 日，10 日（細胞移植 3 日後），14 日（細胞移植 7 日後），21 日（細胞移植 14 日後），28 日（細胞移植 21 日後）の段階で，コーナーテストを用いた運動・感覚機能の評価を行った¹⁰⁾．治療効果の評価は盲検的に実施した．

8. 統計学的評価

全てのデータは平均±標準偏差で表記した．2 群間の比較には，対応のない t 検定を用い，3 群間以上の比較には 1 元あるいは 2 元配置分散分析を用いた．その後，ダネットあるいはボンフェローニのポストホック解析を行った．統計学的処理には SPSS（ver. 25.0. Armonk, NY, USA）を用いた．P 値が 0.05 未満のものを統計学的有意とした．

結 果

1. OGD-PBMC では VEGF が分泌される

ラット由来の PBMC の保護的極性への変化を定量的に評価するために，VEGF のウェスタンブロッティングを行った．OGD-PBMC では VEGF の分泌が認められたのに対し，Normoxic-PBMC では認められなかった（ $P = 0.029$ ）（図 1A，B）．

2. OGD-PBMC は細胞移植後，脳梗塞後のラットの脳内に移行する

脳梗塞モデルラットに投与した PBMC が，ラットの脳内に移行するかについて，GFP マウス由来の PBMC を用いて検討した．脳梗塞 10 日後（細胞移植 3 日後）に，OGD-PBMC 投与群では，虚血中心とペナングラの境界に GFP 陽性細胞が認められたのに対し，Normoxic-PBMC 投与群では認められなかった（図 2）

3. OGD-PBMC を移植したラットでは，脳内の VEGF 発現を認める

次に，脳梗塞モデルラットにラット由来の OGD-PBMC を移植した後，脳内で VEGF の発現を認めるかもしくは増加するのかを免疫蛍光染色で検証した．偽手術を行ったラットの脳内では，VEGF が認められなかったのに対し，脳梗塞 28 日後（細胞移植 21 日後）のラットでは，虚血中心辺縁部で VEGF を認めた．さらに，OGD-PBMC 投与群では，Normoxic-PBMC 投与群に比し，VEGF の発現が増加していた（ $p < 0.001$ ，図 3A,B）．

4. OGD-PBMC を移植したラットでは血管新生が亢進する

当研究室ではこれまで，18 時間 OGD 刺激を加えたミクログリアを，脳梗塞モデルラットに移植することで，ラットの虚血中心辺縁部で血管新生が亢進することを報告した²⁾．

そこでミクログリア同様に，ラット由来の OGD-PBMC を移植した脳梗塞モデルラットで脳内の血管新生が亢進するかについて，免疫蛍光染色で検証した．血管内皮のマーカーである CD31 に対する抗体を用いた免疫蛍光染色で血管新生を定量的に評価した²⁾．脳梗塞 28 日後（細胞移植 21 日後），虚血中心辺縁部における CD31 の免疫反応性は，Normoxic-PBMC 投与群に比し，OGD-PBMC 投与群で大きかった（ $p < 0.01$ ，図 3C 上段）．また，ペナンプラにおける CD31 の免疫反応性も，Normoxic-PBMC 投与群に比し，OGD-PBMC 投与群で大きかった（ $p < 0.01$ ，図 3C 下段）．

5. OGD-PBMC を移植したラットでは軸索伸展も生じる

次にラット由来の OGD-PBMC を移植したラットの脳内で軸索伸展が生じるか免疫蛍光染色で検証した．軸索のマーカーである

S M I 3 1 に 対 す る 抗 体 を 用 い た 免 疫 蛍 光 染 色 で ,
軸 索 伸 展 を 定 量 的 に 評 価 し た ²⁾. 脳 梗 塞 2 8
日 後 (細 胞 移 植 2 1 日 後), ペ ナ ン ブ ラ に お け
る S M I 3 1 の 免 疫 反 応 性 は , N o r m o x i c - P B M C
投 与 群 に 比 し , O G D - P B M C 投 与 群 で 増 加 し て
い た ($p < 0.01$, 図 3 D).

6. O G D - P B M C を 移 植 し た ラ ッ ト で は , 脳 梗 塞 後 の 機 能 が 著 明 に 改 善 す る

最 後 に , O G D - P B M C 細 胞 移 植 療 法 が 脳 梗 塞 後 の 運 動 ・ 感 覚 機 能 障 害 を 改 善 さ せ る か コ ー ナ ー テ ス ト を 用 い て 検 証 し た . 脳 梗 塞 2 8 日 後 (細 胞 移 植 2 1 日 後) に , O G D - P B M C 投 与 群 で は , P B S 投 与 群 に 比 し , 有 意 に 運 動 ・ 感 覚 機 能 障 害 が 改 善 し た ($p = 0.020$). 一 方 , N o r m o x i c - P B M C 群 と P B S 投 与 群 の 間 に 運 動 ・ 感 覚 機 能 障 害 に 有 意 差 は な か っ た ($p = 0.77$) (図 4).

考 察

今回，OGD 刺激を PBMC に加えることにより，PBMC からの VEGF 分泌が生じ，PBMC が組織保護的な極性に変わることを示した（図 1）．当研究室ではこれまで，18 時間の OGD 刺激を脳内炎症性細胞ミクログリアに加えることにより，ミクログリアが保護的な極性に変わることを報告した²⁾．本研究においても，ミクログリア同様，OGD 刺激により PBMC から VEGF 分泌が亢進し，組織保護的な極性に变化した可能性が考えられた．PBMC 中にはマクロファージが存在し，マクロファージは低酸素刺激により VEGF を分泌することが報告されており¹¹⁾．OGD-PBMC から VEGF が分泌される機序の一つと考える．今後，OGD 刺激による PBMC の保護的極性への変化の機序に関して検討する必要がある．

さらに OGD-PBMC を投与することにより，脳梗塞後のラットの脳内に PBMC が移行し（図 2），脳内の VEGF の発現が亢進し（図 3A,B），血管新生・軸索伸展が亢進すること

を示した（図 3C,D）。これは，投与した OGD-PBMC が，脳内で組織修復因子である VEGF を分泌し，血管新生や軸索伸展を亢進させたためと考える．VEGF は血管新生のみならず，軸索伸展にも寄与することが報告されており¹²⁾，軸索伸展の一部は VEGF の作用によるものと考えられる．VEGF の他に，プログレニリンなども脳梗塞後に組織保護的な作用を持つことが報告されており¹¹⁾，今後 OGD-PBMC におけるこれらの因子の関与についても，検討する必要がある．

最後に，OGD-PBMC の投与により，ラットの脳梗塞後の機能が著明に改善することを示した（図 4）．PBMC は比較的簡便に採取できる細胞であることから，今後は臨床応用を目指して行くとともに，さらなる機序の解明を進める方針である．

結 論

18 時間の OGD 刺激により，PBMC が保護

的な極性に変化し，血管新生・軸索伸展を介して，脳梗塞後の機能回復を促進する可能性が考えられた．

謝 辞

本研究全般にわたり，ご指導ご助言をいただきました，新潟大学脳研究所神経内科小野寺理教授，金澤雅人講師，現・岐阜大学神経内科・老年内科下畑享良教授に深謝申し上げます．

GFPマウスは，大阪大学遺伝情報実験センター岡部勝先生が樹立され，当施設に提供されたものを使用した．マウス提供にもお礼申し上げます．

文 献

- 1) Liu X, Ye R, Yan T, Yu SP, Wei L, Xu G, Fan X, Jiang Y, Stetler RA, Liu G, Chen J. Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside. Prog Neurobiol 115:92-115, 2014.
- 2) Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. Sci Rep 7:42582, 2017.
- 3) Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. Int J Mol Sci 18:e2135, 2017.

- 4) Dudvarski Stankovic N, Teodorczyk M, Ploen R, Zipp F, Schmidt MHH. Microglia-blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta Neuropathol* 131:347-363. 2016.
- 5) Kim E, Cho S. Microglia and monocyte-derived macrophage in stroke. *Neurotherapeutics* 13:702-718. 2016.
- 6) Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:991-993. 2011.
- 7) Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Yoshinori T, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T,

Nishihara M, Nishizawa M, Shimohata T.
Multiple therapeutic effects of
progranulin on experimental acute
ischaemic stroke. Brain 138:1932-1948.
2015.

8) Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK.
Penumbra tissue salvaged by
reperfusion following middle cerebral
artery occlusion in rats. Stroke
23:553-559. 1992.

9) Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M,
Igarashi H, Nakada T, Nishizawa M,
Shimohata T. Effects of angiopoietin-1
on hemorrhagic transformation and
cerebral edema after tissue
plasminogen activator treatment for
ischemic stroke in rats. PLoS One
9:e98639. 2014.

10) Balkaya M, Kröber J, Gertz K,
Peruzzaro S, Endres M.

Characterization of long-term
functional outcome in a murine model of
mild cerebral ischemia. J Neurosci
Methods 15:179-187. 2013.

- 11) Fang HY, Hughes R, Murdoch C, Coffelt
SB, Biswas SK, Harris AL, Johnson RS,
Imityaz HZ, Simon MC, Fredlund E,
Greten FR, Rius J, Lewis CE.

Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are
important transcriptional effectors in
primary macrophages experiencing
hypoxia. Blood 114:844-859. 2009.

- 12) Sondell M, Lundborg G, Kanje M.

Vascular endothelial growth factor has
neurotrophic activity and stimulate
axonal outgrowth, enhancing cell
survival and Schwann cell proliferation
in the peripheral nervous system. J
Neurosci 19:5731-5740. 1999.

図 1 OGD-PBMC と Normoxic-PBMC の VEGF
分 泌

- A) 通 常 培 養 を 行 っ た P B M C (N o r m o x i c -
P B M C) と 18 時 間 O G D 刺 激 を 加 え た
P B M C (O G D - P B M C) の V E G F に 対 す る ウ
ェ ス タ ン ブ ロ ッ テ ィ ン グ . P B M C :
p e r i p h e r a l b l o o d m o n o n u c l e a r c e l l s ,
O G D : o x y g e n - g l u c o s e d e p r i v a t i o n ,
V E G F : v a s c u l a r e n d o t h e l i a l g r o w t h
f a c t o r
- B) ト ラ ン ス フ ェ リ ン に 対 す る V E G F の デ ン
シ ト メ ト リ ー . O G D - P B M C で は V E G F の
分 泌 が 認 め ら れ た の に 対 し ,
N o r m o x i c - P B M C で は 認 め ら れ な っ た
(N = 4) .

図 2 OGD-PBMC の 脳 内 へ の 移 行

脳 梗 塞 7 日 後 の ラ ッ ト に , G F P マ ウ ス 由 来 の
N o r m o x i c - P B M C あ る い は O G D - P B M C を 移 植
し , 脳 梗 塞 10 日 後 (細 胞 移 植 3 日 後) に V E G F

に対する免疫染色を行った．OGD-PBMC 投与群では GFP 陽性細胞が認められたのに対し，Normoxic-PBMC 投与群ではみとめられなかった．GFP : green fluorescent protein, PBMC : peripheral blood mononuclear cells, OGD : oxygen-glucose deprivation (N = 3)

図 3 PBMC を移植したラットの脳の VEGF の発現，血管新生・軸索伸展

- A) 脳梗塞 7 日後のラットに Normoxic PBMC あるいは OGD-PBMC を移植し，脳梗塞 28 日後（細胞移植 21 日後）に VEGF に対する免疫染色を行った．PBMC : peripheral blood mononuclear cells, OGD : oxygen-glucose deprivation, VEGF : vascular endothelial growth factor
- B) 脳梗塞 28 日後，OGD-PBMC 投与群では，Normoxic-PBMC 投与群に比し，有意に虚血中心辺縁部での VEGF の発現が亢進していた (**p < 0.001)．N = 28

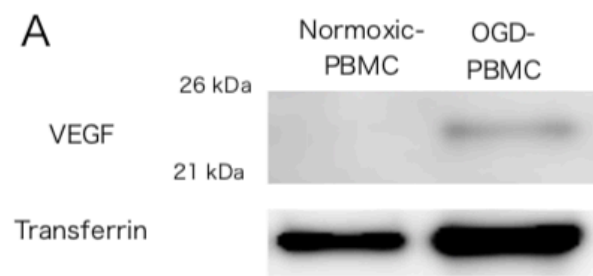
C) 脳梗塞 7 日後のラットに Normoxic-PBMC
あるいは OGD-PBMC を移植し、脳梗塞 28
日後（細胞移植 21 日後）に CD31 に対す
る免疫染色を行った。虚血中心辺縁部、
ペナングラにおける CD31 の免疫反応性
は、Normoxic-PBMC 投与群に比し、
OGD-PBMC 投与群で有意に大きかった
（各 $*p < 0.01$ ）。N = 28. CD31:cluster
of differentiation 31

D) 同様に、脳梗塞 28 日後（細胞移植 21 日
後）に SMI31 に対する免疫染色を行った。
ペナングラにおける SMI31 の免疫反応
性は、Normoxic-PBMC 投与群に比し、
OGD-PBMC 投与群で有意に大きかった
（ $*p < 0.01$ ）。N = 28

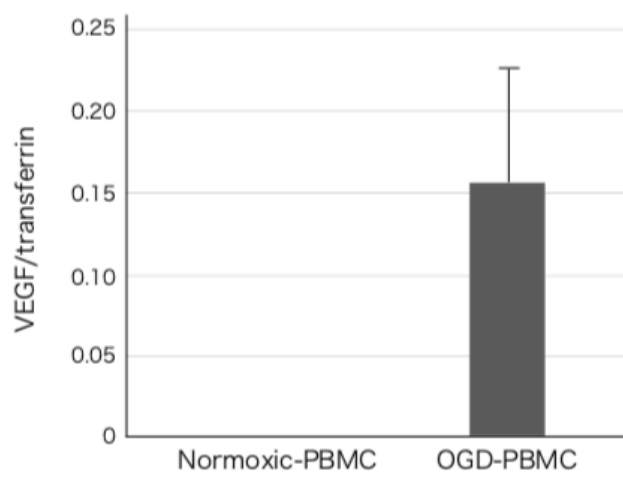
図 4 コーナーテストを用いた運動・感覚機能
評価。脳梗塞 28 日後（細胞移植 21 日後）に、
OGD-PBMC 投与群では、PBS 投与群に比し、
有意に運動・感覚機能障害が改善した（ $\#p =$

0 . 0 2 0) .

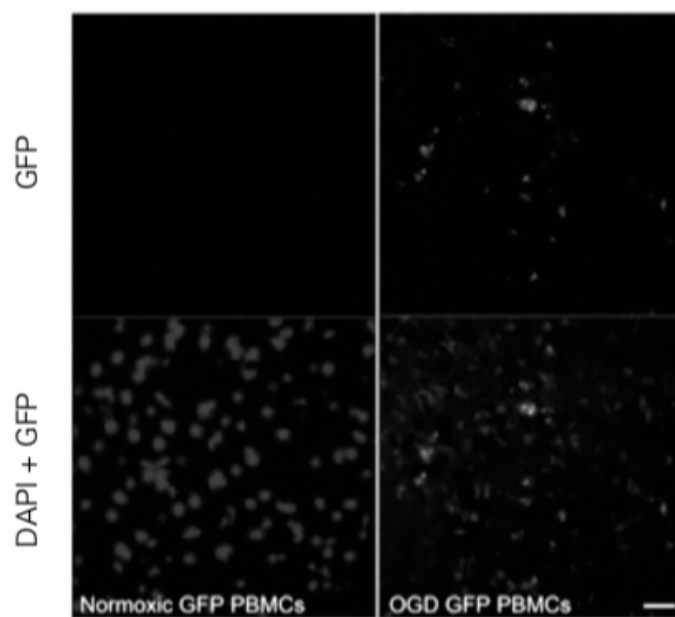
☒ 1



B



☒ 2



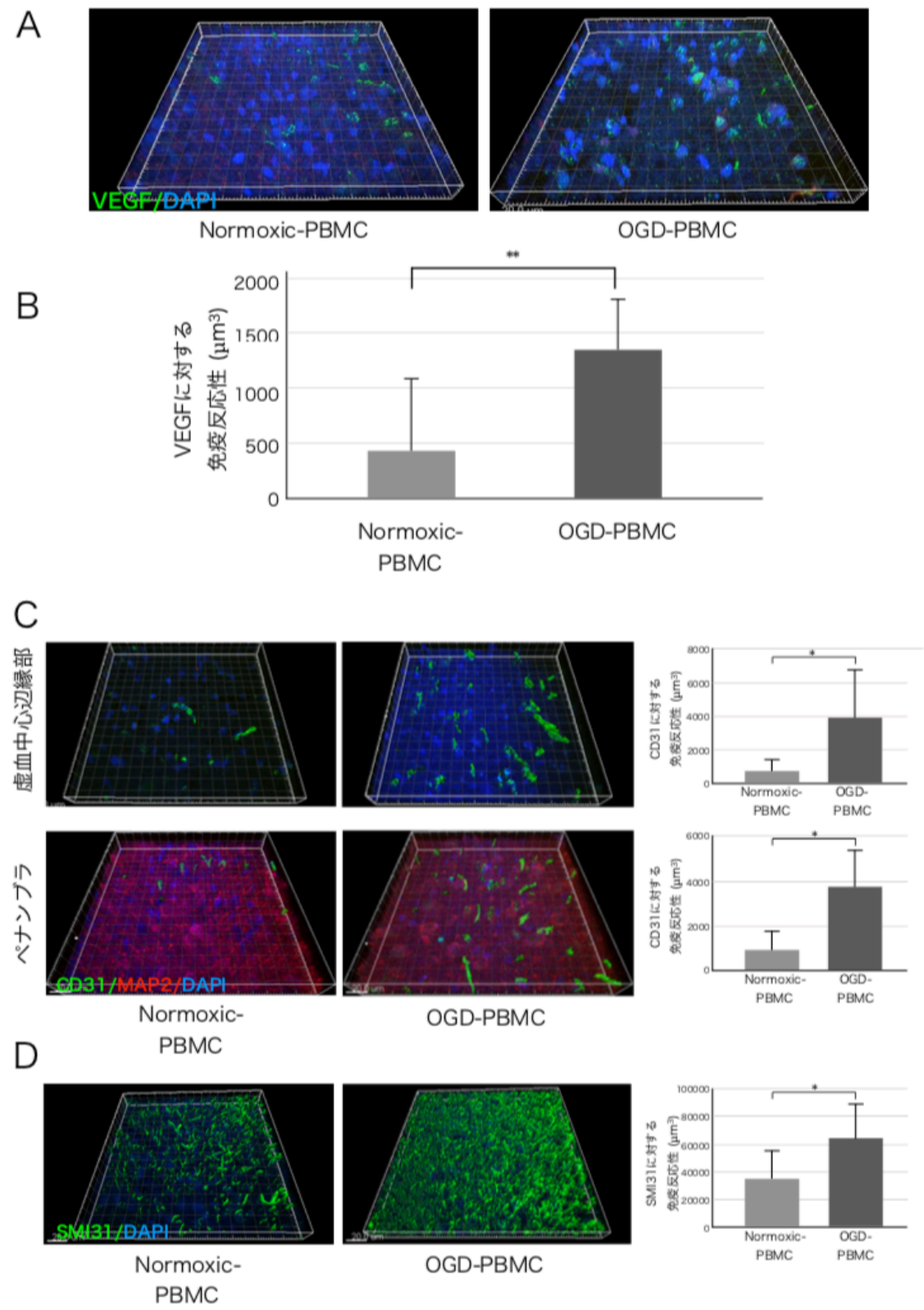


図 4

