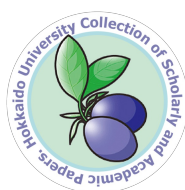




Title	脳血管障害患者に対する再生医療の現状と将来
Author(s)	川堀, 真人; 七戸, 秀夫; 黒田, 敏 他
Description	特集 脳梗塞超急性期診療 7. 出版年次: 2017
Citation	日獨医報, 62(2), 161-167
Issue Date	2018-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70922
Type	journal article
File Information	J5_Nichidoku-iho62_71.pdf



7. 脳血管障害患者に対する再生医療の現状と将来

川堀 真人¹⁾, 七戸 秀夫¹⁾, 黒田 敏²⁾, 宝金 清博¹⁾

北海道大学大学院医学研究科・医学部 脳神経外科¹⁾, 富山大学医学部 脳神経外科²⁾

1) Department of Neurosurgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine

2) Department of Neurosurgery, Toyama University

NICHIDOKU-IHO
Vol.62 No.2 71-77 (2017)

Cell Therapy Against Stroke, Current Status and Future Perspective

Masahito Kawabori¹⁾, Hideo Shichinohe¹⁾, Satoshi Kuroda²⁾, Kiyohiro Houkin¹⁾

Summary

Despite recent development of treatments, stroke still remains one of the leading causes of death and disability worldwide. Stem cell therapies have recently attracted much attention owing to their potential therapeutic efficacy in patients with stroke. Various types of cells, including neural stem cells (NSC), embryonic stem cells (ES), and mesenchymal stem cells (MSC) have been shown to improve the neurological outcomes in animal models of stroke, and clinical trials of these cells have been conducted in patients with stroke. In this article, the authors describe the recent advances and future perspectives of cell therapy against stroke.

はじめに

脳卒中、特にその大部分を占める脳梗塞は、日本全国で約30万人が新規に発症し、その多くが死亡もしくは後遺症を残す重篤な疾患である。2025年には520万人の要介護者が推定され、それに伴う社会的負担として、年間に必要な医療・社会的資源は約6.5兆円(医療費約1.8兆円、介護費約2.5兆円、離職などによる社会的損失約2.3兆円)と試算され、これは今後も増大すると考えられることから、より有効な治療法が求められている。

しかし脳卒中が他の疾病と比較し治療が困難となる原因の1つとして、「一旦傷害された脳神経組織を再生させる治療法」が確立していないことがあげられる。そのため、治療法の主眼は、「障害を可能な限り軽度でとどめる治療法」になってくるのだが、脳卒中の大半を占める脳梗塞においては、血管閉塞を生じてから脳神経組織が傷害されるまでの時間(therapeutic time window)は非常に短く、市民・救急隊への啓蒙、血栓回収療法を含む新たな治療方法の開発などが行われ一定の効果が得られ

ているものの、多くの患者に後遺症が生じているのが現状である。このような状況の中で、近年の神経科学と幹細胞研究の進歩により、「一旦傷害された脳神経組織を再生させる治療法」、つまり再生医療が可能となりつつある。本報告では、幹細胞を用いた再生医療の現状とその課題および将来像について報告する。

幹細胞とその特徴

1. 幹細胞の種類

幹細胞の定義として、「分裂し自分自身と同じ性質を持った細胞を産生する能力(自己複製能)と機能するさまざまな細胞に分化する能力(分化能)の両方を持つ細胞」が一般的である。現在多くの基礎および臨床研究が進められている細胞種として、胚性幹細胞[ES (embryonic stem) 細胞]、人工多能性幹細胞[iPS (induced pluripotent stem) 細胞]、間葉系幹細胞[MSC (mesenchymal stem cell)]などがあげられる。

表1 再生医療に用いられる主な幹細胞の種類と特徴

	ES細胞	iPS細胞	MSC
有利な点	万能性	万能性 倫理的問題なし 免疫拒絶低い	免疫拒絶なし 倫理的問題なし
不利な点	倫理的問題あり 免疫拒絶反応あり	腫瘍化	分化の制限

2. 各幹細胞の臨床応用に向けての利点・欠点(表1)

ES細胞は動物の発生初期段階である胚胎盤期の胚の一部に属する内細胞塊より作られ、理論上すべての組織に分化する万能性を有し、培養下でも比較的容易に心筋細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、血液細胞などに分化させることができる。遺伝子操作も比較的容易であることから、特定の遺伝子を意図的に破壊したノックアウトマウスの作成など基礎医学研究でも広く用いられてきた^{1,2)}。しかし、受精卵を材料としてES細胞を樹立するため、ヒトES細胞の場合では生命の萌芽を破壊するとの主張があり、このヒトになりうる受精卵を破壊することに対する倫理・宗教的問題は依然多くの国や地域で臨床応用に向けた足かせとなっている。またES細胞より作り出された臓器を患者に移植する際にも、主要組織適合抗原(major histocompatibility complex: MHC)が患者とES細胞の材料となった受精卵とで異なることが大半であるため、移植後の免疫拒絶を生じると考えられており、これもクリアすべき課題として残っている。

iPS細胞はYamanakaらが2006年に報告した方法で³⁾、ES細胞の問題点であった倫理的問題および免疫拒絶をクリアできる方法の1つとして爆発的に研究・開発が進められている。これは体細胞(すでに分化した皮膚、粘膜細胞など)に特定の遺伝子(oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入(リプログラミング)することで、再び万能性を有するES細胞に類似したiPS細胞が作成されるというものである。これにより患者本人から採取した体細胞から幹細胞を作り出すことが可能となり、その幹細胞を用いての再生医療のみならず、病態理解や創薬に繋がる可能性が考慮されている。しかし一方でその問題点として、腫瘍化の問題が存在する。癌遺伝子であるc-Mycを導入することや、遺伝子の導入に使うレトロウイルスの染色体への挿入による内在性発がん遺伝子の活性化などが原因の1つと考えられているが、完全に制御できたとは言い

がたい状況である。また遺伝子操作を行ったことによる長期的な変化についても未解決の問題である。

MSCは中胚葉性組織(間葉)に由来する体性幹細胞であり、間葉系に属する細胞(骨、血管、筋肉、軟骨)への分化能を持つが、近年の研究で、中胚葉由来ではない神経細胞(外胚葉)、グリア細胞(外胚葉)、肝臓(内胚葉)などにも一部分化することが証明されている。間葉系幹細胞は骨髄、脂肪組織、臍帯組織、歯髄などから取得することができ、一般的にプラスチックフラスコ底面に接着能を有する線維芽細胞様の細胞と考えられている。その中でも臨床応用が盛んな骨髄幹細胞(bone marrow stem cell: BMSC)は、骨髄液から単離された骨髄単核球(bone marrow mononuclear cell: BMMNC)に含まれるため、これを培養し増殖させて使用することが多いが、最近では、BMMNC自体を移植に用いる場合もある。BMMNCは患者の骨髄液や血液などから遠心分離で採取することができるため、BMSCに比較し培養増殖させないことから、含まれる幹細胞数は少なくなるデメリットもあるが、遠心分離のみで採取可能なため超早期の投与が可能となるメリットが存在する。これら間葉系幹細胞のメリットとして採取・培養法が比較的確立されており、患者本人から取得した場合には免疫拒絶の問題や倫理的問題が生じないことが最大の特徴としてあげられる。そのため現在、脳梗塞に対する幹細胞移植治療においてはMSCの治験が大多数を占めている。しかしES細胞やiPS細胞のようなすべての細胞に分化できる万能性を有しているとはいいがたく、その分化の程度が限定されるという問題点が存在する。

脳卒中に対する幹細胞の基礎研究

1. 幹細胞の作用機序

脳梗塞モデルに対する幹細胞投与による機能改善が多く報告されるようになり、その機序も徐々に明らかとな

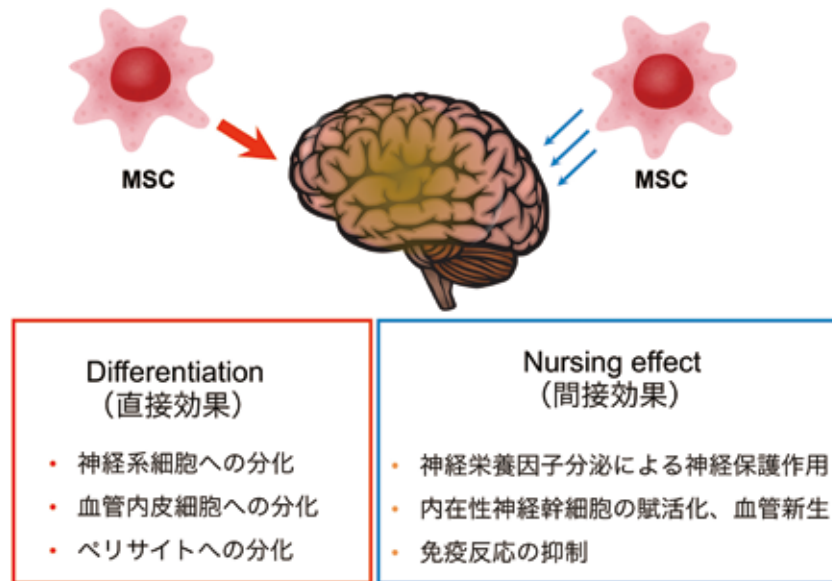


図1 BMSCの神経機能改善の機序

ってきている。以後は、臨床応用が進んでいるBMSCを中心に報告する。投与した幹細胞が脳内で機能改善を果たすためには、投与された部位において生着(生存)することが必須条件となるが、1998年にAziziらによって、脳内に投与されたBMSCが生着することが報告され⁴⁾、以後BMSCを用いた脳梗塞への応用が大きく発展することになった。BMSCは脳梗塞で傷害された部位へ遊走することも確認され、BMSC表面に存在するCXCR4 [stromal cell-derived factor (SDF)-1aのレセプター]が遊走に関与していることがわかってきている⁵⁾。その後の報告によって投与されたBMSCは生着するのみならず、脳内で細胞増殖することも確認されている⁶⁾。このように投与されたBMSCは、生着、遊走、増殖を行いながら、さまざまな機序で神経機能を改善することが報告されているが、その作用は大きく2つに分けて考えることができる。1つ目は分化(differentiation)による直接効果であり、2つ目は保護効果(nursing effect)による間接効果である(図1)。

1つ目の効果である分化についてであるが、投与された中胚葉由来のBMSCが外胚葉由来の神経細胞に分化することは理論上難しいと考えられてきたが、近年の研究によって脳内に投与されたBMSCの一部が形態学的に神経細胞に近い形に変化し、神経細胞特有のタンパク質、遺伝子発現を有するようになることが証明されている^{4, 7~10)}。これらの神経細胞への分化については脳内周

辺環境[epidermal growth factor (EGF)やグルタミン酸刺激]が関与し、神経細胞に分化したBMSCが脳内で長期にわたり生存し、神経細胞のネットワークを再構築していることもわかってきている^{11, 12)}。しかし投与された細胞のネットワークは脆弱であり、環境を完全に失われる前に元通りに改善しうるかどうかにについては懐疑的な意見も存在する。神経細胞以外ではBMSCは血管内皮などへの分化も確認されており、脳内の環境に応じて柔軟に分化する可能性が示唆されている。

2つ目の効果である保護効果(nursing effect)であるが、投与されたBMSCから分泌される種々の神経保護因子および神経栄養因子が脳内のダメージを受けた神経細胞などに保護的に働きかけていることがわかってきている¹³⁾。そもそもBMSCは骨髓内でさまざまなサイトカインなどを分泌し、血液の素となる造血幹細胞の栄養、分化などをサポートしていることから、このような機序を持つことは比較的理解しやすいと考える。BMSCが実際に分泌している栄養因子としては、nerve growth factor (NGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)などがあげられ、分泌されるこれらの栄養因子、発達因子により傷害を受けた細胞の生存率が改善することや、脳内に存在する神経細胞を活性化させ新たな神経ネットワークの構築が行われることがわかってきている^{14~16)}。またダメージを受けた細胞に対する保護効果だけではなく、脳梗塞に伴う

表2 幹細胞投与方法の比較

投与ルート	メリット	デメリット
経静脈的投与 (Intra-venous)	低侵襲 複数回の投与可能	低到達細胞率 肺塞栓のリスク
経動脈的投与 (Intra-arterial)	比較的低侵襲 複数回の投与可能	細胞による脳梗塞
直接投与 (Intra-cerebral)	到達細胞数多	侵襲大
経髄液投与 (Intra-thecal)	比較的低侵襲	水頭症リスク 到達細胞数未知

炎症反応の軽減にも作用していることがわかってきている。

2. 臨床応用に向けた研究

BMSCをはじめとする幹細胞が、脳梗塞モデルにおいて機能改善を果たすことは多くの実験から確認されてきているが、実際の患者に使用する際にはクリアしなければならない壁が多く存在する。動物実験では有効であった薬物が、実際の脳梗塞患者に対してその有効性を示すことができなかった反省点から米国において、Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) という団体が組織され、臨床試験につなげることができるような基礎研究の遂行について言及している¹⁷⁾。またその後、細胞治療に関しても同様にStem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS) という団体から多くの推奨がなされている^{18~20)}。以下に基礎研究から臨床応用 (Bench-to-bedside) に必要と考えられる指摘点を示す。

1) 細胞種

多くの基礎研究はiPS細胞、ES細胞、BMSC、BMMNCのそれぞれについての効果や機序を検討していて、細胞種間での比較検討はほとんど行われていないのが現状である。また臨床応用が進む間葉系幹細胞においては、患者本人から取得した自家細胞を使用するか他人から得られた他家細胞を使用するかについても、一長一短があると考えられている。患者本人から得られた細胞は免疫拒絶が生じないと考えられることから長期にわたる生着が期待できる反面、細胞取得から必要細胞数まで培養するには、かなりの時間がかかることが予想されるため、急性期の投与は難しいなどの側面もある。一方、他家細胞であれば、事前に準備・ストックすることが可能なことから脳梗塞超急性期にも投与することが可能となり、栄養因子などによる脳梗塞超急性期の脳保護効果が期待でき

るが、その一方で免疫拒絶から長期間の細胞生着は期待できず、アレルギー反応なども心配される。

2) 細胞数

ヒトに幹細胞をどの程度投与すると機能改善が得られるのかというデータは存在しないため、細胞数の決定には動物実験を参考にして行われることが多い。その際の指標の1つとして、脳重量もしくは体重を参考にするのが現時点では妥当であると言われている。実験に使われることの多い齧歯類 (マウス・ラット) では投与時期、投与ルートがさまざまであることから完全に同じ条件で実験を行うことは難しいが、多くの基礎実験では1万~100万個で有効性を見た研究が多く、脳重量で換算するとヒトにおいては有効と考えられる投与量は75万~7,500万個程度と推測される。至適細胞数の決定には細胞培養時間という因子も付け加わる。これは多くの細胞を培養するには長期間の培養が必要となるというジレンマであり、治療効果が強く見込まれる脳梗塞早期に少ない数の細胞を投与するのが良いのか、多くの細胞数を投与するために、脳梗塞後ある程度時間が経つことを許容するのが良いのかについては、今後の知見の集積が待たれる。

3) 投与ルート

細胞を体の中に入れるための最適なルートについても依然決定していないのが現状である。経静脈的投与ルート、経動脈的投与ルート、直接投与ルート、経髄液投与ルートなどが候補としてあげられるが、各々にメリットデメリットが存在する (表2)。

経静脈的投与ルートは患者に与える侵襲性の低さが最大のメリットであり、複数回の投与も検討できる。この投与方法は動物実験では発症早期 (24時間以内) に投与した場合において、特に運動機能改善が認められることが多い。しかし実際に移植した細胞の大半は肺や脾臓に補足され、0.4~4%程度しか脳内に到達しないという報告もあり、その機能改善は新たな神経細胞のネットワーク

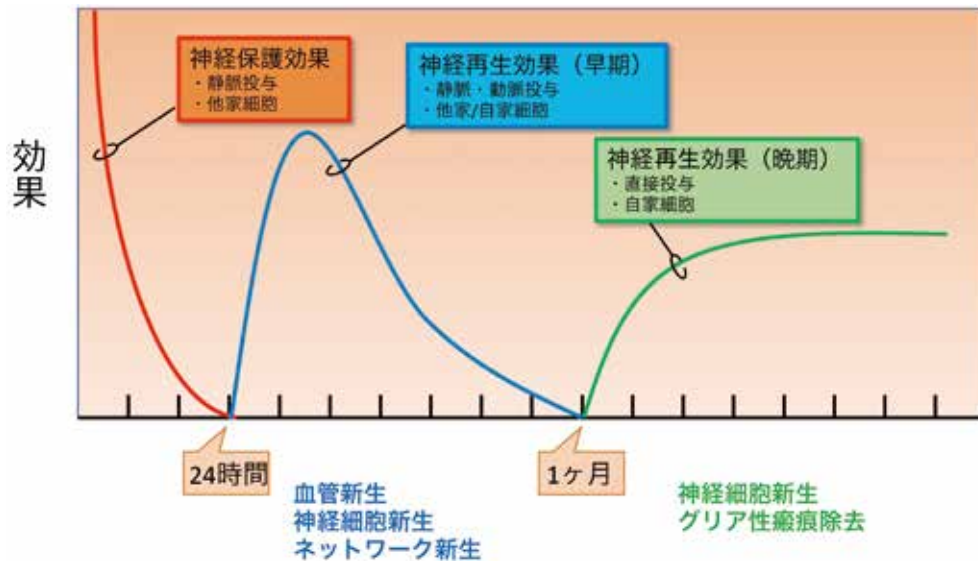


図2 細胞投与時期と最適と考えられる投与ルートおよびその目的
(文献21)より転載)

を構築するというよりかは、傷害を受けた脳細胞を守る nursing effectや脾臓を介した全身の免疫反応調整にある可能性が考えられる。そうなってくると炎症反応がすでに低下、前述のホーミングサイトカインが下がる亜急性期から慢性期にかけての効果は不十分になる可能性が考えられる。

経動脈的投与ルートはカテーテルなどを用いることで比較的低侵襲下に大量の細胞を脳内に運ぶことができるメリットが考えられている。この方法であれば、静脈投与するのと比較して肺や脾臓でトラップされる細胞を減らすことができることから、より多くの細胞が脳内に到達することが予想される。しかし、細胞塊による新たな脳梗塞の発生のリスクがあることと、動脈内に投与した細胞が脳に定着せず最終的には肺などまで運ばれることも示されている。

直接投与ルートは頭蓋骨に穴を開けて、専用の注射針を用いて脳内に細胞を投与する方法である。脳内の梗塞巣に近い場所に直接大量の細胞を運ぶことができることがメリットではあるが、そのためには穿頭術を必要とし、脳内出血・けいれん・慢性硬膜下血腫などの手術合併症のリスクが無視できないと考えられる。直接投与法は脳梗塞直後の脳内炎症期に投与しても細胞が十分生着できないことがわかっており、むしろ亜急性期から慢性期での投与が望ましい可能性が示唆されている。

経髄液投与ルートは腰椎穿刺という比較的低侵襲な手技によって細胞を脳の周りの髄液腔に投与することがで

きるが、その効果についてはさまざまな意見があり、現時点で有効性が確立しているとはいえない状況である。

4) 投与時期

細胞投与時期に関しても不明な点が多いが、複数のタイミングで投与した研究においては経静脈投与ルートは脳梗塞後0～1日目に有効なことが多く、慢性期(28日)では効果が見られなかったという報告がある一方、経動脈投与では1～7日前後に効果が最も得られ、直接投与は42日後でも効果が認められたとの報告がある。細胞治療に詳しいHessらによると、発症24時間以内は他人から得られた(他家)細胞を経静脈的投与、24時間～1ヶ月までは患者から得られた(自家)細胞の経静脈的・経動脈的投与、1ヶ月以降は自家細胞の直接投与が望ましいのではないかと論じている(図2)²¹⁾。しかしどのような細胞をいつ投与することが患者にとって大きな利益が得られるかに関しては依然不明である。実際、自家細胞の培養には2週間～2ヶ月程度を要するため、発症24時間以内に投与する場合には他家細胞もしくは培養を要さないBMMNCそのものの投与以外は不可能と考えられる。

脳卒中に対する幹細胞の臨床研究

1. 世界における臨床研究

米国の臨床試験登録サイトであるClinicalTrials.govと日本の臨床試験登録サイトであるUMIN (University hospital Medical Information Network)によると、

2017年7月までで、31の脳梗塞に対する幹細胞移植の臨床研究が終了しその結果が報告されており、また現在も15件弱の臨床研究が進行中である。過去に報告された研究においては、ヒト間葉系幹細胞が27件、ヒトES細胞が3件、ブタ神経幹細胞1件と間葉系幹細胞の利用が大多数(87%)を占め、その27件の中でも骨髄および末梢血の単核球(MNC)移植が18件、培養を要するBMSCが9件となっており、単離・移植が早期に行えるMNCが多い結果となっている。投与方法については、経静脈的投与が11件(35%)、経動脈的投与が9件(29%)、直接投与が7件(23%)、経髄液投与を含むその他が4件(13%)とさまざまな方法が施行されている。投与時期についてもさまざまな報告が行われており、脳梗塞発症から10日以内の急性期に投与されたものが5件(16%)、10日～3ヶ月の亜急性期が14件(45%)、3ヶ月以降の慢性期が12件(39%)となっている。多くの報告にてその有用性や安全性が報告されており、脳梗塞に対する幹細胞投与による機能改善は十分に期待できるものとなってきていると考えるが、前述したように、最適なプロトコルの確立には至っていないのが現状である。

2. 日本における臨床研究

日本における臨床研究としては、札幌医科大学の本望教授らのグループが、2011年に脳梗塞亜急性期の患者に自家BMSCを経静脈的ルートにて投与する治験の結果を報告している²²⁾。彼らは脳梗塞後36～133日で 1×10^6 個のBMSCを投与し、運動機能の回復ペースが移植によって有意に加速されること、MRIの梗塞巣が減少することを証明している。本望教授らのグループはこの結果を持って、現在、細胞生物製剤の実用化を目指し患者数を増やした第3相試験〔二重盲検無作為化試験(double blinded study)〕を開始している。また国立循環器病研究センターの田口医師らは、脳梗塞後7～10日に骨髄より採取されたMNCを静脈投与した結果を報告している²³⁾。 2.5×10^8 個もしくは 3.4×10^8 個のMNCが投与され、運動機能と脳血流の改善を認めたと報告している。また著者らは2017年より、脳梗塞亜急性期に自家BMSCを脳内に直接投与する方法による脳梗塞の改善を目指す治験を開始しており、2018年末までに6例の患者のリクルートを行う方針としている(RAINBOW project)。本治験は今までの幹細胞治療にない新たな取り組みとして、細胞培養に必要となる血清を通常の動物由来の血清ではな

く、健常ボランティアからの血小板溶解物(platelet lysate)を用いること、脳内の予定した部位にピンポイントで細胞移植を行うために脳ナビゲーションを用いて定位的に細胞を投与すること、投与した細胞の遊走を確認するため細胞にMRI造影剤の超常磁性酸化鉄(Superparamagnetic Iron Oxide: SPIO)を幹細胞に取り込ませ投与すること、脳代謝の改善と神経ネットワークの改善をFDG-PET (fluoro-deoxyglucose-positron emission tomography) およびIMZ-SPECT (^{123}I iomazenil single photon emission computed tomography)で確認すること、などを予定している。

3. 幹細胞治療の産業化

多くの基礎研究、臨床治験によって脳梗塞に対しての幹細胞治療の効果は認められてきているが、この治療法が広く普及するためには産業化についても検討する必要がある。他家細胞を用いる場合であれば、国内・国外の場所を問わず大量生産が可能となり、急性期からの投与・廉価な細胞販売など多くの利点が見込める一方、免疫拒絶やアレルギーの問題が生じてくると考えられる。一方、長期間の生着が可能なことなど高い効果が予想される自家細胞の場合は、患者個人の細胞を培養増殖させることから完全なテーラーメイド医療となり、細胞培養にかかる時間・培養場所・価格などクリアすべき問題が多く存在すると考えられ、現状としては多くの企業が他家細胞をベースに細胞治療に参入してきている。

今後、自家、他家細胞および投与時期や投与ルートなどに関する知見が得られることで何らかの棲み分けが進むことが予想される。また平成26年11月には「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」の施行および我々が主体となって作成した厚生労働省「脳梗塞の細胞治療製品の開発に関するガイドライン」が発出され、国をあげての細胞治療への取り組みが始まったところである。昨今の再生医療に関する関心の高まりを得て、自動細胞培養器など細胞培養に関する開発も加速度的に進んできており、幹細胞治療は近い将来広く普及する可能性は十分あると考えられる。

まとめ

脳卒中、特に脳梗塞に対する幹細胞治療は、基礎研究(Bench)の段階から臨床研究(Bed)に移行しつつある。

依然として解決すべき問題点は存在するものの、その有効性は多くの知見から明らかとなっており、近い将来に大きく普及する可能性のある領域である。

【参考文献】

- 1) Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 7634-7638, 1981
- 2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147, 1998
- 3) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676, 2006
- 4) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3908-3913, 1998
- 5) Shichinohe H, Kuroda S, Yano S, et al: Role of SDF-1/CXCR4 system in survival and migration of bone marrow stromal cells after transplantation into mice cerebral infarct. *Brain Res* **1183**: 138-147, 2007
- 6) Yano S, Kuroda S, Shichinohe H, et al: Do bone marrow stromal cells proliferate after transplantation into mice cerebral infarct?--a double labeling study. *Brain Res* **1065**: 60-67, 2005
- 7) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10711-10716, 1999
- 8) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* **164**: 247-256, 2000
- 9) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61**: 364-370, 2000
- 10) Yamaguchi S, Kuroda S, Kobayashi H, et al: The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)--a preliminary study using microarray analysis. *Brain Res* **1087**: 15-27, 2006
- 11) Liu Z, Li Y, Zhang ZG, et al: Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**: 1288-1295, 2010
- 12) Chiba Y, Kuroda S, Maruichi K, et al: Transplanted bone marrow stromal cells promote axonal regeneration and improve motor function in a rat spinal cord injury model. *Neurosurgery* **64**: 991-999; discussion 999-1000, 2009
- 13) Zhong C, Qin Z, Zhong CJ, et al: Neuroprotective effects of bone marrow stromal cells on rat organotypic hippocampal slice culture model of cerebral ischemia. *Neurosci Lett* **342**: 93-96, 2003
- 14) Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, et al: Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J Neurosci Res* **86**: 1024-1035, 2008
- 15) Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, et al: Bone marrow stromal cells promoting corticospinal axon growth through the release of humoral factors in organotypic cocultures in neonatal rats. *J Neurosurg Spine* **6**: 412-419, 2007
- 16) Shichinohe H, Kuroda S, Tsuji S, et al: Bone marrow stromal cells promote neurite extension in organotypic spinal cord slice: significance for cell transplantation therapy. *Neurorehabil Neural Repair* **22**: 447-457, 2008
- 17) Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR): Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* **30**: 2752-2758, 1999
- 18) Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke Participants: Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke* **40**: 510-515, 2009
- 19) Savitz SI, Chopp M, Deans R, et al: STEPS Participants: Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke* **42**: 825-829, 2011
- 20) Savitz SI, Cramer SC, Wechsler L; STEPS 3 Consortium: Stem cells as an emerging paradigm in stroke 3: enhancing the development of clinical trials. *Stroke* **45**: 634-639, 2014
- 21) Hess DC, Borlongan CV: Cell-based therapy in ischemic stroke. *Expert Rev Neurother* **8**: 1193-1201, 2008
- 22) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al: Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* **134**: 1790-1807, 2011
- 23) Taguchi A, Sakai C, Soma T, et al: Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients. *Stem Cells Dev* **24**: 2207-2218, 2015