

低酸素低血糖刺激後のミクログリア・末梢血単核球による 脳梗塞機能回復促進療法

金 澤 雅 人

新潟大学脳研究所脳神経内科学分野

Cell therapy using microglia or peripheral mononuclear cells preconditioned
by oxygen-glucose deprivation against ischemic stroke

Masato KANAZAWA

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata, Japan

要 旨

脳梗塞は重度の後遺症を呈する疾患であり、脳梗塞後の機能回復療法の開発が望まれている。近年、脳梗塞に対する細胞療法の研究が盛んに行われている。しかし、既存の細胞療法は、投与細胞の採取や調整に複雑な手技を要し、一般臨床への普及が難しい。我々は、炎症に作用すると考えられていたミクログリアや末梢血単核球に、低酸素低糖という簡便な刺激を加えることにより、脳梗塞に対して治療効果のある細胞を調整できることを証明した。本稿では、我々の開発した技術の背景と今後の展望について概説する。

キーワード：脳虚血、再生医学、細胞療法、ミクログリア、末梢血単核球、低酸素低糖刺激、細胞修飾

はじめに

脳血管障害は日本人における死亡原因の第4位を占める疾患であるとともに¹⁾、要介護の原因疾患の第2位を占める²⁾。特に要介護4、5では第1位と最多であり、重度の後遺症を呈する。つまり、脳梗塞は救命できたとしても、その後遺症を長期間被りながら生活していくため、患者本人お

よび家族の負担は計り知れないほど大きい。そのため、後遺症の軽減につながる脳梗塞治療の改善は急務と言える。

脳梗塞に対する治療は、急性期の閉塞動脈の再灌流療法と、慢性期の再発予防療法および機能回復を目指した治療に大別される。再灌流療法として、組織プラスミノゲンアクティベーターによる経静脈的血栓溶解療法や機械的血栓回収療法が

Reprint requests to: Masato KANAZAWA
Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University,
1-757 Asahimachi-dori, Chuoku,
Niigata 951-8585, Japan.

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所脳神経内科学分野

金澤雅人

行われており、脳梗塞診療を大きく変化させ、発症後の劇的な機能回復をもたらすことができるようになってきている。しかし、その治療可能時間の短さから、恩恵にあずかれる患者は全体の3-10%に止まる³⁾。また、血管内治療は、80%の例で血流再開を認めるが、それでも半数以上は後遺症を認め十分な治療とは言えない。慢性期の治療としての機能回復を目指したりハビリテーションでも、半数が障害を残し⁴⁾、他に有効な後遺症改善を促進する治療もないため、新しい治療の開発が期待されている。近年では、機能回復促進を期待するものとして、幹細胞を主とする細胞療法の検討が行われている⁵⁾⁶⁾。

本稿では、我々が現在開発に取り組んでいる新規細胞療法を紹介し、今後の細胞療法研究の展望について述べる。

1) 脳梗塞に対する既存の細胞療法

脳梗塞後の機能回復を促進することを目的とし、亜急性期以降に行われる幹細胞療法がいくつか報告されてきた⁵⁾。これらは複数の治療標的に作用する多面的な保護効果を期待するもので、具体的には embryonic stem cell (ES 細胞) や、induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) を用いた細胞療法の有効性が報告されている。このうち、ES 細胞は倫理上の問題があり、iPS 細胞は特殊な培養を要する点や、腫瘍化の懸念が問題となる。また、臨床応用しやすい骨髄由来間葉系幹細胞・単核球を用いた細胞療法の研究が多く報告されている⁵⁾⁶⁾。

自己骨髄由来間葉系幹細胞・単核球は、拒絶反応がない点は魅力的であるものの、脳梗塞再発予防のための抗血栓療法下での骨髄穿刺の危険性が問題となる。これらは細胞数が少なく、治療必要量を確保するために培養が数週間必要であるが、発症後7-30日の時点で細胞を投与した臨床試験では、機能改善を認めなかったという報告もあり⁷⁾、より早期に治療を開始できる細胞が望ましいと考えられる。このため、より簡便に、多くの細胞数が採取でき、早期に治療介入が可能である細胞

として、ミクログリアや末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) に注目した。

2) 低酸素低糖刺激ミクログリア

ミクログリアやPBMC中に含まれるマクロファージや単核球は、脳梗塞後に炎症を惹起する組織障害性の性質を示す。一方、亜急性期以降には血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) などの組織修復因子や抗炎症性サイトカインを分泌し、組織保護的な極性となり組織修復に関与する⁸⁾。実際に、マクロファージを用いた細胞療法の有効性が報告されている⁹⁾。しかし、既報での修飾には、サイトカインが必要で長期間の培養を要するものであった⁹⁾。臨床応用を目指した際、より簡便で、より短期間の培養で保護的な性質を有する細胞に変換できないかと考え、その特徴や有効性を以下のように確認した。

既報では、脳梗塞後18-24時間で一過性に保護的なタイプのミクログリアが増え、その後炎症性が増加、亜急性以降に関しては再び保護的なタイプが増えてくることが示されていた¹⁰⁾。そこで我々は、脳梗塞類似の刺激、すなわち低酸素低糖 (oxygen-glucose deprivation: OGD) 刺激をミクログリアに18時間加え、ミクログリアが組織保護的な極性になるか検証した。すると、OGD刺激を加えたミクログリアは、VEGFや抗炎症性サイトカイン (TGF- β) を分泌した、すなわち組織保護的な極性に変化することがわかった。さらに、OGD刺激したミクログリアを、脳梗塞後遺症を有するラットに経動脈的に投与すると、脳梗塞巣周囲での血管新生・軸索進展が亢進し、脳梗塞後遺症が改善することがわかった¹¹⁾。この結果から、本技術を用いれば、特殊な薬品や培養装置を用いずに投与細胞を調整できることが判明し、本技術は従来の細胞療法に対し優位性を持つものと考えた。また本技術は、長期間の培養を要せず投与細胞を調整できることから、脳梗塞発症直後から治療を開始できるという利点も持つ。しかし、本技術の臨床応用を考慮した際、ヒト生体からミクログリアを採取することが困難である

という点が次の課題となった。

3) 低酸素低糖刺激末梢血単核球を用いた細胞療法

そこで次に、我々はPBMCに着目した。PBMC中には単球やマクロファージといったミクログリア類似の細胞が存在し、脳梗塞後の病態に関与することが知られている。PBMCもミクログリア同様、OGD刺激で組織保護的な効果を発揮するか検討した。

その結果、PBMCにOGD刺激を加えると、ミクログリア同様VEGFやTGF- β の分泌が亢進することがわかった¹²⁾。一方、脳梗塞後、血中に表面マーカーSSEA-3陽性細胞が組織から遊走してくることも知られている¹³⁾。SSEA-3は多分化能を持つ内在性幹細胞であるmultilineage-differentiating stress-enduring cell (Muse細胞) Muse細胞のマーカーであり、SSEA-3陽性細胞は正常のPBMC中にほとんどない。OGD後の細胞変化にSSEA-3陽性細胞増加がみられるかを検討した。PBMCにOGD刺激を加えると、PBMC中のSSEA-3陽性細胞の数が增加することがわかった。以上から、OGD刺激でPBMCは組織保護的な性質に変化することを示した¹²⁾。

次に、脳梗塞モデルラットに、OGD刺激したPBMC (OGD-PBMC) を投与し、その後の効果を検討した。脳梗塞7日後のラットにOGD-PBMCを経動脈的に投与すると、PBMCはBBBを通過し、脳内に移行することを確認した。また、無治療群に比しOGD-PBMC投与群では、投与3日後に脳梗塞巣辺縁でのSSEA-3陽性細胞数が増加していた。また、通常培養したPBMCを投与した群に比し、OGD-PBMC投与群では投与3日後に脳梗塞巣辺縁でのVEGF、TGF- β の発現が亢進していた(尚、TGF- β には組織修復因子としての効果もある)。さらに、通常培養したPBMCを投与した群に比し、OGD-PBMC投与群では投与21日後に脳梗塞巣辺縁での血管新生、軸索進展が有意に亢進していた。以上から、OGD-PBMCの投与は、脳内の組織修復因子の発現とSSEA-3陽性細胞の増加により、脳梗塞後の組織修復を促進すると考えた¹²⁾。

最後に、脳梗塞後遺症の機能改善についても検討した。ラットを壁の隅に追い詰めると、ラットは左右どちらかに振り向いて逃げようとする。ラットの左大脳半球に脳梗塞が生じると、ラットは右方向を向かなくなる。この手法はコーナーテストと呼ばれ、運動感覚機能を反映すると考えられる。このコー

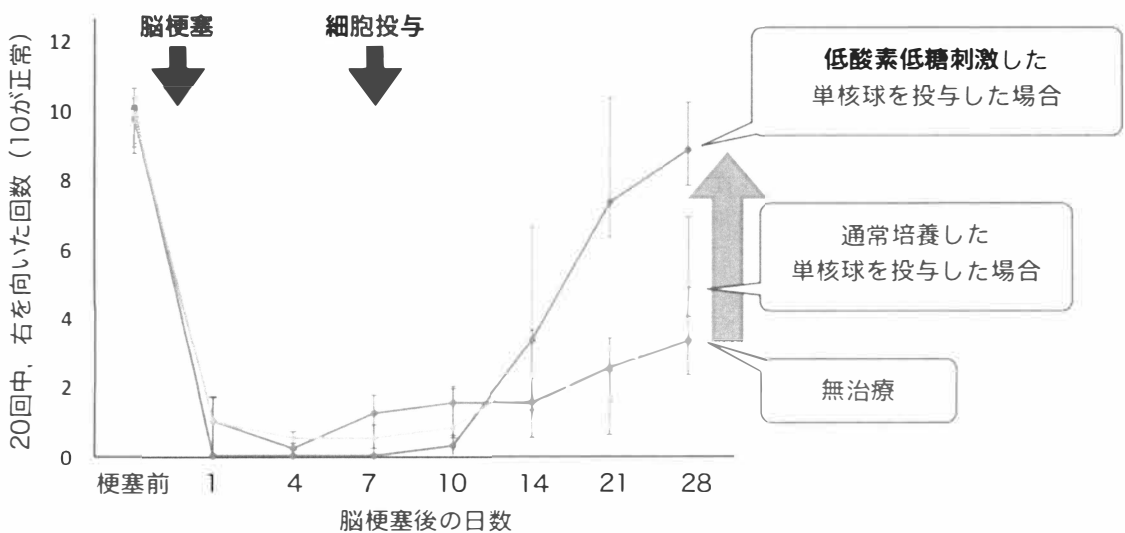


図1 低酸素低糖刺激末梢血単核球投与による脳梗塞機能回復 (文献12から改変)
機能回復に伴い、右を向く回数が10回に近づくテストによる

ナーテストを用いて、OGD-PBMC投与の治療効果を評価した。その結果、無治療群ではほとんど症状の改善が見られないのに対し、OGD-PBMC投与群では、投与21日後に無治療群に比し有意に症状の改善が認められた(図1)。以上の結果から、OGD-PBMC投与は、脳梗塞に対する新規治療戦略として有望であると考えた¹²⁾。

今後の課題

我々は、OGD刺激後の保護的PBMC投与は、亜急性期から慢性期脳梗塞の機能回復を促進する新しい治療法として有望である可能性を示した。過去には、修飾なしのPBMCやミクログリアを脳虚血ラットに投与し、治療効果を検討したのもあったが、これらでは治療効果を認めていなかった¹⁴⁾¹⁵⁾。OGDによるPBMC保護効果獲得機序は、1. OGD刺激を加えると、PBMCは転写因子PPAR γ の増加により、VEGFを分泌し、極性が組織保護的に変化すること、2. PBMCは細胞遊走因子MCP-1を介して脳内に移行し、脳内の組織修復因子の分泌が亢進すること、3. 刺激前には、ほとんど見られないSSEA3細胞を増加させることによることを考えている。これらの機序の相乗効果で、血管新生・軸索進展の促進を介して、脳梗塞後遺障害改善するという一連の機序が示された。これまで、ミクログリア、PBMC、アストロサイトなどは組織障害、回復阻害作用を有すると考えられてきた⁸⁾。OGDによりミクログリアやPBMCを組織保護的な性質に変える技術自体が、これまでと一線を画する細胞療法の基礎となるかもしれないと考える。

おわりに

本技術は、採血のみで投与細胞を採取できる点、特殊な装置なしに簡便に投与細胞を保護的な極性に修飾する点において、従来の細胞療法と一線を画すものである。細胞の性質を組織保護的に変換させ、細胞投与後に、脳内の残存細胞自体を変化させて、血管新生、神経軸索進展を誘導すること

は、細胞間情報伝達による新たなネットワークを形成するものである¹⁶⁾¹⁷⁾。この可塑性促進自体が新しい治療可能領域であるといえる⁵⁾。作用機序は十分には解明できておらず、さらに詳細を検討している。閉鎖系でOGD刺激を行うことができれば、一般病院でも治療可能なスキームとなると考えており、臨床応用を目指して、産学官連携の研究が進行している。

謝 辞

我々の細胞療法の研究は、岐阜大学脳神経内科 下畑享良先生、新潟大学脳神経内科 小野寺理先生、西新潟中央病院脳神経内科 高橋哲哉先生、新潟病院 中島孝先生、神戸医療産業都市推進機構医療イノベーション推進センターの尾前薫 専門職、木村泰子 専門職、LHS研究所 福島雅典先生との共同研究によるものであり、ここに深謝いたします。

文 献

- 1) 令和元年人口動態統計月報年計(概数)の概況、厚生労働省。
- 2) 令和元年国民生活基礎調査の概況、IV 介護の状況、厚生労働省。
- 3) Otsu Y, Namekawa M, Toriyabe M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Uemura M, Onodera O, Shimohata T, and Kanazawa M. Strategies to prevent hemorrhagic transformation after reperfusion therapies for acute ischemic stroke: A literature review. *J Neurol Sci.* Dec 15; 419: 117217, 2020.
- 4) Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DW, Mitchell PJ, Demchuk AM, Dávalos A, Majoie CB, van der Lugt A, de Miquel MA, Donnan GA, Roos YB, Bonafe A, Jahan R, Diener HC, van den Berg LA, Levy EI, Berkhemer OA, Pereira VM, Rempel J, Millán M, Davis SM, Roy D, Thornton J, Román LS, Ribó M, Beumer D, Stouch B, Brown S, Campbell BC, van Oostenbrugge RJ, Saver JL, Hill MD, and Jovin TG; HERMES collaborators. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised

- trials. *Lancet* 387: 1723-1731, 2016.
- 5) Hatakeyama M, Ninomiya I, Otsu Y, Omae K, Kimura Y, Onodera O, Fukushima M, Shimohata T, Kanazawa M. Cell Therapies under Clinical Trials and Polarized Cell Therapies in Pre-Clinical Studies to Treat Ischemic Stroke and Neurological Diseases: A Literature Review. *Int J Mol Sci* 21: 6194, 2020.
 - 6) 畠山公大, 二宮格, 小野寺理, 下畑享良, 金澤雅人. 脳梗塞に対する細胞療法の最前線. *日本内科学会雑誌* 110: 117-123, 2021.
 - 7) Prasad K, Sharma A, Garg A, Mohanty S, Bhatnagar S, Johri S, Singh KK, Nair V, Sarkar RS, Gorthi SP, Hassan KM, Prabhakar S, Marwaha N, Khandelwal N, Misra UK, Kalita J, Nityanand S; InveST Study Group. Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: a multicentric, randomized trial. *Stroke* 45: 3618-3624, 2014.
 - 8) Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, and Shimohata T. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. *Int J Mol Sci* 18: 2135, 2017.
 - 9) Chernykh ER, Shevela EY, Starostina NM, Morozov SA, Davydova MN, Menyayeva EV, and Ostanin AA. Safety and Therapeutic Potential of M2 Macrophages in Stroke Treatment. *Cell Transplant*. 25: 1461-1471, 2016.
 - 10) Perego C, Fumagalli S, and De Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation* 8: 174, 2011
 - 11) Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M, and Shimohata T. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep*. 7: 42582, 2017.
 - 12) Hatakeyama M, Kanazawa M, Ninomiya I, Omae K, Kimura Y, Takahashi T, Onodera O, Fukushima M, and Shimohata T. A novel therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation. *Sci Rep* 9: 16819, 2019
 - 13) Hori E, Hayakawa Y, Hayashi T, Hori S, Okamoto S, Shibata T, Kubo M, Horie Y, Sasahara M, and Kuroda S. Mobilization of Pluripotent Multilineage-Differentiating Stress-Enduring Cells in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 25: 1473-1481, 2016.
 - 14) Ukai R, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, and Kocsis JD. Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J Neurotrauma* 24: 508-520, 2007.
 - 15) Jiang C, Wang J, Yu L, Ou C, Liu X, Zhao X, and Wang J. Comparison of the therapeutic effects of bone marrow mononuclear cells and microglia for permanent cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 250: 222-229, 2013.
 - 16) Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M, Onodera O, Shimohata T, and del Zoppo GJ. Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? *J Cereb Blood Flow Metab* 39 (5): 753-769, 2019.
 - 17) Hatakeyama M, Ninomiya I, and Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res* 15: 16-19, 2020.
-