

脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた脳梗塞治療とそのメカニズムの検討

黒田淳哉

九州大学大学院医学研究院 病態機能内科学

【研究の背景】

脳梗塞は、時に重篤な後遺症を残す。機能回復のためリハビリテーション治療が行われているが、効果は不十分なことも多い。従来、成体脳においては神経細胞の再生は起こらないとされてきたが、近年、成体脳における神経幹細胞の存在が明らかになった。しかし、脳虚血の際の内因性神経細胞再生は非常に弱く、機能回復には結びついていない。我々は、脳虚血病態研究の一環として、脳細小血管壁に存在する血管周皮細胞に着目した研究に取り組んできた¹⁻⁴⁾。血管周皮細胞は、**Neurovascular unit**の構成細胞として、血液脳関門の維持、血管新生などに重要な役割を果たすのみならず、脳虚血に際しても神経栄養分子を分泌して神経保護的な役割を果たす⁴⁾。この血管周皮細胞は、間葉系幹細胞としての性質を持つとされている。最近、脳梗塞の再生医療の可能性が論じられているが、間葉系幹細胞を用いた治療も有力な候補となり得ると考えられる。実際、骨髄由来間葉系幹細胞を脳梗塞マウスに投与することにより、梗塞巣縮小と血管新生増加、神経機能回復などが報告されており、臨床試験では、安全性・有効性を示唆する報告もある。一方で、脂肪組織由来間葉系幹細胞には低侵襲で多くの細胞数が採取できるという利点があるが、脳梗塞治療の可能性について十分な検討がなされていない。

【目 的】

脂肪組織由来間葉系幹細胞を脳梗塞マウスに投与することによる神経機能・組織学的変化を評価し、そのメカニズムを検討する。

【方 法】

マウス(野生型)に中大脳動脈閉塞により脳梗塞を作成した。マウス脂肪組織から酵素処理・遠心により単離した間葉系幹細胞を、脳梗塞マウスに静注投与し、**day 1**から**day14**にかけて運動機能(ロータロッド試験、シリンダー試験、ステアケース試験)を評価するとともに、**MRI**による画像評価、脳梗塞サイズの評価などを行い、対照マウス(生理食塩水を投与)と比較した。

組織修復反応を含む脳梗塞病態を調べるため、脳を構成する細胞のマーカーや線維芽細胞による **fibronectin**、**collagen type I**などの細胞外基質、**GFAP**陽性アストロサイトによるグリオシス反応、ならびに梗塞巣内への炎症細胞浸潤などを評価した。ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を低酸素下で培養し、**VEGF**、**HGF**といった細胞増殖因子の発現変化を評価した。

【結 果】

当初、ヒト疾患モデルによく使用される **C57BL/6** マウスを用いて、一過性中大脳動脈閉塞により脳梗塞を作成し、マウス脂肪組織由来幹細胞を投与したが、**MRI**による脳梗塞サイズ、ロータロッド試験・シリンダー試験・ステアケース試験によ

る運動機能は対照と差を認めなかった。しかしながら、C57BL/6 マウスは脳血管に個体差が強いため、同じ手技で中大脳動脈閉塞を行っても脳梗塞サイズや神経症状に個体間のばらつきが大きく、評価が困難になっている可能性が考えられた。

そこで、脳血管の個体差が少なく脳梗塞が安定して作成可能な CB-17 マウスを用いて実験を行うこととした。このマウスは神経症状が出にくいことから、まず、線維化応答や免疫反応を含む脳梗塞病態を調べることにした。中大脳動脈永久閉塞による脳梗塞を作成すると、神経細胞の脱落とともに経時的に PDGFR β 陽性細胞の梗塞巣内部への侵入・占拠、梗塞巣内部での細胞外基質の発現、GFAP 陽性アストロサイトの梗塞巣周囲への集積などが観察された。さらに、中大脳動脈永久閉塞と一過性閉塞を比較すると、一過性閉塞では 60 分以上の閉塞により永久閉塞と同じサイズの梗塞が形成されるが、梗塞巣周囲のアストロサイトの集積と梗塞巣内部の線維化の程度が強くなり、7 日目以降の梗塞サイズが永久閉塞に比べて縮小した³⁾。

脂肪組織由来間葉系幹細胞を GFP 過剰発現マウスから採取して脳梗塞マウスに投与して組織を観察したが、梗塞巣付近には GFP 陽性細胞はほとんど認めなかった。ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の虚血下での反応を調べるため、低酸素下で培養したところ、VEGF の発現は増加し、HGF の発現は逆に減少した。

【考 察】

脳梗塞の病態には、PDGFR β を介した梗塞巣内部の線維化応答が中心的な役割を果たしており、血流が再開することでその反応がより促進されることが梗塞後の修復に重要であると考えられた。脂肪組織由来間葉系幹細胞を投与することで、これらの反応・経過が修飾されるかどうか、それが症状の軽減につながるかどうかを今後さらに調べる必要がある。ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞は低酸素刺激により細胞増殖因子の発現が変化しており、機序として注目する必要がある。投与した幹細胞は脳梗塞周囲にはほとんど存在しないことから、局所で神経細胞などへの分化が起きているわけではなく、前述のような液性因子の産生を介している可能性がある。今後のさらなる研究が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

脳梗塞は寝たきりや要介護となる疾患の第 1 位であり、高齢化の進行に伴い、介護負担などその社会的影響はますます大きくなることが予想される。現在、神経機能回復のため、リハビリテーションが行われているが、必ずしも十分な効果があるとは言えない。幹細胞を用いる脳梗塞再生医療により、脳梗塞の病態メカニズムを修飾することができれば、リハビリテーションとの併用により、より大きな神経機能回復効果を見込むことも可能になるかも知れない。また、脳梗塞再生医療の効果のメカニズム(例えば幹細胞が生成する液性因子など)が明らかになれば、幹細胞を用いなくとも再生医療と同様の効果をもつ新たな薬剤・治療法の創出につながるものと期待される。今後さらに研究を進めていきたい。

【参考・引用文献】

- 1) Kuroda J, Ago T, Nishimura A, Nakamura K, Matsuo R, Wakisaka Y, Kamouchi M, Kitazono T: Nox4 is a major source of superoxide production in human brain pericytes. *J Vasc Res* 51:429-438, 2014
- 2) Makihara N, Arimura K, Ago T, Tachibana M, Nishimura A, Nakamura K, Matsuo R, Wakisaka Y, Kuroda J, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T: Involvement of platelet-derived growth factor β in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke. *Exp Neurol* 264:127-134, 2014
- 3) Ishitsuka K, Ago T, Arimura K, Nakamura K, Tokami H, Makihara N, Kuroda J, Kamouchi M, Kitazono T: Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: A role of pericytes for

neuroprotection. *Microvasc Res* 83:352-359, 2012

- 4) Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Nakamura K, Ishitsuka K, Kuroda J, Sugimori H, Ooboshi H, Sasaki T, Kitazono T: PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury. *Curr Neurovasc Res* 9:1-9, 2012
- 5) Tachibana M, Ago T, et al. Early reperfusion elicits effective tissue repair through astrogliosis and fibrotic formation leading to reduced infarct volume after brain ischemia. *In submission*