

脳梗塞を対象とした再生アソシエイト細胞静注治療の開発

瀧澤俊也

東海大学医学部 内科学系神経内科学

【研究の背景】

新たな脳梗塞の治療標的として、神経細胞の保護・再生とともに栄養血管新生による血行改善が重要であると考え。血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell: EPC) は、本共同研究者の浅原らがヒト末梢血中にその存在を世界で初めて発見し (Science, 1997)、その後 G-CSF で EPC の分化を促進し回収率を効率化や、量・質の優れた分化能の高い EPC を増化させる (QQ-NMC) 培養法などの改善を重ねてきた。最終的に、血管再生能に富み良質な EPC とともに抗炎症型マクロファージや制御性 T 細胞の増加による抗炎症効果・免疫寛容効果を併せ持つ再生アソシエイト細胞 (RACs) 移植培養法を開発した (J Am Heart Assoc, 2014)。我々は 2016 年に再生アソシエイト細胞の動注治療が、マウス永久中大脳動脈閉塞モデルでの梗塞巣の縮小効果・血管再生・抗炎症・脳保護作用を示すことを報告した (Takizawa et al, 2016)。この治療法を簡便かつ容易に臨床現場に普及するため、RACs 静注によるマウス脳梗塞縮小効果の検証と脳梗塞患者の再生アソシエイト細胞動態解析は必須と考える。

【目 的】

本研究の目的は、RACs の静注療法でのマウス脳梗塞モデルにおける血管再生・抗炎症効果を評価することである。さらに、ヒト脳梗塞患者に自己血培養した RACs の静注治療を前提にして、ヒト脳梗塞患者から静脈採血して RACs 動態解析を行うことである。

【方 法】

- 1) 5 日間培養した血管再生能に富み良質な EPC を含む RACs を、マウス中大脳動脈閉塞作成 3 日後に静注する。移植 7 日後に神経症候 (Bederson score、Rotor Rod 試験) の評価後に sacrifice し、梗塞巣測定、血管再生因子である VEGF、IL-10、CD34 免疫染色/Western blot を行う。また、未分化の EPC を含有する細胞群、RACs 群を尾静脈からの注入し、様々な細胞数量 (10^4 、 10^5 、 10^6 個) で検討し、至適用量を決定する。
- 2) 急性期脳梗塞患者 24 人及び健常コントロール者 23 名から静脈採血して RACs 動態解析を行う (臨審委第 12R-068 号承認済)。脳梗塞患者から採取した単核球を培養して、健常コントロールと細胞の生育状況、含有している細胞種の差異を検討する。具体的には、CD34 陽性細胞内未分化 EPC 分画を採取し、EPC 分化増幅培養 (Masuda et al, 2014) を行い、培養各時点における内皮系表面マーカーによる培養 EPC の FACS 解析及び EPC-CFA による未分化型、分化型 EPC コロニー数の算定を行う。両解析結果の相関関係を統計学的に解析し、培養 EPC の分化過程における経時的マーカー変遷を追跡し、EPC 分化過程の細胞表面マーカーの FACS によるプロファイリングを行い、RACs 群を健常者と比較検討する。

【結 果】

- 1) マウス中大脳動脈永久閉塞モデル作成 3 日後に、RACs ($1 \times 10^5/50 \mu\text{L}$) を静注した群では、PBS 群と比較して 7 日後の脳梗塞容積が有意に縮小していた。一方、RACs ($1 \times 10^4/50 \mu\text{L}$) を静注した群では PBS 群と比較して梗塞巣の縮小を認めなかった。IL-10 ないし VEGF 陽性細胞は、PBS 群と比較して RACs ($1 \times 10^5/50 \mu\text{L}$) を静注した群では増

加傾向を認めた。Matrigel tube formation assay では、PBS 群と比較して RACs 投与で血管新生の有意な増加を認めた。

- 2) 急性期脳梗塞患者 (n=24, 69±17 歳) と健常者 (n=23, 66±10 歳) の RACs の動態解析を行った。健常者のみならず脳梗塞患者において QQ-MNC 培養は、large cell colony、CD34 陽性細胞、CD133 陽性細胞、CD206 陽性細胞を増加させ、培養上清の炎症性サイトカインを減少させた。急性期脳梗塞患者の RACs は発症 3 日後、10 日後ともに同様の増加傾向を認めた。

【考 察】

マウス脳梗塞モデルにおいて、閉塞 3 日後の RACs ($10^5/50 \mu\text{L}$) の静注移植は、IL-10 増加など多面的脳保護・血管再生作用を介して梗塞巣を縮小した。また QQ-NMC 培養法は、ヒト脳梗塞患者の静脈血において抗炎症効果と良質の EPC を増加させており、今後静注による脳梗塞治療への応用が期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

EPC を用いた脳梗塞治療の研究は国外で行われているが、“良好な血管再生環境”を形成する RACs を脳梗塞治療に応用しているのは、国内外で我々だけの独自の研究である。

- 1) 血管再生能に富み良質な EPC とともに抗炎症型マクロファージや制御性 T 細胞の増加による抗炎症効果・免疫寛容効果を併せ持つ RACs 培養は世界で初めて開発した技術であり、我々のみが成し得る独創的研究である。特に、この細胞移植は、a) 培養開始後 1 週間で移植可能となること、b) 採血量が少ないこと、c) 自己細胞なので免疫拒絶反応の危険が少ないこと、d) 培養に際し特別な機器や施設を必要としないことなど多くの臨床応用上の利点を有する。
- 2) 脳梗塞患者の EPC 分化動態の解明は、脳梗塞発症・再発予知の観点から大きな意義がある。
- 3) 動物実験とヒト脳梗塞患者の EPC 分化動態で解明される至適条件をもとに、脳梗塞患者を対象に RACs を静注移植する第 1 相臨床研究を予定する。この第 1 相臨床研究で治療の安全性、血管新生・梗塞巣縮小や mRS の改善が確認されれば、臨床的に極めて大きな意義を持つと確信する。さらに、これらの研究結果を基盤として、プラセボ対照多施設ランダム化臨床研究の実施に向け準備を進めたい。

【参考・引用文献】

Takizawa S, et al. Recent Progress in Endothelial Progenitor Cell Culture Systems: Potential for Stroke Therapy. Neurol Med Chir. 56: 302-309, 2016.