

## 末梢血由来単核球細胞による脳梗塞機能回復療法

金澤雅人

新潟大学脳研究所 脳神経内科学分野

### 【研究の背景】

脳梗塞の治療として、亜急性期以降の内科的治療は、再発予防のみである。リハビリによる機能回復治療でも効果が十分ではなく、半数以上が後遺症を有する。脳梗塞慢性期の機能回復を促進する新しい治療法の検討は、喫緊の課題である。

近年、脳梗塞に対して、iPS 細胞を含めて様々な幹細胞療法が検討されているが、1. 数が少なく、時間をかけて特殊な培養が必要、2. 癌化の危険性、3. 非常に高額であり、幅広く応用するのは困難である。申請者は、ミクログリアに注目した。それは、1) 組織障害性の M1 様ミクログリアではなく、血管新生、神経再生に修復させる M2 様ミクログリアは様々な成長因子を脳梗塞周辺で分泌すること、2) 薬剤を到達させない血液脳関門を越えて、病変周辺に集まる性質があるためである<sup>1)</sup>。

申請者は、初代ミクログリアに軽い虚血刺激(低酸素低糖刺激; OGD)を加えることで、保護的な M2 様ミクログリアに極性をかえる技術を開発した<sup>2)</sup>。後遺症が見られるラットの慢性期に細胞を投与することで、投与細胞は、脳梗塞病変に集簇し、血管内皮増殖因子(VEGF)分泌による、血管新生、神経軸索伸展を促進し、機能予後を著明に回復させることを示した。さらに、臨床応用を目指して、性質が類似し、ミクログリアよりも簡便に採取できる末梢血由来単核球(PBMC)に注目した。

### 【目 的】

PBMC を、OGD 刺激にて保護的な分画に変化させ、臨床応用可能な血管新生による細胞療法の可能性を検証する。

### 【方 法】

ラット塞栓系モデルを用いて、in vivo の検討を行った。PBMC の分離は、フィコール分離を行い、更に様々な分画の細胞に分けるため各種抗体を用いたフローサイトメトリーを行った。

1. OGD 刺激後の PBMC (OGD-PBMC) が、どのような細胞が変化するかを検証した。
2. 投与後の血管新生、神経軸索伸展を二光子顕微鏡で観察し、3D 解析 IMARIS で評価した。
3. 細胞の動脈投与の効果を確認するため、無刺激、ないし OGD-PBMC を、虚血 1 週間後に  $5 \times 10^6$  個、経頸動脈投与し、その後 3 週間症状をコーナートテストで検討した。

### 【結 果】

1. OGD-PBMC は VEGF を分泌する

OGD 刺激後、PBMC の M2 化を定量的に評価するために、ラットおよびヒトの培養馴化培地の 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、通常の Normoxic-PBMC では認められなかった。極性変化に関与する転写因子 PPAR $\gamma$  は、Normoxic-PBMC と比べて、OGD-PBMC で有意に増加していた。

2. OGD 刺激によって PBMC 中の SSEA3 陽性細胞が増加する

SSEA3 とは多能性幹細胞が発現するマーカーである。フローサイトメトリーで SSEA3 陽性細胞の有無を検証した。Normoxic-PBMC 中には SSEA3 陽性細胞はほとんど存在しないが、OGD-PBMC では SSEA3 陽性細胞の割合が有意に増加していた。

3. OGD-PBMC は細胞移植後、ラットの脳梗塞巣に移行する

ラットの脳梗塞モデルを作成し、脳虚血 7 日後に PBMC を経頸動脈投与した。内在性の細胞と区別するため、GFP マウス由来の PBMC を用いた。この結果、脳虚血 10 日後(細胞移植 3 日後)に、OGD-PBMC 投与群では、虚血周辺部に、GFP 陽性細胞が認められた。一方、Normoxic-PBMC 投与群ではそれらの細胞は認められなかった。脳内移行性獲得に、単球の遊走を引き起こすケモカイン単球走化性因子 MCP-1 が関係すると考え、評価したところ、OGD-PBMC では、Normoxic-PBMC と比べて有意に増加した。

4. OGD-PBMC は脳内における VEGF 発現をもたらす

脳梗塞モデルラットに、OGD-PBMC を経動脈的に投与した後、脳内における VEGF 発現が増加するのかを免疫蛍光染色を用いて検証した。OGD-PBMC 投与群では、Normoxic-PBMC 投与群に比し、VEGF の発現が有意に増加していた。

5. OGD-PBMC は脳内における SSEA3 陽性細胞を増加させる

PBMC を移植したラットの脳内における SSEA3 陽性細胞の数を、免疫蛍光染色を用いて計測した。脳虚血 10 日後(細胞投与 3 日後)の時点で、OGD-PBMC 投与群では対照群に比し、虚血中心辺縁部における SSEA3 陽性細胞数が有意に増加していた。

6. OGD-PBMC は血管新生、神経軸索進展を促進する

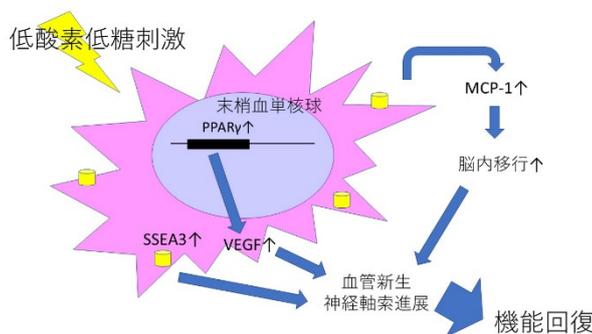
脳虚血 28 日後(細胞移植 21 日後)の脳サンプルを用いて、免疫蛍光染色で検証した。細胞投与後、虚血中心辺縁部及びペナンプラにおける血管新生マーカー CD31 の免疫反応性は、Normoxic-PBMC 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群で増加していた。また、虚血ペナンプラにおける軸索マーカー SMI31 の免疫反応性は、Normoxic-PBMC 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群で増加していた。

7. OGD-PBMC 投与は、脳梗塞後の機能回復を促進させる

OGD-PBMC を投与したラットで、脳梗塞後の機能回復が生じるかを検討した。脳虚血前、および脳虚血 28 日(細胞投与は 7 日後)まで、運動・感覚機能の評価を行った。脳虚血 28 日後、OGD-PBMC 投与群では、対照群に比し、有意に運動・感覚機能障害が改善した。

【考 察】

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<sup>3)</sup>。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 $\gamma$  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が示された。また、2. PBMC は 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。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(図)。OGD により PBMC を保護的な極性に変える技術が、これまでと一線を画する細胞療法の基礎となると考える<sup>4)</sup>。



【臨床的意義・臨床への貢献度】

本技術は、採血のみで投与細胞を採取でき、閉鎖系でこれ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、現在、本技術の作用機序のさらなる解明と、臨床応用を目指して、産学官連携の研究が進行している。

【参考・引用文献】

1. Kanazawa M, et al.: Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *Int J Mol Sci* 18: 2135, 2017
2. Kanazawa M, et al: Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep* 7: 42582, 2017
3. Hatakeyama M, Kanazawa M, et al: A novel therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation. *Sci Rep* 9: 16819, 2019
4. Hatakeyama M, Kanazawa M, et al; 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