

脳梗塞に対する末梢血単核球細胞療法の保護的極性獲得機序の解明

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】

脳卒中は寝たきり原因の第1位、医療費の約1割を費やす重要な克服すべき疾患である。脳梗塞は脳卒中の7割を占め、機能予後を改善する治療の開発が社会的に求められている。脳梗塞の治療として、急性期の治療は、血栓溶解薬組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) 療法や血管内治療による再灌流療法が確立している。一方、亜急性期・慢性期の内科的治療は、再発予防のみである。さらに、再灌流療法は短い治療可能時間、特別なデバイスが必要であるため、全体の10%までしか行えず、仮に再灌流できても、半数以上が後遺症を有する¹⁾。つまり、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。しかし、1. 幹細胞は数が少なく、時間をかけて特殊な培養で細胞数を増やす必要があること、2. 癌化の危険性があること、3. 条件付き先駆け承認されたステミラック注も含めて非常に高額であり、幅広く応用するのは今だ困難である²⁾。その一方、ミクログリア、末梢血単核球 (PBMC) は病変部に集簇しやすいこと、刺激によっては保護的な成長因子を分泌することから、細胞療法として有利な性質を有している。申請者は、初代ミクログリアや PBMC に軽い虚血刺激 (低酸素低糖刺激; OGD) を加えることで、保護的な細胞に極性をかえる技術を開発した^{3,4)}。急性期に十分な治療が行われず、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)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β 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。OGD で組織保護的に極性を変化させたこれらの細胞の作用機序として、投与した細胞が脳梗塞病巣へ遊走することも報告している。さらに血管新生、軸索伸展に関しては、1. 成長因子等や細胞自体を介した血管新生が軸索伸展をガイドする作用、2. 細胞自体の転換によることを考えている^{2,5)}。つまり、PBMC を用いて性質変換することで、一般病院でも脳梗塞後の機能回復を目指した細胞療法を行える可能性を示している。

【目的】

OGD-PBMC 投与後の脳梗塞期の回復の作用機序の解明を行う。具体的には、1. ヒト由来 OGD-PBMC による細胞療法でも脳内修復促進における血管新生、神経軸索伸展を認めるかを検証する、さらに、2. OGD-PBMC による細胞修飾の細胞間連絡シグナルの解明を行う。

【方法】

ラット塞栓系モデルを用いて、in vivo の検討を行った³⁾。PBMC の分離は、フィコール分離により実施した⁴⁾。

1. 投与後の血管新生、神経軸索伸展を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、3D 解析 IMARIS で評価した。
2. OGD 前後の転写因子の検討で、Hif-1 α を標的とする一次抗体と細胞抽出液、培養馴化培地を用いたウェスタンブロッティングを行った。さらに、miRNA (miR) の阻害薬を投与し、その下流の Hif-1 α 発現をウェスタンブロッティング、VEGF 分泌は培養馴化培地を Luminex アッセイにて検討した。

【結 果】

1. ヒト OGD-PBMC 投与は、血管を新生し、神経軸索を進展させる

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、虚血辺縁部における血管新生マーカー CD31 の免疫反応性は、PBS 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群で増加していた。また、同部位における軸索マーカー SMI31 の免疫反応性は、PBS 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群で増加していた。

2. OGD 刺激によって PBMC において Hif-1 α が誘導される

OGD 刺激後、Hif-1 α を定性的に評価するために、培養馴化培地と細胞抽出液のウェスタンブロットティングを行った。通常培養では、培養馴化培地と細胞抽出液から Hif-1 α のシグナルは検出されなかったが、OGD 刺激後には細胞抽出液でのみ Hif-1 α のシグナルが検出された。

3. miR 阻害配列により、OGD-PBMC 中の Hif-1 α 誘導は亢進する

OGD 刺激を行う際、miR の特異配列を添加した。これより、転写因子 Hif-1 の発現が変化するのか、さらに変化するのであればその下流に位置する VEGF 分泌が変化するのかを検証した。コントロール配列に比して、miR の阻害で、Hif-1 の発現は増加した。さらに、VEGF の分泌能の変化を培養馴化培地の Luminex アッセイで評価したところ増加していた。

【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ている⁴⁾。今回、この細胞療法の作用機序を検討した。OGD による PBMC の保護効果獲得機序は、1. OGD 刺激で、PBMC は転写因子 Hif-1 α の発現が増加した。また、Hif-1 の発現は miR 阻害により増加し、さらに VEGF 分泌も増加させることを見出した。Hif-1 のメッセンジャー RNA に、miR が作用することで Hif-1 は発現が調節されている⁵⁾。さらに Hif-1 は VEGF 発現を促進させる転写因子であり、miR-Hif-1-VEGF の系が OGD-PBMC の極性変化に関与していると考えた。

VEGF は、血管新生や神経軸索の進展を誘導する^{6,7)}。実際に、OGD 刺激 PBMC を脳梗塞ラットに投与すると、脳内で VEGF が増加することを示しているが⁴⁾、今回、ヒト由来細胞投与でも血管新生・軸索進展の促進を来すことが異なる細胞種でも検証できた。

【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いる。現在、臨床応用を目指して、投与を簡便に行うスキームを確立すべく、産学官連携の研究が進行している。

【参考・引用文献】

1. Otsu Y, Kanazawa M, et al. Strategies to prevent hemorrhagic transformation after reperfusion therapies for acute ischemic stroke: A literature review. *J Neurol Sci* 419: 117217, 2020. doi: 10.1016/j.jns.2020.117217.
2. 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.
3. Kanazawa M, et al. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep* 7: 42582, 2017.
4. 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.
5. Bruning U, et al. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol* 31: 4087-4096, 2011.
6. Kanazawa M, et al. Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target?. *J Cereb Blood Flow Metab* 39:753-769, 2019.

7. Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res* 15:16-19, 2020.