

＜シンポジウム (2)—9—4＞神経疾患 iPS 細胞の現状と展望

脳梗塞への再生医療と iPS 細胞移植療法

阿部 康二 山下 徹 河相 裕美

(臨床神経 2012;52:1143-1146)

Key words : iPS細胞, 脳梗塞, 山中4因子, MMP9

様々な病態が時間経過と共にダイナミックに変化してゆく脳梗塞の急性期病態においては、その各局面においてことなる病態や治療法の選択肢が存在する。このような脳梗塞への細胞移植療法については、骨髄幹細胞をはじめ培養神経幹細胞、臍帯血幹細胞、ES細胞、iPS細胞などの基礎研究が推進されている。このうち筆者らはiPS細胞のラット脳梗塞モデルへの移植をおこなったデータについて報告する。8週齢マウスに30分間の右中大脳動脈閉塞後、再還流をおこない、翌日マウスiPS細胞 5×10^6 個を右脳線条体にマイクロシジリングをもちいて投与した。このマウス群とは別に、正常脳に生食(PBS)を投与した群、虚血脳にPBSを投与した群、正常脳にiPS細胞を投与した群も加えて4群に分類して検討した。投与後は4群とも運動機能評価をおこない、14日および28日後に脳を摘出し組織学的検討をおこなった。その結果、運動機能は4群間で明らかな差をみとめなかったが、組織学的検討では移植されたiPS細胞は正常脳内にくらべ虚血脳内で顕著に生着および増殖し巨大な腫瘍を形成した。HE染色では腫瘍内で扁平上皮、腺、軟骨様の組織形成を確認したため、三胚葉分化能を有すると考えられた。またiPS細胞誘導に重要な山中4因子やMMP9の発現を検討したところ、その発現量が虚血脳にiPS細胞を移植した群と正常脳にiPS細胞を移植した群において大きくことなっていた。このように虚血脳内は移植されたiPS細胞が生着増殖するのに有利な環境であり、このために山中4因子やMMP9が重要な役割を演じていることが示唆された。

1) 脳梗塞急性期の再生医療

当教室のIwaiらによれば、砂ネズミ5分間前脳虚血後の海馬歯状回で10日から60日まで観察したところ、歯状回SGZの神経幹細胞は10日をピークに増加しこれらの細胞はしだいに神経細胞に成熟分化していくことが示された¹⁾。また正常成熟脳に存在するoligodendrocyte progenitor cellがラットの一過性脳虚血後に増加し²⁾、加齢ラットでは増加細胞数および突起数が若年ラットよりも少なかったとする報告も出てきている³⁾。このような内在性神経幹細胞は神経栄養因子の投与により増殖することが知られており、2002年の報告ではラット一過性前脳虚血モデルで神経栄養因子bFGFおよびEGF

により、失われつつある海馬CA1細胞層が見事に再生され、しかも電気生理機能を保持し、空間認知機能などの臨床症状も改善した⁴⁾。また2003年にはFGF-2による蛋白治療(マウス)や遺伝子治療(砂ねずみ)、またIGF-1とGDNFによる蛋白治療(SHRラット)が報告された。2004年にはFGF2遺伝子をラット中大脳動脈閉塞モデルで脳室内や静注により脳梗塞後に遺伝子治療をおこない、それぞれ脳梗塞体積の縮小と導入遺伝子の梗塞辺縁部マクロファージでのFGF2遺伝子発現を観察し、側脳室SVZの神経幹細胞増殖を促進したとされる。

一方、外来性神経幹細胞移植による脳梗塞再生医療について、Honmouらはヒト成熟脳由来の神経幹細胞をそのまま砂ネズミの側頸動脈閉塞モデルに移植したところ、虚血病巣内での生着が確認され、神経細胞やグリア細胞への分化とシナプス再形成がみとめている⁵⁾。幹細胞による移植再生治療は、神経幹細胞の他にも骨髄組織(bone marrow stromal cell, MSC)や臍帯血など様々な細胞で試みられ治療効果を挙げている。また2002年のLiらの報告によれば、ラットの一過性2時間MCA閉塞後24時間目にヒト骨髄細胞(hMSC)を静注したところ、内在性の第3脳室周囲幹細胞(SVZ)が増殖した。一方、2004年のIihoshiらによれば、ラットの一過性45分MCA閉塞後、3~72時間後に骨髄細胞(MSC)を静注したところ、時間依存性に脳梗塞縮小効果があり、3時間後投与ではほぼ梗塞が消失し、72時間後投与でも脳梗塞を38%縮小したという。

2) 遺伝子治療と再生医療の融合療法

2000年ごろから遺伝子治療と再生医療単独の融合療法が報告され始めて新たな注目を集めている。すなわち単純な幹細胞移植における問題点を、何らかの遺伝的改変や遺伝的修飾を施して移植するex vivo遺伝子治療は移植再生医療との融合療法として当然の方向性といえる。現在までに、neurosphere(NS)やneuronal progenitor cell(NPC)、NT2細胞、骨髄細胞(MSC)などに、NGFやBDNF、GDNFなどの神経栄養因子遺伝子を導入して正常あるいは虚血脳に移植して、導入遺伝子の発現や移植細胞の生着、脳梗塞治療効果を観察したものが報告されている2006年に発表された大阪医大の

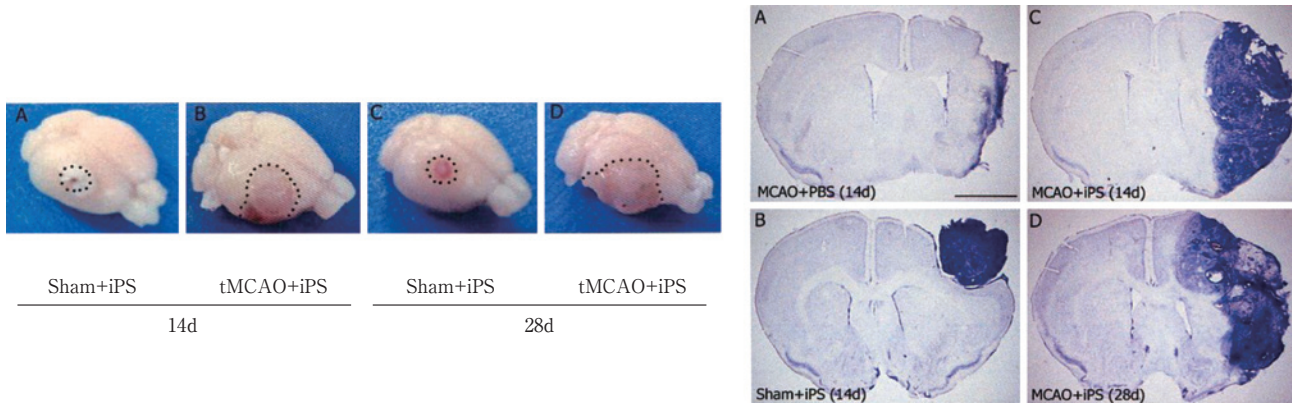


Fig. 1 Sham control脳 (Sham) に移植した場合とくらべて、一過性脳虚血 (tMCAO) 後の脳に移植した iPS 細胞は、14 日目および 28 日目に大きく腫瘍化した (左)。同脳の切片染色では、小さく境界明瞭な正常脳移植 iPS 組織とくらべて、巨大化し境界不鮮明な iPS 組織がみとめられた (右)。(Kawai, Yamashita, and Abe, JCBFM, 2010)

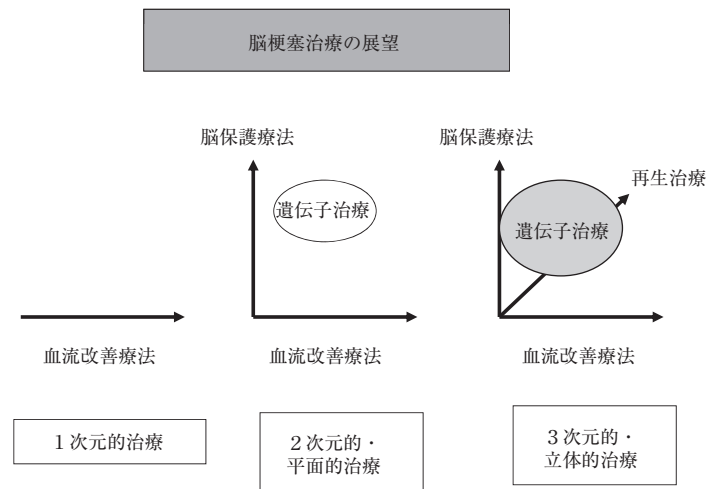


Fig. 2 脳梗塞の治療はこれまでの血流改善療法による 1 次元的治療に加えて、脳保護療法の実現により「2 次元的・平面的治療」の段階に移行した。再生医療の登場により脳梗塞の治療は従来にない画期的な段階に入っており、遺伝子治療との融合によって「3 次元的・立体的治療」の段階にいたる。

宮武らによる HGF 遺伝子導入骨髄幹細胞移植療法や、2007 年に発表された岡山大学の亀田らによる神経幹細胞への GDNF 遺伝子導入細胞移植療法も注目を浴びている。また遺伝子そのものではないがミクログリアを interferon で活性化修飾して移植することにより治療効果を向上するといった試みもされ始めている。遺伝子導入するベクターの種類も、アデノウイルスから retrovirus, lentivirus まで様々にもちいられており、発現プロモーターも Tc, CA, eIF1 α など研究者の目的に応じて様々に試行されている。この ex vivo 遺伝子治療は将来的に分化誘導ならびにローカル・遠隔ネットワークのプログラミングをうまく導入してやることで、脳梗塞の急性期・慢性期共に実用的な再生医療へと発展していくものと考えられている。

3) 脳梗塞急性期の iPS 細胞移植療法

筆者らは iPS 細胞のラット脳梗塞モデルへの移植をおこなった。8 週齢マウスに 30 分間の右中大脳動脈閉塞後、再還流をおこない、翌日マウス iPS 細胞 5×10^6 個を右脳線条体にマイクロシリンジをもちいて投与した⁶⁾。このマウス群とは別に、正常脳に生食 (PBS) を投与した群、虚血脳に PBS を投与した群、正常脳に iPS 細胞を投与した群も加えて 4 群に分類して検討した。投与後は 4 群とも運動機能評価をおこない、14 日および 28 日後に脳を摘出し組織学的検討をおこなった。その結果、運動機能は 4 群間で明らかな差をみとめなかったが、組織学的検討では移植された iPS 細胞は正常脳内にくらべ虚血脳内で顕著に生着および増殖し巨大な腫瘍を形

成した (Fig. 1). HE 染色では腫瘍内で扁平上皮, 腺, 軟骨様の組織形成を確認したため, 三胚葉分化能を有すると考えられた. また iPS 細胞誘導に重要な山中 4 因子や MMP9 の発現を検討したところ, その発現量が虚血脳に iPS 細胞を移植した群と正常脳に iPS 細胞を移植した群において大きくことなっていた. このように虚血脳内は移植された iPS 細胞が活着増殖するのに有利な環境であり, このために山中 4 因子や MMP9 が重要な役割を演じていることが示唆された⁶⁾.

4) 期待される脳梗塞慢性期の再生医療

脳梗塞急性期に再生医療の恩恵に浴することができる患者は時間的技術的な制約のために脳梗塞患者全体の 5% 以下であろう. したがって慢性期に移行した患者における再生医療の重要性は今後ますます重要になるものと思われる. 筆者の研究室の出口らは, この目的で慢性期の再生医療には神経再生のための足場 (scaffold) が必要と考え, 人工的に切除した大脳にシリカベースの蜂巢状足場 GPSM (γ -glycidoxypropyl trimethoxy silane) を埋め込んだところ, 慢性期における脳の変形が予防され, 足場内部へ血管組織やグリア組織, 神経細胞突起が新しく進入し, しかもこの scaffold 内腔に神経栄養因子 EGF + bFGF を同時にふくませておくと, 対照と比較してこれらの新しい進入が増幅されることをみいだした⁷⁾. 現在, 新しい神経細胞体そのものの進入促進を図って研究を続けているが, このような慢性期の脳梗塞再生医療研究は今後の発展が大きく期待されている. 新素材による新しい軟性 scaffold の将来性も期待されている^{8)~10)}. 脳梗塞病態の経時的変化と 2008 年 4 月から始まったシームレス治療戦略のなかで, 脳梗塞病期に応じた遺伝子治療と再生医療の使い分けが必要となって来るものと考えられている. 歴史的に見ると脳梗塞の治療はこれまでの血流改善療法による 1 次元的治疗に加えて, 2001 年からの脳保護療法の実現により漸く「2 次元・平面的治療」の段階に移行したのと考えられる. 再生医療の登場により脳梗塞の治療は従来にない画期的な段階に入っており, 遺伝子治療との融合によって「3 次元・立体的治療」の段階にいたるのであろうと考えられ, これを筆者は「脳梗塞治療 3 段階説」と呼ぶことを提唱している (Fig. 2).

※本論文に関連し, 開示すべき COI 状態にある企業, 組織, 団体はいずれも有りません.

文 献

- 1) Iwai M, Sato K, Omori N. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* 2002;22:411-419.
- 2) Tanaka K, Nogawa S, Ito D, et al. Activation of NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells during post-ischemic reperfusion in the rat brain. *Neuroreport* 2001; 12:2169-2174.
- 3) Ohta K, Iwai M, Sato K, et al. Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2003; 335:159-162.
- 4) Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110:429-441.
- 5) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 2011;134:1790-1807.
- 6) Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, et al. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:1487-1493.
- 7) Deguchi K, Tsuru K, Hayashi T, et al. Implantation of a new porous gelatin-siloxane hybrid into a brain lesion as a potential scaffold for tissue regeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:1263-1273.
- 8) Ellis-Behnke RG, Liang YX, You SW, et al. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5054-5059.
- 9) Schneider GE, Ellis-Behnke RG, Liang YX, et al. Behavioral testing and preliminary analysis of the hamster visual system. *Nat Protoc* 2006;1:1898-1905.
- 10) Guo J, Su H, Zeng Y, et al. Reknitting the injured spinal cord by self-assembling peptide nanofiber scaffold. *Nanomedicine* 2007;3:311-3121.

Abstract**iPS cell transplantation for ischemic brain**

Koji Abe, M.D., Toru Yamashita, M.D. and Hiromi Kawai, M.D.

Department of Neurology, Okayama University Medical School

Stroke is a major neurologic disorder. Induced pluripotent stem (iPS) cells can be produced from basically any part of patients, with high reproduction ability and pluripotency to differentiate into various types of cells, suggesting that iPS cells can provide a hopeful therapy for cell transplantation. However, transplantation of iPS cells into ischemic brain has not been reported. In this study, we showed that the iPS cells fate in a mouse model of transient middle cerebral artery occlusion (MCAO). Undifferentiated iPS cells (5×10^5) were transplanted into ipsilateral striatum and cortex at 24 h after 30 mins of transient MCAO. Behavioral and histologic analyses were performed at 28 day after the cell transplantation. To our surprise, the transplanted iPS cells expanded and formed much larger tumors in mice postischemic brain than in sham-operated brain. The clinical recovery of the MCAO + iPS group was delayed as compared with the MCAO + PBS (phosphate-buffered saline) group. iPS cells formed tridermal teratoma, but could supply a great number of Dcx-positive neuroblasts and a few mature neurons in the ischemic lesion. iPS cells have a promising potential to provide neural cells after ischemic brain injury, if tumorigenesis is properly controlled.

(Clin Neurol 2012;52:1143-1146)

Key words: iPS cell, cerebral infarction, Yamanaka 4 factors, MMP9
