

骨髓細胞を用いた脳血管障害に対する治療法の開発

田口 明彦

国立循環器病センター研究所循環動態機能部 (脳血管内科)

Novel Therapeutic Strategy Against Stroke by Bone Marrow Cell Transplantation

Akihiko Taguchi

National Cardiovascular Center Research Institute

概要

わが国においては、急速な高齢化社会を迎えており、脳血管障害や認知症などの中枢神経障害などによる要介護者の急激な増加は、きわめて深刻な社会問題である。国立循環器病センターでは、自己幹細胞を用いた脳梗塞・脳血管性認知症予防、および脳梗塞治療の開発を行っており、わが国における要介護者の減少を目標とした普遍的な治療法開発に取り組んでいる。

はじめに

現在わが国においては、急速な高齢化社会を迎えており、それに伴う要介護者の急激な増加はきわめて深刻な社会問題である。特に要介護者発生原因の40%以上が脳血管障害など中枢神経障害であり、これらの疾患に対する有効な治療法の開発は緊急の課題である。神経系幹細胞を用いた様々な研究においては、単なる神経幹細胞移植では治療効果が不十分であることが、米国における臨床試験などにおいても明らかにされつつあるが、血管を介した組織修復作用を有する自己骨髓単核球細胞を用いた、心筋梗塞患者を対象とした臨床試験ではその治療効果が報告されるとともに、ほかの虚血性疾患への適応の拡大が示唆されている。われわれは、難治性虚血性疾患である Buerger 病患者に対する自己骨髓単核球移植および患者会の支援、活動協力などを通じて、自己骨髓単核球移植と組織修復に関する臨床知見の蓄積を続けるとともに、脳血管障害予防法・治療法を開発を行っており、われわれの研究の現状およびその方法性に関して紹介する。

細胞治療による脳梗塞予防法の開発

脳血管など全身の血管網の恒常性維持には、末梢血中に存在する骨髓由来血管血球系幹細胞 (CD34 陽性細胞など) の関与が示唆されている。われわれは国立循環器病センターや兵庫医科大学病院などにおいて、末梢血中血管血球系幹細胞の動態と、患者病態の関連について検討を行ってきた。その結果、①脳梗塞急性期において全身的な組織修復反応として末梢血中へ骨髓由来血管血球系幹細胞の動員が行われること、②慢性期における末梢血中血管血球系幹細胞が脳循環代謝と関連していること、③血管血球系幹細胞の減少が認知機能の異常と関連していること、④前向き検討においても血管血球系幹細胞の減少が認知機能の経時的な低下と関連していること、⑤脳血管障害の関与が弱いアルツハイマー型認知症においては末梢血中血管血球系幹細胞の減少は見られないこと、さらに⑥脳血管再生が促進されている病態では末梢血中血管血球系幹細胞の増加が見られること、また脳血管障害以外の病態においても⑦糖尿病性心筋障害と末梢血中血管血球系幹細胞の減少が関連していること、など、末梢血中血管血球系幹細胞と微小循環障害・再生機転に関する非常に重要な様々な知見を発見・報告している¹⁻⁴⁾。

またわれわれは Buerger 病患者に対する自己骨髓単核球移植においては、慢性微小循環障害に対する血管血球系幹細胞を含む骨髓単核球の治療を行い、その治療効果を明らかにするとともに⁵⁾、脳血管障害動物モデルにおいて血管血球系幹細胞移植の血管再生効果を明らかにしており⁶⁾、これらの臨床的観察研究、介入試験および基礎研究による知見をもとに、自己血管血球系幹細胞や iPS 細胞を用いた脳血管障害・脳血管性認知症の予防の開発に向けた研究を行っている。

細胞治療による脳梗塞治療法の開発

1. 再現性の高い脳梗塞モデルの確立

脳梗塞に対する治療効果の判定には再現性の高い動物モデルが必須であるが、既存の脳梗塞動物モデルは、すべてその再現性や脳梗塞後の生存率に大きな問題を抱えていた。そこでわれわれは、中大脳動脈(M1 distal portion)を直視下で結紮し、中大脳動脈灌流領域の皮質部位に常に一定の脳梗塞を生じる非常に再現性の高い脳梗塞動物モデルを開発した⁶。本手法は比較的容易に形態学的にも常に同一の脳梗塞を作成することが可能であり、今後の新しい脳卒中治療法の開発に必要な実験モデルとして、広く普及させていきたいと考えている。

2. マウス脳梗塞モデルを用いた骨髄系血管血球系幹細胞の投与効果

脳梗塞作成 48 時間後のマウスに対し、骨髄系血管血球系幹細胞を尾静脈より単回投与し、血管再生の促進効果、内因性の神経再生促進効果、脳組織再生効果および神経機能再生効果に関して検討を行った。その結果、①脳梗塞後の血管血球系幹細胞投与は梗塞周囲における血管再生を促進し、血流の再建を誘導すること、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導するだけでなく、その生着に必須であること、③血管血球系幹細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織の再生を誘導すること、④脳梗塞後の血管再生による脳組織再生は脳機能の再生をもたらすことなどを明らかにした⁶。ほかの細胞群の治療効果における検討では骨髄由来間葉系幹細胞投与では一定の治療効果を認めるものの、血管血球系幹細胞を骨髄から動員する作用のある G-CSF の投与においては、逆に脳萎縮や神経機能が低下することを明らかにしている。これらの知見は、骨髄単核球など血管血球系幹細胞の血管内移植による血管再生(あるいは微小循環保護)が、内因性の神経再生に必要な不可欠であることを示唆するとともに、脳梗塞亜急性期患者に対する新しい細胞治療の可能性を示すものであると考えている。

さらに治療時期に関する検討では、マウス骨髄単核球細胞を脳梗塞 1, 2, 4, 7, 10, 14 日および 21 日後に投与し、その効果を検討した。その結果、脳梗塞後 2, 4, 7, 10 日および 14 日後の投与において、脳梗塞巣の減少および行動の改善を認めたが、脳梗塞後 1 日および 21 日後においてはこれらの改善効果を認めなかった。これらの結果は内因性の神経幹細胞の動員

など組織修復機構が活性化されている時期においては細胞投与による効果が期待できるものの、脳梗塞発生直後や脳梗塞慢性期においては骨髄単核球細胞移植による効果が期待できないことを示している。

3. 霊長類における脳梗塞後の自己骨髄単核球細胞投与

脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球移植に関する前臨床試験として、霊長類における脳梗塞後の骨髄採取およびその静脈内投与に関する検討を行った。ヒトにおける臨床試験では対象疾患を心原性脳塞栓症患者としているため、当動物実験モデルにおいてもヒト病態に近い自己血栓によるカニクイザル塞栓モデルを国立循環器病センター研究所放射線医学部とともに作成した。カニクイザルを用い、全身麻酔下において血管撮像装置を使用し、超選択的カテーテル法により自己血栓を中大脳動脈遠位部より投与し、PET による血流評価を併用して中大脳動脈領域の脳梗塞を作成した。脳梗塞の確認は MRI を用いて行い、脳梗塞後には主に左上肢を中心とした機能障害を認めた。脳梗塞作成後 7 日後に腸骨骨髄より骨髄液の採取 (10 mL) を採取し、臨床プロトコールに基づき Ficoll を使った単核球細胞の精製を行い、静脈より自己骨髄由来単核球細胞の投与を行った。

投与骨髄単核球の体内分布の検討においては、骨髄単核球細胞の FDG ラベルを行い、細胞投与 3 時間目における FDG 陽性細胞の分布を観察した。投与された細胞群は脾臓に多くの集積が見られるものの、肺にはほとんど集積が見られなかった。また一部は頭部における集積も観察された。さらに、骨髄単核球投与前後における末梢血中血管血球系幹細胞の定量的評価を行ったところ、細胞投与 1 時間後においても末梢血中 CD34 陽性細胞数の約 2.5 倍の増加が観察された。現在のところ、再現性の十分高い霊長類の心原性脳塞栓症モデルは存在せず、われわれのモデルにおいても個体間の神経機能および脳梗塞領域に関するバラつきが非常に大きいため、統計学的な検討は行うことはできないが、脳梗塞後の経時的神経学的評価においては、細胞投与後に順調な機能回復が観察された。また、細胞投与に伴う神経症状の悪化や脳出血は認められなかった。

4. 脳梗塞患者における神経再生に関する病理的検討

脳損傷後において、マウスなどげっ歯類だけでなく、脳梗塞患者においても神経再生機構が活性化されることが報告されている。われわれは脳梗塞患者にお

ける神経再生に関する病理的検討を行い、血管再生および神経再生のピークはそれぞれ脳梗塞数日後、および2~3週間後であり、マウスにおける脳梗塞後の再生過程と類似していることを明らかにしている。これらの所見は、ヒトにおいても脳梗塞急性期—亜急性期において内因性神経幹細胞誘導が起こることを示しており、ヒトにおける血管再生療法の可能性を示す重要な所見であると考えている。

5. 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植

自己骨髄単核球を用いた血管再生あるいは組織修復促進を目的とした治療法は、四肢虚血性疾患や虚血性心疾患だけでなく、肝硬変患者に対しても開始されており、それぞれその効果が報告されている。

われわれが行う脳梗塞患者を対象とする自己骨髄細胞を用いた臨床試験では、対象患者群を重症心原性脳塞栓患者(NIHSS 10点以上かつ入院時からの回復が5点以下)とし、脳梗塞発症7~10日後に局所麻酔下において自己骨髄細胞を採取し、骨髄単核球分画を精製後に静脈内への投与を行う。一次エンドポイントは、①投与1カ月後のNIHSSの改善度(有効性)、②NIHSS悪化症例の頻度(安全性)であり、平成19年10月「厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」による認可を経て、エントリー患者の募集を開始している。予定症例数は低用量群(骨髄採取25 mL)6名と高用量群(骨髄採取50 mL)6名であり、過去に国立循環器病センターに重度心原性脳塞栓症で入院した患者群をコントロールとして用いる。

脳梗塞に対する今後の再生医療

脳梗塞においては、神経細胞だけでなく脳脊髄閥門を形成する細胞群などが障害されるため、脳の組織修復および脳神経機能の改善にはこれらの支持細胞群を含む神経組織全体の再構築が望まれている。われわれは脳梗塞後の神経再生には血管の再生が必要不可欠であることを明らかにしてきたが、神経幹細胞の生着、成熟のための新生血管床の形成、その血管床への神経幹細胞移植、および薬剤などを用いた移植神経幹細胞の分化、成熟、機能の促進、さらにはこれらの再生機転にたいする内因性阻害因子の抑制、など生理的なメ

カニズムに基づいた、治療法の発展・開発を現在進めており、血管新生を基盤としたより効果的かつ安全な治療法の開発にむけた成果を上げつつある。

また、脳血管障害・脳血管性認知症の予防に関しても、末梢血中のCD34陽性細胞などの血管血球系幹細胞の減少が脳梗塞の発症や神経組織の代謝や機能にまで影響を与え高次神経機能の低下や痴呆症の発症とも関連していることをわれわれは示してきたが、血管血球系幹細胞を用いた治療法の開発は急性期脳梗塞など急性虚血性疾患患者に対する有効な治療法となるだけでなく、脳血管性認知症や糖尿病性腎症微小循環障害、糖尿病性心不全患者など、生活習慣病に伴う幅広い疾病群に対する根治的・普遍的な予防法として発展させるための研究を行っている。

文 献

1. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, Todo K, Mori K, Stern DM, Soma T, Naritomi H: Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004; 109: 2972-2975.
2. Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern DM, Naritomi H: Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 445-449.
3. Taguchi A, Nakagomi N, Matsuyama T, Kikuchi-Taura A, Yoshikawa H, Kasahara Y, Hirose H, Moriwaki H, Nakagomi T, Soma T, Stern DM, Naritomi H: Circulating CD-34 positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab In press*.
4. Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y: Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2008; 31: 157-158.
5. Taguchi A, Ohtani M, Soma T, Watanabe M, Kinoshita N: Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25: 276-278.
6. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T: Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004; 114: 330-338.