

1. 神経科学シリーズ

脳梗塞モデルに対する骨髄細胞移植 (6)

上田 雅之 神谷 信雄 須田 智 片山 泰朗

日本医科大学大学院医学研究科神経・腎臓・膠原病リウマチ学

1. Neuroscience Series

Transplantation of Bone Marrow Cells in a Focal Ischemia Model (6)

Masayuki Ueda, Nobuo Kamiya, Satoshi Suda and Yasuo Katayama

Department of Neurological, Nephrological and Rheumatological Science,

Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

We describe cell transplantation for experimental brain infarction. Pluripotent embryonic stem (ES) cells, fetal and adult neural stem cells, and bone marrow cells are considered to be possible donor cells for transplantation. In addition, recently established inducible pluripotent stem (iPS) cells are also candidate donor cells. Because an embryo or fetus is required to obtain ES and fetal neural stem cells, obtaining such cells is ethically problematic. Adult neural stem cells are difficult to obtain, because these cells are present in the subventricular zone and the hippocampus. Although iPS cells can be used for autologous transplantation, gene transfection is necessary to produce these cells. Bone marrow cell transplantation has been established as a hematologic treatment. Bone marrow contains pluripotent bone marrow stromal cells (BMSCs) that can be used for autologous transplantation. BMSC transplantation reportedly results in good functional recovery and infarct volume reduction in an experimental stroke model. BMSCs produce various trophic factors, such as vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor, and nerve growth factor, which decrease apoptosis in the ischemic boundary zone. BMSCs require a period of cell culture before transplantation, whereas bone marrow mononuclear cells (BMMCs) can be collected autologously just before administration. This ease of collection may provide a clinical advantage, although BMSCs may have a greater protective potential than do BMMCs. We examined the effects of BMMC transplantation in an experimental stroke model. Autologous BMMCs were obtained from each rat, and animals were subjected to 90 minutes of focal ischemia followed by BMMC administration via the ipsilateral carotid artery or the femoral vein immediately after reperfusion. Infarct volume and motor function were assessed at 24 hours and at 7 days after reperfusion. Infarct volume reduction and good motor function were observed in animals that had undergone intra-arterial BMMC transplantation. BMMCs were labeled with PKH26 before administration, and many PKH26-positive cells were observed within the ischemic hemispheres of rats that had

undergone intra-arterial BMMC transplantation. The larger number of transplanted BMSCs in the brain during the early stage of reperfusion may be important for the protective effect. Further investigations are necessary to establish cell transplantation therapy for ischemic stroke.

(日本医科大学医学会雑誌 2009; 5: 47-52)

Key words: bone marrow mononuclear cells, bone marrow stromal cells, transplantation, ischemic stroke, neuroprotection

はじめに

従来、脳組織には再生能力がないと考えられていたが、脳虚血後の海馬歯状回において神経幹細胞が増殖して最終的に神経細胞に分化すること¹、さらには神経栄養因子である上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) と線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2: FGF-2) を投与することで内在性神経幹細胞による神経新生を賦活できること²が証明され、脳梗塞再生療法の可能性が脚光を浴びることとなった。しかし、内在性神経幹細胞からの神経新生は脳神経細胞全体からみるとごくわずかであり、臨床応用に際しては“数少ない内在性神経幹細胞を効率よく動員して神経新生を制御する”という大きなハードルを超えなければならない。このような観点から脳梗塞再生療法のもうひとつの可能性である細胞移植も注目されている。本稿では、脳梗塞再生医療に対する細胞移植療法における骨髄細胞移植の基礎的知見について脳梗塞モデルに対する骨髄細胞移植を中心に概説する。

移植細胞

移植に用いるドナー細胞としては、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞)、胎児および成人由来神経幹細胞、そして骨髄細胞などがあるが、最近樹立された人工多能性幹細胞 (inducible pluripotent stem cell: iPS 細胞) もその候補となり得る。

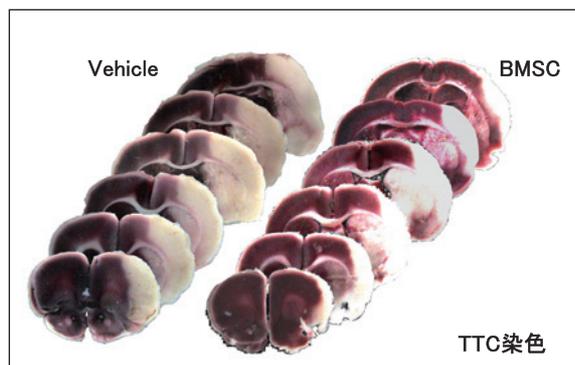
万能細胞として知られる ES 細胞は、きわめて高い増殖能・分化能を有する魅力的な細胞である。ES 細胞の脳梗塞モデルに対する移植については、神経幹細胞まで分化させた細胞をマウス脳内に移植した実験が報告されており、移植後にそれらの細胞が虚血半球に広範に分布したうえで神経細胞・グリア細胞に分化することが確認されている³⁴。しかし、ES 細胞ではその高い増殖能・分化能の制御が問題で神経系組織以外への分化や腫瘍化が知られており、また受精卵からし

か得ることができないため、倫理的問題を抱えていることは周知の事実である。胎児由来神経幹細胞移植は、パーキンソン病における細胞移植療法としてすでに臨床応用されているが^{5,6}、移植に必要な細胞数の確保に多くの胎児を必要とすることが倫理的に問題となっている。なお ES 細胞も胎児由来神経幹細胞も自家移植は不可能であり、移植後の拒絶反応への対応も必要である。成人由来神経幹細胞は理論的には自家移植が可能であるが、側脳室周囲や海馬からの採取が必要であり、現実問題として臨床応用には困難をきわめられると思われる。ES 細胞類似の増殖能・分化能を有する iPS 細胞は、体細胞由来であることから ES 細胞の抱える倫理的問題を回避することが可能であるが、その樹立に癌関連遺伝子 c-Myc を含む 4 因子を導入する必要があったことから^{7,8}、移植後の腫瘍化が懸念された。その後、c-Myc を除いた 3 因子の導入でも iPS 細胞を得ることができると報告されたが、作成効率がきわめて悪いことが問題である⁹。

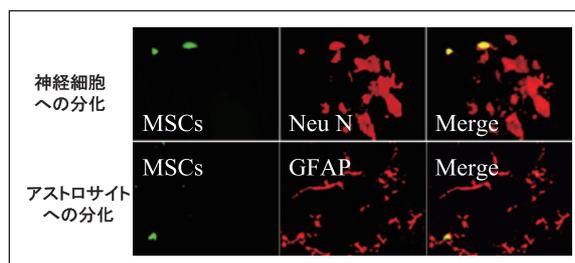
これらの細胞移植における倫理的・方法論的問題に対するひとつの解決策が骨髄細胞移植である。骨髄中に存在する細胞が血液細胞以外に分化することはよく知られており、再生医療におけるドナー細胞として期待されている。骨髄移植は血液疾患領域において臨床的に確立した方法であることと自家移植が可能であることから、脳梗塞に対する細胞療法としての臨床応用に最も近いと考えられ、実際に本邦においても臨床研究が進行している。

脳梗塞モデルに対する骨髄細胞移植

骨髄には大部分を占める造血細胞に加え、少数の細胞網構造を示す骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell: BMSC) も含まれる。骨髄細胞の初期培養において培養容器底に付着する BMSC は、造血細胞から分離して培養することができる。BMSC はサイトカインを産生することで骨髄造血機能を支えるための微小環境を維持しているが、これらには神経栄養因子と



A: 骨髄間質細胞(BMSC)移植による脳梗塞縮小効果



B: 移植骨髄間質細胞(BMSC)の分化

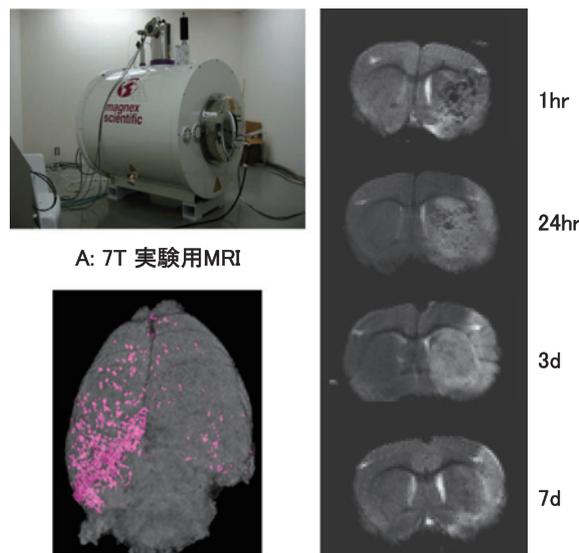
図1 ラット脳梗塞モデルにおける骨髄間質細胞移植の効果

ラット90分中大脳動脈閉塞モデルにおいて、再灌流3時間後に Vehicle または GFP ラット由来骨髄間質細胞 (BMSC) を経静脈的に移植し、再灌流24時間後にラット脳の冠状切片 (2mm厚) を2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色したものを示す (A: 上段)。TTC 染色で染色されない梗塞巣 (白い部分) は、Vehicle 移植と比べ BMSC 移植で縮小していた。

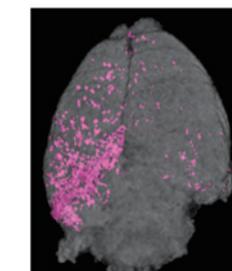
また同モデルにおいて移植1カ月後の凍結脳切片を用いた免疫組織化学を示す (B: 下段)。GFP ラット由来の移植細胞の一部が NeuN 陽性神経細胞および GFAP 陽性アストロサイトへ分化することが確認された。

して知られるものも含まれる。さらに BMSC には多分化能を有する多能性幹細胞が含まれ、中胚葉由来細胞のみならず神経細胞やグリア細胞などの外胚葉由来細胞へも分化し得ることが知られている¹⁰。

脳梗塞に対する骨髄細胞移植は、Chenらがラット脳梗塞モデルにおけるラット由来 BMSC の脳内移植の有効性を報告したことに始まる¹¹。その後もラット由来 BMSC の脳内移植、経静脈的投与および経動脈的投与の効果がラット脳梗塞モデルにおいて検証され、梗塞が完成した後 (虚血導入24時間後) の移植においても機能改善をもたらすことが報告された¹²⁻¹⁴。さらにはヒト由来 BMSC も同様のラット脳梗塞モデルにおいて有効性を示すことが明らかとなった¹⁵。移植された BMSC は脳内で増殖して梗塞周辺部



A: 7T 実験用MRI



B: 移植細胞の分布 (再灌流1時間後: 3D表示)

C: 移植細胞の経時的動態 (T2強調画像)

図3 ラット脳梗塞モデルにおける移植骨髄単核球細胞の動態

ラット90分中大脳動脈閉塞モデルにおいて、超磁性体鉄で標識した自己骨髄由来 BMMC を再灌流直後に同側総頸動脈内に移植し、移植細胞の動態を実験用7T MRI (A) を用いて再灌流1時間後から7日後まで観察した。標識移植細胞は再灌流1時間後には虚血半球に広範に分布し (B)、T2 強調画像において低信号を示す移植細胞は経時的にその数を減らすことが観察された (C)。

に遊走することがマウス脳梗塞モデルで明らかとなり¹⁶、障害部位周辺で産生される monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) などのサイトカインが BMSC 遊走に関与することも示唆された¹⁷。さらにラット脳梗塞モデルに BMSC を移植すると神経細胞のアポトーシスが抑制されることが報告され¹⁸、BMSC 移植には神経保護作用があることも示唆された。われわれもラット90分中大脳動脈閉塞モデルにおいて再灌流3時間後の GFP ラット由来の BMSC 移植の脳梗塞縮小効果 (図 1A: 上段) および移植された BMSC の NeuN 陽性神経細胞・GFAP 陽性アストロサイトへの分化 (図 1B: 下段) を確認している。BMSC が産生するサイトカインとして血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF)、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF)、FGF-2 などが明らかとされ^{19,20}、脳梗塞モデルにおける神経保護作用として BMSC がサイトカインソースとして働く機序が示された²¹。実際に神経保護活性を有するサイトカイン

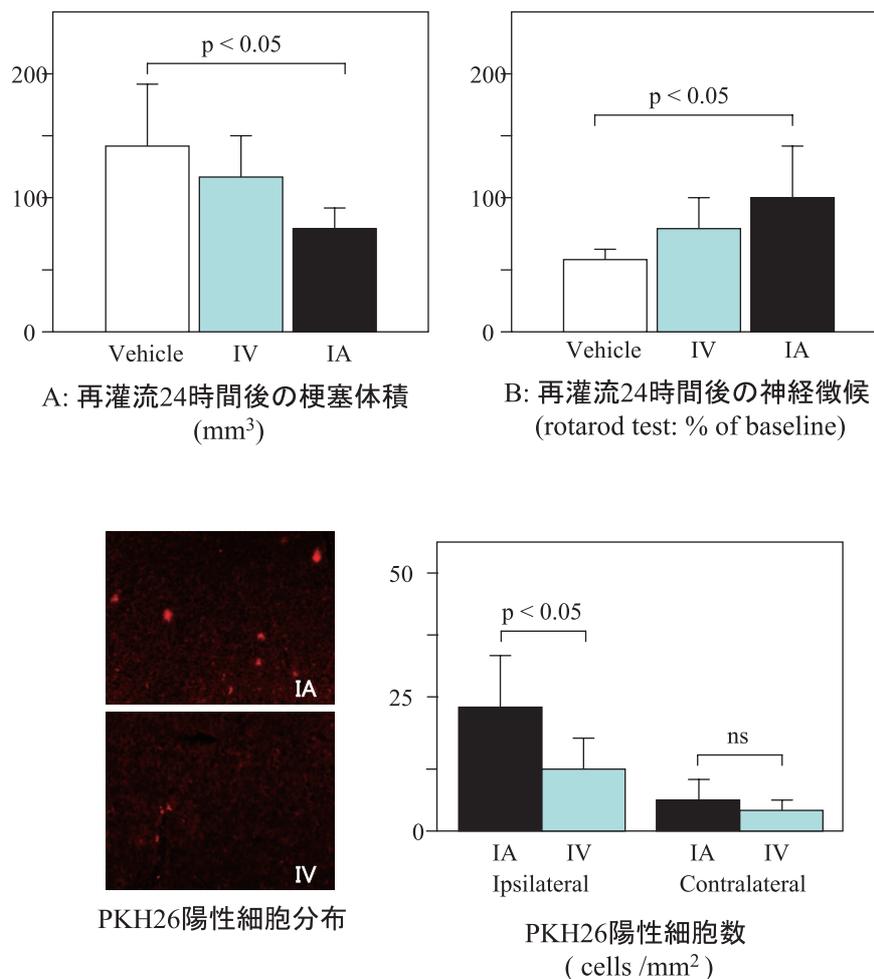


図2 ラット脳梗塞モデルにおける骨髄単核球細胞移植の効果 (文献25より改変)
 ラット90分中大脳動脈閉塞モデルにおいて、再灌流直後のVehicle移植、自己骨髄由来骨髄単核球細胞(BMMC)の経静脈的移植(IV)または同側総頸動脈内移植(IA)の再灌流24時間後の梗塞体積(TTC染色)および神経徴候(ロタロッドテスト)に及ぼす影響を示す。Vehicle群と比較して、BMMC総頸動脈内移植群において梗塞体積の有意な縮小(A)と神経徴候の有意な改善(B)を認め、BMMC経静脈的移植においては梗塞体積も神経徴候も有意な変化は認めなかった。
 またPKH26で標識したBMMCを用い、総頸動脈内移植では経静脈的移植と比較してより多くの標識細胞が虚血半球に存在すること(再灌流1時間後)を確認した(C)。

遺伝子を導入したBMSCは、ラット脳梗塞モデルにおいてより強力な脳梗塞縮小効果と機能改善効果を示すことが報告されている^{22,23}。

このように脳梗塞モデルに対する魅力的な効果を有するBMSCではあるが、移植に必要な細胞数を確保するためには培養期間を要することから神経保護効果を期待して急性期脳梗塞の治療に自家移植として応用するには困難が予想される。一方、密度勾配遠心法を用いて骨髄細胞から得る単核球分画(bone marrow mononuclear cell: BMMC)には造血幹細胞、血管前駆細胞、MSCなどが含まれ、サイトカインソースとしての機能が期待できる。ラット脳梗塞モデルに対す

るBMMCの移植実験では、移植細胞が脳梗塞周囲に分布・生着して一部が神経細胞・グリア細胞に分化することと脳梗塞縮小効果・機能改善効果が認められることが確認され、より早期の投与の方が効果的であることも示唆された²⁴。

われわれもBMMCの神経保護効果に注目しており、臨床応用を視野に入れた基礎実験を行っている²⁵。雄性SDラットの自己骨髄細胞を大腿骨より採取し、密度勾配遠心法を用いてBMMCを分離した。90分間の一過性左中大脳動脈閉塞を行い、得られたBMMC(1×10⁷)を虚血再灌流直後に同側総頸動脈あるいは大腿静脈より投与、24時間後および7日後に梗塞体

積と神経徴候の評価を行った。この実験条件では、BMMC 静脈投与では認められなかった梗塞縮小・機能回復効果が BMMC 総頸動脈投与では認められた(図 2A, B)。さらに PKH26 で標識した BMMC を用いて総頸動脈投与ではより多くの標識細胞が虚血半球に存在することも確認し(図 2C)、脳梗塞周囲に導入する移植細胞数を多くする手段として総頸動脈投与も考慮すべきことが示唆された。さらに超磁性体鉄(super paramagnetic iron oxide : SPIO) で標識した BMMC を脳梗塞ラットに総頸動脈経由で移植し、移植細胞の動態を実験用 7T MRI (図 3A : Varian Technology Japan, UNITY INOVA 300 型) を用いて観察することも可能であり、SPIO で標識された移植細胞は再灌流直後には虚血半球に広範に分布し(図 3B)、その後は T2 強調画像において低信号のスポットとして認められる移植細胞は経時的にその数を減らすことが明らかとなった(図 3C)。

おわりに

発症 3 時間以内の超急性期脳梗塞に対する rt-PA 静注の承認を受け、脳梗塞の治療は Brain attack キャンペーンに代表されるように超急性期にいかに対応するかという時代に入ってきた。一方で大半の脳梗塞患者は rt-PA 静注の適応外であり、後遺症として重篤な神経脱落症状を呈していることも避けることのできない現実である。本稿で紹介した脳梗塞に対する細胞移植療法は、今後の脳梗塞の臨床において治療オプションとなり得るものである。この分野の研究のさらなる進展を願ってやまない。

文 献

- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR: Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 1998; 18: 7768-7778.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M: Regeneration of hippocampal pyramidal neurons by recruitment of endogenous neural progenitors: An animal model for a neuronal replacement therapy for ischemic brain injury. *Cell* 2002; 110: 429-441.
- Takagi Y, Nishimura M, Morizane A, Takahashi J, Nozaki K, Hayashi J, Hashimoto N: Survival and differentiation of neural progenitor cells derived from embryonic stem cells and transplanted into ischemic brain. *J Neurosurg* 2005; 103: 304-310.
- Hayashi J, Takagi Y, Fukuda H, Imazato T, Nishimura M, Fujimoto M, Takahashi J, Hashimoto N, Nozaki K: Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 906-914.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 710-719.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54: 403-414.
- Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 101-106.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
- Chen J, Li Y, Chopp M: Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology* 2000; 39: 711-716.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M: Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32: 1005-1011.
- Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M: Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 2001; 56: 1666-1672.
- Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M: Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001; 189: 49-57.
- Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M: Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59: 514-523.
- Yano S, Kuroda S, Shichinohe H, Hida K, Iwasaki Y: Do bone marrow stromal cells proliferate after transplantation into mice cerebral infarct? -a double labeling study. *Brain Res* 2005; 1065: 60-67.
- Wang L, Li Y, Chen J, Gautam SC, Zhang Z, Lu M, Chopp M: Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol* 2002; 30: 831-836.
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M: Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003; 73: 778-786.
- Garcia R, Aguiar J, Alberti E, de la Cuetara K, Pavon N: Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors.

- Biochem Biophys Res Commun 2004; 316: 753-754.
20. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE: Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; 94: 678-685.
 21. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H: Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat. *Mol Ther* 2005; 11: 96-104.
 22. Ikeda N, Nonoguchi N, Zhao MZ, Watanabe T, Kajimoto Y, Furutama D, Kimura F, Dezawa M, Coffin RS, Otsuki Y, Kuroiwa T, Miyatake S: Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2005; 36: 2725-2730.
 23. Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, Funakoshi H, Kajimoto Y, Nakamura T, Dezawa M, Shibata M, Otsuki Y, Coffin RS, Liu WD, Kuroiwa T, Miyatake S: Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and *ex vivo* HGF gene transfer with HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1176-1188.
 24. Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD: A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res* 2004; 1007: 1-9.
 25. Kamiya N, Ueda M, Igarashi H, Nishiyama Y, Suda S, Inaba T, Katayama Y: Intra-arterial transplantation of bone marrow mononuclear cells immediately after reperfusion decreases brain injury after focal ischemia in rats. *Life Sci* 2008; 83: 433-437.

(受付 : 2008 年 9 月 1 日)

(受理 : 2008 年 9 月 18 日)
