

## iPS 細胞による脳梗塞の再生治療

## 脳梗塞に対する細胞治療の中での位置づけ

大木 宏一

東京都済生会中央病院脳神経内科・脳卒中センター

Regenerative Therapy for Ischemic Stroke Using iPS Cells;  
Positioning among Cell-based Therapies for Ischemic Stroke

Koichi Oki

Department of Neurology, Stroke Center, Tokyo Saiseikai Central Hospital

**Key words:** iPS cell, ischemic stroke, cell transplantation, stem cell, cell-based therapy

## はじめに

2007年にヒトの induced pluripotent stem cells (iPS細胞：人工多能性幹細胞)が報告されて以降、iPS細胞を神経疾患の治療にも応用すべく様々な研究が行われている。iPS細胞は、皮膚線維芽細胞等の体細胞に少数の因子を導入することにより得られる幹細胞であり、その細胞をさらに神経系へ分化誘導することによって、神経細胞やグリア細胞を得ることができる。従って、「生検等による病変組織の取得」に対するハードルが高い中枢神経系疾患の病態解明や診断に関して、あるいは再生能力の乏しい中枢神経系の再生医療に対するツールとして、その臨床応用が期待されている。

本稿では、iPS細胞を中枢神経系疾患に対する細胞移植療法として用いる場合の現状と今後の展望につき、パーキンソン病のような神経変性疾患と、脳梗塞のような神経系以外の素因で発症する中枢神経系疾患に分けて概説し、さらには脳梗塞に対するさまざまな治療の中でのiPS細胞移植療法の位置づけについて述べていく。

## 1. パーキンソン病に対する細胞移植療法

## (1) パーキンソン病に対する細胞移植療法の歴史

パーキンソン病に対して細胞移植治療の歴史は古く、中絶胎児由来の中脳組織をパーキンソン病患者の被殻と尾状核に移植した報告がスウェーデンより1988年になされている<sup>1</sup>。この治療に関しては、長期的な経過も報告されており、

①移植後10年以上にわたり運動機能改善が保たれている例もあり、また剖検脳やPETにて移植細胞と宿主脳の間に関能的神経回路が確認された。

②移植細胞数が少ない、または免疫抑制剤中止により生存移植細胞数が少なくなると機能回復が認められない。

③移植した細胞にも、宿主と同じパーキンソン病の病理変化が認められた。

等の知見が得られている<sup>2</sup>。

## (2) パーキンソン病に対する細胞移植療法の今後

パーキンソン病に対する治療としては、さまざまな薬物療法や脳深部刺激療法等の手術療法等が臨床応用されているが、これらは全て対症療法である。一方で、失われたドパミン神経回路を再構築する根本的治療としては、細胞移植治療がその選択肢として挙げられ

る。前述のスウェーデンからの報告において、移植細胞と宿主脳に機能的神経回路が確認された点は、この治療が neural replacement (移植細胞が神経系細胞に分化し病的脳組織を置換すること) を目指す治療として有用性があることを示しているが、一方で移植した細胞にも、宿主と同じパーキンソン病の病理変化が認められた点は、神経変性疾患に移植細胞を行うことを考えた場合、非常に重要な知見である。すなわち治療のために移植した細胞に宿主と同様の病態が生じてしまえば、治療としての効果が少なくなるからである。しかしながら実臨床では、移植したことによる機能回復がある程度の期間維持できれば、既存の薬物治療を温存できる可能性もあり、その有用性が全くなくなるわけではないことも事実である。

パーキンソン病に対する細胞移植治療は、今後も検討すべき治療であるが、それを臨床に応用する際に問題となるのは、倫理的側面である。スウェーデンでの胎児脳組織の移植では、多くの胎児脳が必要なこと、また中絶胎児とはいえ胎児脳を移植源にしていることに関して、倫理的問題が生じ得る。また embryonic stem cell (ES 細胞：胚性幹細胞) を用いる場合にも、一個体になり得る受精卵を破壊して作成するために、倫理的問題は避けられない。一方で iPS 細胞は、そのような倫理的問題が少ないために、今後の臨床応用が期待されている。すでに京都大学では、2018 年に iPS 細胞由来の細胞をパーキンソン病患者脳に移植する臨床研究が開始されている。しかしながら iPS 細胞の臨床応用には、それ以外のさまざまな課題も山積している (詳細については後述)。

## 2. 脳梗塞に対する細胞移植療法

### (1) 移植細胞の種類と期待される作用機序

現在研究されている脳梗塞に対する細胞移植療法の移植源としては、①間葉系幹細胞<sup>3</sup>や血球系細胞<sup>4</sup>等の非神経系細胞 (骨髄、歯髄、臍帯、胎盤由来等)、②ES 細胞や iPS 細胞、胎児脳を由来とする神経幹細胞が挙げられる。

これらの細胞移植療法による機能回復は、下記の機序を介して促進されていると考えられており<sup>5</sup>、大別すると、移植細胞からの分泌物等を介した作用機序の「By stander 効果」(移植細胞の生存は必須ではない)と、移植細胞自体の生存が必須の「Neural replacement 効果」によると考えられる。

#### ■ By stander 効果

- ・神経保護効果
- ・炎症反応の修飾
- ・血管・神経新生、再髄鞘化
- ・栄養因子の分泌

#### ■ Neural replacement 効果

- ・移植細胞による損傷神経組織・回路の再構築

「細胞移植療法」と、神経組織の「再生医療」は混同して理解される場合も多いが、細胞移植療法は、いわゆる「再生」という意味合いの neuronal replacement 効果以外にも、上述のようなさまざまな機序を介して機能回復に寄与しており、各細胞移植治療の作用機序を理解して、最適な細胞種を選択することが重要である。

非神経系細胞の移植療法については、既にヒトにおける臨床試験が行われており、より臨床応用に近いと考えられる。この非神経系細胞移植により期待される効果としては By stander 効果によるものが大きいと考えられている。一方で neuronal replacement を目標にする場合には、おそらく神経幹細胞を用いた方が効率は良いであろうと考えられる<sup>5</sup>。

### (2) iPS 細胞由来神経幹細胞移植療法について

神経幹細胞の移植療法は、neuronal replacement 効果および bystander 効果の双方の機能回復機序を有していると考えられ、移植細胞の安全性や倫理的問題が解決するのであれば、理想的な移植細胞となる。しかしながら、実際にはその安全性等を担保するための基礎実験が必要な段階であり、非神経系細胞移植に比べ臨床応用は遅れている。

移植する神経幹細胞の供給源としては、ES 細胞や胎児脳、iPS 細胞等が考えられるが、パーキンソン病における移植療法と同様に、ES 細胞や胎児脳を供給源とする場合には倫理的問題が不可避であり、実用化へのハードルは高いと考えられる。一方、iPS 細胞は皮膚や血液といった体細胞から得ることができ、倫理的問題は少ないと考えられる。しかし臨床応用に関しては、パーキンソン病の場合と同様に様々な問題点を解決しなければならず、現在は動物を用いた基礎研究の段階にある。

初期の基礎研究においては、iPS 細胞を未分化のまま移植すると腫瘍化することが報告されており<sup>6</sup>、iPS 細胞を脳梗塞治療に用いる場合、少なくとも神経幹細胞まで分化させて用いることが必須である。現在までに、神経幹細胞へ分化誘導させた iPS 細胞を脳梗

塞モデル動物に移植する基礎研究が複数報告されているが<sup>5-9</sup>, 筆者らも Sweden Lund 大学において, ヒト iPS 細胞を接着培養法で分化させることにより得られる神経幹細胞 (lt-NES cells: long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells) を脳梗塞モデル動物に移植する基礎研究を行った<sup>10</sup>. この研究からは

- ①ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞は, 移植後腫瘍形成することなくさまざまなタイプの成熟神経細胞及びアストロサイトに分化し, 研究観察期間の数カ月間, 生存が確認されたケースもある.
- ②神経細胞に分化した細胞は移植脳に軸索を伸長し, また電気生理学的にも移植脳からのシナプス入力を受ける成熟した神経細胞に分化した.
- ③虚血脳への神経幹細胞の移植により, 機能改善が移植後早期より認められたが, 移植細胞の生存とは無関係であった.
- ④機能回復は neuronal replacement 以外の他の機序 (VEGF 等の栄養因子の分泌) による可能性が高い.

ということが判明した.

他の研究室も含めたいずれの報告においても, ①安全性(腫瘍形成なし), ②細胞レベルでの分化・成熟, ③機能回復という3点は認められているが, 移植により得られた機能回復が neuronal replacement による直接的なものと証明した報告は僅かである<sup>11</sup>. この点は, “iPS 細胞を用いた” 神経幹細胞治療としての今後の課題の一つとなるであろう. すなわち, neuronal replacement を求めなければ, 既に臨床試験が始まっている非神経系細胞移植でも同等の効果が望めるかもしれないからである.

### 3. iPS 細胞移植療法の臨床応用に対する課題

#### (1) 安全性

iPS 細胞では, 外来遺伝子の挿入による内在性がん原遺伝子の活性化や, がん原遺伝子である *c-Myc* の導入による「腫瘍化」の可能性があり, 臨床応用も含めその安全性の評価・担保は非常に重要である.

腫瘍化に関しては, 樹立時の細胞の由来 (origin) やクローンの差異によって腫瘍形成能が異なることが報告されており<sup>12</sup>, 事前の移植実験により腫瘍形成能が低い“安全な”クローンを選別することにより腫瘍化のリスクを避けられる可能性がある<sup>13</sup>. また腫瘍化の一因となる外来遺伝子の内在遺伝子への挿入を避けるため, その挿入なしで iPS 細胞を樹立する integration free の方法や<sup>9</sup>. また *c-Myc* なしでの iPS

細胞樹立も報告され<sup>14</sup>, 腫瘍化回避に関する研究は精力的に行われている.

#### (2) 自家移植と他家移植, 免疫抑制剤の要否

iPS 細胞を移植源とする場合, 自家移植と他家移植のどちらを選択するかについても議論する必要がある. 患者本人から体細胞を採取し自家 iPS 細胞を樹立した後に患者本人に移植する自家移植では, 免疫拒絶反応が少なく, またドナー細胞からの感染のリスクが低い等のメリットがあるが, 一方で分化誘導や安全性の確認までに非常に時間がかかり, 脳梗塞等の治療のタイムウインドウが限られた疾患には適さないと考えられる. 一方, パーキンソン病のような神経変性疾患の場合には治療のタイムウインドウは比較的広く, 自家移植が可能である.

コストの面を考えると, 個々の患者ごとに iPS 細胞を採取・培養する自家移植では多大な負担が生じると考えられる. その点, 他人の細胞から作成される, あらかじめ安全性の確認が済んだ iPS 細胞バンクから, HLA が一致するものを移植細胞として使用する他家移植では, 時間的な制約はなく, またコスト面での優位性もある. 一方で他家移植の場合, 免疫抑制剤の使用を検討しなければならないが, 基礎実験からは免疫抑制剤を使用せずに移植細胞が生着したとの報告もある<sup>9</sup>. 免疫抑制剤の使用の要否, 及び使用する場合の最適なプロトコルの策定も, 他家移植を選択した場合の今後の課題である.

#### (3) 最適な移植時期, 移植経路の選択 (脳梗塞において)

これまでの iPS 細胞由来神経幹細胞移植に関する脳梗塞の基礎研究では, 梗塞作成の1週間後に, 定位的細胞移植 (頭蓋骨に作成した穿頭孔より注入針を用いて脳内に移植する方法) を行っていることが多い. しかしながら脳梗塞後急性期の炎症が強い脳内環境は細胞の長期生存に対しては厳しいと考えられ<sup>15</sup>, neuronal replacement による機能回復に主眼をおくなら, 炎症が軽減する亜急性期以降に細胞移植を行う方が望ましいと考えられる. また細胞移植のルートとしては, 患者への侵襲や抗血栓薬投与中という観点からは経動脈・静脈的な投与の方が望ましいが, 一方で間葉系幹細胞の経動脈的移植実験においては, 梗塞作成1週間後の投与では移植細胞はほとんど脳内に生着しないと報告されており<sup>16</sup>, 亜急性期以降の細胞移植では定位的な細胞移植を選択した方が良いと考えられる.

表 神経組織再生戦略を検討するうえで重要な疾患による差異

	パーキンソン病	脳梗塞
障害される細胞・組織	ドパミン神経細胞 (ターゲットは限定的)	神経細胞, グリア細胞, 血管, etc. (多岐にわたるターゲット)
障害される部位	黒質・線条体系 (部位は限定的)	あらゆる部位 (部位特異的な戦略が必要?)
発症の要因	内因性 (神経細胞自体の変性)	血管障害に伴う神経障害 (非損傷ホスト組織は正常)
発症様式	慢性進行 (治療介入時期はさまざま)	急性発症 (治療時期が重要)
機能障害の自然回復	なし	あり (症例によっては, 組織再生の必要なし)
神経再生以外の治療	抗パーキンソン病薬, 脳深部刺激療法 etc. (可能であれば, 神経再生が最善の治療)	抗血栓薬, 抗脳浮腫薬, フリーラジカル消去薬 etc. (他治療で後遺症なければ, 組織再生の必要度低)

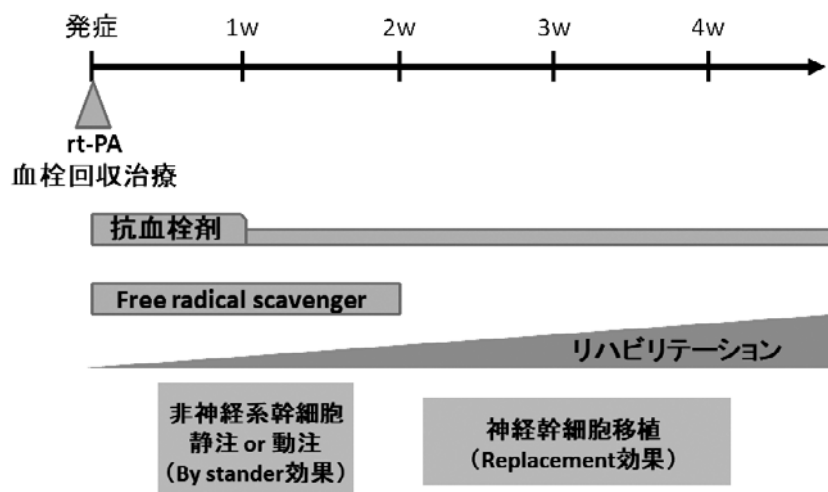


図 脳梗塞の治療戦略

#### 4. 各疾患による細胞移植療法の戦略

特定の神経細胞が内因的な機序により徐々に障害を受けていく神経変性疾患と、神経細胞のみならずグリア細胞や血管等のさまざまな組織が外的な要因によって突然障害を受ける脳血管障害では、細胞移植療法の位置づけや治療戦略も自ずと違ってくる (表)。

神経変性疾患では神経組織の変性を治すような根本的な治療法は現時点では開発されておらず、何もしなければ症状は進行性であり、機能の回復は限定的である。

一方脳梗塞等の脳血管障害では神経組織の解剖学的修復・再生が困難でも、既存の治療やリハビリテーションによって、機能的には回復する症例も多く、全ての症例が神経幹細胞移植療法の対象にはならないと考える。一方非神経系細胞移植は、炎症反応の修飾や神経保護効果等の既存の治療の延長線上にあるような機序を介して機能回復に寄与する可能性が高く、他の薬剤と同列にある選択肢の一つとして、急性期から亜急性期にかけて使用されるようになることが予想され

る。そのような治療の流れの中で、既存の治療または非神経系細胞移植療法によっても機能回復が得られない場合にはじめて、neural replacement 効果を目指とする神経幹細胞移植が検討されるべきであろう (図)。また脳梗塞において神経組織再生 (= neural replacement) を目指す場合には、神経細胞のみならずグリア細胞や血管組織・支持組織等の全てを考慮した組織の再生と、その結果として構築される新規神経回路が痙攣等の有害事象を呈することなく機能的に有効に働くことが重要となってくる。そのためには、細胞移植とリハビリテーションをうまく組み合わせ、有効な神経回路の取捨選択が行われるような環境を整えることも重要であると考えられる。

#### おわりに

さまざまな細胞移植療法の中で、iPS 細胞等を由来とした神経幹細胞の移植は、neuronal replacement を目指した治療として最適な方法と考えられる。一方で脳梗塞の場合には、神経細胞以外にもグリア細胞や血管組織・支持組織等の全ての脳組織が再生されるこ

とが必要であり, それらによる有効な神経回路が再構築されなければ, 有効な機能回復は得られないと考えられる. 今後は, iPS細胞の腫瘍化の問題を克服することはもとより, 既存の治療とうまく組み合わせることで総合的に機能回復を図るような治療戦略を練ることも重要な課題であると考えられる.

#### 文 献

1. Lindvall O, Rehnström S, Gustavii B, et al.: Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease. *Lancet* 1988; 2: 1483-1484.
2. Bega D, Krainc D: Long-term clinical outcomes after fetal cell transplantation in parkinson disease: implications for the future of cell therapy. *JAMA* 2014; 311: 617-618.
3. 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.
4. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al.: Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004; 114: 330-338.
5. Lindvall O, Kokaia Z: Stem cell research in stroke: how far from the clinic? *Stroke* 2011; 42: 2369-2375.
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. Gomi M, Takagi Y, Morizane A, et al.: Functional recovery of the murine brain ischemia model using human induced pluripotent stem cell-derived telencephalic progenitors. *Brain Res* 2012; 1459: 52-60.
8. Jensen MB, Yan H, Krishnaney-Davison R, et al.: Survival and differentiation of transplanted neural stem cells derived from human induced pluripotent stem cells in a rat stroke model. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013; 22: 304-308.
9. Mohamad O, Drury-Stewart D, Song M, et al.: Vector-free and transgene-free human iPS cells differentiate into functional neurons and enhance functional recovery after ischemic stroke in mice. *PLoS One* 2013; 8: e64160.
10. Oki K, Tatarishvili J, Wood J, et al.: Human-Induced Pluripotent Stem Cells form Functional Neurons and Improve Recovery After Grafting in Stroke-Damaged Brain. *Stem Cells* 2012; 30: 1120-1133.
11. Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, et al.: Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells* 2012; 30: 1163-1173.
12. Miura K, Okada Y, Aoi T, et al.: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 743-745.
13. Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al.: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 12704-12709.
14. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al.: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 101-106.
15. Okano H: Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 2002; 69: 698-707.
16. Ishizaka S, Horie N, Satoh K, et al.: Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke* 2013; 44: 720-726.

(受付 : 2019年7月30日)

(受理 : 2019年8月5日)