

## 【背景・目的】

急性期脳梗塞において、血栓溶解療法や血管内治療等の有効性は確立しているが、依然として脳梗塞は高い死亡率を有し、重篤な神経学的機能障害を来す疾患である。多くの動物実験で、骨髄間葉系幹細胞(MSC)移植の脳虚血に対する治療効果が報告されており、その作用機序として、虚血病巣に遊走したMSCからの種々のサイトカインや成長因子の傍分泌作用が、脳保護に関与していると考えられている。特に炎症抑制性蛋白であるIL-10は、脳虚血における神経・血管保護作用や、抗アポトーシス蛋白発現増強作用が報告されており、ミクログリアの活性化や、Th1細胞やマクロファージからの炎症性サイトカイン(IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 等)分泌を抑制することが知られている。今回我々はアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、IL-10の発現を強化させたMSC(MSC/IL-10)をラット一過性脳虚血モデルに移植し、急性期脳梗塞におけるMSC移植の治療効果が増強されるかを検討した。

## 【方法】

第2~4継代目のヒトMSCを使用した。Cytomegalovirus immediate-early enhancer/chicken  $\beta$ -actin hybrid(CAG)プロモーター制御下にIL-10を発現する、double-stranded AAV1-CAG-IL-10を作製し、このAAVベクターをMSCにトランスダクションした24時間後に移植に用いた。実験動物は8週齢雄性SDラットを使用し、脳虚血モデルは、intraluminal suture techniqueを用い、4-0ナイロン糸によりラット中大脳動脈を90分間閉塞後、塞栓糸を引き抜き再灌流させることにより作成した。虚血再灌流直後もしくは3時間後に、 $1 \times 10^6$ 個のMSC単独または同数のMSC/IL-10を尾静脈より投与し、対照群にはPBSを投与した。再灌流7日後に断頭し、TTC染色による梗塞体積測定(各n = 5)および神経学的評価(各n = 8)を行った。また再灌流72時間後に、再免疫組織学的検討(各n = 5)およびELISA法によるサイトカイン定量(各n = 4)、Realtime PCR法による移植細胞の臓器分布の評価(各n = 4)を行った。

## 【結果】

### 1) 梗塞体積・神経学的評価

再灌流直後投与では、MSC単独群( $180.8 \pm 17.8 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.05$ )およびMSC/IL-10群( $124.7 \pm 19.1 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.05$ )ともに、対照群( $223.2 \text{ mm}^3$ )に比べて有意な梗塞縮小を認めた。さらにMSC/IL-10群はMSC単独と比べ有意な梗塞縮小効果を認めた( $p < 0.05$ )。一方、再灌流3時間後投与では、MSC単独群( $210.2 \pm 17.7 \text{ mm}^3$ )は対照群( $223.2 \pm 22.3 \text{ mm}^3$ )と比べて縮小効果を認めなかったが、MSC/IL-10群では、有意な梗塞の縮小を認めた( $137.2 \pm 22.4 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.01$ )。神経学的評価に関しては、再灌流直後投与では、MSC単独群とMSC/IL-10群ともに、姿勢異常(MSC,  $p < 0.01$ ; MSC/IL-10,  $p < 0.01$ )、片麻痺(MSC,  $p < 0.05$ ; MSC/IL-10,  $p < 0.01$ )のいずれも対照群に比べ有意な改善を認めた。

再灌流 3 時間後投与では、MSC 単独群には神経徴候の改善を認めなかったが、MSC/IL-10 群では姿勢異常 ( $p < 0.01$ )、片麻痺 ( $p < 0.01$ ) ともに対照群に比べ有意に改善した。

## 2) 炎症抑制・神経保護効果の評価

皮質梗塞境界領域において、MSC/IL-10 群では、活性化ミクログリアマーカーである Iba-1 陽性細胞数が、MSC 単独群に比べ有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。虚血脳半球における炎症性サイトカイン発現は、MSC/IL-10 群は MSC 単独群に比べ、有意に減少していた ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $p < 0.05$ ;  $\text{IL1-}\beta$ ,  $p < 0.01$ ;  $\text{IL-6}$ ,  $p < 0.05$ )。血清  $\text{TNF-}\alpha$  も同様に、MSC/IL-10 群は、MSC 単独群に比べ有意に減少を示した ( $p < 0.05$ )。一方、MSCs/IL-10 群では MSC 単独群と比べ、虚血脳半球における IL-10 発現の有意な増加を認めた ( $p < 0.01$ ) が、血清 IL-10 においては、各群間で有意差を認めなかった。Fluoro-Jade C (FJC) 染色を用いた神経細胞死の評価では、MSC/IL-10 群では、皮質梗塞境界領域における FJC 陽性細胞数が MSC 単独群に比べて有意に減少しており、神経細胞死の有意な抑制効果を認めた ( $p < 0.05$ )。

## 3) 移植細胞の追跡

ヒト MSC をラットに異種移植していることを利用し、ヒト Alu 配列特異的プライマーを用いた Realtime PCR で、移植細胞の虚血側・健側脳半球、肺、脾臓、骨髄における移植された MSC および MSC/IL-10 の分布を評価した。これにより再灌流 72 時間後では、虚血脳半球 ( $p < 0.05$ ) と脾臓 ( $p < 0.05$ ) において、MSC/IL-10 が MSC より有意に多く分布していることが確認された。さらに再灌流 7 日後では、各臓器で移植細胞数は減少傾向にあったものの、虚血脳半球 ( $p < 0.05$ ) と脾臓 ( $p < 0.05$ ) においては同様に、MSC/IL-10 が MSC より有意に多く分布していた。さらに移植細胞の生存評価のため、PKH 染色で標識した MSC または MSC/IL-10 を投与したが、再灌流 14 日後では、いずれの群においても移植細胞は虚血脳半球において消失していた。

## 【考察・結論】

AAV ベクターを介して IL-10 発現を強化することにより、MSC 移植は虚血再灌流直後のみならず 3 時間後投与においても梗塞縮小効果をもたらすことが可能であり、脳梗塞急性期における治療可能時間域の延長が得られた。MSC/IL-10 の経静脈投与は、虚血脳組織における IL-10 発現を増加させ、炎症性サイトカインの発現やミクログリアの活性化を抑制することで脳保護に寄与した可能性が示唆された。移植された MSC/IL-10 は長期間生存しないことから、宿主における IL-10 発現増強は一過性であり、免疫抑制等の副作用も少ないと考えられる。この研究による成果は、遺伝子修飾を施した治療用細胞を、損傷脳組織に導入し、適切な期間維持させる方法を開発する基盤となり、さらに有効で新しい脳梗塞治療へとつながる可能性がある。