

論文審査の結果の要旨

Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke

急性期脳梗塞における IL-10 強発現骨髄間葉系幹細胞移植の脳保護効果

日本医科大学大学院医学研究科 神経・腎臓・膠原病リウマチ学分野
大学院生 中島 壯崇

Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 6:102-111,2017 掲載

様々な非臨床・臨床試験において、骨髄間葉系幹細胞(MSC)の移植による急性期脳梗塞に対する治療効果が報告されている。作用機序として、虚血病巣に遊走した MSC からの様々なサイトカインや成長因子のパラクライン作用による脳保護効果が指摘されている。中でも炎症制御性サイトカインである IL-10 は、ミクログリアの活性化や Th1 細胞からの炎症性サイトカイン分泌を抑制し、さらにアポトーシスを制御することから、臨床的効果を高める治療分子として期待されるが、体内法で遺伝子治療を行うと骨髄抑制などの副反応が危惧される。そこで今回、安全に *ex vivo* 遺伝子治療が可能であるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、ラット IL-10 発現を強化させたヒト MSC(MSC/IL-10)を構築し、臨床における血栓回収療法に伴う再灌流を想定したラット一過性脳虚血モデルに経静脈的に移植することにより、その脳保護効果を検討した。治療の有効性を判定するにあたり、90 分間の脳虚血の再灌流直後に、 1×10^6 個の治療細胞を移植したラットにおいて、7 日後における脳梗塞体積と神経徴候の評価を行ったところ、MSC 単独群と比べ MSC/IL-10 群で有意に梗塞体積が縮小し、神経徴候の改善を認めた。IL-10 発現を強化することで MSC 移植の脳梗塞における炎症制御作用の増強が想定され、再灌流から 72 時間後の時点で、免疫組織学的検討を行った。虚血側大脳半球において、MSC 単独群と比べ MSC/IL-10 群では、活性化ミクログリアのマーカーである Iba-1 陽性細胞数や、TNF- α , IL-18 といった炎症性サイトカインの発現は有意に抑制されており、その一方で IL-10 発現は有意に増加した。また Fluoro-Jade C 染色を用いた神経細胞死の評価では、皮質梗塞境界領域における変性神経の細胞数が、MSC/IL-10 群において MSC 単独群に比べて有意に減少しており、これらの結果から炎症制御作用の増強が、脳保護に繋がった可能性が示唆された。さらにヒト 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 Real-time PCR 法により、移植細胞の生体内分布を評価した。再灌流 72 時間後の虚血側大脳半球において、MSC/IL-10 が、MSC よりも有意に多く分布していた。さらに移植細胞の局在を解析するため、PKH 染色で標識した MSC または MSC/IL-10 を投与したところ、再灌流 14 日後で、いずれの群においても移植細胞は虚血側大脳半球から消失していた。安全性の面では、移植された MSC/IL-10 が長期間宿主内に生存しないことや、再灌流 72 時間後の時点での血清 IL-10 の濃度が対照群と比べ有意差がなく、虚血脳組織での局所的な発現に限られたことから、骨髄抑制など IL-10 過剰発現に伴う副反応のリスクは軽減されるものと考えられた。第二次審査において、*ex vivo* で移植 MSC に *IL-10* 遺伝子を導入する今回の手法に関し、IL-10 タンパク質の直接投与や、*IL-10* 遺伝子発現 AAV ベクターの *in vivo* 投与と比べた利点、MSC 移植及び IL-10 が脳保護に作用する機序や、具体的な投与方法など臨床応用における課題等に関して質疑が行われ、的確な回答がなされた。

以上より、脳梗塞急性期において AAV ベクターを介して *ex vivo* 法により IL-10 発現を強化することで、MSC 移植の炎症制御作用が増強され、より強力な脳保護効果へと繋がること示された。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、損傷脳組織において一過性に機能させる新規治療技術の基盤となり、将来の脳梗塞治療へと繋がる可能性を示すものであり、学位論文として十分に価値あるものと認定した。