

【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、適応時間の短さや厳格な適応基準により恩恵を受けられる患者は少ない。歯髄幹細胞(DPSCs)は骨髄間葉系細胞(BMSCs)と比較して、採取時の侵襲性が低く、増殖能が高いこと、また、T細胞反応の抑制効果も強いことから移植ソースとして期待されている。既に脳虚血に対するDPSCsの治療効果が報告されており、その作用機序として、DPSCsからの種々な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。その中でも肝細胞増殖因子(HGF)は、様々な病態で抗アポトーシス作用、抗炎症作用、血管新生作用等が広く知られており、脳虚血においては、血液脳関門障害の抑制や神経保護効果が報告されている。そこで本研究では、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いてHGFを強発現させたDPSCsの移植による急性期脳梗塞における治療効果の増強について検討した。

【方法】

cytomegalovirus (CMV) プロモーター制御下にHGFを発現するself-complementary AAV1-CMV-HGFベクターを構築し、これをヒト由来のDPSCsに遺伝子導入してHGF発現を強化したDPSCs/*HGF*を作製した。脳虚血モデルラットは、8週齢雄性SDラットに対してintraluminal suture techniqueを用いて中大脳動脈を90分間閉塞後、再灌流して作成した。DPSCs単独群、DPSCs/*HGF*群、対照群の3群に分け、DPSCs単独群およびDPSCs/*HGF*群では虚血再灌流直後に 1×10^6 個の細胞、対照群には溶媒(PBS)を静脈内投与した。再灌流7日後にラットの神経学的評価を行った後、脳組織TTC染色により梗塞体積を測定した。また、再灌流72時間後に、免疫組織学的解析やELISA法による炎症性サイトカイン発現および活性化ミクログリアの分布、western blot法によるtight junction構成タンパク質発現およびEvans blueによる血管外漏出量の評価を行なった。低毒性生細胞蛍光ラベル(PKH染色)による移植細胞の生存・集積および脳微小血管密度を各群間で比較し解析を行なった(再灌流72時間後および14日後)。

【結果】

1) 梗塞体積・神経学的評価

再灌流7日後において、DPSCs/*HGF*群はDPSCs単独群および対照群に比べて有意な梗塞縮小効果を認めた。

神経学的評価に関しては、DPSCs単独群、DPSCs/*HGF*群ともに、姿勢異常、片麻痺のいずれも対照群に比べ有意な改善を認めた。

2) 移植細胞の生存・集積解析

PKH染色で標識したDPSCsまたはDPSCs/*HGF*を投与し、虚血脳半球のいずれの群においても再灌流72時間後に移植細胞の生着を認めたが、再灌流14日後では認めなかった。

3) 炎症抑制・神経保護効果の評価

DPSCs/*HGF* 群では、皮質梗塞境界領域において、活性化ミクログリアのマーカーIba-1陽性細胞数が DPSCs 単独群に比べ有意に減少していた。虚血脳半球における炎症性サイトカインの発現は、DPSCs 単独群に比べ皮質梗塞境界領域において有意に抑制されていた。血清中炎症性サイトカインも同様に、DPSCs/*HGF*群では、DPSCs 単独群に比べ著しい低下を示した。Fluoro-Jade C (FJC)染色では、DPSCs/*HGF* 群では皮質梗塞境界領域における FJC 陽性細胞数が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。

4) 血液脳関門の機能評価

DPSCs/*HGF* 群は、DPSCs 単独群および対照群に対して Evans blue 色素による血管外漏出量の有意な減少を認めた。また、DPSCs/*HGF*群において、tight junction 構成タンパク質である ZO-1 および occludin の発現は、DPSCs 単独群に比べ有意に増加していた。また、再灌流 14 日後における脳微小血管密度は、DPSCs 単独群に比べ DPSCs/*HGF*群において有意に増加していた。

【考察・結論】

ラット一過性局所脳虚血モデルにおいて、HGF 発現 AAV ベクターを用いて遺伝子導入した DPSCs は、再灌流直後における DPSCs 移植の梗塞縮小における治療効果をもたらした。DPSCs/*HGF*の経静脈投与により虚血脳組織における HGF 発現を一過性に増加させると、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し、また、血液脳関門の障害を軽減して血管新生を促進することで、DPSCs 移植による脳保護効果を増強する可能性が初めて示唆された。本研究成果を応用することで、損傷脳組織において脳保護効果を示す有用な *ex vivo* 遺伝子療法として、新しい脳梗塞治療の開発が期待される。