

論文内容の要旨

iPSC-derived mesenchymal stem cells attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory signaling and oxidative stress

iPS 細胞由来間葉系幹細胞は炎症シグナルと酸化ストレスを抑制することで脳虚血再灌流障害を軽減させる

日本医科大学大学院医学研究科 神経内科学分野

大学院生 荒川将史

Molecular Therapy – Methods & Clinical Development 第 30 巻掲載予定

【背景・目的】

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) は、虚血性脳卒中に対する治療効果については、これまで多くの研究がなされている。脳虚血後に生じる炎症や酸化ストレスは、神経細胞の損傷とそれによる運動機能障害を引き起こすが、MSCs は組織損傷に応じて多様なサイトカインを分泌し、抗炎症・抗酸化作用や血管新生作用などを介して組織の保護・修復を促す。MSCs の中でも骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) は臨床研究を含め広く用いられているが、その採取には侵襲的処置が必要であり、ドナー間での細胞性質の変動や培養時の細胞劣化がある為、均一な細胞の確保は困難である。そこで代替となる細胞供給源として induced pluripotent stem cells (iPSCs) 由来間葉系幹細胞 (iPSC-derived mesenchymal stem cells, iMSCs) が注目されている。iPSCs は自己複製能と多分化能をもつ人工多能性幹細胞であり、そこから作製された iMSCs は長期培養においても均質性を保ち、更に BMMSCs より高い増殖能を有する。そのため治療用の安定した細胞供給が可能であり、iMSCs を用いて動物疾患モデルにおける治療効果を確認する研究が始まっている。今回我々はラット局所脳虚血モデルを用い、iMSCs 投与による治療効果とその機序について検討し、BMMSCs と治療効果を比較した。

【方法】

ヒト iPSCs は理化学研究所より購入し、BMMSCs は株式会社カネカより提供された。過去の報告より、神経堤細胞を経由して iMSCs を作製した。8 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットの左中大脳動脈を閉塞し 90 分後に再灌流した transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) 動物モデルを作成した。BMMSCs 投与群、iMSCs 投与群、対照群 (Vehicle 群) の 3 群を作成し、虚血再灌流直後に BMMSCs 群と iMSCs 群には 1×10^6 個の細胞を、Vehicle 群にはリン酸緩衝液を投与した。tMCAO 後、3 日、7 日、14 日、28 日に運動機能と認知機能を評価した。tMCAO 後、3 日目の脳切片を用いて梗塞体積と免疫染色・enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による抗炎症・抗酸化ストレス作用と神経細胞死の評価を行い、これらを各群間で検討した。

【結果】

1) 梗塞体積

Vehicle 群 ($241.9 \pm 16.2 \text{ mm}^3$) との比較で、BMMSCs 群 ($189.1 \pm 27.7 \text{ mm}^3$, $p = 0.011$) および iMSCs 群 ($188.8 \pm 25.3 \text{ mm}^3$, $p = 0.010$) で有意に梗塞体積が縮小した。BMMSCs 群と iMSCs 群間に有意な差はなかった。

2) 運動機能、認知機能評価

運動機能評価としての Rotarod 試験における走行可能時間は tMCAO 後 3 日 (Vehicle 64.1 ± 36.7 秒 vs. BMMSCs 122.1 ± 46.5 秒, $p = 0.031$, and iMSCs 121.5 ± 42.7 秒, $p = 0.033$)、

7日 (83.6 ± 43.4 秒 vs. 142.6 ± 37.4 秒, $p = 0.035$, and 149.8 ± 50.1 秒, $p = 0.017$)、14日 (80.5 ± 28.2 秒 vs. 134.9 ± 45.6 秒, $p = 0.016$, and 125.7 ± 30.7 秒, $p = 0.049$)、28日 (57.3 ± 35.4 秒 vs. 107.5 ± 31.2 秒, $p = 0.01$, and 110.6 ± 25.3 秒, $p = 0.007$) であり細胞投与群で有意な運動機能の改善を認めた。

認知機能評価において、迷路試験での正解率は tMCAO 後 28日 (Vehicle 58.1 ± 10.1 % vs. BMMSCs 78.5 ± 12.5 %, $p = 0.002$, and iMSCs 78.4 ± 7.6 %, $p = 0.002$) であり、Vehicle 群と比べ細胞投与群で有意に認知機能低下を抑制した。

MSCs の投与により脳虚血後の運動機能を改善し、認知機能低下を抑制したが BMMSCs 群と iMSCs 群間に有意な差はなかった。

3) 炎症抑制

脳内の炎症により活性化されるミクログリアのマーカー Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) と炎症マーカー tumor necrosis factor - α (TNF- α) の大脳皮質梗塞境界域における発現細胞数、虚血脳における炎症性サイトカイン interleukin (IL) -1 β 、IL-6 濃度を調べた。Vehicle 群と比較し、BMMSCs 群と iMSCs 群では Iba-1 陽性細胞数 (Vehicle 134.5 ± 12.4 cells/ 0.5mm^2 vs. BMMSCs 89.7 ± 14.0 cells/ 0.5mm^2 , $p < 0.001$, and iMSCs 91.3 ± 10.1 cells/ 0.5mm^2 , $p < 0.001$)、TNF- α 陽性細胞数 (125.1 ± 12.4 cells/ 0.5mm^2 vs. 97.3 ± 15.4 cells/ 0.5mm^2 , $p = 0.018$, and 95.6 ± 12.6 cells/ 0.5mm^2 , $p = 0.013$) は有意に低く、IL-1 β 濃度 (Vehicle 6.9 ± 2.2 pg/mg vs. BMMSCs 3.3 ± 2.3 pg/mg, $p = 0.046$, and iMSCs 2.9 ± 1.6 pg/mg, $p = 0.024$)、IL-6 濃度 (24.2 ± 8.0 pg/mg vs. 15.2 ± 3.0 pg/mg, $p = 0.048$, and 14.1 ± 3.3 pg/mg, $p = 0.027$) も、細胞投与群で有意な低下を認めた。MSCs の投与は抗炎症効果を示したが、BMMSCs 群と iMSCs 群とに有意な差はなかった。

4) 酸化ストレス抑制

皮質梗塞境界域において、酸化ストレスにより生成される代謝産物 4-hydroxynonenal (4-HNE) 及び 8-hydroxy-20-deoxyguanosine (8-OHdG) の発現と虚血脳における抗酸化酵素 superoxide dismutase (SOD) 活性を検討した。Vehicle 群と比較すると BMMSCs 群、iMSCs 群で 4-HNE 発現細胞数 (Vehicle 142.6 ± 14.9 cells/ 0.5mm^2 vs. BMMSCs 114.3 ± 6.2 cells/ 0.5mm^2 , $p = 0.005$, and iMSCs 106.3 ± 10.8 cells/ 0.5mm^2 , $p < 0.001$)、8-OHdG 発現細胞数 (153.0 ± 22.4 cells/ 0.5mm^2 vs. 108.2 ± 14.3 cells/ 0.5mm^2 , $p = 0.003$, and 106.7 ± 10.3 cells/ 0.5mm^2 , $p = 0.002$) は有意に低く、虚血脳における SOD 活性は細胞投与群で有意に高値 (2.2 ± 0.2 Units/mg vs. 2.9 ± 0.3 Units/mg, $p = 0.012$, and 2.8 ± 0.4 Units/mg, $p = 0.030$) であった。MSCs の投与は抗酸化作用を示したが、BMMSCs 群と iMSCs 群間で有意な差はなかった。

5) 神経保護効果

神経細胞死の評価として、Fluor-Jade C (FJC) による変性ニューロンの染色を行った。皮質梗塞境界域における FJC 陽性細胞数は、Vehicle 群 (146.6 ± 13.1 cells/ 0.5mm^2) と比べ BMMSCs 群 (114.3 ± 21.8 cells/ 0.5mm^2 , $p = 0.027$)、iMSCs 群 (116.4 ± 21.2 cells/ 0.5mm^2 , $p = 0.038$) で有意な減少を認めた。MSCs はその投与により神経細胞死を低下させ、脳保護効果を示したが、BMMSCs 群と iMSCs 群間で有意な差はなかった。

【結論】

iMSCs の投与は梗塞体積を有意に縮小し、運動機能の改善と認知機能低下を抑制した。その機序は抗炎症・抗酸化ストレス作用を介した脳保護効果に由来するものであり、本研究により、その治療効果が BMMSCs と同等であることが初めて示された。iMSCs は作製時の非侵襲性と、細胞性質の安定性から細胞供給源として利点を有し、本研究成果により脳梗塞幹細胞治療における今後の臨床応用が期待される。