

第二次審査(論文公開審査)結果の要旨

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, volume 30, 2023 掲載

DOI: 10.1016/j.omtm.2023.07.005

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機能障害を引き起こす。間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)は、その組織損傷に応じて多様なサイトカインを分泌し、抗炎症・抗酸化ストレス作用、血管新生などを介して組織の保護・修復を促すため、MSCs を用いた幹細胞治療研究が行われている。MSCs の中で広く用いられている骨髄由来間葉系幹細胞(bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)は、ドナー間での性質変動や培養時の細胞老化があり、均一な細胞の確保は困難である。そこで代替として 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ち、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持し、更に BMSCs より高い増殖能を有するため、治療用の安定した細胞供給が可能である。

申請者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、BMSCs と治療効果を比較した。

方法として、まず神経堤細胞を中間体として iMSCs を作製した。8 週齢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。BMSCs 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 BMSCs 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 日目に運動機能と認知機能を、tMCAO 後 3 日目の脳切片を用いた梗塞体積と免疫染色・ELISA による抗炎症・抗酸化ストレス作用、神経細胞死の評価を行い、各群間で検討した。

結果は、梗塞体積は Vehicle 群との比較で、BMSCs 群および iMSCs 群で有意に縮小していた (BMSCs $p = 0.011$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.010$ [vs. Vehicle])。

運動機能評価は、ロタロッド試験を用いた走行可能時間は tMCAO 後 3 日 (BMSCs $p = 0.031$

[vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.033$ [vs. Vehicle]), 7 日 (BMSCs $p = 0.035$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.017$ [vs. Vehicle]), 14 日 (BMSCs $p = 0.016$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.049$ [vs. Vehicle]), 28 日 (BMSCs $p = 0.01$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.007$ [vs. Vehicle])のいずれも細胞投与群で有意な運動機能の改善を認めた。認知機能評価は、tMCAO 後 28 日目の Y 迷路試験での交替行動率が、Vehicle 群と比べ細胞投与群で有意に高く、認知機能低下を抑制していた (BMSCs $p = 0.002$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.002$ [vs. Vehicle])。

抗炎症作用評価は、Vehicle 群との比較で、炎症により活性化されるミクログリアマーカー 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が BMSCs 群と iMSCs 群で有意に低く (Iba-1: BMSCs $p < 0.001$ [vs. Vehicle], iMSCs $p < 0.001$ [vs. Vehicle] および TNF- α : BMSCs $p = 0.018$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.013$ [vs. Vehicle])、虚血脳における炎症性サイトカイン interleukin (IL) -1 β 、IL-6 濃度も細胞投与群で有意な低下を認めた (IL-1 β : BMSCs $p = 0.046$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.024$ [vs. Vehicle] および IL-6: BMSCs $p = 0.048$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.027$ [vs. Vehicle])。

抗酸化ストレス作用は、Vehicle 群との比較で、酸化ストレス代謝産物である 4-hydroxynonenal(4-HNE) 及び 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) の皮質梗塞境界域における発現細胞数が BMSCs 群と iMSCs 群で有意に低く (4-HNE: BMSCs $p = 0.005$ [vs. Vehicle], iMSCs $p < 0.001$ [vs. Vehicle] および 8-OHdG: BMSCs $p = 0.003$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.002$ [vs. Vehicle])、虚血脳における抗酸化酵素 superoxide dismutase(SOD) 活性は細胞投与群で有意に高かった (BMSCs $p = 0.012$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.030$ [vs. Vehicle])。

神経細胞死の評価は、Fluor-Jade C(FJC)による変性ニューロンの染色を行い、皮質梗塞境界域における FJC 陽性細胞数は、Vehicle 群と比べ BMSCs 群、iMSCs 群で有意な減少を認めた (BMSCs $p = 0.027$ [vs. Vehicle], iMSCs $p = 0.038$ [vs. Vehicle])。

以上まとめると梗塞体積、運動・認知機能評価、抗炎症作用、抗酸化ストレス作用、神経細胞死の抑制による治療効果は、Vehicle 群と比べ有意に良好であり、かつ BMSCs 群と iMSCs 群間では同等であった。以上より、本研究結果により iMSCs は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。

第二次審査では、細胞投与経路として静脈投与を選択した理由、tMCAO モデルラットの利点、単球マクロファージとミクログリアの役割の違い、細胞投与のタイミングや単回投与とした理由、iMSCs の腫瘍化リスク、臨床応用の実現性、iMSCs 作製に関わるコストなどの幅広い質疑が行われ、いずれも的確な回答が得られ、本研究に関する知識を十分に有していることが示された。本研究は、iPSC 細胞を用いた間葉系幹細胞治療を従来の間葉系幹細胞治療と比較した意義のあるもので、将来の脳梗塞幹細胞治療への展望を示すものであり、学位論文として十分に価値あるものと認定した。