

iPS細胞を用いた脳梗塞の幹細胞治療*

大木 宏一**

Key Words : iPS cells, stem cells, stroke, transplantation, replacement

(神経治療 32 : 93-97, 2015)

はじめに

本邦において脳血管障害は、その死亡率は以前より改善傾向にあるが、要介護が必要な原因疾患として最多となっており(厚生労働省平成22年国民生活基礎調査の概況)、急激な高齢化社会の進行の中で、「救命はできたが機能障害が残存し、介護が必要な疾患」として、本人・家族、そして社会的にも大きな負担・損失が生じるものとなっている。

そのため脳血管障害(特に脳梗塞)に関する治療に関してはさまざまな研究が行われており、特に近年の神経科学の発展により神経発生や幹細胞に関する知見が数多く報告されている。これにより「中枢神経は一度損傷を受けると再生しない」という通説は覆され、「中枢神経系も可塑性があり再生可能なもの」として認識されつつある。そしてこれらの成果をもとに、脳梗塞においてさまざまな幹細胞を用いた細胞治療が研究されており、既存の方法とは一線を画した革新的な治療として高い期待が持たれている。本稿では、各種幹細胞療法の中でも特にinduced pluripotent stem cells (iPS細胞: 人工多能性幹細胞)に焦点をあて、他の幹細胞療法と比較することによりその利点・欠点を挙げ、また今後の臨床応用への展望を述べていく。

I. 脳梗塞に対するさまざまな幹細胞治療

現在研究されている脳梗塞に対する幹細胞療法としては、①骨髄由来の間葉系幹細胞や血球系幹細胞等の非神経系幹細胞の移植、②成体脳に内在する神経幹細胞の活性化、③embryonic stem cell (ES細胞: 胚性幹細胞)やiPS細胞、胎児脳由来の神経幹細胞の移植が挙げられる。幹細胞療法は下記I~Vのようなさまざまな機序を介して機能回復を促進

していると考えられているが¹⁾、neural replacement (移植細胞が神経系細胞に分化し損傷脳組織を置換すること)以外のさまざまな機能回復機序を持っている点を認識することは、最適な幹細胞療法の選択を行う上で非常に重要と考えられる。

- I) 損傷神経組織の移植細胞による置換 neural replacement
- II) 血管新生, 再髄鞘化, 内在性の神経新生の促進 promotion of angiogenesis, remyelination, neurogenesis
- III) シナプス新生 synaptogenesis
- IV) 炎症反応の修飾 modulation of inflammation
- V) 神経保護効果 neuroprotection

1. 非神経系幹細胞の移植

上述の幹細胞療法のなかで、非神経系幹細胞の移植療法に関しては、既にヒトにおける静脈注射投与の臨床試験^{2~5)}でその安全性が報告されており、より臨床応用に近いと考えられる。一方この非神経系幹細胞移植により期待される効果としては、栄養因子分泌を介した前述のII~Vによるものが想定されるが、neural replacementに関しては神経幹細胞を用いた方が効率は良いであろうと考えられる¹⁾。

2. 内在性神経幹細胞の活性化

内在性神経幹細胞の活性化に関しては、倫理的問題や腫瘍化の可能性はなく、またneural replacementの効果を含めた全ての機能回復機序が期待されるが、実際の機能回復にどの程度寄与するかという点については、さらなる研究が必要な段階である。また実際の治療介入の手段としては、薬剤投与や非神経系幹細胞移植による栄養因子分泌を介した方法

* Stem Cell Therapy for Stroke with iPS Cells.

** 慶應義塾大学医学部神経内科 Koichi Oki : Department of Neurology, Keio University School of Medicine

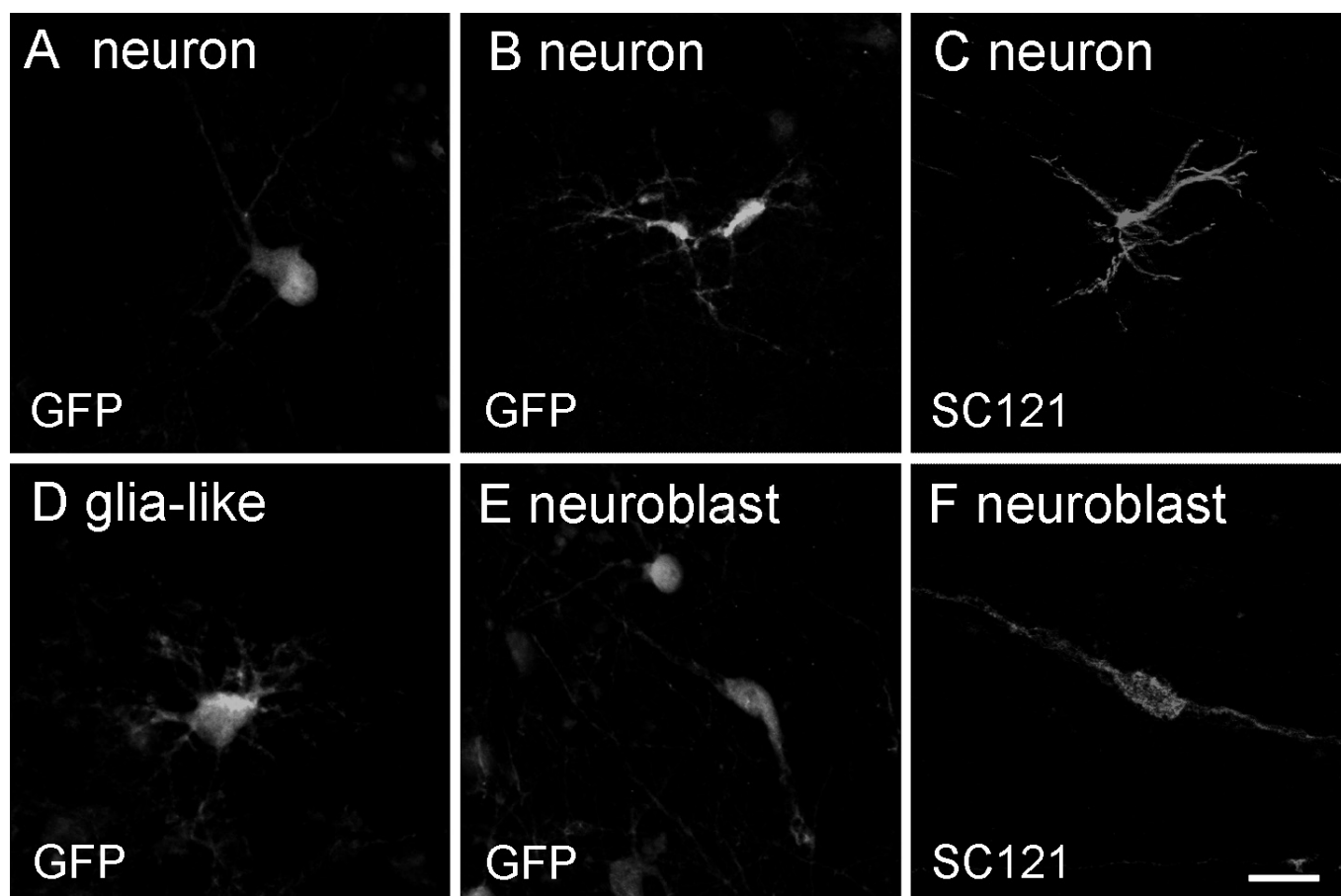


Fig. 1 Differentiation of human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived long-term expandable neuroepithelial-like stem cells (lt-NES cells) grafted in stroke-damaged rats
Human-iPSC-derived lt-NES-cells grafted in stroke-damaged rats differentiate to mature neurons (A-C), glia-like cells (D) and neuroblasts (E, F) at 4 months after transplantation. GFP (green fluorescent protein) or SC121 (human specific protein) were used for morphological analysis. Scale bar = 20 μ m.

等が考えられるが、神経幹細胞移植自体も内在性の神経幹細胞活性化を促すことが報告されている⁶⁾。

3. 神経幹細胞の移植

神経幹細胞の移植療法では、neural replacementの効果を含めた全ての機能回復機序が期待されるが、臨床応用に際して神経幹細胞の供給源が胎児脳やES細胞である場合には倫理的な問題が生じ、またiPS細胞である場合には後述するような「腫瘍化」の問題を克服しなければならず、解決しなければならない点が数多く残っている。

現時点では、「より臨床応用しやすい非神経系幹細胞の静脈内投与」、「臨床応用には解決すべき課題があるがneural replacementにおいて優位性があると考えられる神経幹細胞の利用」、「さらなる基礎研究が必要な内在性神経幹細胞の活性化」という3つの大きな幹細胞療法の治療戦略があると考えられる。次項ではその中でもヒトiPS細胞由来の神経幹細胞移植療法について述べていく。

II. iPS細胞由来神経幹細胞の移植療法

2007年に山中教授らが、線維芽細胞等の最終分化した体細胞に4種の初期化遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を導入することにより、ES細胞と同等の増殖能・分化能を有するiPS細胞を樹立することをヒト由来細胞で成功した。以降生命倫理的問題が回避できるという利点から、iPS細胞を用いた研究が多く発表されている。

筆者らもSweden Lund大学において、ヒトiPS細胞を接着培養法で分化させた神経幹細胞 (lt-NES cells : long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells) を脳梗塞モデル動物に移植する基礎研究を行った⁷⁾。この研究からは

- ① ヒトiPS細胞由来神経幹細胞は、移植後腫瘍形成することなくさまざまなタイプの成熟神経細胞及びアストロサイトに分化し、数ヶ月の間生存し得た (**Fig. 1**)。

Table 1 Experimental reports of induced pluripotent stem cells grafted in stroke-damaged animals

Authors (Year)	Grated cells	Transplant site	Transplant time	Fate of grafted cells	Follow up (behaviour test)	Follow up (histological)	Mechanism of functional recovery
Chen et al. ⁸⁾ (2010)	mouse undifferentiated iPSCs	subdural space (+ Fibrin Blue)	1hr	no survival	4wks	6wks	anti-inflammation
Jiang et al. ⁹⁾ (2011)	human undifferentiated iPSCs	striatum	1wk	neural cells	3wks	3wks	mechanism not verified
Oki et al. ⁷⁾ (2012)	human iPSCs derived NSCs (lt-NES cells)	cortex or striatum	2days or 1wk	neurons and astrocytes	10wks	4months	trophic factors
Qin et al. ¹⁰⁾ (2013)	human iPSCs derived NSCs (lt-NES cells)	striatum	1day	neurons and astrocytes	4wks	4wks	mechanism not verified
Mohamad et al. ¹¹⁾ (2013)	vector free human iPSCs derived NSCs	cortex	1wk	neurons and astrocytes	4wks	4wks	trophic factors and neural replacement?
Yuan et al. ¹²⁾ (2013)	human iPSCs derived NSCs (4-stage culture)	striatum	not mentioned	Nestin & GFAP positive cells	3wks	3wks	mechanism not verified
Qin et al. ¹³⁾ (2013)	human undifferentiated iPSCs	striatum	1day	neurons and astrocytes	4wks	4wks	trophic factors and neural replacement?
Tornero et al. ¹⁴⁾ (2013)	progenitors for cortical neurons derived from human lt-NES cells	cortex	2days	cortical neurons	8wks	5months	mechanism not verified
Liu et al. ¹⁵⁾ (2013)	mouse iPSCs (without viral and oncogenic factors) derived NPCs	cortex	0 day	neurons and astrocytes	3wks	3wks	mechanism not verified

Abbreviations : iPSCs = induced pluripotent stem cells, NSCs = neural stem cells, lt-NES cells = long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells, NPCs = neural progenitor cell

- ② 神経細胞に分化した細胞は移植脳に軸索を伸長し、また電気生理学的にも移植脳からのシナプス入力を受ける成熟した神経細胞に分化した。
- ③ 虚血脳への神経幹細胞の移植により、機能改善が移植後早期より認められたが、移植細胞の生存とは無関係であった。
- ④ 機能回復はneural replacement以外の他の機序 (vascular endothelial growth factor : VEGF 等の栄養因子の分泌) による可能性が高い。

ということが判明した。

他の研究室も含めたいずれの報告においても (Table 1), ① 安全性 (腫瘍形成なし), ② 細胞レベルでの分化・成熟, ③ 機能回復という3点は認められているが、機能回復がneuronal replacementによる直接的なものと証明しているものは脳梗塞の基礎研究においては現時点ではなく、脊髄損傷後の移植実験においてわずかで報告されているのみである¹⁶⁾。この点は、“iPS細胞を用いた”幹細胞治療としての今後の課題

の一つとなるであろう。すなわち、neural replacementを求めなければ、非神経系幹細胞移植でも同等の効果が望めるかもしれないからである。

III. iPS細胞を用いた幹細胞治療の利点・欠点、今後の展望

iPS由来の神経幹細胞も非神経系幹細胞と同様に、炎症修飾作用、神経保護効果、血管新生、再髄鞘化、内在性神経幹細胞活性化等の作用を持っているが、それに加え神経系細胞への分化効率が高いことが、iPS細胞由来神経幹細胞を用いることの利点と考えられる。非神経系幹細胞から神経系細胞への分化も確認されているが、損傷脳組織を移植細胞由来の神経系細胞で効率よく置換すること (neural replacement) を目的とするなら、神経幹細胞の方が有利であろう。しかし前述のように、現在行われている基礎研究では、神経細胞への形態的・機能的分化は細胞レベルでは確認されているものの、その集合体としての新規神経回路による機能回復は証明

されていない。また新規神経回路によって生じる「痙攣」等の有害事象も検討しなければならない。脳梗塞で失われる neurovascular unit の再生として、神経細胞・グリア細胞、血管系を含めた機能回復に有効な神経回路の構築をいかに行っていかかが今後の更なる課題となるであろう。

その他iPS細胞を用いることの欠点としては、安全面（造腫瘍性に関する対策）や細胞調整上の問題が挙げられる。

iPS細胞では、外来遺伝子の挿入による内在性がん原遺伝子の活性化や、がん原遺伝子である*c-Myc*の導入による「腫瘍化」の可能性があり、臨床応用も含めその安全性の評価・担保は非常に重要である。iPS細胞は樹立時の細胞の由来（origin）が腫瘍形成能に有意に相関することが示されており¹⁷⁾、事前の移植実験等によって腫瘍形成能が低い“安全な”成体組織由来のクローンを選別することにより、腫瘍化のリスクを避けられる可能性がある。また腫瘍化の一因となる外来遺伝子の内在遺伝子への挿入を避けたintegration free iPS細胞由来神経幹細胞の移植実験¹¹⁾やがん原遺伝子を用いないiPS細胞の樹立^{15,18)}も報告されており、腫瘍化回避に関する研究は精力的に行われている。

iPS細胞由来神経幹細胞を自家移植として用いる場合、免疫拒絶反応が少なく、ドナー細胞からの感染のリスクが低い等のメリットがあるが、一方で分化誘導や安全性の確認までに非常に時間がかかり、脳梗塞などの治療にタイムウィンドウがある疾患には適さない可能性がある。また脳梗塞のようなcommon diseaseで全ての症例に自家移植を行うと、コスト面でも多大な負担が生じると考えられる。その点、他人の細胞から樹立し、安全性の確認も済んだiPS細胞バンクからHLAが一致するものを移植細胞として使用する他家移植では、時間的な制約はなく、コスト面での優位性もある。一方でその場合、免疫抑制薬の使用を検討しなければならないが、基礎実験からは免疫抑制薬を使用せずに移植細胞が生着したとの報告もある¹¹⁾。免疫抑制薬の使用の要否、及び使用する場合の最適なプロトコルの策定も、他家移植を選択した場合の今後の課題である。

また全ての移植療法に共通する課題だが、最適な移植時期、移植方法の確立も重要である。現在までに報告されているiPS細胞由来神経幹細胞の脳梗塞への移植研究では、梗塞作成の1週間後に、定位的細胞移植（頭蓋骨に作成した穿頭孔より注入針を用いて脳内に移植する方法）を行っていることが多い。臨床応用を考えると患者さんへの侵襲や抗血栓薬の投与中という観点から経静脈的・動脈的投与の方が優れているが、一方で間葉系幹細胞の経動脈的な移植では、梗塞1日後の投与では移植細胞は梗塞巣中心に生着するが、4日後投与では梗塞巣周囲にとどまり、梗塞作成1週間後の投与では移植細胞はほとんど生着しないと報告されている¹⁹⁾。つまり経動脈・静脈投与では急性期に細胞を投与しないと生着しない可能性が考えられるが、一方で脳梗塞急性期の炎症が強い脳内環境は

細胞の長期生存に対しては厳しいと考えられ²⁰⁾、neural replacementによる機能回復に主眼をおくなら、炎症が軽減する亜急性期以降に、またその場合は定位的に移植を行う方が有効な神経回路の再構築という点で優位かもしれない。

おわりに

現在脳梗塞の幹細胞治療として多くのものが研究されているが、その機能回復機序もさまざまであり、非神経系幹細胞移植でも十分な機能回復が得られる症例と、neural replacementを目指した神経幹細胞移植が必要な症例をどのように選択するかについての議論も必要である。また近年、脳梗塞に対する薬物療法や血管内治療等の進歩も著しいが、これらの治療と幹細胞移植療法は決して相容れないものではない。双方の利点・欠点を理解し、両者を組み合わせることで更なる機能回復を図ることができれば、脳梗塞治療の大きな進歩となるであろう。

本論文はCOI報告書の提出があり、開示すべき項目はありません。

文 献

- 1) Lindvall O, Kokaia Z : Stem cell research in stroke: how far from the clinic? *Stroke* 42 : 2369-2375, 2011
- 2) Bang OY, Lee JS, Lee PH et al : Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 57 : 874-882, 2005
- 3) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T et al : Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 134 : 1790-1807, 2011
- 4) Savitz SI, Misra V, Kasam M et al : Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. *Ann Neurol* 70 : 59-69, 2011
- 5) 田口明彦 : 高齢者のための再生医療 研究の現状と未来への展望 脳梗塞患者に対する再生医療の現状とその未来. *日本老年医学会雑誌* 50 : 359-361, 2013
- 6) Mine Y, Tatarishvili J, Oki K et al : Grafted human neural stem cells enhance several steps of endogenous neurogenesis and improve behavioral recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurobiol Dis* 52 : 191-203, 2013
- 7) Oki K, Tatarishvili J, Wood J et al : Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain. *Stem Cells* 30 : 1120-1133, 2012
- 8) Chen SJ, Chang CM, Tsai SK et al : Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *Stem Cells Dev* 19 : 1757-1767, 2010
- 9) Jiang M, Lv L, Ji H et al : Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* 354 : 67-75, 2011
- 10) Qin J, Song B, Zhang H et al : Transplantation of human neuro-epithelial-like stem cells derived from induced pluripotent stem cells improves neurological function in rats with experi-

- mental intracerebral hemorrhage. *Neurosci Lett* 548 : 95–100, 2013
- 11) Mohamad O, Drury–Stewart D, Song M et al : Vector–free and transgene–free human iPS cells differentiate into functional neurons and enhance functional recovery after ischemic stroke in mice. *PLoS One* 8 : e64160, 2013
 - 12) Yuan T, Liao W, Feng NH et al : Human induced pluripotent stem cell–derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stem Cell Res Ther* 4 : 73, 2013
 - 13) Qin J, Gong G, Sun S et al : Functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat hemorrhagic stroke model. *Neurosci Lett* 554 : 70–75, 2013
 - 14) Tornero D, Wattananit S, Gronning Madsen M et al : Human induced pluripotent stem cell–derived cortical neurons integrate in stroke–injured cortex and improve functional recovery. *Brain* 136 : 3561–3577, 2013
 - 15) Liu SP, Fu RH, Wu DC et al : Mouse–induced pluripotent stem cells generated under hypoxic conditions in the absence of viral infection and oncogenic factors and used for ischemic stroke therapy. *Stem Cells Dev* 23 : 421–433, 2013
 - 16) Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A et al : Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell–derived long–term self–renewing neuroepithelial–like stem cells. *Stem Cells* 30 : 1163–1173, 2012
 - 17) Miura K, Okada Y, Aoi T et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27 : 743–745, 2009
 - 18) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K et al : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26 : 101–106, 2008
 - 19) Ishizaka S, Horie N, Satoh K et al : Intra–arterial cell transplantation provides timing–dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke* 44 : 720–726, 2013
 - 20) Okano H : Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 69 : 698–707, 2002

Stem Cell Therapy for Stroke with iPS Cells

Koichi OKI

Department of Neurology, Keio University School of Medicine

Recently, several stem cell–based approaches have been considered as a novel treatment for stroke, such as delivery of non neural stem cells, stimulation of endogenous neural stem cells, and transplantation of neural stem cells (NSCs). Among them, transplantation of NSCs is thought to have an advantage for functional recovery through neural replacement rather than other mechanisms because NSCs can easily differentiate into neural cells compared to non neural stem cells.

From the ethical aspect, induced pluripotent stem cells (iPSCs) are good candidates for a source of NSCs. Recently several studies demonstrate neural stem/progenitor cells derived from iPSCs promote functional recovery after transplantation in stroke–damaged animals. However this

functional recovery is not caused by neural replacement ; mainly from other mechanisms such as trophic effects, anti–inflammation, neuroprotection and so on. Therefore, further researches targeting for construction of functional neural circuits after transplantation are needed to take advantage of using NSCs derived from iPSCs because it has already been reported that other cell–based approaches can improve functional recovery through several mechanisms except neural replacement. Moreover we still have a lot of other tasks for clinical use of iPSCs, such as management of tumorigenicity, selection of optimal time, site and method for transplantation, etc.

Here we discuss about the potential and clinical application of iPSCs for stroke therapy.