

バイオイメージングを駆使した脳梗塞に対する再生医療

七戸 秀夫¹, 寶金 清博¹, 黒田 敏²

¹北海道大学医学研究科脳神経外科 ²富山大学医学薬学研究部 (医学) 脳神経外科

はじめに：自家骨髄間質細胞を用いた 脳梗塞再生医療

脳卒中はわが国の主要疾病の一つであり、とりわけ近年、脳梗塞の発症率が増加している。脳梗塞による後遺症は多くの国民の日常生活に重大な支障を及ぼしており、その介護やケアに要する医療費は年々増加している。そのため脳梗塞により後遺症を来している患者に対し、神経機能を回復させるための治療法開発が従来から課題となっていた。しかし国内外で長きにわたり研究が行われてきたものの、有効な治療薬はほとんど発見されていない。後遺症としての神経症状の改善を見込める治療は、現状ではリハビリテーションだけであるが、その治療効果には限界がある。

脳梗塞など中枢神経疾患の有する問題点は、脳組織がひとたび障害を受けるとその再生が非常に困難であるということにつきる。いまから約1世紀前、スペインの神経解剖学者ラモニ・カハールは末梢神経には軸索再性能があるが中枢神経にはそのような再生は見られないと記述した。それから約100年間に渡って中枢神経系は再生がおこる環境を失っているとの考え方が支配し続けた。しかし、20世紀末に至ってこれを覆す知見が次々と発表されつつあ

る。現在では虚血のみならず、外傷、神経変性など様々な原因による中枢神経系疾患で、再生医療の可能性がひろく模索されている。

最近、様々な幹細胞をもちいた再生医療が急速に進歩しており、これまで困難であった脳梗塞の後遺症を回復させるためのブレイクスルーとして期待されている。なかでも骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cells; BMSC) は、1998年に神経系細胞へも分化し得ることが報告されてから、注目を集めるようになった移植ソースである¹⁾。BMSCとは本来、骨髄腔内の壁細胞であり、生理的には造血幹細胞の生存、増殖に関わる niche を形成すると考えられている。また骨、軟骨、脂肪組織に分化可能なことから間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) の別名も持つ。BMSCのもつ神経保護作用には、大きく分けて三つの機序が考えられている。一つは、移植された BMSC が神経系細胞に分化するというもの (transdifferentiation)。もう一つはドナー細胞が、レシピエントの障害された神経細胞に細胞融合するというもの (cell fusion)。さらには、BMSC が損傷組織の周辺部でサイトカインや栄養因子を分泌し、神経保護効果を発揮するというものである (nursing effect)。これらは、BMSC の有する heterogeneity に由来する多面性効果であると考えられ

この総説は、第41回日本磁気共鳴医学会大会シンポジウム3「分子イメージングにおける Breakthrough」での講演を中心にまとめたものである。

キーワード cerebral infarct, bone marrow stromal cell, cell transplantation, bio-imaging

る²⁾。また BMSC は患者自身の骨髄から採取・培養が可能であり、ES 細胞や iPS 細胞に比べ生命倫理的な問題や免疫反応、腫瘍形成などの問題がなく、臨床応用を考える上できわめて有利である。このため、自家 BMSC 移植による脳梗塞患者に対する中枢神経再生医療は、国内外で小規模な臨床試験として開始されつつある^{3),4)}。Honmou らは 12 名の脳梗塞患者に対し自己 BMSC を静脈投与し、11 名の患者で移植後に神経症状の改善を得たと報告している⁴⁾。

脳梗塞再生医療とバイオイメージング

しかし、BMSC 移植治療が本格的に臨床応用されるまでには、依然として解決されるべき課題が残っている。その課題の一つが、バイオイメージングを利用した cell tracking である。すなわち、適切な方法でドナー細胞をラベリングし、組織への生着や細胞増殖、病変部への遊走など、生体内でのドナー細胞の挙動を経時的に捕らえることである。その重要性は細胞治療研究を創薬研究になぞらえることで理解が容易になる。cell tracking は薬物動態に相当すると考えられるが、薬物の血中濃度や組織移行が不明なままの状態、治療効果の有無や機序は語れないはずである。しかし脳梗塞の細胞治療の分野では、その特殊性から、現在までほとんどの臨床試験で cell tracking が試みられてこなかった。

実際にトランスレーショナルリサーチとしては、様々なモダリティを利用した cell tracking が行われてきた。一つには、蛍光や発光に関する物質や遺伝子などで細胞をラベリングし、生体内から発せられる光を捕らえて画像化する光イメージング法である^{5)~7)}。これらの方法は時間分解能にすぐれているが、人体、特に頭蓋内の中枢神経疾患では、光の組織透過性の

問題から臨床応用が難しい。また核医学的な方法による細胞ラベリングも行われており、放射性プローブとして ¹¹¹In-indium oxine⁸⁾、^{99m}Tc-HMPAO⁹⁾ などが用いられている。先駆的な仕事として、Correa らは ^{99m}Tc-HMPAO を用いて自家骨髄単核球をラベリングし、脳梗塞患者に対し経頸動脈的な細胞投与を行い、細胞が脳梗塞周辺部に集積するところを画像化した⁹⁾。しかし、これらの方法は定量性に優れるものの、放射性プローブには半減期や取り込んだ細胞に対する毒性の問題があり、現在まで広く臨床応用されるには至っていない。一方 MRI による cell tracking も報告されており、ガドリニウムなど様々な細胞ラベリング法が報告されてきた¹⁰⁾。なかでも超常磁性酸化鉄 (superparamagnetic iron oxide; SPIO) 製剤によるラベリング法は、細胞毒性が低くかつ比較的感度も高いため、これまでにとくさんの基礎研究が報告されている^{11),12)}。

もう一つの重要な課題は、バイオイメージングを用いた細胞治療後の客観的な脳機能評価である。過去の BMSC 移植治療の臨床試験では、NIH stroke scale (NIHSS), modified Rankin Scale (mRS), Barthel index といった機能予後スケールにより治療効果を評価している^{3),4)}。ここで参考になるのが先行する脳保護薬開発の歴史であり、振り返るとこれらの薬剤で臨床応用されたものは極めて少なく、最近ではラジカルスカベンジャーである NXY-059 において残念な結果が得られた。NXY-059 は、前臨床試験で脳保護薬開発研究のスタンダードである Stroke Therapy Academic Industry Round-table (STAIR)¹³⁾の基準を満たしており、まず、randomized, double-blinded, placebo-controlled study である SAINT-I Trial (2006) が実施された。この試験では発症 90 日後の機能予後が有意に改善し、大変大きな注目を集めた¹⁴⁾。しかし症例数を増やし (3195 例)、満を持して

行われた SAINT-II (2007) では有意な治療効果が示せなかった¹⁵⁾. この結果を受け、それ以後は薬剤自体の開発が中止となり、研究者に大きな失望をもたらした. しかし同様な事態は、機能予後スケールだけで治療効果を評価している限り、脳梗塞に対する細胞治療の臨床試験でもおこり得る. その対策として、移植治療効果の客観的評価法として、ホスト脳の機能変化をバイオイメージングにより評価することが必要と考えられる¹⁶⁾. 実際に Meltzer らは、脳梗塞患者に対する細胞移植術前後に ¹⁸F-FDG-PET を試行し、病変周囲の糖代謝の改善が運動機能回復と相関していたと報告している¹⁷⁾. また、Honmou らは細胞治療前後で MR axonography を行い、その有用性を報告している⁴⁾.

バイオイメージングを用いたトランスレーショナルリサーチ

我々は、臨床試験の成否を左右する重要なファクターである、MRI を用いた cell tracking や、PET/SPECT を用いた客観的な治療効果判定について、トランスレーショナルリサーチを行ってきた. まず、BMSC を移植 24 時間前に SPIO 製剤とインキュベートし、細胞をラベリングした. SPIO 製剤には、肝臓用 MRI 造影剤として広く臨床的に使用されているリゾピスト® (Fujifilm RI Pharma Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用した. ラット MCA 永久閉塞モデルを作成し、脳虚血 7 日後に、虚血側の線条体内へ BMSC を定位的移植した. ラット脳梗塞/BMSC 移植モデルに対し、小動物用 7T-MRI により移植前から移植後 8 週まで経時的に撮影した (T_2 -WI, T_2^* -WI). また、SPIO でラベルした BMSC をファントムに移植し、臨床用 3T-MRI (Philips Intera Achieva 3.0 TTM) で撮影した (T_1 -WI, T_2 -WI, T_2^* -WI, SWI). ラット脳梗塞/BMSC 移植モデルの行動学的評価として、MRI と平行してロータロッドテストを用いた運動機能評価を経時的に行った. 移

植 8 週間後に屠殺し、組織学的検討として蛍光免疫染色、Turnbull blue (鉄) 染色などを行った. 一方、小動物用 PET/SPECT/CT scanner (Inveon, Siemens) を用いて、ラット脳梗塞/BMSC 移植モデルに対し移植前 (脳虚血 6 日後) と移植後 4 週に ¹⁸F-FDG PET や ¹²³I-IMZ SPECT を行ない、脳局所糖代謝や中枢性ベンゾジアゼピンレセプター機能の変化について検討した.

その結果、行動学的評価によると脳梗塞作成後は運動機能低下が持続していた. しかし BMSC 移植群では、対照群と比べ移植 4 週間以降に運動機能の有意な改善がみられた¹⁸⁾. 組織学的検討では、移植 8 週間後でも BMSC は脳内に生着しており、病変部への遊走や、神経系細胞や血管内皮マーカーの発現がみられた^{12),18)}. 小動物用 7T-MRI では、移植された SPIO-BMSC が移植後 8 週間は捕捉可能であり、移植部位から病変周囲への遊走が経時的に観察できた¹²⁾. 一方、臨床用 3T-MRI でも T_2 -WI, T_2^* -WI, SWI ではファントム内の 1×10^3 個の細胞集団から良好に画像化できた. 細胞数の増加に応じて描出が増強されたが、少量の細胞数では over estimation される傾向がみられ、定量化は困難であった¹⁹⁾. ¹⁸F-FDG PET では虚血 6 日後の脳梗塞周辺部で脳局所糖代謝の低下が見られたが、BMSC 移植群では移植 4 週間後には vehicle 群に比べ有意に改善が見られた²⁰⁾. また ¹²³I-IMZ SPECT では虚血 6 日後の虚血側大脳皮質で IMZ 結合能の低下が見られたが、これも BMSC 移植群では移植 4 週間後には vehicle 群に比べ有意に改善が見られた²¹⁾.

これらの実験は、今後予定する臨床試験のシミュレーションとしての側面を持ち、実験結果からは MRI と SPIO 標識による cell tracking, PET/SPECT による移植治療効果の評価法は、臨床につながる高いポテンシャルをもつと考えられた.

臨床試験に向けた取り組み

我々は上記の研究成果に基づき、医師主導による『新たな培養・移植・イメージング技術を駆使した自己骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生治療—治療メカニズムの解明を目的とした臨床試験』（RAINBOW 研究）を、平成 27 年度の開始に向け準備中である。本研究は、以下の点で過去の臨床試験と異なる新規性のあるプロトコルである。すなわち、①他家血小板溶解物（platelet lysate: PL）をもちいた、自己 BMSC の安全かつ効率的な培養法、②脳梗塞周辺部への効率的な移植を目指した、脳定位の手術による直接細胞移植法、③バイオイメージングを活用した、中枢神経再生治療の有効性・安全性に関する評価法、である。具体的には、対象となる脳梗塞患者から亜急性期に骨髄を採取し細胞培養を行う。この際にボランティア由来の PL を培養添加物として用い、animal serum free の培養とする。3~4 週間培養し必要な細胞数 (5×10^7 個) 以上に達したら、移植 24 時間前に SPIO 製剤（リゾピスト[®]）で BMSC をラベリングする。SPIO-BMSC を梗塞巣周辺の健常部数カ所に定位的脳内移植を行う。経時的に MRI による cell tracking を行い、また ^{18}F -FDG PET などを活用し細胞移植の有効性に関して評価する、というプロトコルを予定している。

本研究に関して、我々の施設は『平成 24 年度革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業実施機関』に選定された。本事業では独医薬品医療機器総合機構（PMDA）と連携し、革新的な技術に基づく再生医療製品について有効性、安全性を確立するための研究が求められている。特に、マルチイメージングにより治療効果を科学的かつ客観的に証明することは、本研究分野では画期的な試みであり、その成果により中枢神経再生療法に新しい道を切り拓くだけでなく、再生医療全体の進展にも大いに寄与するものと期待される。

文 献

- 1) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 3908–3913
- 2) Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Hida K, Iwasaki Y: Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J Neurosci Res* 2008 ; 86 : 1024–1035
- 3) Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005 ; 57 : 874–882
- 4) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, et al.: Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 2011 ; 134 : 1790–1807
- 5) Shichinohe H, Kuroda S, Lee JB, et al.: *In vivo* tracking of bone marrow stromal cells transplanted into mice cerebral infarct by fluorescence optical imaging. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004 ; 13 : 166–175
- 6) Kim DE, Schellingerhout D, Ishii K, Shah K, Weissleder R: Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 2004 ; 35 : 952–957
- 7) Sugiyama T, Kuroda S, Osanai T, et al.: Near-infrared fluorescence labeling allows noninvasive tracking of bone marrow stromal cells transplanted into rat infarct brain. *Neurosurgery* 2011 ; 68 : 1036–1047
- 8) de Haro J, Zurita M, Ayllón L, Vaquero J: Detection of ^{111}In -oxine-labeled bone marrow stromal cells after intravenous or intralesional administration in chronic paraplegic rats. *Neurosci Lett* 2005 ; 377 : 7–11
- 9) Correa PL, Mesquita CT, Felix RM, et al.: Assessment of intra-arterial injected autologous bone marrow mononuclear cell distribution by radioactive labeling in acute ischemic stroke. *Clin Nucl Med* 2007 ; 32 : 839–841
- 10) Modo M, Mellodew K, Cash D, et al.: Mapping transplanted stem cell migration after a stroke : a

- serial, *in vivo* magnetic resonance imaging study. Neuroimage 2004 ; 21 : 311-317
- 11) Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, et al. : Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors : magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. Proc Natl Acad Sci USA 1999 ; 96 : 15256-15261
 - 12) Ito M, Kuroda S, Sugiyama T, et al. : Validity of bone marrow stromal cell expansion by animal serum-free medium for cell transplantation therapy of cerebral infarct in rats-a serial MRI study. Transl Stroke Res 2011 ; 2 : 294-306
 - 13) STAIRparticipants. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. Stroke 1999 ; 30 : 2752-2758
 - 14) Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, et al. : Nxy-059 for acute ischemic stroke. N Engl J Med 2006 ; 354 : 588-600
 - 15) Shuaib A, Lees KR, Lyden P, et al. : Nxy-059 for the treatment of acute ischemic stroke. N Engl J Med 2007 ; 357 : 562-571
 - 16) Savitz SI, Chopp M, Deans R, Carmichael T, Phinney D, Wechsler L : Stem cell therapy as an emerging paradigm for stroke (steps) ii. Stroke 2011 ; 42 : 825-829
 - 17) Meltzer CC, Kondziolka D, Villemagne VL, et al. : Serial [¹⁸F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke. Neurosurgery 2001 ; 49 : 586-591 ; discussion 591-592
 - 18) Sugiyama T, Kuroda S, Takeda Y, et al. : Therapeutic impact of human bone marrow stromal cells expanded by animal serum-free medium for cerebral infarct in rats. Neurosurgery 2011 ; 68 : 1733-1742
 - 19) Shichinohe H, Kuroda S, Kudo K, et al. : Visualization of the superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled bone marrow stromal cells using a 3.0-T MRI-a pilot study for clinical testing of neurotransplantation. Trans Stroke Res 2012 ; 3 : 99-106
 - 20) Miyamoto M, Kuroda S, Zhao S, et al. : Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarction in rats : a serial ¹⁸F-FDG PET study. J Nucl Med 2013 ; 54 : 145-150
 - 21) Saito H, Magota K, Zhao S, et al. : 123I-iodoazemil single photon emission computed tomography visualizes recovery of neuronal integrity by bone marrow stromal cell therapy in rat infarct brain. Stroke 2013 ; 44 : 2869-2874

Bioimaging in Cell Transplantation Therapy for Stroke

Hideo SHICHINOHE¹, Kiyohiro HOUKIN¹, Satoshi KURODA²

¹*Department of Neurosurgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine
N15 W7 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8638*

²*Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical
Science for Education, University of Toyama*

Recent studies have elucidated the therapeutic potential of bone marrow stromal cells (BMSCs) against stroke. Although some clinical trials have begun, some issues remain before extensive trials. We aimed to solve the issues regarding safety of the BMSC culture and objective assessment of the therapeutic effect.

We cultured BMSCs with 5% human platelet lysate (hPL), labeled them with superparamagnetic iron oxide (SPIO), made permanent rat models of middle cerebral artery occlusion (MCAo), and injected the BMSCs into the ipsilateral striatum stereotactically 7 days post-insult. We used rotarod test to analyze behavior, 7-tesla magnetic resonance (MR) imaging to track cells, and fluorine-18 fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography (¹⁸F-FDG PET) to analyze glucose metabolism. The animals were sacrificed 8 weeks after transplantation, and histological analysis was performed.

Rotarod testing showed deterioration of motor function in rats suffering from permanent MCAo. BMSC transplantation significantly enhanced recovery of motor function, and MR imaging demonstrated the aggressive migration of BMSCs towards the lesion. Moreover, ¹⁸F-FDG PET showed that BMSC transplantation promoted the recovery of glucose utilization in the peri-infarct area. Histological analysis supported the MR imaging findings and showed the inclination for neural differentiation of donor cells.

In conclusion, the application of the bioimaging techniques, MR imaging with SPIO labeling and ¹⁸F-FDG PET, are also valuable in assessing BMSC transplantation against stroke. We would translate the present results to the optimal design of future clinical trials.