M2 化ミクログリアによる脳梗塞機能回復療法

新潟大学　脳研究所神経内科学分野
金澤　雅人

Ⅰ．緒　言

脳梗塞に対する治療は，急性期の閉塞動脈の再灌流療法と，慢性期の再発予防療法および機能回復を目指した治療に大別される．再灌流療法として，血栓溶解療法が行われおり，著者らは，これまで再灌流療法に伴う出血合併症を抑制し，その治療適応患者の増加を目指す研究を行ってきた[1-4]．一方，慢性期の治療としての機能回復を目指したリハビリテーションでは，半数が障害を残し[5]，他に有効な後遺症改善を促進する治療もないため，新しい治療の開発が期待されている．

脳梗塞の機能回復を目指す戦略のひとつとして，梗塞部位の血管新生を促進させるという考えがある[6]．血管新生を促進させる成長因子（血管・組織リモデリング因子)の一つとして，血管内皮増殖因子(VEGF)があり，VEGF の全身投与で，血管新生と機能予後の改善がラット一過性局所脳虚血(tMCAO)モデルで示されている[7]．しかし，VEGF は全身投与により，低血圧・頻脈の副作用[8]や，急性期では脳浮腫・出血合併が生じうる[7]．また，脳には血液脳関門(BBB)があるため，特に蛋白製剤は脳内に届かず，作用しない恐れもある．そのため，血管新生を促進する治療には，副作用がなく，脳内に有効に到達する手法の開発が求められる．

近年，脳梗塞の亜急性期以降に，複数の治療標的に作用する多面的な保護効果を期待する幹細胞療法がいくつか報告されてきた[9-13]．代表的な細胞として骨髄由来間葉系幹細胞があり，細胞投与後，脳梗塞病変部において VEGF などの成長因子を分泌し，血管新生を促進することで機能を回復させる[12,13]方法である．効果が期待される治療法である一方，骨髄由来の細胞を用いるため，脳梗塞後の抗血小板療法，抗凝固療法下で採取が困難であること，十分な細胞数を得るため専用の細胞調整センター(CPC)を要することなどが，臨床応用の普及の妨げになっている．

以上の状況を踏まえ，我々はミクログリアを用いた新しい細胞療法について検討を行った．ミクログリアに着目した理由は，1. VEGF，トランスフォーミング増殖因子(TGF)-β，マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)-9 といったリモデリング因子の分泌源となること，2. 脳梗塞後に病変辺縁に集まる性質があること[14,15]，3. M2 ミクログリアという保護的な性質を持つタイプも存在する[16,17]ため，より効果が期待できるためである．検討の結果，薬剤を使用せず，適度の低酸素低糖刺激(OGD)により，ミクログリアを M2 化できること，そしてラット tMCAO モデルにおいて，そのミクログリアを亜急性期に投与することで，機能予後を改善できることを明らかにした[18]．今回，この技術をさらに簡便な臨床応用とするため，これまで仔マウスから得ていたミクログリアを成体脳から単離できるかを検討した．さらに，細胞保護効果について OGD が低酸素あるいは低糖刺激より有効であるかどうかを検討し，脳梗塞後の機能回復を目指した OGD 刺激後の M2 ミクログリア細胞療法の確立について，検討した．

Ⅱ．対象・方法

1．　動物実験モデル

本研究は，新潟大学動物実験倫理委員会及び新潟大学倫理委員会の承認を受け，新潟大学動物実験指針と研究に関する倫理指針に従って実施した．オス 8 週令 Sprague-Dawley ラット（体重 300～370g）を用いて，1.0%イソフルレン，笑気 70%，酸素 30%で麻酔維持し，手術を実施した．

一過性局所脳虚血は Koizumi のモデルを用い[19]，左中大脳動脈閉塞により 90 分間の局所脳虚血を負荷し

た．虚血中は直腸温をモニターし，常温群は体温調節マットと温熱ランプにて 37.0±0.5℃に維持した．

２． 初代ミクログリア細胞培養

初代ミクログリアの培養に，生後 0~1 日の C57/BL6 マウス新生児の大脳皮質を用いた[18]．脳虚血 3 日後から，脳虚血病変周囲にミクログリアが集簇することを報告している[4]．成体脳梗塞ラットからのミクログリアの単離では，この脳虚血 3 日後の大脳皮質を分離し，以下細かく刻んだ大脳皮質をパパイン溶液で培養し，遠心処理を行い，培養 14 日目，130rpm で 15 分間，フラスコを振動させ，ミクログリアを単離した．

単離したミクログリアはポリ-D-リジン 10μg/mL でコーティングした 6 穴プレートに 1×10^6 cells/well で播き，一晩インキュベートした．

３． 末梢血単核球分画分離

ミクログリアに類似した単球/マクロファージを含有する単核球を分離するため，ヒト健常ボランティアから末梢血 50mL を採血し,Ficoll による分離を行った.GE ヘルスケアジャパン Ficoll-Paque Premium 1.084 のデータシートに従い，分離した．

４． 細胞染色

ミクログリアの染色では，メタノールで固定後， FITC-conjugated マウス・モノクローナル抗 CD11b 抗体（Abcam，1:100）を用いて，4℃で一晩反応させた．その後，DAPI で核染色を行い，全 DAPI 陽性中の CD11b 陽性細胞数を 400 倍にて検鏡，計測した．

５．Oxygen-Glucose Deprivation（OGD）

初代培養細胞を低酸素・低グルコース(OGD)条件に晒すことで，生体内での虚血状態を再現した[18]．コントロール群は，高グルコース培地，21%酸素に 5%二酸化炭素を加え，培養した（Normoxia 群）．

６． 乳酸脱水素酵素（LDH）アッセイ

OGD 後の細胞死を調べるために lactate dehydrogenase(LDH)アッセイを行った[18]．

７． ウェスタンブロット法

ビシンコニン酸法にて，蛋白量を 5 μg に調整したサンプルを Tris-glycine SDS-PAGE にて電気泳動した[1-3]．その後，PVDF 膜に転写し，5%スキムミルクと 0.1% Tween-20 でブロッキングした．1 次抗体はラビット・ポリクローナル抗 VEGF 抗体（Santa Cruz，1:200）を用いて，4℃で一晩反応させた．リン酸バッファーで洗浄後，horseradish peroxidase (HRP)標識抗ラビット 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ，Chemiluminescent HRP 基質(GE ヘルスケアジャパン)にて目的とする蛋白バンドを検出した．内部コントロールとして，アクチン，トランスフェリンを用いた．

８．統計解析

one-way ANOVA 法および two-way ANOVA 法を，頻度の解析には Fisher 法を用いた．全ての検定において，確立値(p)が 0.05 未満のものについて有意差ありとした．結果は平均値±標準誤差で示した．

Ⅲ．結　果

１． 成体脳梗塞ラットからのミクログリアの単離

これまで，仔マウス脳からミクログリアを単離していたが，未検討であった成体脳梗塞ラットからミクログリアを単離することができれば，ヒトの疾患脳からも単離が可能となる．脳虚血 3 日後のラットから，プロトコールに従い，ミクログリアを単離した．その後，ミクログリアのマーカーCD11b で細胞染色を行った．

結果，99%以上の細胞が，CD11b 陽性細胞であった．

２．　仔マウスと成体脳梗塞ラットから単離したミクログリアの OGD 刺激の違い

一般的に，初代細胞培養では，胎児や仔由来の細胞を用いる．成体脳から得た細胞との，viability を比較するため，OGD 後 LDH アッセイにて評価した．

OGD 刺激前の O_2 21%，高グルコース濃度の状態でも，成体ラット由来のミクログリアでは，仔マウス由来の細胞より半数以上が細胞死を認めた（P<0.01）．同様に，OGD 刺激後も，成体ラット由来のミクログリアは，仔マウス由来の細胞より有意に細胞死が増加していた（P<0.01）（図１）．

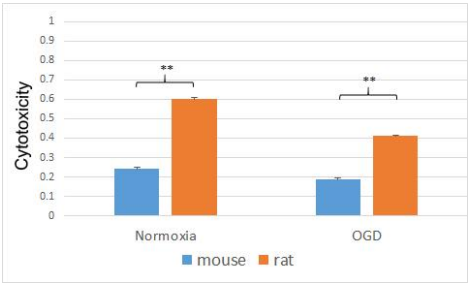

図１　仔マウスと成体脳梗塞ラット由来ミクログリアの OGD 刺激後の細胞障害度（**：P<0.01）

３．　OGD 刺激後の保護的サイトカイン VEGF 分泌

OGD 刺激後の培養上精を用い，VEGF のウエスタンブロットを行ったところ，OGD 刺激によって，仔マウス由来・成体ラット由来のミクログリアどちらも VEGF の分泌量が増加した．また，OGD 刺激後の VEGF 分泌量に関して，仔マウス由来と成体ラット由来では，差を認めなかった（図２）．

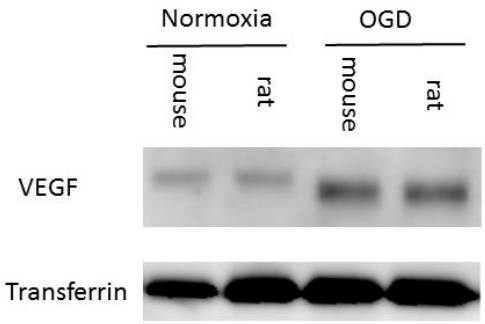

図２　仔マウスと成体脳梗塞ラット由来ミクログリアの OGD 刺激後の VEGF 分泌量

４．　OGD 刺激は，低酸素刺激，低糖刺激よりも勝る保護効果を示す可能性がある

OGD 刺激はが，低酸素刺激，低糖刺激より勝る相乗効果があるかを検討するため，低糖刺激として，培地を低グルコース濃度に変えて，低酸素刺激を行わなかった群（GD 群），低酸素刺激として，培地は変更せず，チャンバー内で低酸素に置換した群（OD 群），OGD 刺激を行った群，通常の糖濃度培地で，O_2 21%で培養した群（Nor 群）の 4 群を用いて，ミクログリアに類似した単球/マクロファージを含む末梢血中単核球を用い，刺激後の培地中の VEGF のウエスタンブロットを行った（図３）．OGD 群は，Nor 群と比べて，VEGF 分泌量が増加していた（P<0.01）．また，GD 群は Nor 群と比べて VEGF 分泌量が増加しているものの，有意差はなく（P=0.059），OD 群も Nor 群と違いなかった．

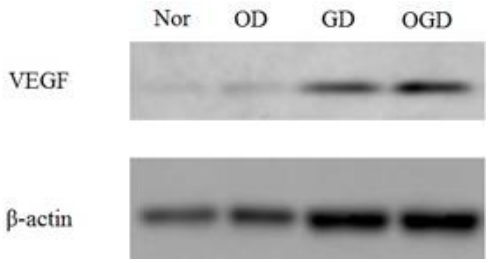

図３　低酸素低糖刺激（OGD），低糖刺激（GD），低酸素刺激（OD）と通常酸素通常糖刺激（Nor）後の培地中の VEGF 発現のウエスタンブロット

Ⅳ．考　察

臨床応用を目指したとき，ミクログリアをいかに得るかが重要である．今回，仔マウス由来のミクログリアの単離プトロコールに従い，成体脳梗塞ラットから，CD11b 陽性ミクログリアを単離できることがわかった．しかし，成体脳梗塞ラットから採取した細胞は，仔マウス由来の細胞と比べて，viability が低下する可能性があることもわかった．ウエスタンブロットの結果では，仔マウス由来と成体ラット由来のミクログリアの OGD 刺激後の VEGF 分泌量は，違いがなかった．しかし，成体ラット由来では死細胞が増加する（図１）影響もあるのかもしれない．今後，成体ラット由来のミクログリア投与による，脳梗塞治療の効果の検証が必要である．

OGD 刺激は，GD や OD と比べて，保護的な成長因子 VEGF を誘導することから，治療応用に適していると考える．その刺激効果は，VEGF 誘導に関しては，低糖刺激が強力であった．しかし，GD よりも OGD 刺激により，より VEGF が誘導され，刺激時間の検討が必要であるものの，短時間で細胞調整が行える点からは，OGD の刺激が最適である．

ミクログリアのみらなず，末梢血由来単核球でも，OGD 刺激で，保護的な増殖因子 VEGF の誘導を確認できた．臨床応用を目指す点で，末梢血由来の細胞を用いることはとても簡便で，有益である．ミクログリアのみならず，ミクログリアに性質の類似した末梢血由来の細胞成分による脳梗塞治療の検討を開始した．

Ⅴ．結　論

成体脳梗塞ラット由来の細胞でもミクログリアを OGD 刺激により保護的な分画に変えることができる．また OGD 刺激は，短時間で VEGF 分泌に十分な刺激を与えることができる．

Ⅵ．参考文献

1) Kanazawa M, Igarashi H, Kawamura K, et al. J Cereb Blood Flow Metab 2011; 31: 1461–1474.
2) Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, et al. PLoS One 2014; 9: e98639.
3) Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, et al. Brain 2015; 138: 1932–1948.
4) Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, et al. J Atheroscler Thromb 2017; 24: 240–253.
5) Winstein CJ, Stein J, Arena R, et al. Stroke 2016; 47: e98–169.
6) Arai K, Jin G, Navaratna D, et al. FEBS J 2009; 276: 4644–4652.
7) Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. J Clin Invest 2000; 106: 829–838.
8) Yang R, Thomas GR, Bunting S, et al. J Cardiovasc Pharmacol 1996; 27: 838–844.
9) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al. Brain 2011; 134: 1790–1807.
10) Taguchi A, Sakai C, Soma T, et al. Stem Cells Dev 2015; 24: 2207–2218.
11) Ishizaka S, Horie N, Satoh K, et al. Stroke 2013; 44: 720–726.
12) Andres RH, Horie N, Slikker W, et al. Brain 2011; 134: 1777–1789.
13) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. J Clin Invest 2004; 114: 330–338.
14) Imai F, Suzuki H, Oda J, et al. J Cereb Blood Flow Metab 2007; 27: 488–500.
15) Wattananit S, Tornero D, Graubardt N, et al. J Neurosci 2016; 36: 4182–4195.
16) Hu X, Li P, Guo Y, et al. Stroke 2012; 43: 3063–3070.
17) Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. J Neuroinflammation 2011; 8, 174.
18) Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, et al. Sci Rep 2017; 7: 42582.
19) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Japan J. Stroke 1986; 8: 1–8.