

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19650

研究課題名(和文) 幹細胞を用いた周産期脳障害の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for perinatal brain damage using stem cells

研究代表者

北瀬 悠磨(Yuma, Kitase)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80736299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：出生後の低酸素性虚血性脳症(Hypoxic-ischemic encephalopathy：HIE)は出生1000に対し1.5例程度発生し、神経学的障害や死亡の主な原因となっている。今回我々はStem cells from human exfoliated deciduous teeth(SHED；脱落乳歯歯髄幹細胞)を用い新規治療法の開発を行った。組織学的検討ではアポトーシス、酸化ストレス、活性化マクロファージを抑制しM2ミクログリアを誘導した。また運動、歩行機能、能動回避に改善を認めた。またSHED培養液は神経細胞保護作用を示した。SHEDはHIEの治療になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：About 1.5 cases of postnatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) occurred to 1,000 births, which is the main cause of neurological disability and death. In this study, we developed HIE model rats and developed novel therapies using Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). In histological examination, we showed that SHED suppresses apoptosis, oxidative stress, activated macrophages and induces M2 microglia. In addition, HIE model rats administered SHED showed improvement in exercise, walking function and active avoidance. The condition medium of SHED also showed neuronal protection. It was suggested that SHED could be a effective treatment for HIE.

研究分野：新生児

キーワード：低酸素性虚血脳症 乳歯歯髄幹細胞 幹細胞療法 免疫組織学的評価 行動評価

1. 研究開始当初の背景

出生後低酸素虚血性脳症 (hypoxic ischemic encephalopathy: HIE) は、虚血性傷害を引き起こし、生涯にわたって神経障害を含む複数の臓器に影響を及ぼすため、周産期において重要な疾患として位置付けられる。HIE は出生 1,000 人当たり約 1.5 人の割合で発生し、その死亡率は約 15% と報告され、重度の痙攣、感覚障害および発達異常が高率で起こることも報告されている。また生涯を通して家族や社会に重い負担となる。

近年、HIE の治療として低体温療法が確立されているが、臨床研究における低体温療法の無作為化試験で HIE 後の低体温療法の有効性は実証されたものの死亡率は約 25% であった。さらに低体温療法は HIE の唯一の主要治療選択肢だが、新生児脳損傷の現在の治療選択肢は主に症状のコントロールに重点を置いており、重症 HIE の有効な治療法ではない。したがって、HIE の新しい治療法の開発は、周産期治療における急務の課題と考えられる。

2. 研究の目的

近年、細胞治療が細胞および組織を修復する有効性を示している報告が数多くなされている。間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) は、脳卒中、パーキンソン病および心筋梗塞などの様々な疾患に対する潜在的な治療源であると報告されており、様々な中胚葉組織細胞に分化し、ニューロン細胞、星状細胞および希突起膠細胞に分化することが可能である。さらに、MSC は、種々の細胞タイプ自体への変換よりもパラクライン効果によってこの新しい脳細胞の形成を刺激すると推定される。従って MSC を用いた細胞療法の効果は HIE の有望な治療法であることが期待される。我々のグループでは、HIE に対する細胞療法としてヒト臍帯血と脂肪細胞を用いた治療法を報告しており、HIE に対してどのような細胞源が治療効果を有するかについて研究を行っている。今回、我々は、様々な種類の MSC のうち、ヒト脱落乳歯髄幹細胞 (stem cells from human exfoliated teeth: SHED) を用いた HIE の新規治療法を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

モデルラットの作成

モデルラットの作成は The Rice-Vannucci 方法を採用し作成した。急性期免疫組織学的評価 (10 匹の vehicle 群、10 匹の SHED 投与群) および行動評価のための 30 匹の動物 (10 匹の sham、10 匹の vehicle 群、10 匹の SHED 投与群) および 20 匹の動物 (10 匹の vehicle 群および 10 匹の SHED 投与群) の合計 70 匹の動物を用いた。仔ラットは吸入イソフルラン 5% によって導入され、皮膚切開時には 2 ~ 2.5% に維持された。次に、左頸動脈を露出させ、迷走神経から剥離し、次いで二重結紮し、中央を切断した。偽手術では、動脈を露出させ、結紮および切断することなく創傷

を閉鎖した。麻酔時間は、各幼児ラットについて約 5-7 分であった。母に戻った後、1 時間の休憩時間を取り、8% 酸素、92% 窒素環境のインキュベーターに入れ、温度を約 37 に保ちながら 1 時間低酸素負荷をかけた。vehicle 群および SHED 投与群のラットに低酸素負荷を与え、sham 群は低酸素負荷を適用しなかった。

MRI による重症度分類

ラットに応じて、重症度が異なるため、MRI の拡散強調画像を撮影し、重症度別に分類した。頭部 MRI の画像化は、低酸素負荷の約 4 時間後に行った。重症度判別のために、画像分析はソフトウェア Apollo view を使用し、グレード 0 は高信号域がほとんど認識されない、グレード 1 は皮質のみに限定、グレード 2 は皮質および基底核において高信号を認識する分類を採用した。これらの仔ラットを対照群と治療群に分け、数と重症度がほぼ等しくなるように群分けを行った。

細胞投与

低酸素負荷の 24 時間後、リン酸緩衝食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) および PBS のみに懸濁した 1×10^6 細胞/ml に調整した SHED 細胞を調製し、氷上で管理した。0.1ml の PBS に懸濁した 1×10^5 個の SHED 細胞を処置群に投与し、0.1ml の PBS を vehicle 群に投与した。投与方法は、ラットを適切な体温を保つために温かいプレートに置き、2.5% イソフルラン麻酔で緩徐に導入し、同じ濃度に維持し、右の外頸静脈を露出させ、35 ゲージ針を使用し投与後、圧迫止血を行い閉鎖した。

組織作成および免疫組織学的検討

出生後 9 日目に、全ての子にペントバルビタールナトリウムを腹腔内に深麻酔のために投与し、犠牲にした後、血液が出てリン酸緩衝液中 4% パラホルムアルデヒドで灌流するまで生理食塩水で心臓を灌流した。その後、脳全体を取り出し、同じ固定剤に一晩浸漬した。エタノールとキシレンで段階的に脱水した後、脳をパラフィンに包埋し、500 μ m ごとに脳全体に連続 (5 μ m) の冠状切片を切断した。その後その後アポトーシス細胞を認識する active caspase-3、酸化ストレスマーカーである 4HNE、活性化マクロファージを認識する ED-1、ミクログリア、マクロファージを認識する Iba-1 の各種抗体を使用して染色を行った。

サイトカイン測定

24 時間後に脳皮質を迅速に分離し液体窒素で冷却した。その後、Multi beads shocker® MB 2000 を用いてサンプルを破砕し濾過を行い、Multi-Detection Microplate Reader (POWER SCAN HT BioTek) を用いてタンパク質濃度を調整した。最後に、xMAP Luminex 法に基づくマルチプレックス分析を行い、種々のサイトカインを測定した。

行動テスト

HI の 5 ヶ月後、ロータロッドトレッドミル試

験、オープンフィールド試験、シリンダー育成試験、歩行解析、行動評価のための能動的回避試験を実施した。

ロータロッドトレッドミル試験

ロータロッドトレッドミルを使用して、ラットがバランス、調整およびスタミナをチェックする自動回転ロッドに耐えることができる時間を測定した。ラットを回転ロッド上に置き、4~40rpmで5分間加速した。2日に合計4回、1日2回測定した。動物が棒の上に立っていた時間をパラメータとして使用した。

シリンダー試験

運動感覚機能の評価としてシリンダー試験を行った。この試験には直径20cm、高さ45cmの円筒状透明ガラスを用いた。ラットを個々にシリンダーに入れ、5分間観察し2日間続けた。シリンダー壁面に前肢を持たれかけた時の両側、右、左の回数を調べ比較検討を行った。

歩行解析テスト

Cat walk[®]を用いてラットの自然歩行を測定し評価した。キャットウォーキングの原理は、床に特別なガラスを使用し、複数の光源で作られたプレートを使用し、歩行の圧力に応じて光を放出することによって自然に床を歩いているラットによる荷重および圧力分布を測定することができる。それを利用し、自然歩行をガラス板の下部から広角高速HDカメラで記録し分析した。

能動的回避試験

ラット用シャトルボックス回避チャンバーパッケージを使用して、学習と記憶を調べるための能動的回避テストを実施した。この検査で使用した装置では、2つの部屋の中央に電気可動板を配置し、5秒間の音と光刺激の後に床に電気刺激を発生させ、次の部屋に脱出する。この試験を20回連続して行い、回避率を測定し、連続4日間、1週間後に計5回測定した。

神経保護活性の評価

SHED細胞の神経保護効果を調べるために、我々は、酸素グルコース欠乏負荷(oxygen-glucose deprivation: OGD)の24時間前または48時間前に、ニューロン培養物に5%または10%の濃度でSHED培養液を添加した。我々は、乳酸脱水素酵素(LDH)細胞傷害性試験キット(Wako, Tokyo, Japan)を用いて、OGDの24時間後にニューロン損傷を定量的に評価した。最大LDH値を定量するために、SHED培養液処置、未処理、陰性コントロールから上清を回収し、放出されたLDHの吸光度を測定した。

4. 研究成果

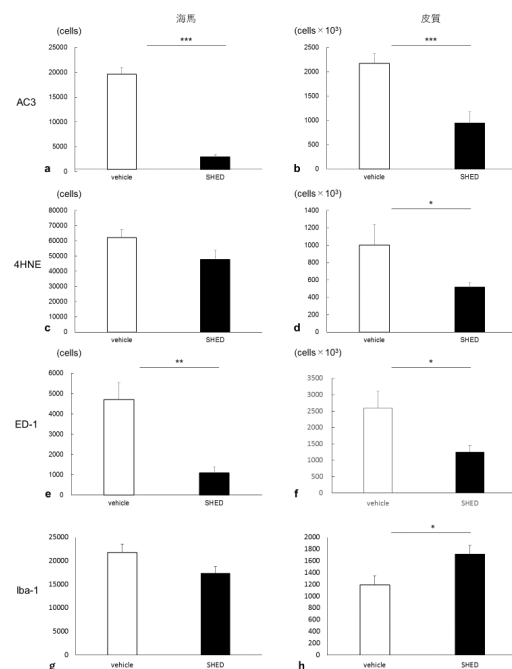
HIE 損傷後の急性傷害マーカーの発現に対するSHED処理の効果

免疫組織学的評価において、アポトーシスマーカーであるActive caspase-3の陽性細胞の総数は、vehicle群(n=5)よりもSHED投与群(n=6)において有意に低かった

($2,958 \pm 471$ 個対 $19,640 \pm 1342$ 個、 $p < 0.001$)。さらに、皮質陽性細胞の数も有意に減少した($944,708 \pm 167,558$ 個対 $2,172,610 \pm 198,598$ 個、 $p < 0.001$)。SHED処置群の海馬および皮質におけるActive caspase-3に対する陽性細胞数は、vehicle群のものと比較してそれぞれ85%および57%減少した(図1a、1b)。

4HNEの評価に関して、2つの群の間に有意差はなかった($47,833 \pm 6,058$ 個対 $62,240 \pm 5,229$ 個、NS)。一方、皮質では、SHED処置群で有意な抑制が観察された($2,825,608$ 個 $\pm 203,684$ 対 $3,784,420 \pm 397,552$ 個、 $p < 0.05$)。SHED処置群の海馬および皮質における4HNEにおける陽性細胞数は、vehicle群のものと比較してそれぞれ23%および25%減少した(図1c、1d)。SHED処置群における活性化ミクログリアのマーカーであるED-1の総数は、海馬のvehicle群のそれよりも有意に低かった($1,100 \pm 281$ 個対 $4,710 \pm 838$ 個、 $p < 0.01$)。皮質($1,260,683 \pm 186,678$ 個対 $2,587,650 \pm 2520,156$ 個、 $p < 0.05$)であった。SHED処置群の海馬および皮質におけるED-1陽性細胞数は、vehicle群のものと比較してそれぞれ77%および51%減少した(図1e、1f)。ミクログリアおよびマクロファージの認識抗体であるIba-1陽性細胞の数は、海馬においてSHED投与群($21,790 \pm 1,350$ 個 $21,790 \pm 1,734$ 個、NS)よりもvehicle群で20%高かったが、皮質においてはSHED投与群でvehicle群よりも144%高かった($1,1718,742 \pm 146,693$ 個対 $1,191,510 \pm 150,140$ 個、 $p < 0.05$) (図1g、1h)。

図1

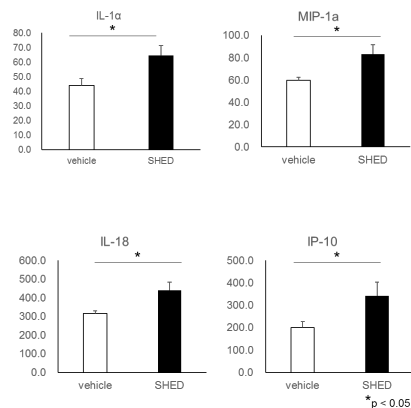


サイトカイン測定

測定の結果、SHED投与群とvehicle群において、IL-1 α (64.6 ± 6.6 pg/ml 対 44.1 ± 4.6 pg/ml、 $p < 0.05$) IL-18 (315.6 ± 13.5 pg/ml

対 $439.4 \pm 45.0\text{pg/ml}$ 、 $p < 0.05$))、MIP-1a ($59.8 \pm 2.6\text{pg/ml}$ 対 $83.2 \pm 8.5\text{pg/ml}$ 、 $p < 0.05$)、IP-10($200.2 \pm 26.2\text{pg/ml}$ 対 $342.8 \pm 60.2\text{pg/ml}$ 、 $p < 0.05$)であった。(図2)

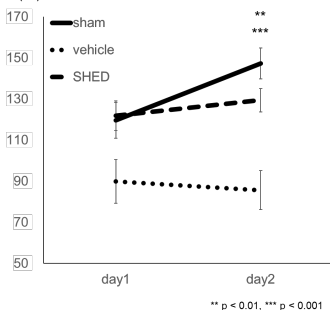
図2：サイトカイン測定結果



ロータロッドトレッドミル試験

生後 162 日、1 日 2 回実施されて 2 日間連続して合計 4 回測定した。sham 群 (n=10) および SHED 投与群 (n=8) において、平均一日量を計算し持続期間を比較検討した。2 日目では sham 群および SHED 投与群が vehicle 群 (n=6) に比べ持続時間が有意に延長した。(sham 対 vehicle 120 ± 8.7 秒 対 90 ± 10.5 秒、 $p < 0.001$ 、SHED 投与群 対 vehicle 群 122 ± 7.1 対 129 ± 5.7 秒、 $p < 0.01$) (図3)

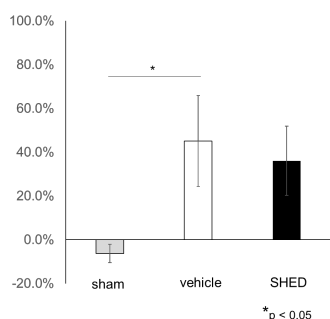
図3：ロータロッドトレッドミル試験 (秒)



シリンダー試験

生後 169 日で 2 日間行い、平均値に基づいて比較を行った。vehicle 群と sham 群との間には有意差を認めた ($44.7\% \pm 22.0\%$ 対 $-12.4\% \pm 9.6\%$ ； $p < 0.05$)。vehicle 群は右側前肢で運動麻痺を示したが、SHED 投与群で治療したラットでは、sham 群と比較して左前肢の有意差は明らかでなかった ($37.2\% \pm 14.9\%$ 対 $12.4\% \pm 9.6\%$ ； $p = 0.060$) (図4)

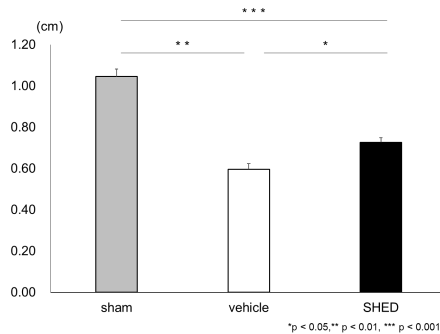
図4：シリンダー試験



歩行解析試験

歩行解析試験では、各ラットで測定可能な自然歩行を 3 回記録し平均値を算出した後、統計処理を行った。生後 197 日目の測定の結果、sham 群および SHED 投与群の右後肢設置面積の幅は、vehicle 群のそれよりも有意に広い結果となった。(sham 群 対 vehicle 群 $1.05 \pm 0.06\text{cm}$ 対 $0.60 \pm 0.04\text{cm}$ 、 $p < 0.001$ 、SHED 投与群 対 vehicle 群 $0.73 \pm 0.03\text{cm}$ 対 $0.60 \pm 0.04\text{cm}$ 、 $p < 0.01$) (図5)

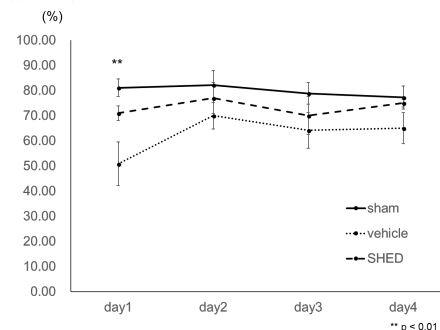
図5：歩行解析試験



能動的回避試験

生後 202 日の能動回避試験では、1 日目の sham 群の回避率は、vehicle 群よりも有意に高かった ($81.0 \pm 3.5\%$ 対 $50.8 \pm 8.7\%$ 、 $p < 0.01$)。vehicle 群と比較して SHED 処置群に有意差は認められなかった ($71.0 \pm 2.9\%$ 対 $50.8 \pm 8.7\%$ 、NS) (図6)

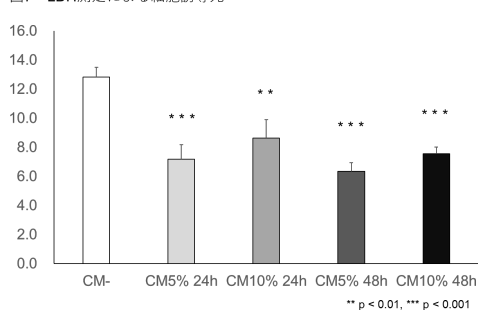
図6：能動回避試験 (%)



SHED 培養液による OGD 誘導細胞死の減少

各条件で LDH を測定した。OGD の 24 時間前に SHED 培養液を神経細胞に添加すると、LDH 放出が 5%、10%それぞれ 55.9% 、 67.2% 有意に減少した (5%： $p < 0.001$ 、10%： $p < 0.05$)。SHED 培養液を OGD の 48 時間前に 5%、10%に添加した場合、LDH 放出はそれぞれ 49.9% 、 58.9% 減少した (5%： $p < 0.0001$ 、10%： $p < 0.001$) となった (図7)

図7：LDH測定による細胞誘導死



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Kitase Y (15 名中 1 番目) Factors related to home health-care transition in trisomy 13. Am J Med Genet A. Oct;173(10):2635-2640 2017. doi: 10.1002/ajmg.a.38371. 査読あり
2. Kitase Y (7 名中 1 番目) A new type of swaddling clothing improved development of preterm infants in neonatal intensive care units. Early Hum Dev. 112:25-28 2017. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2017.06.005 査読あり
3. Kitase Y (9 名中 3 番目) Abnormal urinalysis on day 7 in patients with IgA vasculitis (Henoch-Schönlein purpura). Nagoya J Med Sci. 2016 Dec;78(4):359-368. doi: 10.18999/nagjms.78.4.359. 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1. 北瀬 悠磨 新生児低酸素性虚血性脳症に対する SHED を用いた幹細胞療法 第1回新生児基礎 TR 研究会 平成 30 年 2 月 23 日～24 日
2. 北瀬 悠磨 子宮内発育遅延モデルラットに対する幹細胞療法の開発 第1回新生児基礎 TR 研究会 平成 30 年 2 月 23 日～24 日
3. 北瀬 悠磨 新生児低酸素性虚血性脳症に対する SHED を用いた幹細胞療法 第16回日本再生医療学会 平成 29 年 3 月 7 日～9 日
4. Yuma Kitase Stem cell therapy with Stem cells from human exfoliated deciduous teeth for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats Pediatric Academic Societies Meeting 2017平成 29 年 5 月 6 日～9 日
5. 北瀬 悠磨 子宮内発育遅延モデルラットに対する幹細胞療法の開発 第53回日本周産期新生児医学会学術集会 平成 29 年 7 月 17 日～19 日
6. 北瀬 悠磨 新生児低酸素性虚血性脳症に対する SHED を用いた幹細胞療法 第40回日本神経科学大会 平成 29 年 7 月 20 日～23 日
7. 北瀬 悠磨 新生児低酸素性虚血性脳症に対する SHED を用いた幹細胞療法 第61回日本成育医学会 平成 28 年 12 月 1

日～3日
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 多能性幹細胞による胎児発育不全に伴う脳障害の改善及び治療

発明者: 佐藤義朗、北瀬悠磨、清水忍、水野正明、早川昌弘、出澤真理、辻雅弘

権利者: 佐藤義朗、北瀬悠磨、清水忍、水野正明、早川昌弘、出澤真理、辻雅弘

種類: 特許

番号: 2017-120900

出願年月日: 2017.6.20

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北瀬 悠磨 (KITASE Yuma)

名古屋大学医学部附属病院・医員

研究者番号: 80736299