

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10119

研究課題名(和文) 臍帯血幹細胞移植による脳保護作用の解明と周生期脳障害への応用

研究課題名(英文) Protection of neonatal hypoxic-ischemic brain injury by transplantation of rat umbilical cord blood cells

研究代表者

中西 圭子 (NAKANISHI, KEIKO)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・非常勤研究員

研究者番号：50280813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット臍帯血幹細胞を培養増殖させ、新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルラットに腹腔内投与すると、脳障害が軽減する。この機序を明らかにするために、GFPトランスジェニックラット臍帯血幹細胞を培養増殖させ、HIEモデルラットに移植し、その分布を検討した。移植したGFP陽性臍帯血幹細胞は脳内ではほとんど観察されず、また一部脳内に侵入していたGFP陽性細胞は神経細胞マーカーを発現していなかった。以上のことから、臍帯血幹細胞は脳内に侵入し神経細胞に分化するのではなく、宿主の反応を介して脳障害軽減効果をもたらしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)は現在もなお、脳性まひの主な原因の一つである。臨床的に低体温療法が行われているが、重症例に対する効果は急性期に限局しており、神経後遺症の克服のために幹細胞療法など新規治療法の開発が期待されている。臍帯血にも幹細胞が含まれることから、日本でも自家臍帯血移植の臨床研究が始まっているが、幹細胞移植による脳障害軽減機序は未だ明らかではない。本研究で、この機序が明らかになれば、臨床研究のさらなる進展や効率的な移植方法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mononuclear cells isolated from GFP-transgenic rat umbilical cord blood were expanded (stem cell enriched-umbilical cord blood cells; SCE-UCBCs) and administered intraperitoneally to neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) model of rats. The GFP-positive cells were hardly detectable in the brain. The GFP-positive cells in the brain were negative for neuronal markers. These results indicate that UCBCs could ameliorate HI injury, possibly through an endogenous response not by supplying differentiated neurons derived from the injected stem cells.

研究分野：神経科学、新生児学

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症 臍帯血幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)に対し、臨床的に低体温療法が行われている。しかしながら、低体温療法により急性期の死亡率や重度障害の発生率は低くなるものの、生存例における6-7歳時の重度障害の発生率には有意差がないことが報告されている(Shankaran et al., NEJM, 2012)。この神経学的後遺症の克服は新生児医療にとって残された課題であり、再生医療など新規治療法の開発が期待されている。

臍帯血は胎盤とともにその多くは廃棄されるが、造血幹細胞や間質性幹細胞を含んでおり、出生時に採取しておけば自家移植が可能なこと、ガン化をおこす心配のないこと、移植片対宿主病(GVHD)をおこしにくいこと、静脈内や腹腔内投与でも脳内へ移行できることなど、骨髄採取が困難な新生児にとって最も臨床に応用しやすい幹細胞源である。また、臍帯血バンクの普及に伴い血液疾患患者などに臍帯血移植治療は既に行われており、その採取法や安全性は確立されている。

米国や韓国では、HIE 患児や脳性マヒ児に対し、自家臍帯血投与の臨床研究が開始され、その実現可能性はすでに報告されている。日本でも大阪市立大学を中心にHIE 患児に対し自家臍帯血移植の臨床研究が始まっているが、臍帯血による脳障害軽減機序は未だ明らかではない。また、これまでの実験動物を用いた報告では、ヒト臍帯血を実験動物に移植(すなわち異種間移植)したものが多く、その評価は様々である。

### 2. 研究の目的

本研究ではHIEモデルラットにGFPトランスジェニック(TG)ラット臍帯血幹細胞を投与し、GFP陽性細胞の宿主内での分布を調べることにより、脳障害軽減機序を明らかにする。また、脳室周囲白質軟化症(PVL)モデル動物を作成し、HIEのみでなく早期産児の周生期脳障害に対する臍帯血幹細胞移植の有効性についても検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では、GFP-TGラット臍帯血幹細胞を増殖させ、HIEモデルラットに投与するという同種間移植実験を行い、検討した。

GFP-TGラットE19.5胎仔より臍帯血を採取し、有核細胞層を分離し、4種のサイトカイン存在下で培養増殖させた。この増殖させた細胞(stem-cell-enriched umbilical cord blood cells; SCE-UCBC)を、日齢7にRice-Vannucci model(右頸動脈結紮および低酸素処理2h)処置を行ったラットに受傷3日後腹腔内投与し、受傷7, 10, 12日後に還流固定した。脳、脾臓などから0.5mmごとの凍結切片を作製し、GFP免疫組織染色を行い、立体解析学的に評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 臍帯血幹細胞の脳内への侵入；

臍帯血幹細胞投与9日後の凍結切片では、脳内のGFP陽性細胞は、個体あたり $114 \pm 40$ 個で、投与した細胞数の0.0057%とごく僅かしか観察されなかった。二重染色を行ったところ、脳内のGFP陽性細胞は神経細胞マーカーであるNeuroDやDCXは陰性であったが、約60%でミクログリア・マクロファージマーカーであるIba1陽性であった。このことは、投与した臍帯血幹細胞は脳内へはほとんど侵入せず、侵入した場合でも神経細胞に分化しているわけではないことを示している。

#### (2) 臍帯血幹細胞の脾臓周囲組織への侵入；

臍帯血幹細胞投与9日後の凍結切片では、脾臓内のGFP陽性細胞は、個体あたり $210 \pm 106$ 個で、投与した細胞数の0.011%とごく僅かであった。一方、脾臓周囲結合組織には多くのGFP陽性細胞が観察され、その数は $2980 \pm 1990$ 個で、投与した数の0.15%であった。これらの細胞を二重染色したところ、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞のごく近傍にGFP陽性細胞が存在していた。以上の結果から、投与した臍帯血幹細胞は腹腔内等で長く生着し、脈管系を介して脳障害軽減作用をもたらしている可能性が示唆された。

#### (3) 臍帯血幹細胞のM1/M2ミクログリアバランスへの影響；

近年、ミクログリアにおいても炎症性(傷害性、M1型)と抗炎症性(保護性、M2型)に分類されることがわかっている。M2マーカーであるマンノース受容体抗体と全ミクログリアマーカーであるIba1抗体の二重染色を行なったところ、臍帯血幹細胞投与群の脳内ではマンノース受容体/Iba1比が上昇していることがわかった。

以上の結果から臍帯血幹細胞は M1/M2 ミクログリアバランスを変えることにより、脳障害軽減作用をもたらしている可能性が示唆された。

(4) 脳室周囲白質軟化症(PVL)モデル動物の作製；

生後2日齢のラットに Rice-Vannucci model と同様の右頸動脈結紮および低酸素処理 2h を行ったところ、7日齢で観察されたような明らかな脳梗塞は生じないことがわかった。今後は、このモデルにおいて PVL でみられるような白質損傷が観察されることを確認するとともに、その損傷が臍帯血幹細胞投与により軽減するかどうか検討していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakanishi K, Niida H, Tabata H, Ito T, Horii Y, Hattori M, Johmura Y, Yamada C, Ueda T, Takeuchi K, Yamada K, Nagata K-I, Wakamatsu N, Kishi M, Pan Y.A, Ugawa S, Shimada S, Sanes J.R, Higashi Y, Nakanishi M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Isozyme specific role of SAD-A in neuronal migration during development of cerebral cortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 3738-3751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhy253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Y, Kondo T, Ueda K, Hattori T, Mikrogeorgiou A, Sugiyama Y, Suzuki T, Yamamoto M, Hirata H, Hirakawa A, Nakanishi K, Tsuji M, Hayakawa M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Administration of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Contributed to the Reduction of Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Neurol	6. 最初と最後の頁 987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2018.00987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mikrogeorgiou A, Sato Y, Kondo T, Hattori T, Sugiyama Y, Ito M, Saito A, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Hayakawa M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Dedifferentiated fat cells, as a novel source for cell therapy to target neonatal hypoxic ischemic encephalopathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dev Neurosci	6. 最初と最後の頁 273-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000455836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, Nakanishi M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 12059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms12059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Johmura Y, Yamashita E, Shimada M, Nakanishi K, Nakanishi M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 31194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep31194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi K, Sato Y, Mizutani Y, Ito M, Hirakawa A, Higashi Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Rat umbilical cord blood cells attenuate hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 44111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep44111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗
2. 発表標題 新生児脳障害モデルラットに投与したラット臍帯血幹細胞の分化
3. 学会等名 第54回周産期新生児医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西圭子、丹伊田浩行、田畑秀典、伊東剛、堀裕生、服部円香、城村由和、山田千里、山田憲一郎、武内恒成、永田浩一、若松延昭、岸将史、東雄二郎、中西真
2. 発表標題 SAD-Aキナーゼは脳皮質神経細胞移動を制御する
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Nakanishi K, Niida H, Tabata H, Johmura Y, Yamada K, Nagata K-I, Wakamatsu N, Kishi M, Higashi Y, Nakanishi M
2. 発表標題	Role of SAD-A kinase in radial neuronal migration during development of cerebral cortex.
3. 学会等名	9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies(FAOPS) Congress, (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Alkisti Mikrogeorgiou, Yoshiaki Sato, Taiki Kondo, Tetsuo Hattori, Yuichiro Sugiyama, Keiko Nakanishi, Masahiro Tsuji, Tomohiko Kazama, Koichiro Kano, Taro Matsumoto, Masahiro Hayakawa
2. 発表標題	Dedifferentiated fat cells, as a novel source for cell therapy to target neonatal hypoxic ischemic encephalopathy
3. 学会等名	Pediatric Academic Societies Annual Meeting 2017 (PAS 2017) (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Yoshiaki Sato, Alkisti Mikrogeorgiou, Taiki Kondo, Tetsuo Hattori, Yuichiro Sugiyama, Keiko Nakanishi, Masahiro Tsuji, Tomohiko Kazama, Koichiro Kano, Taro Matsumoto, Masahiro Hayakawa
2. 発表標題	Dedifferentiated fat cells, as a novel source for cell therapy to target neonatal hypoxic ischemic encephalopathy,
3. 学会等名	International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual meeting2017 (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	佐藤義朗、Alkisti Mikrogeorgiou、近藤大貴、杉山裕一郎、鈴木俊彦、北瀬悠磨、見松はるか、辻雅弘、中西圭子、早川昌弘
2. 発表標題	周産期低酸素性虚血性脳症に対する脱分化脂肪細胞を用いた新規治療法の開発
3. 学会等名	第53回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 鈴木 俊彦、佐藤 義朗、上田 一仁、片岡 英里奈、北瀬 悠磨、杉山 裕一朗、立花 貴史、見松 はるか、伊藤 美春、齋藤 明子、村松 友佳子、中西 圭子、早川 昌弘
2. 発表標題 新生児慢性肺疾患モデルラットにおけるCCL2を抑制する間葉系幹細胞投与の影響についての検討
3. 学会等名 第53回日本周産期・新生児医学会学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西圭子、佐藤義朗、水谷友香、伊藤美春、平川晃弘、東雄二郎
2. 発表標題 新生児脳障害モデルに投与したラット臍帯血幹細胞の分化
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北瀬悠磨、佐藤義朗、上田一仁、見松はるか、鈴木俊彦、杉山裕一朗、松原弘記、中西圭子、辻雅弘、山本朗仁、早川昌弘
2. 発表標題 新生児低酸素性虚血脳症に帯する脱落乳歯歯髄幹細胞を用いた幹細胞療法
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木俊彦、佐藤義朗、呉尚治、上田一仁、見松はるか、北瀬悠磨、Alkisti Mikrogeorgiou、杉山裕一朗、近藤大貴、中西圭子、辻雅弘、早川昌弘
2. 発表標題 Multilineage-differentiating stress enduring cells を用いた新生児低酸素性虚血性脳症に対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第62回日本新生児成育医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗
2. 発表標題 臍帯血移植した新生児脳障害モデルラットの立体解析学的評価
3. 学会等名 第62回日本新生児成育医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato Y, Kondo T, Hattori T, Mikrogeorgiou A, Sugiyama Y, Tsuji M, Nakanishi K, Hayakawa M.
2. 発表標題 Administration of bone marrow mononuclear cells decreases hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats.
3. 学会等名 10th Hershey conference on Developmental brain Injury (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Mikrogeorgiou A, Sato Y, Kondo T, Sugiyama Y, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Matsumoto T, Kano K, Hayakawa M.
2. 発表標題 Dedifferentiated fat cells as a treatment for perinatal hypoxic ischemic brain injury.
3. 学会等名 10th Hershey conference on Developmental brain Injury (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗、東雄二郎
2. 発表標題 周生期脳障害モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞投与の効果
3. 学会等名 第52回日本周産期新生児医学会
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 ミクログルキオ・アルキスティ、佐藤義朗、近藤大貴、杉山裕一朗、鈴木俊彦、北瀬悠磨、見松はるか、辻雅弘、中西圭子、早川昌弘
2. 発表標題 Dedifferentiated fat cells ameliorate hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal rat model.
3. 学会等名 第52回日本周産期新生児医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗、平川晃弘、東雄二郎
2. 発表標題 低酸素性脳障害モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞の効果
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 佐藤義朗、ミクログルキオ・アルキスティ、近藤大貴、杉山裕一朗、鈴木俊彦、北瀬悠磨、見松はるか、風間智彦、松本太郎、加野浩一郎、辻雅弘、中西圭子、早川昌弘
2. 発表標題 成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)は新生児ラットの低酸素虚血傷害を軽減する
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 ミクログルキオ・アルキスティ、佐藤義朗、近藤大貴、杉山裕一朗、鈴木俊彦、北瀬悠磨、見松はるか、辻雅弘、中西圭子、早川昌弘
2. 発表標題 Dedifferentiated fat cells as a candidate for the treatment of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy.
3. 学会等名 第61回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 北瀬悠磨、佐藤義朗、見松はるか、鈴木俊彦、Alkisti Mikrogeorgiou、杉山裕一朗、中西圭子、辻雅弘、早川昌弘
2. 発表標題 新生児低酸素性虚血性脳症に対するstem cells from human exfoliated deciduous teethを用いた幹細胞療法.
3. 学会等名 第61回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木俊彦、佐藤義朗、上田一仁、片岡英里奈、Alkisti Mikrogeorgiou、北瀬悠磨、杉山裕一朗、立花貴史、見松はるか、松沢要、伊藤美春、齋藤明子、村松友佳子、中西圭子、早川昌弘
2. 発表標題 CCL2ドミナントネガティブ阻害剤導入幹細胞を用いた慢性肺疾患モデルに対する改善効果
3. 学会等名 第61回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中西圭子、佐藤義朗、水谷友香、伊藤美春、平川晃弘、東雄二郎
2. 発表標題 臍帯血幹細胞移植した周生期脳障害モデルラットにおける立体解析学的評価.
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗
2. 発表標題 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットに投与したラット臍帯血幹細胞の分化の検討
3. 学会等名 第64回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakanishi K, Niida H, Tabata H, Johmura Y, Ueda T, Yamada K, Nagata K-I, Wakamatsu N, Kishi M, Ugawa S, Shimada S, Higashi Y, Nakanishi M
2. 発表標題 Distinct role of SAD-A and SAD-B in radial neuronal migration in the developing brain.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会/第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 義朗  (SATO YOSHIAKI)  (30435862)	名古屋大学医学部附属病院・総合周産母子医療センター・新生児科・講師   (13901)	
研究協力者	伊藤 美春  (ITO MIHARU)  (60570083)	名古屋大学医学部附属病院・総合周産母子医療センター・新生児科・特任助教   (13901)	
研究協力者	東 雄二郎  (HIGASHI YUJIRO)  (30181069)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・客員研究員   (83902)	