

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K19686

研究課題名(和文) 小児脳性麻痺に対する臍帯血投与と運動刺激の併用療法による損傷脳再生機構の解明

研究課題名(英文) Combination therapy of cord blood transplantation and rehabilitation for cerebral palsy

研究代表者

王 飛霏 (Feifei, Wang)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：10629033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳性麻痺は、受精から生後4週までの間に何らかの原因で受けた脳損傷によって引き起こされる難治性疾患である。本研究は、新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスを用いて臍帯血投与とリハビリテーションの併用療法による損傷脳修復機構の解明を目的として行った。モデルマウスに対してリハビリテーション及び臍帯血投与による併用療法を実施した。併用療法群はコントロール群に比べて運動機能の改善傾向を示し、脳室下帯及び海馬での神経新生も活性化されていた。また、モデルマウスの脳傷害側で高発現しているサイトカイン・ケモカインの中でCCL11が神経前駆細胞の増殖と遊走を活性化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臍帯血投与と運動刺激の併用療法により神経新生の活性化が促進され、運動機能の改善に関わるとすれば、その時期と因子を明らかにすることにより、臨床で臍帯血を投与するタイミングやリハビリテーションの開始時期を見極めることができ、より具体的な治療方法を模索できると予想される。世界で行われている臨床研究に貴重な基礎的データを提供し、臍帯血を用いた再生医療の改良に寄与することが可能となり、大きな意義をもたらす。

研究成果の概要(英文)：Neonatal hypoxia-ischemia induces massive brain damage during the perinatal period, resulting in long-term consequences to central nervous system structural and functional maturation. We investigated the therapeutic effect of rehabilitation and transplantation of human umbilical cord blood for a neonatal mouse model of ischemia-reperfusion brain injury. Nine-day-old mice were exposed to a 120 min hypoxia following unilateral carotid occlusion. At 4 weeks after treatment, the combined therapy group was tended to show an improvement, but didn't show it was not significantly different compared with the control groups. Neural precursor cells (NPCs) migrated toward an injured area, where a marked increased CC chemokines was detected. In vitro studies showed that incubation of NPCs with recombinant mouse CCL11 promoted migration and proliferation.

研究分野：神経科学

キーワード：臍帯血 神経幹細胞 脳性麻痺 リハビリテーション サイトカイン ケモカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺には根本的な治療法が無く、有効な治療法の開発が待ち望まれている。本学では、2011年に新規治療法として「脳性麻痺患者に対する自己臍帯血輸血の臨床研究」が承認され、整備が進められている。臍帯血は多様な幹細胞を含み、採取が容易で倫理的問題が少ないという利点から再生医療の理想的な幹細胞ソースとして注目されている。低酸素性虚血性脳症モデル動物を用いたこれまでの基礎研究では、ヒト臍帯血細胞投与による運動機能の改善効果が報告されている。欧米やアジア諸国においては中枢神経疾患や自己免疫疾患に対する臍帯血輸血の臨床試験も行われており、さらなる治療メカニズムの解明が重要である。

### 2. 研究の目的

臍帯血を用いた主な治療メカニズムは、臍帯血細胞が分泌する液性因子による神経保護作用であることが明らかになりつつあるが、液性因子の中には神経保護だけでなく神経新生に関連する因子も含まれている。神経新生は、内在性神経幹細胞から新たに神経細胞が産生される現象であり、運動機能回復のターゲットとなる神経の再生・修復に深く関わる。また、げっ歯類に運動刺激を行うと、脳内の内在性神経幹細胞が増殖し神経新生が活性化することが報告されている。したがって本研究では、臍帯血投与と運動刺激の併用療法による機能改善効果やメカニズムを明らかにすることで、新たな臍帯血治療の戦略を提案することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新生仔脳虚血再還流障害モデルマウスの作製

生後9日の免疫不全 NOD/SCID マウスを顕微鏡下にて右総頸動脈をクランプ後、低酸素負荷を行なった。その後、クリップを外し血流を再灌流させた。

#### (2) MRI による虚血性病変部位の画像診断

上述のように作製したモデルマウスは、9.4T MRI 装置 (Agilent Technologies) に挿入して頭部断面を撮像し脳傷害を確認した。

#### (3) ヒト臍帯血細胞の調整、静脈内投与

ヒト臍帯血 (Ficoll 分離法による単核球細胞) は RIKEN 細胞バンクより購入した。上述の MRI 撮影にて脳傷害を認めたマウスにヒト臍帯血細胞を尾静脈内投与 ( $1 \times 10^6$  cells/100ul) した。治療コントロール群は等量の PBS を投与した。

#### (4) 総合的行動学評価

モデル作製前、モデル作製後、2週間ごとにロタロッドテストを行った。

#### (5) 動物用トレッドミルによる運動刺激

運動刺激は動物用トレッドミル (MK-680S, 室町機械) を用いた。モデル作製1週間後から作業性乳酸閾値に基づいた運動刺激を1日30分、週に5日間、これを5週間行った。

#### (6) 組織学的評価

実験群は、臍帯血投与のみ、運動刺激のみの単独療法群、臍帯血と運動刺激の併用療法群、治療なしのコントロール (PBS 投与) 群に分けた。治療から24時間、1、3、5週間後にモデルマウスのサクリフェイスを行い、各臓器および脳を摘出し臍帯血細胞を検出した。

#### (7) 脳内サイトカインの変動解析

上述の実験群において経時的に脳組織ホモジネートを採取した。それぞれの群でサイトカイン定量抗体アレイ『Quantibody』 (Raybiotech) を行い、網羅的に発現強度を比較・解析した。

#### (8) 初代培養神経幹細胞の培養及び *in vitro* アッセイ

神経幹細胞は胎生13.5日目のマウス脳線条体より採取し、neurosphere法で培養する。前述のサイトカインアレイで高発現していた分子を chemoattractant として増殖・分化・遊走アッセイを行った。遊走アッセイの解析は『Manual Tracking』 (Image J, NIH) を用いて遊走の軌跡、移動速度、移動距離を計測した。

#### 4. 研究成果

生後 9 日の NOD/SCID マウスを用いて新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスを作製し、脳切片を神経前駆細胞マーカーにて免疫染色した。脳傷害側の脳室下帯では神経幹細胞数が顕著に増加し、傷害部位に向かって活発に遊走する様子が認められた。このモデルマウスに対してトレッドミルによる運動刺激（リハビリテーション）及び臍帯血投与を実施し、行動学的・組織学的評価を行った。ロタロッドテストにおいて、臍帯血投与及び運動刺激の併用療法群は、コントロール群や単独治療群に比べて運動機能の改善傾向を示した。さらに併用療法群の脳傷害側では、脳室下帯及び海馬における神経新生が活性化していた。

次に、モデルマウスの脳内微小環境を明らかにするために、脳組織ライセートを用いてサイトカイン定量抗体アレイを行った。脳の正常側に比べ傷害側で高発現しているサイトカインやケモカインを同定し、その中でも CCL11 が特定の受容体を介して神経幹細胞の増殖と遊走を活性化することを明らかにした。ヒト臍帯血細胞を投与したモデルマウスでは、投与前に比べ脳内のサイトカイン・ケモカイン発現が大きく変動した。

これらの結果より、新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスにおいて、運動刺激と臍帯血投与の併用療法によって、行動学的な改善傾向及び神経新生の活性化が認められた。トレッドミルによるリハビリテーションの条件は作業性乳酸閾値に基づき算出したが、モデルマウスにとってさらに効果的な条件を見つけることにより、より有効な治療法になうと考えられる。また、臍帯血投与により脳内のサイトカイン・ケモカインプロファイルが顕著に変動した。特に脳傷害側で高発現していたサイトカインやケモカインの中には神経新生や神経保護に関わる因子も含まれており、脳内微小環境を調節している可能性が考えられる。

今後は併用療法を行なったマウスの脳内サイトカインの変動も評価していく予定である。そしてこれらの発現プロファイルを解明することと組織修復や機能改善に関わる役割や機能を明らかにすることによって、脳性麻痺に対する臍帯血治療がより効果的な治療法になりうると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kikuchi H, Saitoh S, Tsuno T, Hosoda R, Baba N, Wang F, Mitsuda N, Tsuda M, Maeda N, Sagara Y, Fujieda M.	4. 巻 44
2. 論文標題 Safety and feasibility of autologous cord blood infusion for improving motor function in young children with cerebral palsy in Japan: A single-center study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Dev.	6. 最初と最後の頁 681-689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2022.08.004.	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 Baba N, Wang F, Iizuka M, Shen Y, Yamashita T, Takaishi K, Tsuru E, Matsushima S, Miyamura M, Fujieda M, Tsuda M, Sagara Y, Maeda N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Induction of regional chemokine expression in response to human umbilical cord blood cell infusion in the neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0221111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221111.	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 Wang F, Baba N, Shen Y, Yamashita T, Tsuru E, Tsuda M, Maeda N, Sagara Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 CCL11 promotes migration and proliferation of mouse neural progenitor cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-017-0474-9	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王飛罪、松島幸生、渡邊理史、馬場伸育、相良祐輔、前田長正
2. 発表標題 ヒト臍帯血移植による神経再生ステップに関わる脳内微小環境の制御機構 -脳性麻痺治療を目指して-
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王飛罪、馬場伸育、沈淵、山下竜幸、都留英美、津田雅之、前田長正、相良祐輔
2. 発表標題 新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスより分泌されるCCL11はCCR2受容体を介して神経幹細胞の遊走と増殖を促進する
3. 学会等名 第18回成体脳ニューロン新生懇談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王 飛罪、松島 幸生、森 亮、大黒 太陽、馬場 伸育、池上 信夫、相良 祐輔、前田 長正
2. 発表標題 脳性麻痺治療を目指した臍帯血移植による脳内微小環境の制御
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王 飛罪、松島 幸生、森田 聡美、馬場 伸育、池上 信夫、相良 祐輔、前田 長正
2. 発表標題 新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスに対するヒト臍帯血移植による 神経再生ステップの検討
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王 飛罪、沈 淵、山下 竜幸、馬場 伸育、都留 英美、高石 公子、飯塚 美知郎、柴垣 里加子、津田 雅之、宮村 充彦、藤枝 幹也、前田 長正、相良 祐輔
2. 発表標題 新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスにおける内在性神経幹細胞の遊走評価
3. 学会等名 第4回臍帯血による再生医療研究会学術集会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------