

令和元年6月14日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19687

研究課題名(和文)脳性麻痺に対する臍帯血移植治療におけるケモカインネットワークの役割の解明

研究課題名(英文) Insights of chemokine networks in cord blood transfusion for cerebral palsy

研究代表者

馬場 伸育 (BABA, Nobuyasu)

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：30711296

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)：脳性麻痺に対する臍帯血を用いた再生医療に期待が寄せられている。その治療機序を解明するため、細胞間情報伝達物質であり幹細胞の遊走にも関与するケモカインネットワークの存在と役割を明らかにした。

マウス脳性麻痺モデルを用いた検討により、脳組織損傷や臍帯血移植に応じて、脳内のケモカイン産生が変化した。傷害後早期に発現が増強するケモカインは病態形成に関与し、時間が経過して、または臍帯血移植後に発現が増強したケモカインは組織修復や機能回復に関与すると考えられた。また、脳組織の細胞や移植臍帯血の細胞は組織損傷の刺激を受けてケモカイン受容体の発現を変化させてケモカインによる情報伝達に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織損傷や臍帯血移植に応じて、脳組織を構成する細胞がケモカインの産生を担い、同時に脳組織細胞や臍帯血細胞におけるケモカインレセプターの発現が変化したことは、損傷組織の病態形成や組織修復、機能回復にケモカインネットワークが関与していることを示唆している。

これまでの研究成果と引き続き研究取組みは脳性麻痺をはじめ様々な難治性疾患に対する臍帯血を用いた再生医療の治療メカニズムの解明と、安全でより効果的な治療法の開発に資する。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine using umbilical cord blood shows promise for the treatment of cerebral palsy. The mechanisms by which cord blood interact and aid in the improvement of symptoms are not clear. I explored the chemokine expression profiles in damaged brain tissue with human cord blood infusion using mouse cerebral palsy model.

Some chemokines were up-regulated immediately after tissue damage occurred, which might respond to tissue damage, and other chemokine expressions were prolonged and cord blood transfusion further increased certain chemokines, which might be related to the new recruitment and differentiation of neural stem cells, leading to the tissue regeneration or functional recovery.

Chemokine receptors on brain composing cells and cord blood cells were altered in response to the tissue damage signals, supporting the concept that chemokine networks may play an active role in tissue regeneration in cerebral palsy with cord blood transfusion therapy.

研究分野：再生医療学 免疫学

キーワード：臍帯血 再生医療 脳性麻痺 ケモカイン ケモカイン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺は胎児期または出生後の脳損傷に起因する運動機能障害であり、生涯にわたり身体と精神の機能を著しく損なう難治性疾患である。脳性麻痺に対する根本的な治療法は確立されておらず、リハビリテーションなどの対症療法を行なっているのが現状であり、有効な新規治療法の開発が望まれている。

臍帯血は白血病など難治血液疾患の治療に用いられてきたが、近年では神経や筋肉、血管や皮膚などの修復に寄与する新たな幹細胞の供給源として再生医療の分野で注目されている。臍帯血中には造血幹細胞のみならず、神経系の細胞などさまざまな細胞に分化する能力を持つ幹細胞が存在すると考えられており、臍帯血を用いた新たな治療法に大きな期待が寄せられている。しかしながら、臍帯血移植の有効性を説明し得る治療機序に関する知見は不足している。

臍帯血による再生医療の治療機序を説明する上で、細胞間の情報伝達物質の動向を解明することは重要である。種々の細胞間の情報伝達分子であるサイトカインのうち、とりわけ細胞の移動・遊走に重要な役割を果たす分子はケモカインと呼ばれる。ケモカインとそれを認識する受容体が織り成すケモカインネットワークは幹細胞の遊走や組織再生において大きな役割を果たしていると考えられるが、重要な分子の識別やその役割について詳細に調査されていない。

2. 研究の目的

マウス脳性麻痺モデルに対するヒト臍帯血移植による組織修復と機能改善において、細胞遊走に関するケモカインネットワークが果たす役割を解明する。すなわち、マウス脳性麻痺モデルの病態と臍帯血移植による組織再生という現象を反映するケモカインとその受容体発現の全体像をとらえて、重要な役割を果たすケモカインネットワークを特定し、その役割を詳細に明らかにすることで、脳性麻痺に対する臍帯血移植治療における治療機序を解明する。

3. 研究の方法

マウス脳性麻痺モデルを用いて、傷害部位の脳組織と同一個体の正常部位の脳組織とを比較して、ケモカインの発現プロファイルを詳細に調べる。脳組織溶解抽出検体を調製して、抗体アレイ法によって、発現が強く認められたり傷害や臍帯血移植によって発現が変化するケモカイン分子を特定する。リストアップされたケモカインについて、ビーズアレイ法によって発現変化を定量的に確認する。また、免疫組織化学染色法によって、脳組織内におけるケモカインの発現と分布を明らかにする。

注目する特定のケモカインが脳組織を構成する細胞や移植に用いるヒト臍帯血に含まれる細胞に対してどのように作用するかを検討するために、マウス脳組織から単離した細胞やヒト臍帯血細胞をケモカインで刺激して、細胞分化マーカーや細胞活性化マーカーの発現など表現型の変化や、細胞遊走能や細胞増殖能、幹細胞分画の長期生存能やコロニー形成などの分化能、また、サイトカイン産生能など機能面の評価を行なう。

4. 研究成果

マウス脳性麻痺モデルの傷害側と正常側脳組織から調製した組織溶解抽出サンプルにおけるケモカインの発現プロファイルを抗体アレイ法により検討した結果、傷害誘導後 24 時間から多数の分子の発現増強が見られた。この中には CXCL12 や CCL2 などが含まれていた。さらに、障害後 1 週、3 週の時点で、正常側と比較して傷害側において発現が増強していたケモカインとして CCL9 や CXCL1、CXCL16 などが認められた。これら抗体アレイ法による結果はビーズアレイ法による解析により定量的に確認した。

さらに、マウス脳性麻痺モデルマウスに対して、傷害 3 週目の時点でヒト臍帯血細胞移植を施し、移植後 2 週目の時点で同様にケモカインの発現変化を検討したところ、移植後の傷害側において、CCL5 や CCL12、CX3CL1 などの発現増強が観察された。これら分子は傷害後発現が認められ、時間の経過とともに発現量が低下したが、臍帯血移植に反応して傷害側において発現が再活性化された。

発現変動を示したケモカイン分子の脳組織内における産生細胞を検討するため、脳組織切片を用いて免疫組織化学染色法によりミクログリアのマーカーである Iba-1 や成熟ニューロンのマーカーである NeuN とケモカイン分子を共染色したところ、CXCL12 や CCL9 はミクログリアお

よび成熟ニューロンが産生細胞であり、一方で CX3CL1 はそのいずれでもない別の細胞が産生細胞であると考えられた。

組織損傷や臍帯血移植に反応して特徴的な発現パターンを示したケモカイン分子について、その機能を検討するためケモカインレセプター発現やケモカインの作用を検討した。ヒト臍帯血単核球の CD34 陽性造血幹細胞分画、および、間葉系幹細胞を含む CD45 陰性の細胞分画において、CXCR4、CXCR2、CCR2 などいくつかのケモカインレセプターの発現が認められた。

損傷を受けた組織では炎症反応を生じることから、ヒト臍帯血細胞が炎症刺激を受けた際のケモカインレセプターの発現変動を評価した。TNF- α や IFN- γ など炎症刺激存在下で培養すると、これらケモカインレセプターの発現はわずかであるが増強した。刺激により発現が増強したレセプターのひとつである CX3CR1 に対するケモカインリガンド CX3CL1 は神経細胞の分化や生存に関与する機能を持つことから、刺激培養した臍帯血細胞を CX3CL1 により再刺激して神経細胞の分化に関連する分子 nerve growth factor receptor (NGFR) の発現変化からケモカイン刺激の影響について評価を試みたが、その効果はほとんど認められなかった。

同様に健常マウスの脳組織を採取して脳細胞を調製し、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β など炎症刺激存在下で培養した。ケモカイン産生とレセプター発現の変化を評価したところ、炎症性刺激によりケモカインやケモカインレセプターの発現が増強した。一方で、炎症刺激と組み合わせるケモカインも刺激剤として用いた場合では、さらなるケモカインの発現増強やレセプターの発現変化は見られなかった。

マウス脳性麻痺モデルまたは臍帯血移植を施したモデルマウスより採取した脳組織から細胞検体を調製して、フローサイトメトリー法により脳細胞のマーカー分子と組み合わせるケモカイン分子、および対応するケモカインレセプターの発現を解析したところ、CD11b 陽性のミクログリアにおいて、組織損傷と臍帯血移植によるケモカインの産生増強が認められた。また、ミクログリアに加えて GFAP 陽性のアストロサイトにおいて、レセプター CXCR2 や CXCR4 の発現が臍帯血移植後に増強した。

組織損傷や臍帯血移植に応じて、脳組織を構成する細胞がケモカインの産生を担い、同時にケモカインレセプターの発現を変化させたことは、損傷組織の病態形成や組織修復、機能回復にケモカインネットワークが関与していることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Naji A, Sukanuma N, Espagnol N, Yagyu KI, Baba N, Sensebé L, Deschaseaux F. Rationale for Determining the Functional Potency of Mesenchymal Stem Cells in Preventing Regulated Cell Death for Therapeutic Use. *Stem Cells Transl Med.* 査読有 2017;6(3):713-719. doi: 10.5966/sctm.2016-0289.

Wang F, Baba N, Shen Y, Yamashita T, Tsuru E, Tsuda M, Maeda N, Sagara Y. CCL11 promotes migration and proliferation of mouse neural progenitor cells. *Stem Cell Res Ther.* 査読有 2017;8(1):26. doi: 10.1186/s13287-017-0474-9.

Naji A, Muzemba BA, Yagyu K, Baba N, Deschaseaux F, Sensebé L, Sukanuma N. Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 査読有 2016;6:26162. doi: 10.1038/srep26162.

〔学会発表〕(計11件)

Nobuyasu Baba, Feifei Wang, Yuan Shen, Tatsuyuki Yamashita, Masayuki Tsuda, Emi Tsuru, Kimiko Takaishi, Yusuke Sagara, Nagamasa Maeda, Characterization of chemokine expression profile by tissue damage and human cord blood cell administration in neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model, 5th World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, 2018 年
馬場伸育、臍帯血治療における障害脳組織周辺でのケモカイン発現プロファイル、第6回臍帯血による再生医療研究会、2018年

馬場伸育、松島幸生、森田聡美、王飛霏、池上信夫、相良祐輔、前田長正、新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスに対する臍帯血移植による再生治療メカニズムの検討 組織損傷とヒト臍帯血細胞輸注によるケモカインの発現変動、第70回日本産科婦人科学会、2018年

岡真萌、馬場伸育、沈淵、王飛霏、山下竜幸、都留英美、津田雅之、相良祐輔、前田長正、マウス新生仔脾細胞からIgA産生細胞の選択的誘導法の検討、第17回日本再生医療学会、

2018 年

馬場伸育、王飛霏、飯塚美知郎、高石公子、沈淵、津田雅之、山下竜幸、都留英美、宮村充彦、藤枝幹也、前田長正、相良祐輔、マウス新生仔脳虚血再灌流障害モデルに対する臍帯血細胞治療による神経再生メカニズムの検討 傷害によるケモカイン発現の変動、第 5 回臍帯血による再生医療研究会、2017 年

田村友里、沈淵、馬場伸育、王飛霏、山下竜幸、都留英美、津田雅之、相良祐輔、前田長正、マウス新生仔末梢血幹細胞から NK 細胞への選択的分化誘導およびその抗腫瘍活性の検討、第 16 回日本再生医療学、2017 年

山下竜幸、都留英美、王飛霏、馬場伸育、沈淵、津田雅之、前田長正、本家孝一、相良祐輔、硫酸化糖脂質サルファタイドによる間葉系幹細胞のエクソソーム分泌促進効果、16 回日本再生医療学、2017 年

王飛霏、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、新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスにより分泌される CCL11 は神経幹 / 前駆細胞の遊走と増殖を促進する、16 回日本再生医療学、2017 年

沈淵、馬場伸育、王飛霏、山下竜幸、都留英美、津田雅之、片岡佐誉、相良祐輔、前田長正、マウス新生仔末梢血を用いた移植片対宿主病抑制効果の検討、16 回日本再生医療学、2017 年

王飛霏、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、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、第 4 回臍帯血による再生医療研究会、2016 年
馬場伸育、王飛霏、高石公子、沈淵、津田雅之、山下竜幸、都留英美、飯塚美知郎、柴垣里加子、宮村充彦、藤枝幹也、前田長正、相良祐輔、新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスにおける組織障害とヒト臍帯血細胞移植によるサイトカイン・ケモカインの発現変化、第 4 回臍帯血による再生医療研究会、2016 年

〔その他〕

ホームページ等

高知大学医学部先端医療学推進センター再生医療部門臍帯血幹細胞研究班ホームページ

<http://www.kochi-ms.ac.jp/~cbsct/index.html>

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、研究者個人に帰属されます。