

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591914

研究課題名 (和文) 胎児付属物由来間葉系幹細胞を用いた周産期脳障害の新しい治療戦略

研究課題名 (英文) The new treatment strategy for the perinatal brain damage with the mesenchymal stem cell derived from fetal appendages

研究代表者

金川 武司 (KANAGAWA TAKESHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40346218

研究成果の概要 (和文)：

周産期医療の進歩は著しいが、胎児仮死や新生児仮死による周産期脳障害は未だ大きな問題点として残されている。これを減少させることは、周産期医療における大きな課題である。今回、周産期脳障害を軽減させるべく胎児付属物由来間葉系幹細胞を用いた脳障害治療を検討し、脳障害時に発生するCRPが脳障害を増悪させることや、 β -ラクタム抗生剤でのプレコンディショニングによる新生児脳障害予防させることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

The Perinatal brain damage due to the fetal distress or neonatal distress remains the most important problem although the perinatal care develops rapidly remarkably.

The aims of this research are the decrease the perinatal damage. In this research, we discovered that C-Reactive protein makes the immature brain susceptible to Hypoxic ischemic insult, even if the insult causes little or no injury by itself. We also clarified that the preconditioning by the beta-lactam antibiotics protects the immature brain damage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：新生児低酸素虚血性脳障害、胎児付属物、幹細胞、CRP、 β -ラクタム抗生剤、プレコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩により、低出生体重時の救命率や予後は飛躍的に改善されてきているが、その一方で極少低出生体重児、胎児仮死や新生児仮死による周産期脳障害は未だ大きな問題点として残されている。現在、周産期脳障害に対して、有効な治療法は開発されていなく、ここ 50 年間周産期脳障害の発生

率が減少していない。そこで、われわれの研究グループは、周産期脳障害に対して新たな治療法を模索し、低体温療法が脳障害に対し有効であることを報告した (Kanagawa T, Tomimatsu T, 2002)。しかし、これは脳障害の進展をくい止めるには有効かもしれないが、一旦おこってしまった脳障害に対しては無力である。そこで、着目され始めたのが神

神経細胞の再生である。神経細胞は今まで、一度失われると二度と再生しないと考えられていた。しかしながら、近年、神経幹細胞が大人の脳においても存在し、分裂を繰り返していることが明らかになった (Neurogenesis in the adult human hippocampus. Eriksson PS, 他 6 名, Nat Med. 4(11):1313-7. 1998)。また、成体虚血性脳障害モデルにより虚血後、神経細胞が再生していることが明らかになった (Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. Takasawa K. 他 9 名, J Cereb Blood Flow Metab. 22(3):299-307. 2002)。それらをふまえて、われわれの研究グループは、未熟脳における神経再生に着目して研究をしてきた。すなわち、新生児脳障害に対して、従来の脳障害の進展をくい止めるといった治療だけでなく、一度起きてしまった脳障害に対し、神経細胞の再生を促すといった治療をめざし、未熟脳神経再生について検討してきた。そして、以下の点について明らかにした。

(1) 未熟脳においては、成熟脳とは比べものにならないほど神経幹細胞が存在しており、これらが盛んに分裂している。

(2) あらゆる因子により神経幹細胞の増殖は調節されていた。われわれは、ステロイドホルモンにより神経幹細胞の増殖は抑制され (Kanagawa T, 2005; 研究業績欄参照)、脳障害の進展をくい止めるはずの低体温療法は実は神経幹細胞の増殖を抑制する (Kanagawa T, 2006; 研究業績欄参照)。これらの変化は、成熟脳に比して著明に影響を受けていた。

(3) 新生児虚血性脳障害モデルにより虚血後、神経細胞がさかんに再生している (未発表データ)。

(4) また、虚血性脳障害後における再生によってできた神経細胞はほとんどが減少していき、一ヶ月後には、脳障害を受けていない脳における新生によってできた神経細胞数と、ほぼ同等になる (未発表データ)。

すなわち、未熟脳は神経再生が盛ん起こっているが、未熟脳でさえも、虚血性脳障害後における神経再生だけでは、脳障害の器質的・機能的治癒には不十分であることも同時に見いだされた。

一方、最近、胚性幹細胞細胞 (ES 細胞) を含めた幹細胞移植による再生を主とした治療、すなわち脳障害 (パーキンソン病、脊椎損傷) を含む心筋梗塞、白血病、糖尿病、肝臓病疾患に対する幹細胞移植が着目されていることは周知のとおりである (Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. Liew CG, 他 6 名, Ann Med. 37(7):521-32, 2005)。たしかに、幹細胞移

植は失われた細胞を再生して補うといった新しい治療法という点で魅力的である。しかし、ES 細胞は、受精卵から作られるため生命倫理の問題、供給源の問題を持っており、とくに日本においては、ヒト臨床で応用するにはまだまだ時間が必要である。そこで、われわれが注目したのは胎児付属物 (胎盤、臍帯、羊膜) おける間葉系幹細胞である。胎児付属物における間葉系幹細胞が多機能幹細胞であることは、先人たちの研究により判明しており、胎児付属物が幹細胞として利用できることは十分に検討されてきた (Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. Erices A, 他 2 名, 09(1):235-42. 2000)。また、胎児付属物は胎児分娩後、不要なものであり捨てられてきたことを考えるに倫理的にまた供給源として、ES 細胞における欠点を補うものである。それに加え、移植治療を行う際、自身の胎児付属物を利用すれば、移植・宿主間の拒絶反応を考慮しなくてよい。

しかしながら、供給源としてまた、幹細胞の多機能性 (この研究においては神経幹細胞として利用できるか) として考えた場合、胎児付属物のうち絨毛、卵膜、臍帯、臍帯血のどれがもっとも適しているかについては分かっていない。また、胎児付属物が幹細胞として利用できることはすべて、*in vitro* における検討であり、*in vivo* における検討は未だ充分にはなされていない。その上、今まで報告されている研究は、すべて成人疾患を対象としたもので、新生児疾患を想定した研究は未だなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新生児虚血性低酸素性脳障害の治療として、間葉系幹細胞移植を用いた場合に、より有効な効果を得るために、以下の 2 点について明らかにすることを目的とした。すなわち、

(1) 胎児付属物から分離された間葉系幹細胞のうち、どれがもっとも神経細胞を有効に誘導させることができるか、

(2) 胎児付属物由来間葉系幹細胞を新生仔低酸素性虚血性脳障害モデルの脳室内に注入し、有効に神経細胞が誘導されるのか、また、実際に神経機能が改善するのか、

上記について、解明するに当たり、新生児脳障害の増悪する因子、改善させる因子について、まずは、予備的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ラット新生児低酸素性虚血性脳障害モデルとしては、以下を作成し、検討した。すなわち、生後 7 日目の Wistar 新生仔ラットを吸入麻酔下に左総頸動脈を露出・結紮する。総

頸動脈を露出するも、結紮しない群 (sham 群) も作成する。術回復 1 時間後、ラットを 8% 酸素、環境温 37°C のチャンバー内に収容し、低酸素負荷を課すことにより新生児低酸素性虚血性脳障害モデルを作成する。このモデルに、以下のことについて検討した。

(1) CRP の新生児低酸素性虚血性脳障害の影響について

生後 6 日目のラット腹腔内にヒト CRP 3mg/kg (n=4) および 5mg/kg (n=4)、生理食塩水 (n=8) を投与し、プレコンディショニング群と sham 群に分けた。次に前述のプレコンディショニングを行ったラットおよび sham を用いて、ラット新生児低酸素虚血性脳症モデルを作成した。低酸素虚血暴露後 4 日目に新生児の脳を摘出した後、固定包埋の上切片を作成し、MAP2

(Microtubule-associated protein-2: 脳神経細胞の細胞質を染色する) の免疫組織染色を行い、脳梗塞量を定量化した。

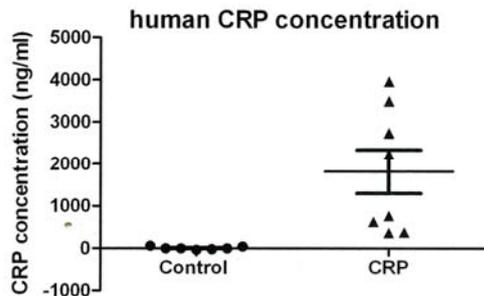
(2) β-ラクタム抗生剤でのプレコンディショニングによる新生児脳障害予防の可能性

生後 2 日目から 6 日目の 5 日間、ラットの腹腔内にセフトリアキソン 200mg/kg/day を投与し、プレコンディショニングを行った。生後 7 日目において新生児の脳を摘出した後、摘出脳をホモジナイズおよび遠心分離した後、western blotting により GLT1 蛋白の同定を行った。次に前述のプレコンディショニングを行ったラットを用いて、ラット新生児低酸素虚血性脳症モデルを作成した。低酸素虚血暴露後 7 日目に新生児の脳を摘出した後、固定包埋の上切片を作成し、MAP2 の免疫組織染色を行い、脳梗塞量を定量化した。

4. 研究成果

(1) CRP の新生児低酸素性虚血性脳障害の影響について

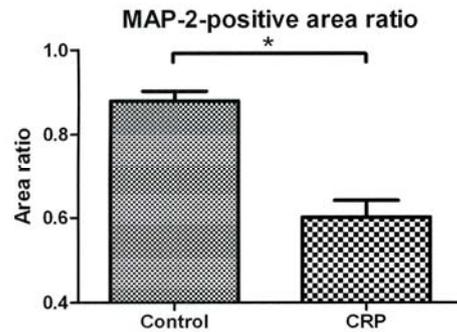
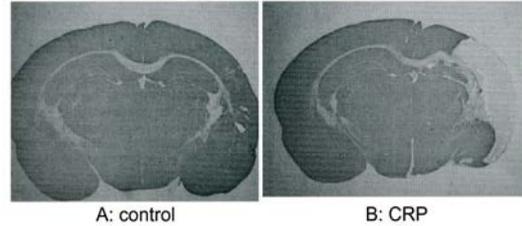
a. ラット血中 CRP 濃度



ラット血中 CRP 濃度、CRP 投与群において有意に上昇を認めていた。(プレコンディショニング群 (1823±520 ng/ml) 対 sham 群 (0 ng/ml))

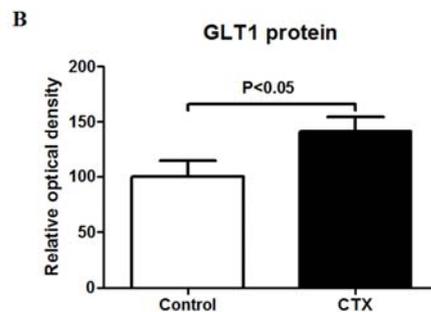
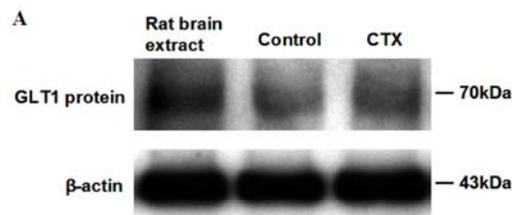
b. MAP 陽性面積

低酸素暴露後の新生児ラット脳において、MAP 染色による陽性面積を比較したところ、MAP 染色面積に有意差を認めた。このことは、CRP によって、脳障害が増悪したことが示された。



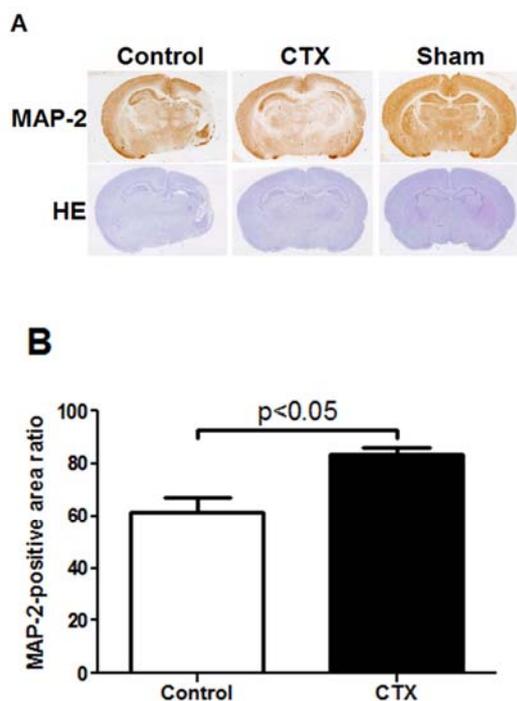
(2) β-ラクタム抗生剤でのプレコンディショニングによる新生児脳障害予防の可能性

a. 生後 7 日目の新生児脳における GLT1 蛋白発現を western blotting により定量したところ、セフトリアキソン投与群において GLT1 蛋白の増加を認めた。



b. プレコンディショニングを行った新生児低酸素虚血性脳症モデルにおける脳梗塞量を免疫組織染色により定量化したとこ

ろ、セフトリアキソン投与群において梗塞量の減少を認めた。



以上の研究成果より、新生児低酸素性虚血性脳障害で生じた炎症マーカーであるCRPそのものにより、新生児低酸素性虚血性脳障害は増悪することが示唆された。また、これら炎症をβ-ラクタム抗生剤にてプレコンディショニングすることにより、GLT1蛋白が増加し、これにより、新生児低酸素性虚血性脳障害が軽減することが示唆された。

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19件)

- Mimura K, Tomimatsu T, Minato K, Otgonbaatar Jugder, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Nozaki M, Yanagihara I, Kimura T. Ceftriaxone preconditioning confers neuroprotection in neonatal rats through glutamate transporter 1 upregulation. *Reprod Sci* 2011 in press. 査読有。
- Kinugasa-Taniguchi Y, Ueda Y, Hara-Oyagi C, Enomoto T, Kanagawa T, Kimura T. Impaired delivery outcomes in pregnancies following myomectomy compared to myoma-complicated pregnancies. *J Reprod Med (Journal Reproductive Medicine)* 2011;3-4:142-148. 査読有。

- Ueda Y, Enomoto T, Miyatake T, Fujita M, Yamamoto R, Kanagawa T, Shimizu H, Kimura T. A retrospective analysis of ovarian endometriosis during pregnancy. *Fertil Steril* 2010;94:78-84. 査読有。
- Usui N, Kanagawa T, Kamiyama M, Tani G, Kinugasa-Taniguchi Y, Kimura T, Fukuzawa M. Current status of negative treatment decision-making for fetuses with a prenatal diagnosis of neonatal surgical disease at a single Japanese institution. *J Pediatr Surg* 2010;45:2328-33. 査読有。
- Tskitishvili E, Sharentuya N, Tsubouchi H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Shimoya K, Tomimatsu T, Kimura T. Maternal blood serum and plasma human tumor-associated antigen RCAS1 during the course of uncomplicated pregnancies: a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2010;64:218-24. 査読有。
- Sharentuya N, Tomimatsu T, Mimura K, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine suppresses interleukin-6 production from vascular endothelial cells: a possible therapeutic role of nicotine for preeclampsia. *Reprod Sci* 2010;17:556-63. 査読有。
- Mimura K, Tomimatsu T, Sharentuya N, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine restores endothelial dysfunction caused by excess sFlt1 and sEng in in vitro model of preeclamptic vascular endothelium: a possible therapeutic role of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:464. e1-6. 査読有。
- Kinugasa-Taniguchi Y, Tomimatsu T, Mimura K, Kanagawa T, Shimoya K, Murata Y, Kimura T. Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats to hypoxic-ischemic brain damage: a preliminary study. *Reprod Sci* 2010;17:419-25. 査読有。
- 臼井規朗, 金川武司, 上山雅史, 谷人, 谷口(衣笠)友基子, 木村正, 福澤正洋. 出生前に消極的治療方針が選択された新

- 生児外科症例の検討. 日本周産期・新生児医学会誌 2010;46:32-8. 査読有.
10. 白井規朗, 金川武司, 上山雅史, 谷人, 福澤正洋. 出生前診断された腹壁異常症例における両親の治療方針選択と予後に関する検討. 日本小児外科学会誌 2010;46:229-34. 査読有.
 11. Tskitishvili E, Sharentuya N, Temma-Asano K, Mimura K, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Fukuda H, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K. Oxidative stress-induced S100B protein from placenta and amnion affects soluble Endoglin release from endothelial cells. *Mol Hum Reprod* 2010;33:188-99. 査読有.
 12. Tskitishvili E, Nakamura H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K. Temporal and spatial expression of tumor-associated antigen RCAS1 in pregnant mouse uterus *Am J Reprod Immunol*. 2010;63:137-43. 査読有.
 13. 荻田和秀, 富松拓治, 澤田健二郎, 上田豊, 金川武司, 衣笠友基子, 坂田正博, 木村正. 本学における Active Management of Labor. *産婦人科の進歩* 2009;61:101-3. 査読有.
 14. Tskitishvili E, Tomimatsu T, Kanagawa T, Sawada K, Kinugasa Y, Mimura K, Kimura T. Amniotic fluid 'sludge' detected in patients with subchorionic hematoma: a report of two cases *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:484-6. 査読有.
 15. Muraji M, Mabuchi S, Hisamoto K, Muranishi M, Kanagawa T, Nishio Y, Kimura T. Cesarean scar pregnancies successfully treated with methotrexate *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:720-3. 査読有.
 16. Mabuchi S, Kawase C, Muraji M, Kanagawa T, Kimura T. A case of recurrent cesarean scar pregnancy. *Acta obstet Gynecol Scand* 2009;88:1059-60. 査読有.
 17. Ueda Y, Enomoto T, Miyatake T, Yoshino K, Fujita M, Miyake T, Fujiwara K, Muraji M, Kanagawa T, Kimura T. Postpartum outcome of cervical intraepithelial neoplasia in pregnant women determined by route of delivery. *Reprod Sci* 2009;16:1034-9. 査読有.
 18. 白井規朗, 金川武司. 【出生前診断の倫理と実際】 出生前診断された腹壁異常治療の実際と倫理的問題点. *小児外科* 2009;41:494-9. 査読有.
 19. 金川武司. ●多胎妊娠、子宮外妊娠、織毛性疾患 ●母体搬送、産褥搬送 ●輸血・輸液 ●その他の偶発合併症 ビジュアル産科, 2009. 査読有.
- [学会発表] (計 3 3 件)
1. 金川武司. 出生前診断. 第 49 回大阪母性衛生学会. 2010 年 12 月 19 日. 大阪大学中之島センター, 大阪.
 2. 金川武司. 出生前診断. 第 41 回阪神周産期勉強会. 2010 年 11 月 25 日. 西宮市民会館, 兵庫.
 3. Mimura K, Tomimatsu T, Sharentuya N, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine restores endothelial dysfunction caused by excess sFlt1 and sEng in in vitro model of preeclamptic vascular endothelium. 第 3 回世界産婦人科研究機構サミット. 2009 年 11 月 12-14 日. 仙台国際センター, 宮城.
 4. Tomimatsu T, Syarentuya N, Mimura K, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine suppresses interleukin-6 production from vascular endothelial cells. 第 3 回世界産婦人科研究機構サミット 2009 年 11 月 12-14 日. 仙台国際センター, 宮城.
 5. Tskitishvili E, Sharentuya N, Temma-Asano K, Tomimatsu T, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T, Shimoya K. Possible connection between sEndoglin and S100B protein might lead to the development of endothelial dysfunction and preeclampsia. 第 3 回世界産婦人科研究機構サミット. 2009 年 11 月 12-14 日. 仙台国際センター, 宮城.
 6. 金雅子, 藤田征巳, 松崎慎哉, 金川武司, 吉野潔, 村田雄二. 分娩前まで

- 持続したCINは帝王切開より経膈分娩の方が有意に退縮しやすい。第61回日本産科婦人科学会。2009年4月3-5日。国立京都国際会館，京都。
7. 上田豊，榎本隆之，宮武崇，連美穂，藤田征巳，金川武司，山本亮，山本敏也，清水廣，吉野潔，村田雄二，木村正。妊娠に合併した卵巣子宮内膜症性嚢胞の検討。第61回日本産科婦人科学会。2009年4月3-5日。国立京都国際会館，京都。
 8. 金川武司，口唇・口蓋裂の胎児診断。第33回遺伝カウンセリングリフレッシュセミナー。2009年1月10-11日。大阪。
 9. 衣笠友基子，味村和哉，香山晋輔，上田豊，金川武司，澤田健二郎，富松拓治，木村正。当院における出生前診断の適応と帰結。第119回近畿産婦人科学会。2008年11月9日。千里ライフサイエンスセンター，大阪。
 10. 金川武司，味村和哉，香山晋輔，衣笠友基子，上田豊，澤田健二郎，富松拓治，坂田正博，木村正。前置胎盤合併に対して、子宮内胎児死亡誘導後に中期中絶術を施行した2症例。第119回近畿産婦人科学会。2008年11月9日。千里ライフサイエンスセンター，大阪。
 11. 連美穂，上田豊，榎本隆之，宮武崇，藤田征巳，山本亮，金川武司，木村正。妊娠中に腫大した卵巣子宮内膜症(chocolate cyst)。第119回近畿産婦人科学会。2008年11月9日。千里ライフサイエンスセンター，大阪。
 12. 金川武司。産科超音波の基礎—妊娠初期から中期までの超音波スクリーニング—。大阪大学産科婦人科専攻医クルズス。2008年10月30日。大阪大学，大阪。
 13. 味村和哉，富松拓治，沙仁吐雅，衣笠友基子，金川武司，木村正。ニコチンの妊娠高血圧症候群治療薬としての可能性～HUVECと抗血管新生因子を用いた妊娠高血圧症候群モデルを用いて～。第29回日本妊娠高血圧学会。2008年10月11-12日。福島ビューホテル，福島。
 14. 金川武司。妊娠初期から中期までの超音波スクリーニングと精査。第1回大阪産婦人科臨床フォーラム。2008年8月9日。大阪。
 15. 金川武司，富松拓治，衣笠友基子，荻田和秀，荒堀仁美，小垣滋豊，和田和子，木村正。湿布の大量貼付によって引き起こされたと思われる胎児動脈管早期収縮の一例。第44回日本周産期・新生児医学会。2008年7月13-15日。パシフィコ横浜，神奈川。
 16. 白井規朗，奥山宏臣，澤井利夫，福澤正洋，窪田昭男，金川武司，木村正，稲村昇，濱中拓郎，末原則幸。横隔膜ヘルニアの治療ストラテジー 予測重症度に基づいた胎児横隔膜ヘルニアの治療方針。第44回日本周産期・新生児医学会。2008年7月13-15日。パシフィコ横浜，神奈川。
 17. 金川武司，富松拓治，衣笠友基子，荻田和秀，荒堀仁美，小垣滋豊，和田和子，木村正。湿布の大量貼付によって引き起こされたと思われる胎児動脈管早期収縮の一例。第10回大阪新生児研究会。2008年6月7日。大阪薬業年金会館，大阪。
 18. 金川武司，富松拓治，衣笠友基子，味村和哉，木村正。出生前超音波検査で認めた四肢短縮例における鼻骨長計測の有用性。第48回日本先天異常学会学術集会。2008年6月29日。東京。
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
金川 武司 (KANAGAWA TAKESHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40346218
 - (2) 研究分担者
富松 拓治 (TOMIMATSU TAKUJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30346209

谷口 友基子 (TANIGUCHI YUKIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60423175