

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791582

研究課題名（和文） 新生児低酸素性虚血性脳症に対する新規治療法の開発

および進行性脳損傷の機序解明

研究課題名（英文） The development of a novel therapeutic tool against hypoxic-ischemic encephalopathy and clarifying the mechanism of slowly progressive brain damage following hypoxic-ischemic insult

研究代表者

原田 和彦（HARADA KAZUHIKO）

独立行政法人国立循環器病研究センター・薬剤部・常勤薬剤師

研究者番号：30509112

研究成果の概要（和文）：ラット卵膜由来間葉系幹細胞（MSC）を新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）モデルラットに対し移植したが、有意な治療効果は認められなかった。一方、性的成熟後の緩徐進行性脳組織障害において、雌性ラットでのみリハビリによる学習・記憶障害の改善や脳組織損傷の縮小が認められることを明らかにした。このことから、HIE ラットにおける緩徐進行性脳組織障害には、性ホルモンが関与している可能性、および外因子に対する反応性が性別によって異なる可能性があることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：Rat fetal membrane-derived mesenchymal stem cells (MSC) were transplanted into rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) intracerebrally. There were no statistically significant differences between MSC treatment and control groups in quantitative histological analysis. On the other hands, there were statistically significant differences on the degree of slowly progressive brain damage (SPBD) following hypoxic-ischemic insults after sexual maturation between male and female rats. Of the HI insult groups, the results of water maze task and the ipsilateral hemispheric areas did not differ by sex in the no-training groups, while they differed significantly by sex in the pre-training groups. In contrast to the task-specific differences in female groups, there were no differences based on training in the male groups. Taken together, it was considered that the progression of SPBD was related to at least in part through sex hormones. And also, it was considered that the responsibilities against exogenous factors might be different by sex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：再生医学、行動薬理学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：間葉系幹細胞、細胞移植、新生児低酸素性虚血性脳症、性差、脳損傷、卵膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児低酸素性虚血性脳症に対する新

規治療法の開発について

①周産期脳障害の1つである新生児低酸素

性虚血性脳症 (Hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE) は、低酸素症と虚血の2つの循環障害が発達期の脳に同時に起こることによって生じる重篤な脳組織障害および脳機能障害へと続く疾患である。HIE に対しては、未だ有効な治療法もなく、病態の進行機序も明らかとなっていない。

②研究開始当時、間葉系幹細胞 (MSC) の様々な疾患・病態に対する治療効果は注目を集めていた。MSC は、実に様々な組織・臓器から分離できることが報告されているが、いずれも細胞を得るためには身体への侵襲を伴うこと、得られる細胞数が少ないため長期の培養期間を必要とすることなどが問題とされていた。そこで、申請者は、非侵襲的に大量に MSC を得られる細胞ソースとしてヒト卵膜に着目していた。当時、申請者はヒト卵膜から MSC を分離・培養する技術を持っており、すでに卵膜由来 MSC の特性や卵膜由来 MSC の血管新生効果について学会報告等行っていた。また、他の研究者により、卵膜由来 MSC が神経細胞へ分化することが報告されていた。

(2) 進行性脳損傷について

HIE モデルラットにおいて、その脳組織障害、学習障害、記憶障害は進行的であり、申請者らは、この HIE による障害を緩徐進行性脳損傷 (Slowly Progressive Brain Damage, SPBD) と名づけた。

①SPBD はモデル作製 5 週以降に見られ、組織損傷は非虚血側脳にまで及ぶことがわかっていった。

②SPBD の進行方向は皮質から脳深部へ、また虚血反対側へと向かって行くことがわかっていった。

③虚血領域は侵食され、侵食された部位には脳脊髄液が充満されており、脳脊髄液が触れている部分には GFAP 陽性細胞が存在することがわかっていった。

2. 研究の目的

本研究では新生児低酸素性虚血性脳症に対する卵膜由来間葉系幹細胞を用いた新規治療法の開発および新生児低酸素性虚血性脳症による脳組織障害の進行機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞移植による治療効果の検討には自家移植を行うため、近交系である Lewis 系ラットを用いた。また、SPBD は Wistar 系ラットを用いた実験系で発見されたため、SPBD の評価には Wistar 系ラットを用いた。

(1) ラット卵膜由来間葉系幹細胞の分離・培養方法

妊娠 15 日目のラットを犠牲死させた後、

子宮を摘出した。子宮から卵膜を取り出し、細切後、37℃の温浴上で 1 時間コラゲナーゼ (type2, 300U/mL) を反応させた。その後、酵素活性を中和するため 10%FBS 加 α -minimal essential medium (α -MEM) を加えた。孔径 100 μ m のメッシュフィルターを用い、細胞懸濁液をろ過した後、300g にて 5 分間遠心した。遠心後、上澄みを破棄し、卵膜細胞を 10%FBS/100U/mL ペニシリン/100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む α -MEM にて 37℃、5%二酸化炭素下のインキュベーター内で培養した。浮遊細胞の多くはラット血球細胞であり、培地交換の際に除去した。プラスチックディッシュへの接着性を持つ紡錘形の細胞を培養した。これらの接着細胞に対し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導およびフローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の評価を行い、接着細胞が間葉系幹細胞 (MSC) であることを確認した。

(2) 新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) モデルラットの作成方法

生後 7 日目の Lewis 系ラットを用いた。ラットにエーテル麻酔を処し、左総頸動脈を露出させた。4-0 縫合糸を用い永久二重結紮を行った後縫合した。術後 30 分回復させた後、8%酸素と 92%窒素の混合気体を充満させたアクリルチャンバー内にて 3 時間低酸素負荷した。チャンバー内の酸素濃度はセンサーにて随時監視した。このときのチャンバー内の温度は保育器を用い、35℃に保った。

(3) ラット間葉系幹細胞の移植方法

①移植用細胞の準備方法

4~5 継代目のラット卵膜 MSC (3×10^6 個) を温度反応性培養皿 (3.5 cm, UpCell) にて培養し、細胞シートを作製した。細胞シートを室温に戻し、非侵襲的に細胞シートを剥離した。剥離した細胞シートを 27G 針と 1mL プラスチックシリンジを用い、PBS にて懸濁した。

②ラット卵膜 MSC の脳内移植方法

HIE モデル作製 24 時間後、エーテル麻酔科にてラットを脳定位固定装置に固定し、ラット卵膜 MSC を移植した。移植は脳虚血側 5ヶ所に行った。HIE モデル 1 例あたりラット卵膜 MSC1 シートを用いた。対照群には PBS を同様の方法で投与した。

(4) 脳組織定量解析方法

移植 2 週間後、ラットをペントバルビタールにて麻酔した。左心室よりヘパリン加生理食塩液を流し、全身灌流した。その後 10%ホルマリン緩衝液を流し、固定した。断頭後、全脳を摘出し、2 日間 10%ホルマリン緩衝液中にて固定した。その後、摘出した脳を rat

brain slicer を用いて、大脳の前面先端から 4, 6, 8, 10, 12mm の部位で切断し、脳の断面をデジタルカメラで撮影した。撮影した脳の断面積を Image J を用いて左右の脳半球面積を測定した。

(5) リハビリ効果の行動学的評価方法

①Wistar系ラットを用いたHIEモデル作製方法

(2)と同様の方法でHIEモデルを作製した。ただし、低酸素暴露時間は2時間であり、このときのチャンバー内の温度は33℃とした。

②実験スケジュール

実験スケジュールは図1に示した。リハビリ群（雄、雌群）は、HIEモデル作製6週後より十字迷路、7週後より8方向放射状迷路、10週後よりオペラント装置を用いた選択反応課題を行い、16週後より水迷路課題をいった。非リハビリ群（雄、雌群）は16週目より水迷路課題のみ行った。

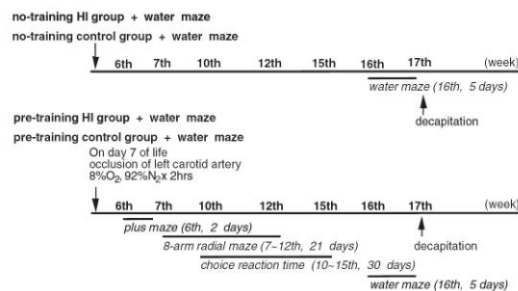


図1. 実験スケジュール

③水迷路課題

水温 23±2℃の水を入れた円形の水槽（直径 150 cm、高さ 45 cm、水深 32 cm）であり、その周囲には空間を認識するための手がかりとなるもの（実験者、スクリーン、柵など）を固定した。プールの中には逃避用の透明なプラットホーム（直径 12 cm、プール壁面からの距離 30 cm）を固定し、その表面は水面下 2 cm の位置に設定した。また、プールの上方には CCD カメラを設置し、画像処理後、コンピュータにて水泳時間、水泳距離、水泳時間を測定した。

④定量的組織解析

HIEモデル作製17週後、(4)と同様に、各ラットを灌流固定した。摘出した脳を rat brain slicer を用いて、大脳の前面先端から 2mm 間隔で切断し、脳の断面をデジタルカメラで撮影した。撮影した脳の断面積を NIH-Image を用いて左右の脳半球面積を測定した。

(6) 統計解析

危険率が 5%以下の場合を統計学的に有意

差ありとした。各群間比較には一元配置分散分析後、多重比較検定を行った。経時的変化の検定には二元配置分散分析法を用いた。

4. 研究成果

(1)ラット卵膜 MSC 移植による脳組織保護効果

各群の虚血側の半球面積は以下に示す通りであった。無処置群 (4 mm 33.2±1.3 mm²、6 mm 42.1±2.6 mm²、8 mm 53.0±1.7 mm²、10 mm 57.7±2.0 mm²、12 mm 51.9±1.9 mm²)、対照群 (4 mm 20.3±1.4 mm²、6 mm 23.2±1.8 mm²、8 mm 30.7±1.3 mm²、10 mm 26.5±4.1 mm²、12 mm 25.3±1.8 mm²)、MSC 移植群 (4 mm 20.7±1.7 mm²、6 mm 27.8±3.1 mm²、8 mm 31.9±3.9 mm²、10 mm 28.9±2.2 mm²、12 mm 25.8±2.1 mm²)。なお、対照群と MSC 移植群にはいずれの脳断面においても統計学的有意差は認められなかった。

(2) リハビリによる学習・記憶能力改善効果

リハビリ群の雌群では、非リハビリ群の雌群と比し、有意な水泳時間の短縮および水泳距離の短縮が認められた。また、リハビリ群間では雄群に比し、雌群において有意な水泳時間の短縮および水泳距離の短縮が認められた。また、リハビリ群の雄群では、非リハビリ群の雄群と比し、水泳時間、水泳距離の短縮は認められなかった。なお、いずれの群においても水泳速度に差は認められなかった。

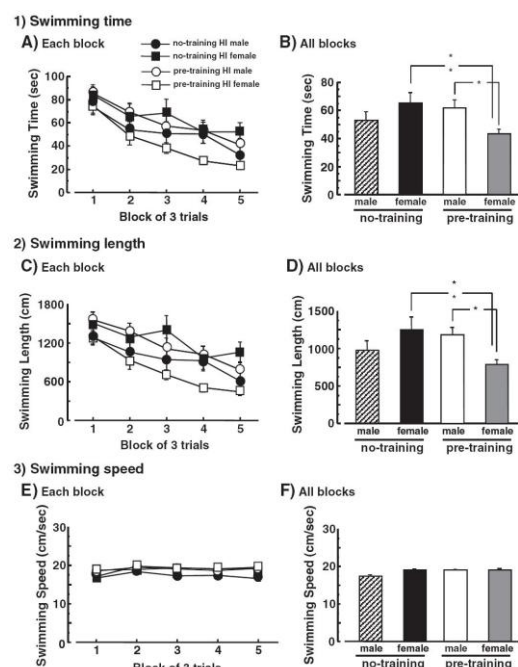


図2. リハビリによる学習・記憶能力改善効果

(3) リハビリによる脳組織保護効果

リハビリ群の雌群では、非リハビリ群の雌群と比し、いずれの脳断面（6 mm、8 mm、10 mm）においても虚血側脳半球面積の有意な縮小が認められた。また、リハビリ群間では雄群に比し、雌群において虚血側脳半球面積の有意な縮小が認められた。また、リハビリ群の雄群では、非リハビリ群の雄群と比し、虚血側脳半球面積の縮小は認められなかった。

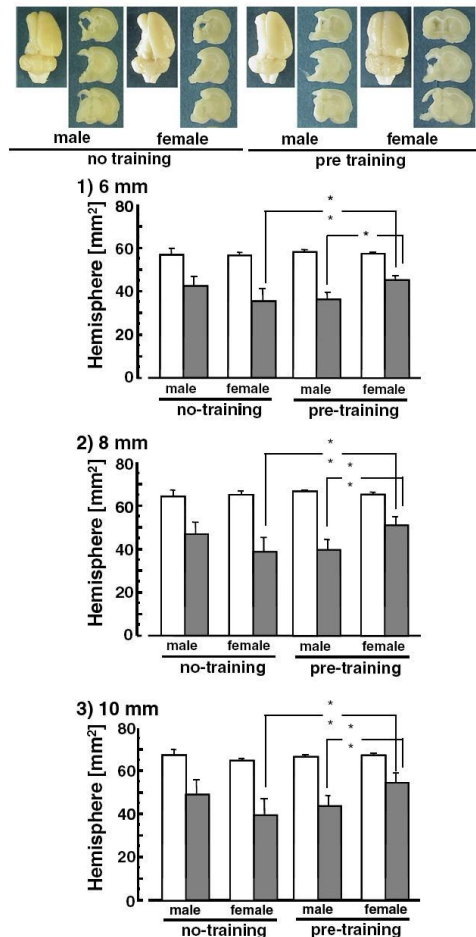


図 3. リハビリによる脳組織保護効果

新生児低酸素性虚血性脳症に対する卵膜 MSC 移植による新規治療法の検討では、卵膜 MSC 移植による脳組織保護・治療効果は認められなかった。近年、MSC 移植による種々の疾患に対する治療効果は、移植した細胞そのものが分化することによるものではなく、移植した細胞が分泌する栄養因子によるパラクライン効果であると考えられている。そのため、移植経路やそれに伴う移植細胞数の変更など検討の余地はあると考えられた。

一方で、緩徐進行性脳損傷の機序検討においては、性的成熟後の緩徐進行性脳組織障害には性差があること、またリハビリに対しては雌性ラットでのみ学習・記憶障害の改善や脳組織損傷の縮小が認められることを明ら

かにした。このことから、HIE ラットにおける緩徐進行性脳組織障害には、少なくとも、性ホルモンが関与している可能性、および外因子に対する反応性が性別によって異なる可能性があることが考えられた。女性ホルモンの一つであるエストロゲンには、以前から脳虚血に対し予防的な効果があると報告があった。しかしながら、今回のデータのように長期的な虚血性脳損傷の進行や学習・記憶に性的因子が関与していることを示唆するものはなく、新たな知見と言える。今後、性ホルモンや性に関わる遺伝子の解析によって、緩徐進行性脳組織障害の機序が明らかにできる可能性がある。

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 4 件）

- ① Hayakawa K ら（15 人中 8 番目）、Therapeutic time window of cannabidiol treatment on delayed ischemic damage via high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 32, 2009, 1538–1544.
- ② Tsuji M ら（9 人中 3 番目）、Sex differences in the benefits of rehabilitative training during adolescence following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Experimental Neurology*, 査読有, 226, 2010, 285–292.
- ③ Ishikane S ら（12 人中 4 番目）、Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 査読有, 49, 2010, 753-761.
- ④ Harada K ら（10 人中 1 番目）、Sustained-release adrenomedullin ointment accelerates wound healing of pressure ulcers. *Regulatory Peptides*, 査読有, 168, 2011, 21-26.

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 原田和彦、マウス下肢虚血モデルに対するヒト卵膜由来間葉系幹細胞移植による血管新生効果、2010 年 4 月 4 日、国立京都国際会館
- ② 原田和彦、ヒト卵膜由来間葉系幹細胞による心血管再生保護効果、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010 年 4 月 24 日、東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 和彦 (HARADA KAZUHIKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・薬剤部・常勤薬剤師

研究者番号：30509112

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし