

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890100

研究課題名（和文）

臍帯血幹細胞を用いた周産期脳障害の治療開発

研究課題名（英文）

Developing a novel therapy with umbilical cord blood cells for perinatal brain injuries

研究代表者

佐藤 義朗 (SATO YOSHIAKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30435862

研究成果の概要（和文）：周産期低酸素性虚血性脳症（HIE）に対する新規治療法の開発は急務である。本研究では、周産期脳障害に対して最も理想的な幹細胞源と考えられる臍帯血細胞を用いた治療法開発への基礎研究を行った。周産期 HIE ラットモデルの作製、臍帯血細胞の採取、調整、保存のシステムの確立後、臍帯血細胞投与の効果を評価した。低酸素虚血負荷後、臍帯血細胞を腹腔内に投与すると、細胞は脳内へ移動し、抗アポトーシス、抗酸化ストレス、および細胞新生の亢進へ作用する傾向を認めた。

研究成果の概要（英文）：It is urgent to develop novel therapies for infants with perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). In the present project, we have performed basic experiments for developing a novel therapy with human umbilical cord blood cells (HUCB), which is most ideal source of stem cells for perinatal brain injuries. After establishing a perinatal HI rat model, we evaluated the effect of administration of HUCB on perinatal HIE. We injected HUCB peritoneally after hypoxic-ischemic insult. The injected HUCB migrated into the brain, and tended to exert the anti-apoptotic and anti-oxidative effect, and increase the cell proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,030,000	309,000	1,339,000
2010年度	920,000	276,000	1,196,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,950,000	585,000	2,535,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：臍帯血、周産期脳障害

1. 研究開始当初の背景

近年の新生児医療のめざましい進歩により、早産児や重症新生児の生存率、予後は飛躍的に改善しているが、周産期低酸素性虚血性脳症（hypoxic-ischemic encephalopathy; HIE）については、出生1000人に対し約20人と言われており、死亡及び後遺症症例は

1800人/年と推定され、発症率については改善がなく、脳性麻痺の主たる原因となっている。周産期 HIE に対する有効な治療法は、脳低温療法のみであるが、最重症例に対しては効果が薄く、新規治療法の開発が急務である。

一方、幹細胞を用いた再生医療は、今まで「不治の病」とされていた多くの疾病に対し

てその克服への希望を与えてくれ、現在では、様々な臓器や疾患に対し研究され、臨床応用されつつある (Sato Y, Oohira A. *Curr Stem Cell Res Ther*; 2009)。周産期 HIE に対しても、動物モデルで、胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来の神経幹細胞、骨髄間葉系細胞などの移植により、行動異常の軽減などの効果が示されている。我々も、胎児脳から培養した神経幹細胞とコンドロイチン硫酸分解酵素の併用療法が周産期 HIE に対して有効な治療であることを明らかにした (Sato Y, et al: *Reprod Sci*, 2008)。

臨床応用に際しては、胎児脳からの神経幹細胞利用や受精卵を利用する ES 細胞は倫理的な観点から利用が困難である。免疫拒絶反応の面なども考えると、自家移植できる細胞が理想的である。投与方法については、脳内直接投与は侵襲が強いため、可能ならば静脈内投与による治療が望ましい。

臍帯血は、採取に関する倫理的問題は極めて少ない上、自己臍帯血の移植が可能であるため免疫拒絶反応に対する危惧も生じない。さらに、成人脳梗塞モデルなどで静脈内投与においても脳内直接投与と同等に効果があることが証明されている。以上から、臨床応用を視野に入れると臍帯血幹細胞は、周産期脳障害に対して最も理想的な幹細胞源と考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、臍帯血幹細胞を用いた周産期 HIE に対しての治療開発への基礎研究を行うことである。併せて、対象疾患児の臍帯血の採取、運搬、調製、凍結保存システムの構築を行うこととする。

3. 研究の方法

(1) 周産期脳障害モデルの作製

周産期 HIE モデルは、国際的に汎用されている Rice-Vannucci モデルを用い、ラットの新生仔で作製した。イソフルレン麻酔下において、生後 7 日目の新生仔ラットの片側頸動脈を結紮し、その後 8% 低酸素負荷し、片側の梗塞モデルを作製した。

予備実験では、50分から90分までのさまざまな時間で低酸素負荷をし、その48時間後に生理食塩水を経心臓的に還流した後、脳を取り出し2mmスライスを作製した。

2,3,5-triphenyltetrazolium Chloride (TTC) 染色にて受傷の程度を評価し、適切な負荷時間を決定した。

(2) 臍帯血の採取、運搬、調製、凍結保存システムの構築

今回の研究では、ヒト臍帯血を使用した。臍帯血採取は、帝王切開にて出生した新生児の臍帯クランプ切離後、胎盤側より採血バックを用いて行った。Ficoll Paque法を用い単核球分画にし、使用まで液体窒素下に保存した。

また、採取・保存した臍帯血の質の評価として顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 (GFU-GM) 数を評価した。

(3) 臍帯血細胞投与

上記により凍結保存した臍帯血を解凍し、低酸素虚血負荷 3 時間後に、 3×10^6 個の細胞を腹腔内投与した。

(4) 臍帯血細胞投与による効果の評価

低酸素負荷 24 時間後、灌流固定し、パラフィン切片を作製した。

① 移植細胞の脳内での確認

抗ヒト HLA-DR 抗体により、移植細胞を同定し、確認した。

② 抗アポトーシス効果

抗 Cleaved-caspase-3 (cas-3) 抗体により、アポトーシス細胞の数をコントロール群と比較した。

③ 酸化ストレスへの影響

酸化ストレスマーカーである、抗 4-Hydroxy-2-Nonenal (4HNE) 抗体を使用し、免疫組織学的に評価した。

④ 細胞新生へ及ぼす影響

抗 phospho-Histone H3 (phosH3) 抗体を使用し、海馬と脳室下帯での分裂細胞数を免疫組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) 生後 7 日目の新生仔ラットの片側頸動脈を結紮し、その後 8% 低酸素負荷を 54 分施行すると、中等度の片側の梗塞ができることがわかった。

(2) 解凍後の臍帯血での GFU-GM アッセイでは、 5×10^5 細胞あたり 49 ± 3 個であり、私達のプロトコールでのヒト臍帯血の採取、運搬、冷凍保存の行程が問題ないことを確認した。

(4)

① ヒト HLA-DR 陽性細胞を少数ながら確認し、腹腔内へ投与した細胞は脳内へ到達すると思われた。

② 皮質における cas-3 陽性細胞は、臍帯血細胞投与群のラットに少ない傾向を認め、臍帯血細胞により抗アポトーシス作用が得られる可能性が示唆された。

③ 皮質における 4HNE 陽性細胞は、臍帯血細胞投与群のラットに少ない傾向を認め、臍帯

血細胞により抗酸化ストレス作用が得られる可能性が示唆された。

iv) 海馬における phosH3 陽性細胞は、低酸素虚血負荷により減少し、臍帯血細胞を投与することによりその減少が抑える傾向を認めた。また、脳室下帯では、低酸素虚血負荷によっても phosH3 細胞の減少は認めなかったが、臍帯血細胞投与群では、無負荷群よりも陽性細胞を多く認める傾向があった。以上のことより、臍帯血細胞投与により、細胞新生を亢進させる可能性があると考えられた。

今後、本研究で得られた結果のより詳細な検討や行動学的な評価を行うことにより、臍帯血細胞投与による効果を明らかにする予定である。

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 10 件)

1. Hayakawa M, Sato Y, Hattori T, Ichinohashi Y, Nakayama A, Yamamoto H, Hemmi H, Miharuru I, Ieda K, Kojima S. Carbohydrate and Energy Metabolism in the Brain of Rats with Thromboxane A2 -Induced Fetal Growth Restriction. *Pediatr Res* 2011: in press. (査読あり)
2. Tagaya M, Sato Y, Hayakawa M. The diffusion weighted imaging for an early diagnosis of parasagittal injury. *Pediatr Int* 2010; **52** (2): 298-301. (査読あり)
3. Osato K*, Sato Y(*equally contribution), Ochiishi T, Osato A, Zhu C, Sato M, Swanpalmer J, Modjtahedi N, Kroemer G, Kuhn HG, Blomgren K. Apoptosis-inducing factor deficiency decreases the proliferation rate and protects the subventricular zone against ionizing radiation. *Cell Death & Disease* 2010; **1** e84.4. (査読あり)
4. Nakanishi K, Sato Y, Oohira A. Biological activities of highly sulfated chondroitin sulfate polysaccharides on neural cells. *Research Advances in Neurochemistry, Global Research Network* 2010; **1**: 1-10. (査読なし)
5. Sato Y, Oohira A. Chondroitin sulfate, a major niche substance of neural stem cells, and cell transplantation therapy of neurodegeneration combined with niche modification. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009; **4** (3): 200-209. (査読あり)
6. Takemoto K, Nakayama A, Ito M, Sato Y, Saito A, Tori Y, Kaneko K, Ando H, Hayakawa M. Male gender is related to the development of parenteral nutrition-associated cholestasis in neonates. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine* 2009; **2** (4): 247-251. (査読あり)
7. Saito A, Matsui F, Hayashi K, Watanabe K, Ichinohashi Y, Sato Y, Hayakawa M, Kojima S, Oohira A. Behavioral abnormalities of fetal growth retardation model rats with reduced amounts of brain proteoglycans. *Exp Neurol* 2009; **219** (1): 81-92. (査読あり)
8. 早川昌弘, 中山淳, 竹本康二, 伊東真隆, 齊藤明子, 佐藤義朗. 早産重症胎児発育不全 severe preterm FGR(IUGR) 病因と病態 胎児発育不全モデルラットの中脳神経における組織学および分子生物学的变化に関する研究. *周産期学シンポジウム* 2009; **09** (27): 37-42. (査読なし)
9. 佐藤義朗, 早川昌弘. 【新生児の薬物療法】 各疾患への薬物療法 新生児痙攣に対するフェノバルビタール療法. *周産期医学* 2009; **39** (12): 1687-1690. (査読なし)
10. 佐藤義朗. 新生児代表的疾患の基礎理解 (第 5 回) 脳室内出血(IVH). *こどもケア* 2009; **4** (5): 85-91. (査読なし)

[学会発表] (計 23 件)

1. 佐藤義朗, 大城誠, 竹本康二, 細野治樹, 齊藤明子, 近藤大貴, 会津研二, 松沢麻衣子, 寺崎浩子, 早川昌弘 未熟児網膜症に対する光凝固術施行時の鎮痛・鎮静 第 29 回周産期学シンポジウム 2011.1.14-15 佐賀
2. Hayakawa, M, Sato Y, Ichinohashi Y, Nakayama A, Yamamoto H, Hemmi H, Miharuru I, Ieda K, Kojima S. Carbohydrate and Energy Metabolism

- in the Brain of Rats with Thromboxane
A2-Induced Fetal Growth Restriction
Hot topics in Neonatology 2010
2010.12.5-7
Washington DC, USA
3. **佐藤義朗**
小児脳腫瘍における頭部放射線療法後の脳障害克服を目指して
第 562 回 九州大学生医研セミナー(多階層生体防御システム研究拠点) グローバル COE 理医連携セミナー(招待講演)
2010.12.2 福岡
 4. **佐藤義朗**, 中西圭子, 伊藤美春, 一ノ橋祐子, 服部哲夫, 邊見勇人, 中山淳, 山本ひかる, 早川昌弘
未熟児無呼吸治療/予防薬の神経幹細胞に対する細胞毒性および増殖に及ぼす影響
第 55 回日本未熟児新生児学会・学術集会 2010.11.5-7 神戸
 5. 一ノ橋祐子, **佐藤義朗**, 服部哲夫, 伊藤美春, 山本ひかる, 中山淳, 早川昌弘
ステロイドによる神経幹細胞の増殖と分化への影響
第 55 回日本未熟児新生児学会・学術集会 2010.11.5-7 神戸
 6. **Sato Y**, Osato K, Ochiishi T, Osato A, Zhu C, Sato M, Swanpalmer J, Modjtahedi N, Kroemer G, Kuhn GH, Blomgren K
Apoptosis-inducing factor deficiency decreases the proliferation rate of neural precursor cells and protects the subventricular zone against ionizing radiation.
第 33 回日本神経科学大会 2010.9.2-4 神戸
 7. **Sato Y**, Hattori T, Suzuki T, Hayashi N, Ito M, Hemmi H, Nakayama A, Yamamoto H, Ichinohashi Y, Hayakawa M
Cerebral Maturation in Preterm SGA Infants
第 46 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2010.7.11-13 神戸
 8. Hattori T, **Sato Y**, Itoh M, Tsuda H, Hemmi H, Sumigama S, Yamamoto H, Nakayama A, Kotani T, Hayakawa H, Hayakawa M
A simple scoring system using fetal MRI for prognosis in left congenital diaphragmatic hernia
第 46 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2010.7.11-13 神戸
 9. **佐藤義朗**, 服部哲夫, 中西圭子, 大平敦彦, Klas Blomgren, 早川昌弘
中枢神経疾患に対する幹細胞療法 ～周産期脳障害の救世主となりうるか～
第 52 回日本小児神経学会総会(シンポジウム) 2010.5.20-22 福岡
 10. Hayakawa M., **Sato Y.**, Nakayama A., Henmi H., Yamamoto H., Hattori T., Hayashi S., Tsuji T., Kato T., Hayakawa F., Kato Y., Takemoto K., Matsuzawa K., Kidokor H., Kubota T., Oshiro M.
Serial EEG findings in very premature infants born at gestational age of 22-23 weeks,
Hot Topics in Neonatology 2009, Washington DC 2009.12.6-8
 11. **佐藤義朗**, 服部哲夫, 大城 誠, 加藤有一, 城所博之, 久保田哲夫, 林誠司, 加藤徹, 松沢麻衣子, 邊見勇人, 山本ひかる, 中山淳, 早川昌弘
在胎 22・23 週児における中枢神経受傷機序の解明 ～経時的脳波を用いた検討～
第 54 回日本未熟児新生児学会・学術集会(シンポジウム) 2009.11.29-12.1 横浜
 12. **Sato Y**, Shinjyo N, Karlsson N, Nilsson M, Sato M, Oosato K, Zhu C, Kuhn HG, Pekny M, Pekna M, Blomgren K
Neural stem/progenitor cells transplanted into the hippocampus of young mice survive and normalize behavior changes induced by irradiation
第 32 回日本神経科学大会 2009.9.16-18 名古屋
 13. **佐藤義朗**, 中西圭子, 早川昌弘
未熟児無呼吸治療/予防薬の神経幹細胞への影響
第 45 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2009.7.12-14 名古屋
- 〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)
- 名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 義朗 (SATO YOSHIAKI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30435862

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし