

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461659

研究課題名(和文) 周生期脳障害に対する糖鎖を応用した臍帯血幹細胞移植法の開発とその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Transplantation of rat umbilical cord blood cells for neonatal hypoxic-ischemic brain injury.

研究代表者

中西 圭子 (NAKANISHI, KEIKO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・主任研究員

研究者番号：50280813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット臍帯血幹細胞を培養増殖させ、新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルラットに腹腔内投与するという同種間移植実験を行い、臍帯血幹細胞の周生期脳障害に対する効果を検討した。幹細胞投与群では残存脳容量は増加し、活性化ミクログリアの集簇が抑制されたが、神経新生の増加は認められなかった。臍帯血幹細胞は、宿主の反応を介して梗塞軽減効果をもたらしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mononuclear cells isolated from rat umbilical cord blood were expanded (stem cell enriched-umbilical cord blood cells; SCE-UCBCs) and they were administered intraperitoneally to neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) model of rats. Administration of SCE-UCBCs increased the residual brain volume and decreased the accumulation of activated microglia to lesion site. These results indicate that UCBCs could ameliorate HI injury, possibly through an endogenous response.

研究分野：神経科学、新生児学

キーワード：臍帯血幹細胞 新生児低酸素性虚血性脳症

## 1. 研究開始当初の背景

新生児医療の進歩に伴い病的新生児の救命率は飛躍的に向上しているものの、新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)など周生期脳障害による神経学的後遺症の頻度は高く、新生児医療にとって残された課題である。HIEに対し臨床では脳低温療法・低体温療法が行われているものの、重症例にはあまり有効でなく(Gluckman PD *et al.*: *Lancet*, 2005)、幹細胞を用いた再生医療など新規治療法の開発が期待されている。

臍帯血は胎盤とともにその多くは廃棄されるが、造血幹細胞や間質性幹細胞を含んでおり、出生時に採取しておけば自家移植が可能で、ガン化をおこす心配のないこと、移植片対宿主病(GVHD)をおこしにくいこと、静脈内や腹腔内投与でも脳内へ移行できることなど、骨髄採取が困難な新生児にとって最も臨床に応用しやすい幹細胞源である。また、臍帯血バンクの普及に伴い血液疾患の患者などに臍帯血移植治療は既に行われており、その採取法や安全性は確立されている。自家臍帯血を採取し幹細胞を増殖させ利用できれば、周生期脳障害の新たな治療戦略となりうる。

アメリカでは既に HIE 患児に対し臍帯血の自家移植の臨床研究が始まっているが、その効果の詳細や機序については、未だ定まった見解が得られていない。また、これまでの実験動物を用いた報告では、ヒト臍帯血を実験動物脳内に移植したものが多く、その評価は様々である。

## 2. 研究の目的

本研究では HIE モデルや脳室周囲白質軟化症(PVL)モデル動物を用いて、周生期脳障害に対する効率的な臍帯血幹細胞移植療法を開発するとともに、その分子基盤を明らかにすることを目的とする。また、糖鎖を応用した臍帯血幹細胞の最適な移植方法を検討する。

## 3. 研究の方法

本研究では、GFP トランスジェニック(TG)ラット臍帯血幹細胞を増殖させ、HIE モデルラットに投与するという同種間移植実験を行い、検討した。

GFP-TGラットE19.5胎仔より臍帯血を採取し、有核細胞層を分離し、4種のサイトカイン存在下で培養増殖させた。この増殖させた細胞(stem-cell-enriched umbilical cord blood cells; SCE-UCBC)を、日齢7にRice-Vannucci model(右頸動脈結紮および低酸素処理2h)処置を行ったラットに腹腔内投与し、受傷3週間後に脳を固定し、5 $\mu$ mのパラフィン連続切片を作製した。HE染色、Ki67抗体およびED1抗体染色、Tomato lectin染色を行い、Stereo Investigator Ver. 11を用いて立体解析学的に評価した。

## 4. 研究成果

(1)脳梗塞に対する臍帯血幹細胞の効果；

100枚毎にパラフィン切片をHE染色し、Cavalieriの原理に基づいて脳の残存容量を計測した。健常側に対する障害側の残存脳容量は、対照群では40.1 $\pm$ 2.8%であったのに対し、SCE-UCBC投与群では61.2 $\pm$ 6.9%と有意に増加していた。

(2)神経新生・血管新生に対する臍帯血幹細胞の効果；

50枚毎にパラフィン切片を増殖細胞マーカーであるKi67抗体染色し、Cavalieriの原理に基づいて脳室下帯および海馬歯状回顆粒細胞層でのKi67陽性細胞数を計測した。障害側海馬顆粒細胞層ではKi67陽性細胞数は健常側に比べ有意に減少していたが、対照群とSCE-UCBC群との間で有意な差は認められなかった。

また、100枚毎にパラフィン切片をTomato lectin染色し、運動野における血管長をspace balls methodを用いて測定した。障害側運動野において、対照群とSCE-UCBC群との間で総血管長に差は認められなかった。

(3)活性化ミクログリアに対する臍帯血幹細胞の効果；

100枚毎にパラフィン切片をED1染色し、障害側に集簇している活性化ミクログリア総数を計測した。対照群では障害側半球に249 $\pm$ 19万個/個体集簇していたのに対し、SCE-UCBC群では116 $\pm$ 55万個/個体と、有意に減少していた。

これらの結果から、臍帯血幹細胞は宿主に何らかの反応を引き起こし、活性化ミクログリアの障害部位への集簇を抑制して、梗塞軽減効果をもたらしている可能性が示唆された。

(4)臍帯血幹細胞の増殖に対するコンドロイチン硫酸糖鎖の影響について；

臍帯血有核細胞を採取し培養増殖させる際に、種々のコンドロイチン硫酸糖鎖を添加し、その増殖促進効果を検討した。高硫酸化型コンドロイチン硫酸糖鎖CS-Eは神経幹細胞に対し増殖促進効果を持つが、臍帯血幹細胞に対しては有意な増殖促進効果は認められなかった。

(5)PVLモデルマウス作製の試み；

持続的低酸素刺激による新規PVLモデルマウスの作製を試みたが、低酸素状態から離脱する際に母獣がマウス仔を食殺してしまい、安定して評価できるモデルとならなかった。今後、このマウスモデルを利用するには、仮親を用意するなど、何らかの工夫が必要であると思われる。

## 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 7 件)

- (1) Nakanishi K, Sato Y, Mizutani Y, Ito M, Hirakawa A, Higashi Y. Rat umbilical cord blood cells attenuate hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Sci Rep* (査読有) 7:44111, 2017. DOI: 10.1038/srep44111.
- (2) Johmura Y, Yamashita E, Shimada M, Nakanishi K, Nakanishi M. Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation. *Sci Rep* (査読有) 6:31194, 2016. DOI: 10.1038/srep31194.
- (3) Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, Nakanishi M. Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. *Nat Commun* (査読有) 7:12059, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12059.
- (4) Johmura Y, Sun J, Kitagawa K, Nakanishi K, Kuno T, Naiki-Ito A, Sawada Y, Miyamoto T, Okabe A, Aburatani H, Li S-F, Miyoshi I, Takahashi S, Kitagawa M, Nakanishi M. SCF(Fbxo22)-KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence. *Nat Commun* (査読有) 7:10574, 2016. DOI: 10.1038/ncomms10574.
- (5) Hattori T, Sato Y, Kondo T, Ichinohashi Y, Sugiyama Y, Yamamoto M, Kotani T, Hirata H, Hirakawa A, Suzuki S, Tsuji M, Ikeda T, Nakanishi K, Kojima S, Blomgren K, Hayakawa M. Administration of umbilical cord blood cells transiently decreased hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Dev Neurosci* (査読有) 37(2):95-104, 2015. DOI: 10.1159/000368396.
- (6) Sagawa H, Terasaki H, Nakanishi K, Tokita Y, Watanabe M. Regeneration of optic nerve fibers with unoprostone, a prostaglandin-related antiglaucoma drug, in adult cats. *Jpn J Ophthalmol* (査読有) 58:100-109, 2014. DOI: 10.1007/s10384-013-0282-4.
- (7) Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, Nakanishi M. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature* (査読有) 502 (7470):249-53, 2013. DOI: 10.1038/nature12488.
- [学会発表] (計 25 件)
- (1) 中西圭子, 佐藤義朗、水谷友香、伊藤美春、平川晃弘、東雄二郎：臍帯血幹細胞移植した周生期脳障害モデルラットにおける立体解析学的評価. 第 94 回日本生理学会大会、2017.3.29.「アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)」
- (2) 鈴木俊彦、佐藤義朗、上田一仁、片岡英里奈、Alkisti Mikrogeorgiou、北瀬悠磨、杉山裕一郎、立花貴史、見松はるか、松沢要、伊藤美春、齋藤明子、村松友佳子、中西圭子、早川昌弘：CCL2 ドミナントネガティブ阻害剤導入幹細胞を用いた慢性肺疾患モデルに対する改善効果. 第 61 回日本新生児成育医学会、2016.12.2.「大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)」
- (3) 北瀬悠磨、佐藤義朗、見松はるか、鈴木俊彦、Alkisti Mikrogeorgiou、杉山裕一郎、中西圭子、辻雅弘、早川昌弘：新生児低酸素性虚血性脳症に対する stem cells from human exfoliated deciduous teeth を用いた幹細胞療法. 第 61 回日本新生児成育医学会 2016.12.2.「大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)」
- (4) ミクロゲルキオ・アルキステイ、佐藤義朗、近藤大貴、杉山裕一郎、鈴木俊彦、北瀬悠磨、見松はるか、辻雅弘、中西圭子、早川昌弘：Dedifferentiated fat cells as a candidate for the treatment of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. 第 61 回日本新生児成育医学会、2016.12.2.「大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)」
- (5) 佐藤義朗、ミクロゲルキオ・アルキステイ、近藤大貴、杉山裕一郎、鈴木俊彦、北瀬悠磨、見松はるか、風間智彦、松本太郎、加野浩一郎、辻雅弘、中西圭子、早川昌弘：成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)は新生児ラットの低酸素虚血傷害を軽減する. 第 39 回日本神経科学大会、2016.7.22.「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- (6) 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗、平川晃弘、東雄二郎：低酸素性脳障害モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞の効果. 第 39 回日本神経科学大会、2016.7.21.「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- (7) ミクロゲルキオ・アルキステイ、佐藤義朗、近藤大貴、杉山裕一郎、鈴木俊彦、北瀬悠磨、見松はるか、辻雅弘、中西圭子、早川昌弘：Dedifferentiated fat cells ameliorate hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal rat model. 第 52 回日本周産期新生児医学会、2016.7.18.「富山国際会議場 (富山県・富山市)」
- (8) 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗、東雄二郎：周生期脳障害モデルラットに対する

- ラット臍帯血幹細胞投与の効果. 第 52 回日本周産期新生児医学会、2016.7.18.「富山国際会議場（富山県・富山市）」
- (9) Mikrogeorgiou A, Sato Y, Kondo T, Sugiyama Y, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Matsumoto T, Kano K, Hayakawa M. Dedifferentiated fat cells as a treatment for perinatal hypoxic ischemic brain injury. 10<sup>th</sup> Hershey conference on Developmental brain Injury. 2016.6.10.「Chateau de Romainville (France)」
- (10) Sato Y, Kondo T, Hattori T, Mikrogeorgiou A, Sugiyama Y, Tsuji M, Nakanishi K, Hayakawa M. Administration of bone marrow mononuclear cells decreases hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. 10<sup>th</sup> Hershey conference on Developmental brain Injury. 2016.6.9.「Chateau de Romainville (France)」
- (11) 中西圭子, 伊藤美春, 佐藤義朗, 東雄二郎: 周産期脳障害モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞移植の検討. 第 93 回日本生理学会大会 (札幌) 2016.3.24.「札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)」
- (12) 佐藤義朗, 近藤大貴, 服部哲夫, 北瀬悠磨, 杉山裕一朗, 鈴木俊彦, 山本美知郎, 平田仁, 鈴木哲, 水野正明, 中西圭子, 辻雅弘, 早川昌弘: 骨髄単核球静脈内投与は新生仔ラットの低酸素性虚血性脳傷害を軽減する. 第 36 回日本炎症・再生医学会、2015.7.22.「虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都・港区)」
- (13) 杉山裕一朗, 佐藤義朗, 北瀬悠磨, 鈴木俊彦, 近藤大貴, 中西圭子, 辻雅弘, 早川昌弘: 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおける由来別同種間葉系幹細胞投与の効果 第 1 報 治療効果について. 第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集会、2015.7.11.「ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)」
- (14) 杉山裕一朗, 佐藤義朗, 北瀬悠磨, 鈴木俊彦, 近藤大貴, 中西圭子, 辻雅弘, 早川昌弘: 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおける由来別同種間葉系幹細胞投与の効果 第 2 報 体内動態について. 第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集会、2015.7.11.「ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)」
- (15) 近藤大貴, 佐藤義朗, 北瀬悠磨, 杉山裕一朗, 鈴木俊彦, 中西圭子, 辻雅弘, 早川昌弘: 骨髄単核球静脈内投与は新生仔ラットの低酸素性虚血性脳障害を軽減する 第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集会、2015.7.11.「ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)」
- (16) 近藤大貴, 佐藤義朗, 杉山裕一朗, 鈴木俊彦, 北瀬悠磨, 片岡英里奈, 伊藤美春, 齊藤明子, 孫田みゆき, 村松友佳子, 辻雅弘, 中西圭子, 早川昌弘: 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおける骨髄単核球静脈内投与の治療効果. 第 59 回日本未熟児新生児学会・学術集会、2014.11.12.「ひめぎんホール (愛媛県・松山市)」
- (17) 佐藤義朗, 中西圭子, 伊藤美春, 早川昌弘: メチルキサンチンは発達脳における神経新生を抑制する. 第 37 回日本神経科学大会、2014.9.11.「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- (18) 佐藤義朗, 服部哲夫, 近藤大貴, Alkisti Mikrogeorgiou, 杉山裕一朗, 小谷友美, 辻雅弘, 中西圭子, 早川昌弘: 臍帯血細胞を用いた周産期低酸素性虚血性脳症に対する治療. 第 2 回 臍帯血による再生医療研究会学術集会、2014.7.12.「山王病院 3 階メインホール (東京都)」
- (19) 杉山裕一朗, 佐藤義朗, 近藤大貴, 鈴木俊彦, 山本徳則, 鈴木哲, 中西圭子, 辻雅弘, 早川昌弘: 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおける各種細胞別の投与後体内動態の検討. 第 13 回日本再生医療学会総会、2014.3.4.「国立京都国際会館 (京都府・京都市)」
- (20) Hattori T, Sato Y, Kondo Y, Ichinohashi Y, Suzuki S, Yamamoto M, Kotani T, Hirata H, Nakanishi K, Hayakawa M. Administration of human umbilical cord blood cells reduce hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. The 43<sup>th</sup> annual meeting of Society for Neuroscience, 2013.11.12.「San Diego (USA)」
- (21) Yamada K, Fukuhara Y, Mizuno S, Nakanishi K, Nomura N, Yamada Y, Wakamatsu N: The pathogenic mechanism of severe intellectual disability caused by MBTPS2 deficiency (BRESHECK/IFAP syndrome). The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Disease (ACIMD)/The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease (JSIMD). 2013.11.27.「Chiba (Japan)」
- (22) 山田憲一郎, 福原弥生, 中西圭子, 水野誠司, 山田裕一, 若松延昭: 海馬初代培養神経細胞を用いた MBTPS2 変異により発症する重度知的障害の病態解明. 第 86

回日本生化学会大会、2013.9.11.「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」

(23) 近藤大貴、佐藤義朗、杉山裕一郎、見松はるか、伊藤美春、齊藤明子、服部哲夫、藤巻英彦、一ノ橋祐子、中西圭子、早川昌弘：新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットを用いた移植細胞体内動態の検討。第49回日本周産期・新生児医学会学術集会、2013.7.15.「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」

(24) 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗、東雄二郎：新生児脳障害モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞投与の検討。第49回日本周産期・新生児医学会学術集会、2013.7.15.「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」

(25) 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗、東雄二郎：新生児脳障害モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞療法。第36回日本神経科学大会、2013.6.21.「国立京都国際会館（京都府・京都市）」

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 5 件）

(1) 名称：脳損傷改善剤  
発明者：大平敦彦、佐藤義朗、中西圭子、前田浩、  
権利者：愛知県および生化学工業株式会社  
種類：特許  
番号：第5279491号  
取得年月日：2013年5月31日  
(2016年5月31日愛知県は放棄)  
国内外の別：国内

(2) 名称：神経細胞の細胞死抑制剤等  
発明者：大平敦彦、佐藤義朗、中西圭子、前田浩、  
権利者：愛知県および生化学工業株式会社  
種類：特許  
番号：第5622346号  
取得年月日：2014年10月3日  
国内外の別：国内

(3) 名称：脳損傷改善剤  
発明者：大平敦彦、佐藤義朗、中西圭子、前田浩、  
権利者：愛知県および生化学工業株式会社  
種類：特許  
番号：10-1368742  
取得年月日：2014年2月24日  
国内外の別：国外（韓国）

(4) 名称：脳損傷改善剤  
発明者：大平敦彦、佐藤義朗、中西圭子、前田浩、  
権利者：愛知県および生化学工業株式会社  
種類：特許  
特許番号：2652675  
取得年月日：2013年5月21日  
国内外の別：国外（カナダ）

(5) 名称：脳損傷改善剤  
発明者：大平敦彦、佐藤義朗、中西圭子、前田浩、  
権利者：愛知県および生化学工業株式会社  
種類：特許  
番号：ZL200780027410.3  
取得年月日：2013年5月21日  
国内外の別：国外（中華人民共和国）

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
中西 圭子（NAKANISHI KEIKO）  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・主任研究員  
研究者番号：50280813

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者  
①佐藤義朗（SATO YOSHIKI）  
名古屋大学医学部附属病院・総合周産母子医療センター・新生児科・講師

②伊藤美春（ITO MIHARU）  
名古屋大学医学部附属病院・総合周産母子医療センター・新生児科・特任助教

③東雄二郎（HIGASHI YUJIRO）  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・部長

④水谷友香（MIZUTANI YUKA）  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・助手

⑤平川晃弘（HIRAKAWA AKIHIRO）  
名古屋大学医学部附属病院・先端医療・臨床研究支援センター・講師