

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860908

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた周産期脳障害の新規治療開発

研究課題名(英文) Therapeutic effect of adipose derived mesenchymal stem cell for neonatal brain injury

研究代表者

杉山 裕一郎 (Sugiyama, Yuichiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00637944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症は未だ脳性麻痺の原因であり治療が困難である。今回我々は脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を用いた新規治療法の開発に取り組んだ。ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルを作成し、静脈内に細胞投与を行ったところ、低酸素による脳受傷から早いタイミング(受傷後4時間)での細胞投与では、有意に死亡率が高かった。このため静脈内投与した細胞の動態を調べたところ、受傷から早いタイミングでの投与では肺塞栓・肺出血のリスクが高いことが判明した。また、肺障害を起こしにくいタイミング(受傷から24時間後)で投与を行っても、脳細胞の受傷所見から血清学的な効果も含めて治療効果が確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy is the main cause of cerebral palsy. We investigated the therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cell (ASC). However, administration of ASC has no effect on brain injury, and caused pulmonary embolism and hemorrhage.

研究分野：新生児

キーワード：間葉系幹細胞 安全性

1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺の主因である周産期低酸素性虚血性脳症 (hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE) は、現在のところ劇的な治療法が存在しない。周産期医療の発展により新生児の生存率は改善したが、HIE に対する唯一の確立した治療法である低体温療法は重症児には効果がなく (Gluckman PD, Lancet, 2005)、脳性麻痺などの神経学的後遺症を残す児も減少していない。人生の長い児の介護・療育にまつわる人的・社会的損失は甚大である。

我々は胎児脳由来神経幹細胞とコンドロイチン硫酸分解酵素 (コンドロイチナーゼ) の脳内同時投与による治療の効果をラットモデルで明らかにしてきた (Sato Y. Reprod Sci, 2008, Sato Y. 特許取得 第 5279491 号)。

2012 年時点での、周産期 HIE に対する細胞療法ソースは臍帯血、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) 程度しか知られていなかったが、当時新たなソースとして脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) に注目した。新生児仮死を伴う場合、本人の臍帯血や骨髄を得ることは困難である。その点、脂肪由来間葉系幹細胞は、新生児からでも採取が容易であり、しかも繰り返し採取でき、培養時間が短いということで、その利便性の良さがあるためである。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、ASC の周産機能障害に対する安全性と治療効果を確認することである。

3. 研究の方法

ASC、BM-MSC とも生後 4-5 週の GFP-Tg Wistar/ST ラットより採取・培養した。ラットをイソフルレンで安楽死させたのち、皮下脂肪および両大腿骨・脛骨を採取し、皮下脂肪はコラゲナーゼ処理し、遠心分離して得られた脂肪由来血管間質細胞群を培養して ASC を得た。採取した骨からは骨髄単核球を採取したのち培養して BM-MSC を得た。ASC、BM-MSC ともに第 3 継代細胞を使用した。

新生児 HIE モデルは同じく Wistar/ST ラットを用い、日齢 7 で吸入麻酔下に左総頸動脈を二重結紮した後切離を行い、1 時間の回復時間を取った後、60 分の 8% 低酸素負荷を行うことで作製した (Rice-Vannucci モデル)。

(1) : 細胞投与タイミング別死亡率

新生児 HIE モデルにおいて低酸素負荷後、4 時間後および 24 時間後に ASC または

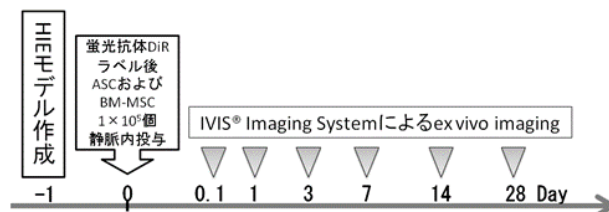
BM-MSC 1×10^5 を個静脈内投与し、投与後 24 時間以内の死亡率を算出した。

(2) : 細胞種別の急性期脳受傷改善効果、および急性期血清サイトカイン・ケモカインプロファイルの検討

新生児 HIE モデルに対し、低酸素負荷後 24 時間に、イソフルレン吸入麻酔下において PBS 0.1ml または ASC、BM-MSC を 1×10^5 個投与し、その後低酸素負荷 48 時間で、サクリフェイスを行い脳パラフィン切片を作成、免疫組織学的に患側 (左側) 海馬におけるアポトーシスマーカーである active caspase-3 の陽性細胞数を stereology を用いて評価した。また同時に右心から直接血液を採取してすぐに氷冷・遠心分離を行い血清を分離し、MILLIPLEX Rat Cytokine/Chemokine Panel (Millipore 社) を用いて血清中のサイトカイン・ケモカインを測定した。

(3) : ex vivo imaging による各種細胞種の体内動態の検討

体内動態解析実験プロトコール



低酸素負荷による脳受傷から 24 時間後に、蛍光色素 DiR で標識した ASC、BM-MSC を 1×10^5 個、右外頸静脈から投与した。その後の体内動態を ex vivo で IVIS® Imaging System により 28 日間経時的に評価した。さらに各臓器への影響を検討するため、死亡率高い低酸素負荷から 4 時間後に ASC または BM-MSC を $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個投与し、投与 15 分後に安楽死させたのち肺・肝・腎のパラフィン切片を作製して HE 染色し病理学的に検討した。

統計解析には JMP version 11 software (SAS, Cary, NC, USA) を用い、グループ間比較を Wilcoxon test、Kruskal-Wallis test、Dunn test により行った。p 値は 0.05 以下を統計学的有意とした。

4. 研究成果

(1) : 細胞投与タイミング別死亡率

低酸素負荷後 4 時間での ASC 投与では、全 14 匹中 9 匹が投与後 24 時間以内に死亡しており、低酸素負荷 24 時間後の投与に比べて有意に死亡率が高かった。低酸素負荷から 24 時間後の投与では、PBS では死亡例がなかったが、ASC、BMSC とも数例の死亡例が見られた。ASC と BM-MSC の死亡率には有意な差を認めなかった。

細胞投与後の死亡率

投与時間 (時間)	細胞種類	投与細胞数 (個)	全数	死亡数	死亡率
4h	ASC	1×10^5	14	9	64%
	BMSC	1×10^5	16	1	6%
24h	ASC	1×10^5	85	7	8%
	BMSC	1×10^5	42	2	5%
	PBS		31	0	0%

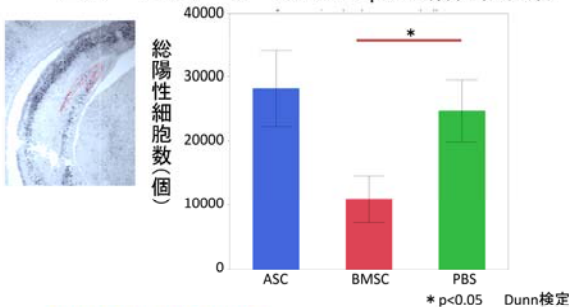
カイ2乗検定

低酸素から細胞投与までの時間を4時間とすると、脂肪由来のASC投与群の方が有意に死亡率が高かった。

(2) : 細胞種別の急性期脳受傷改善効果、および急性期血清サイトカイン・ケモカインプロファイルの検討

受傷側の海馬歯状回における active caspase-3 の総陽性細胞数はコントロール群 (n=7) 24700 ± 12800 個、BM-MSC 群 (n=7) 11000 ± 9530 個、ASC 群 (n=6) 28200 ± 16700 個であり、BM-MSC 群において有意に減少していた (p<0.05)。ASC 投与群では PBS 投与群と有意な差を認めなかった。

投与細胞別、HIEモデルラット脳海馬歯状回におけるアポトーシスマーカーActiveCaspase3陽性細胞数



BMSC投与群において有意なアポトーシスマーカー陽性細胞の減少を認めた。

MILLIPLEX Rat Cytokine/Chemokine Panel (Millipore 社) を用いた血清サイトカイン・ケモカイン測定においてもほぼ BM-MSC 群においてのみ有意な変化を認めた。BM-MSC 投与群において Macrophage

Inflammatory Proteins 1 α (MIP-1 α)、Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted(RANTES)、Fractalkine、Interferon Gamma Inducible Protein 10 (IP-10)等のマクロファージ誘導ケモカイン血中濃度が PBS 群と比べ有意に低値であった (p<0.05)。ASC 投与群では IP-10のみ PBS 投与群と比べて有意な低下を認めたが、その他のケモカインに関しては有意な差を認めなかった。また、抗炎症性サイトカイン Interleukin-2、Interleukin-4、Interleukin-12a の値は BM-MSC 群において有意に高値であった。ASC 群ではこれらのサイトカイン血中濃度に有意差を認めなかった。

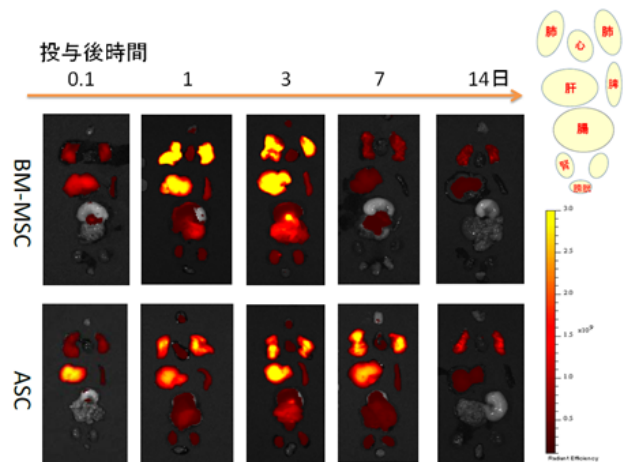
投与後24時間の血清 Multiplex結果まとめ

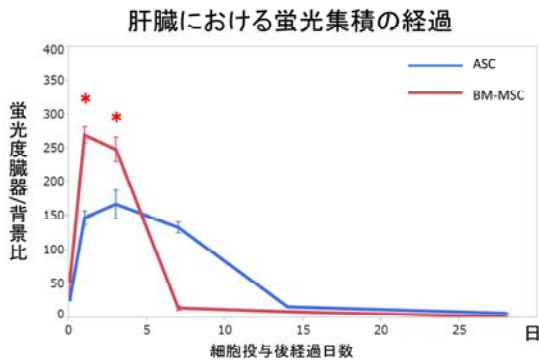
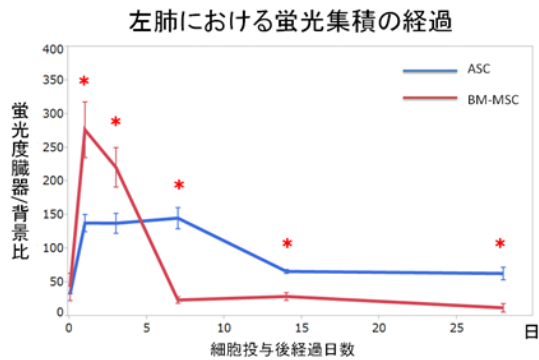
	ASC	BMSC
貪食細胞 走化性因子	CCL2 (MCP-1)	→
	CCL3 (MIP-1a)	→
	CCL5 (RANTES)	↓
	CX3CL1 (Fractalkine)	→
	CXCL1 (GRO/KC)	→
	CXCL2 (MIP-2)	↓
成長因子	CXCL10 (IP-10)	↓
	GM-CSF	→
	G-CSF	→
	EGF	→
	VEGF	→

血清の解析ではBMSC群に貪食細胞走化因子の抑制を認めた。ASCでは血清学的変化をほぼ認めず。

(3) : ex vivo imaging による各種細胞種の体内動態

投与後 1.3 日目までの肺における蛍光度の組織/背景比は ASC 138 ± 22、BMSC 277 ± 72 と BMSC の方が肺への集積が多かったが (p<0.05)、7,14 日目以降は ASC 66 ± 5、63 ± 16、BMSC 24 ± 8、29 ± 10 と ASC の方が有意に高く、ASC は肺への集積が 4 週間後まで遷延していた (p<0.05)。肝臓や腎臓では 2 週間を超えて集積が遷延することはなかった。また、脳における蛍光度は一律に低値を示していた。



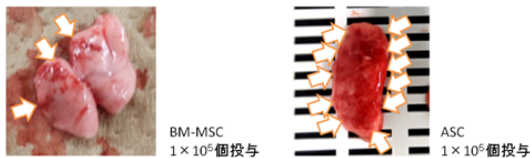


病理学的評価

低酸素負荷から4時間後に投与15分後のマクロ所見からは、特に 1×10^5 個のASC投与個体において、肺出血が強く認められた。BM-MSc投与群にも肺出血斑が認められたが、軽微であった。

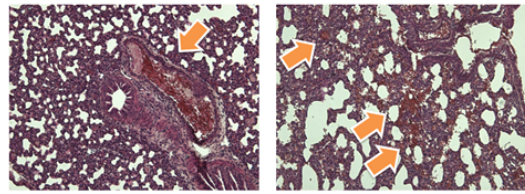
ミクロ所見では、ASC投与群の肺において、 1×10^6 個投与では大血管における細胞塊の血栓ならびにフィブリン析出を認め、 1×10^5 個では肺実質出血を強く広範に認めた。BM-MSc投与では、マクロ所見と同様少量の肺出血は認められたが、血栓や血管内のフィブリン析出は認めなかった。肝・腎には両細胞投与群とも、特に異常所見を認めなかった。

静注後15分でのマクロ肺所見



肺のマクロ所見を示す。BM-MScでも肺出血がわずかに認められるが(矢印)、ASCでは、肺全体に出血斑を認める。

ASC静注後15分でのミクロ肺所見



ASC1 $\times 10^6$ cell 静注後
HE染色 $\times 40$
大血管に細胞塞栓、および
フィブリン析出あり

ASC1 $\times 10^5$ cell 静注後
HE染色 $\times 200$
広範に肺出血を認める
びフィブリン析出あり

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2件)

1) 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. 2015;37(2):95-104 査読有り

2) Ito M, Kidokoro H, Sugiyama Y, Sato Y, Natsume J, Watanabe K, Hayakawa M. Paradoxical downward seizure pattern on amplitude-integrated electroencephalogram J Perinatol. 2014;34(8):642-4. 査読有り

[学会発表] (計4件)

1) 杉山裕一郎、佐藤義朗、北瀬悠磨、鈴木俊彦、Alkisti Mikrogeorgio、近藤大貴、中西圭子、辻雅弘、鈴木哲、山本徳則、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間葉系幹細胞療法の検討 日本再生医療学会 2016年3月19日 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

2) 杉山裕一郎、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 第1報 治療効果について 日本周産期新生児学会 2015年7月11日 ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)

3) 杉山裕一郎、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第2報
体内動態について 日本周産期新生児学会
2015年7月11日 ヒルトン福岡シーホーク
(福岡県福岡市)

4) 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

各種細胞別の新生児低酸素性虚血性脳症モ
デルラットにおける移植後体内動態の検討
日本再生医療学会 2014年3月4日 京都
国際会議場 (京都府京都市)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 裕一朗 (Sugiyama, Yuichiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00637944