

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860912

研究課題名(和文)9.4T 高磁場MRSによる脳性麻痺に対する臍帯血移植の損傷脳回復機構の解明

研究課題名(英文)Neuroregenerative effect of umbilical cord blood stem cells for hypoxia-ischemia in the neonatal mouse: a proton MRS study

研究代表者

王 飛霏(WANG, FEIFEI)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：10629033

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)：脳性麻痺に対する有望な新規治療法として、本学では『脳性麻痺患者に対する自己臍帯血幹細胞輸血による治療研究』が進められている。本研究は、9.4T 1H-MRS (Proton-Magnetic resonance spectroscopy) を用いて、新生児虚血性脳障害モデルマウスの脳における各種代謝物質を検出した。脳障害1週間後に1H-MRS測定を行ったところ、脳傷害側にてN-アセチルアスパラギン酸ピークの低下、乳酸ピークの上昇を認めた。臍帯血幹細胞群はコントロール群のPBS移植群に比べ改善傾向を示したが有為な改善は認めなかった。移植条件(時期、細胞数)など、更なる検討が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the effect of umbilical cord blood for a mouse model of neonatal ischemia-reperfusion brain injury using proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS). NOD/SCID mice (postnatal day 9) underwent right common carotid artery occlusion with an aneurysm clip. Following hypoxic exposure, reperfusion was achieved by unclamping the artery. T2 hyperintensity abnormalities reflecting tissue edema were observed in the cortex and striatum at 24 hours after injury. 1H-MRS at 1 week after injury showed a significant decrease in n-acetyl aspartate: choline ratio in the injured group compared to the control group. The umbilical cord blood cells were transplanted intravenously at 3 weeks after injury. The cell transplanted group tended to show an improvement in behavioral tests, but it was not significantly different compared with the control groups. These results showed that 1H-MRS is valuable for the diagnosis of a mouse model of neonatal brain injury.

研究分野：再生医学

キーワード：脳性麻痺 臍帯血幹細胞 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳性麻痺に対する根本的治療はなく、有効な治療法の開発・確立が望まれている。本学では、新規治療法として『小児脳性麻痺に対する自己臍帯血幹細胞輸血の治療研究』が承認され、準備が進められている。

(2) 臍帯血幹細胞は従来、白血病治療に用いられてきたが、近年では基礎研究において脳梗塞 (Borlongan *et al.*, Stroke, 2004)、脊髄損傷 (Zhao *et al.*, Cell Transplant., 2004)、心筋梗塞 (Leor *et al.*, Stem Cells, 2006) などの動物モデルに対する機能改善効果が報告されている。しかし、脳性麻痺治療としての臍帯血幹細胞治療に関しては基礎・臨床ともに、その作用機序も含め未だ不明の部分も多い。

(3) 臨床では、病理状態を示す有益な指標の一つとして¹H-MRS (プロトン MRS) が用いられている。¹H-MRS は生体に存在するプロトンの磁気共鳴を利用した非侵襲的検出方法であるが、脳性麻痺患者の¹H-MRS データは非常に少ない。これまでの報告によると、脳性麻痺患者の¹H-MRS では、頭頂-後頭皮質において正常脳組織でほとんど検出されない乳酸の存在が認められ、正常脳に比べ神経細胞マーカーである N-アセチルアスパラギン酸が低下する (Ancora *et al.*, Brain Dev., 2010)。さらに近年、¹H-MRS を用いて 1.28ppm のピーク値で脳内の内在性神経幹細胞の存在を捉えられることが示唆され (Manganas *et al.*, Science, 2007)、神経新生の新たな評価・追跡手法として注目されている。本研究では、¹H-MRS 解析を用いて、モデルマウスの経時的な脳代謝化合物の変化や神経新生の追跡により、神経再生メカニズムの解明を目指して基礎研究を行う。

2. 研究の目的

臍帯血幹細胞移植後の脳内各種代謝物の変化及び内在性神経幹細胞の動態を¹H-MRS 測定により解析し、運動機能改善に関わる機序を明らかにする。そして得られた所見から、臨床現場における治療効果の向上や有効な治療戦略の創出を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新生仔脳虚血再灌流モデルマウスの作製 生後 7 日 (Postnatal day 7, P7) の NOD/SCID マウスを顕微鏡下にて右総頸動脈をクランプ、低酸素負荷後に血流の再灌流を行った。

(2) MRI による虚血性病変部位の画像診断 上述のように作製したモデルマウスは、イソフルランにより麻酔し 9.4T MRI 装置に挿入して頭部断面を撮像した。

(3) 臍帯血幹細胞の調整、移植治療

臍帯血幹細胞 (Ficoll 分離法による単核球細胞) は、Flow cytometry (BD FACSCalibur) による表面マーカー解析 (CD34, CD45, CD4, CD8) を行った。MRI により脳障害を認めたマウスに臍帯血幹細胞を尾静脈内投与 (1×10^6 cells/100ul) する。移植細胞が追跡できるように、Q-Dot (Invitrogen) ラベリングを行った。治療コントロール群として、等量の PBS を投与した。

(4) ¹H-MRS 測定

モデル作製前・作製後に、9.4T MR 装置を用いて¹H-MRS 測定を行った。(測定条件: PRESS 法, TR=2000 ms, TE=14 ms, Averages=128)。関心領域は、虚血性病変のコア部位及びその周辺ペナンプラとした。神経幹細胞の測定でも、同様の関心領域を用いた。測定代謝物質は、N-アセチルアスパラギン酸、クレアチン、乳酸、コリンとし、データ解析は解析ソフト (VnmrJ 3.1) を用いた。

(5) 行動学的評価

モデル作製前、モデル作製後、治療 1 週間後に行動学的評価を行った。Balanced beam test (小原医科産業)、Rota-rod test (室町機械) を用いた。

(6) 組織学的評価

移植細胞の追跡では、移植治療 24 時間、3 週間後にサクリファイスを行い、各臓器を摘出し Q-dot ラベリングされた移植細胞を検出した。また、神経新生の評価では、移植後に BrdU (内在性神経幹細胞マーカー) を腹腔内投与し、移植治療 1、2、4 週間後に BrdU 染色、さらに神経細胞への分化を評価するために、NeuN, MAP2, Dcx (神経系マーカー) を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 新生仔脳虚血再灌流モデルマウスは、モデル作製 24 時間後及び 1 週間後の T2 強調画像において障害側の線条体から皮質にかけて虚血性病変を示した。¹H-MRS 測定では、脳障害から 1 週間後に N-アセチルアスパラギン酸ピークの低下、乳酸ピークの上昇を認めた (図 1-3)。

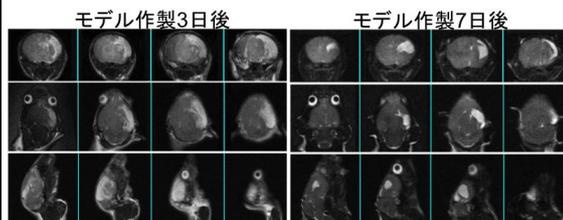


図 1 モデルマウスの MRI (T2WI)

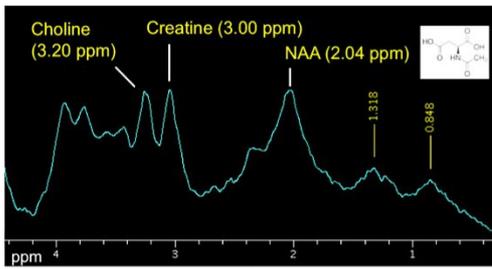


図2 正常マウスの¹H-MRS

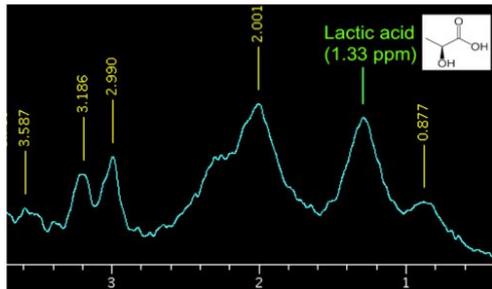


図3 モデルマウスの¹H-MRS

(2) 行動学的評価

作製したモデルマウスは、Balanced beam test、Rota-rod testにおいて、正常マウスに比べ有意な運動障害を認めた。臍帯血幹細胞群はコントロール群のPBS移植群に比べ改善傾向を示したが有意な改善は認めなかった。移植条件(時期、細胞数)など、更なる検討が必要であると考えられる(図4-6)。

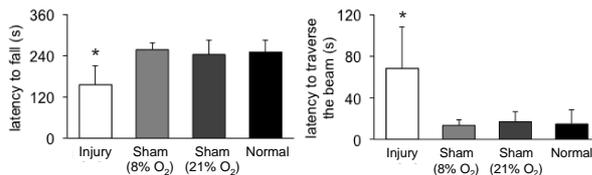


図4 Rota-rod test

図5 Balanced beam test

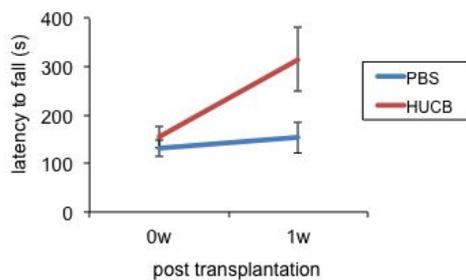


図6 臍帯血幹細胞移植後の Rota-rod test

(3) 内在性神経幹細胞の評価

モデル作製1週間後では、内在性神経幹細胞由来Dcx陽性細胞が脳室下帯から障害部位に向かって活発に遊走し、遊走した細胞は損傷部位まで到達していることが確認された(図7, 8)。

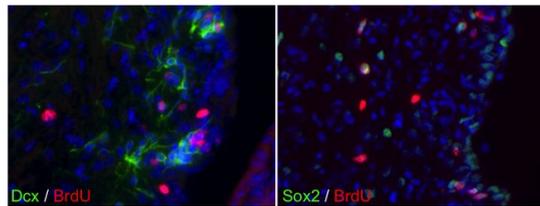


図7 脳室下帯における内在性神経幹細胞

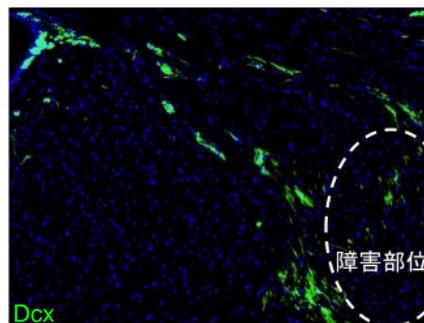


図8 障害部位に遊走するDcx陽性細胞

(4) 考察

本研究では、当初予定していた総頸動脈結紮モデルである新生仔脳症モデルマウスではなく、再灌流障害を取り入れた新生仔脳虚血再灌流モデルマウスを新たに作製し、実験に用いた。作製したモデルマウスは、活性酸素種の増加、T2強調画像での顕著な虚血性病変、運動障害を認めた。

移植した臍帯血幹細胞は、移植24時間後に脾臓、肝臓、わすかではあるが脳にて確認された。

¹H-MRSではそれぞれの脳代謝物質のピークが観測されたが、マウス1匹を測定するのに45分以上要した。はっきりとしたピークを出すためには長い積算時間が必要であるが、マウスの状態を保つための温風装置等も不可欠となる。

今後は¹H-MRSの測定方法、臍帯血幹細胞の移植時期、移植ルート、様々な点で更なる検討が必要である。

<引用文献>

Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. Stroke. 2004;35(10):2385-9.

Zhao ZM, Li HJ, Liu HY, Lu SH, Yang RC, Zhang QJ, Han ZC. Intrasplinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats. *Cell Transplant*. 2004;13(2):113-22.

Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash IM, Nagler A. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells*. 2006;24(3):772-80.

Ancora G1, Soffritti S, Lodi R, Tonon C, Grandi S, Locatelli C, Nardi L, Bisacchi N, Testa C, Tani G, Ambrosetto P, Faldella G. A combined a-EEG and MR spectroscopy study in term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Dev*. 2010;32(10):835-42.

Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enkolopov G, Maletic-Savatic M. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*. 2007;318(5852):980-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Syngeneic transplantation of newborn splenocytes in a murine model of neonatal ischemia-reperfusion brain injury.

Wang F, Shen Y, Tsuru E, Yamashita T, Baba N, Tsuda M, Maeda N, Sagara Y. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 28(7): 842-7. 査読有 doi: 10.3109/14767058.2014.935327.

Regenerative Medicine in Neurological Disorders: The Present Situation and Future Issues with Stem Cell Therapy.

Wang F. *J Neurol Disord Stroke*. 2013, 1(1): 1005. 査読有

URL: <http://www.jscimedcentral.com/NeurologicalDisorders/Articles/neurologicaldisorders-1-1005.pdf#search=%27Regenerative+Medicine+in+Neurological+Disorders%3A>

Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury. Okuma Y, Wang F, Toyoshima A, Kameda M, Hishikawa T, Tokunaga K, Sugiu K, Liu K, Haruma J, Nishibori M, Yasuhara T, Date I. *Neurosci Lett*. 2013, 25; 554:156-61. 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.058.

Neuroprotective effects of liraglutide for stroke model of rats. Sato K, Kameda M, Yasuhara T, Agari T, Baba T, Wang F, Shinko A, Wakamori T, Toyoshima A, Takeuchi H, Sasaki T, Sasada S, Kondo A, Borlongan CV, Matsumae M, Date I. *Int J Mol Sci*. 2013, 30; 14(11):21513-24. 査読有 doi: 10.3390/ijms141121513.

〔学会発表〕(計 3 件)

王 飛霏、臍帯血移植による治療メカニズムの解明はどこまで進んだか 脳性麻痺モデルマウスを用いた基礎研究を通して 第3回臍帯血による再生医療研究会学術集会、シーサイドホテル芝弥生(東京都) 2015年07月26日

王 飛霏、沈 淵、山下竜幸、馬場伸育、都留英美、津田雅之、前田長正、相良祐輔 新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスの臍帯血移植療法における内在性神経幹細胞の損傷脳再生機構 第14回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県) 2015年3月19日

王 飛霏、沈 淵、山下竜幸、馬場伸育、都留英美、津田雅之、前田長正、相良祐輔 新生仔脳虚血再灌流障害モデルマウスの確立と同種同系脾細胞の試み 第2回臍帯血による再生医療研究会学術集会、山王病院(東京都) 2014年7月12日

〔その他〕

ホームページ等

(1) 高知大学医学部先端医療学推進センター 臍帯血幹細胞研究班 <http://www.kochi-ms.ac.jp/~cbsect/>

(2) 臍帯血による再生医療研究会(UCBRM) <http://www.kochi-ms.ac.jp/~ucbrm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 飛霏 (Feifei Wang)

高知大学

教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号: 10629033