

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591617

研究課題名(和文) 新生児虚血性脳障害の新規モデルを用いた、臍帯血及び骨髄単核球による再生治療

研究課題名(英文) Umbilical cord blood cell therapies in a novel neonatal stroke model

研究代表者

辻 雅弘 (TSUJI, MASAHIRO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・再生医療部・室長

研究者番号：80579467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：既存の新生児虚血性脳障害モデルは、脳障害の程度の個体差が大きく、研究の妨げになっていた。我々はCB17という特定系のマウスを使用し、片側中大脳動脈を永久閉塞することにより、均質な脳障害を呈する新生児脳梗塞モデルの作製に成功した。

同モデルを使用し臍帯血幹細胞治療の効果を検討した。ヒト臍帯血造血幹細胞を動脈閉塞48時間後に静脈内投与したところ、形態的および行動学的脳障害の軽減を認めた。作用機序の一因として血流改善が示唆された。以上から「新生児低酸素性虚血性脳症に対する自己臍帯血幹細胞治療」の臨床試験開始に役立つ知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Currently, the rodent models of neonatal ischemic brain damage that are available exhibit significant inter-animal variability, which makes it difficult to accurately assess the mechanisms of brain injury and the efficacy of candidate treatments. By using specific mouse strain, CB-17, we succeeded in producing a novel, highly reproducible model of neonatal stroke, middle cerebral artery occlusion (MCAO).

We examined the effects of human umbilical cord blood CD34+ cells (hematopoietic stem cell/endothelial progenitor cells) in the mouse model of neonatal stroke. The stem cells were injected intravenously 48 hours after MCAO. With the cell treatment, cerebral blood flow, morphological brain damage, and behavioral alterations were significantly ameliorated compared with the control group.

After preclinical studies including this study, we have started a clinical study "Autologous cord blood cell therapy for neonatal encephalopathy".

研究分野：小児神経学

キーワード：新生児脳梗塞 新生児脳症 新生児低酸素性虚血性脳症 臍帯血 幹細胞 細胞治療 マウス 脳血流

1. 研究開始当初の背景

1) 既存の新生児虚血性脳障害モデルは、脳障害の程度の個体差が大きく、詳細な機序検討や治療効果の検討の妨げになっていた。
 2) 新生児脳障害に対する新たな治療法として幹細胞治療が注目され、特に臍帯血幹細胞治療は採取の倫理的問題や治療による危険性が極めて低く、早期の臨床応用が期待されている。しかし、臍帯血中のどの細胞が有効かは検証されておらず、単核球分画と間葉系幹細胞の投与実験しか報告されていなかった。また、技術的制約から新生児マウス/ラットモデルを用いた実験では、静脈内投与の代用として腹腔内投与が行われている。

2. 研究の目的

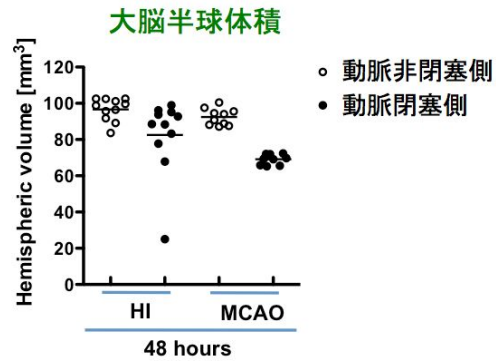
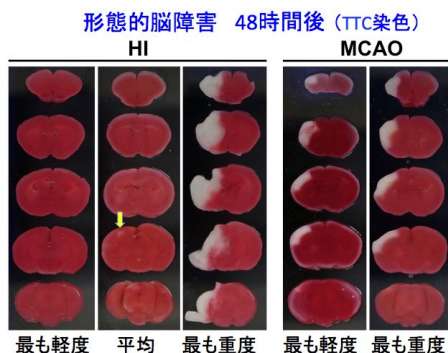
1) 脳障害の程度が均質な新規の新生児脳梗塞モデルマウスを開発すること。
 2) 上記モデルを用いて臍帯血 CD34 陽性細胞 (造血幹細胞 / 血管内皮前駆細胞) 投与の効果検討を行うこと。また、確実な静脈投与法を確立し、臨床応用時の投与経路に則して静脈内投与で細胞治療の効果検討を行うこと。

3. 研究の方法

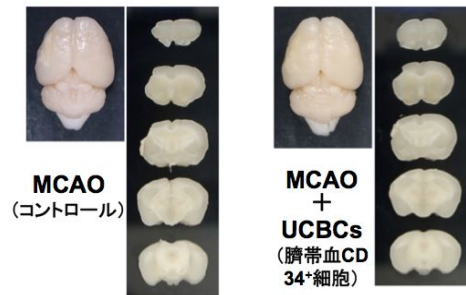
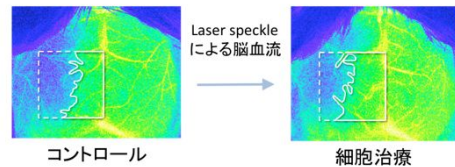
1) 頭蓋内側副血行路の個体差の少ない CB17 という特定系のマウスを使用した。日齢 12 (脳の成熟度においてヒト正期産出生 0 日齢と同等と考えられている) に頭蓋骨を空窓し、片側中大脳動脈 (MCA) を電気メスにより永久閉塞させた (MCAO)。脳血流、脳組織障害、行動障害を順次検討した。新生児脳障害研究で頻用されている低酸素性虚血性脳症 (HI) モデルとの比較を行った。
 2) 上記モデルを使用し臍帯血幹細胞治療の効果を検討した。ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を動脈閉塞 48 時間後に静脈内投与した。脳血流、脳組織障害、行動障害を検討した。

4. 研究成果

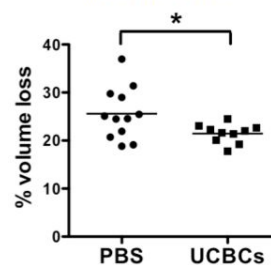
1) 全てのマウスにおいて、大脳皮質にほぼ限局した均質な脳梗塞を呈するモデルの作製に成功した。傷害側大脳半球に占める梗塞巣体積の比率は、最少の個体で 18%、最大の個体で 30%であった。長期生存率は 85%。Rotarod test や Open-field test における行動障害を呈した。このモデルを用いることにより、信頼性の高い詳細な検討が可能となると共に、使用する動物数を減らすことができる。



2) 臍帯血幹細胞投与により、形態的および行動学的脳障害の軽減を認めた。脳内に投与細胞は少数しか認めず、投与細胞が直接神経細胞に分化し神経回路を再生させた効果よりは、血流改善等の作用機序が示唆された。細胞治療による有害事象は認めなかった。



大脳半球体積の減少率 (脳傷害から7週後)



なお、静脈投与法は、大腿の皮膚を切開し、35G 針を用いて顕微鏡観察下に行うことによって確実に実施できるようになった。

以上の動物実験で得られた知見は臨床試験の立案・実施に役立つものである。これらの結果を基にして我々は最近、多施設共同で「新生児低酸素性虚血性脳症に対する自己臍帯血幹細胞治療」の臨床試験を開始した。

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 3件)

Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. *Experimental Neurology* 2013; 247C: 218-225 査読有り

Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34⁺ cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience* 2014; 263: 148-158 査読有り

Ohshima M, Taguchi A, Tsuda H, Sato Y, Yamahara K, Harada-Shiba M, Miyazato M, Ikeda T, Iida H, Tsuji M. Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia. *Brain Development* 2015; 37: 376-386 査読有り

[学会発表](計 16件)

- 1) 辻 雅弘. 低酸素性虚血性脳症と脳血流: 新生仔マウス・ラットでの検討. 第 54 回日本小児神経学会総会 札幌 5/17-19/2012
- 2) Tsuji M, Taguchi A, Kasahara Y, Ohshima M, Yamahara K, Matsuyama T, Ikeda T. Intravenous administration of human CD34⁺ cord blood cells after neonatal stroke ameliorates brain damage in a mouse model. The 8th Hershey Conference on Developmental Brain Injury. London, UK 6/5-8/2012
- 3) 辻 雅弘, 田口明彦, 笠原由紀子, 大島麻妃子, 山原研一, 池田智明, 松山知弘. 新生児脳梗塞モデルマウスに対するヒト臍帯血 CD34 陽性細胞静脈内投与の効果. 第 11 回日本再生医療学会総会 横浜 6/12-14/2012
- 4) 辻 雅弘. 再現性の高い新生児脳虚血モデルマウスの新規作成: 従来の低酸素性虚血性脳症モデルとの比較. 第 57 回日本未熟児新生児学会・学術集会 熊本 11/25-27/2012

- 5) 辻 雅弘, 大島麻妃子, 田口明彦, 笠原由紀子, 山原研一, 池田智明, 松山知弘. 新生児脳梗塞モデルマウスに対するヒト臍帯血 CD34 陽性細胞静脈内投与の効果: 第二報. 第 12 回日本再生医療学会総会 横浜 3/21-23/2013
- 6) 辻 雅弘, 大島麻妃子. 新生児虚血性脳障害モデルマウスにおける臍帯血 CD34 陽性細胞移植の効果: 第二報. 第 116 回日本小児科学会学術集会 広島 4/19-21/2013
- 7) 辻 雅弘. 再現性の高い新生児脳虚血モデルマウスの新規作成: 従来の低酸素性虚血性脳症モデルとの比較 -第二報-. 第 55 回日本小児神経学会・学術集会 大分 5/30-6/1/2013
- 8) 辻 雅弘, 池田智明. 新生仔マウスでの薬剤・細胞治療において投与経路の違いが及ぼす効果の検討: 腹腔内投与と静脈内投与の比較. 第 49 回日本周産期・新生児医学会学術集会 横浜 7/14-16/2013
- 9) Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. *Neuroscience Meeting 2013; Annual Meeting of Society for Neuroscience*. San Diego, USA 11/9-13/2013
- 10) 辻 雅弘. 幹細胞治療において投与経路・細胞の違いがもたらす体内細胞分布の差: 新生児低酸素性虚血性脳症マウスモデルでの検討. 第 58 回日本未熟児新生児学会・学術集会 金沢 11/30-12/2/2013
- 11) Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. The 9th Hershey Conference on Developmental Brain Injury. St. Michaels, Maryland, USA 6/3-6/2014
- 12) 辻 雅弘. 幹細胞静脈内投与後の体内分布: 新生児低酸素性虚血性脳症マウスと脳梗塞カニクイザルモデルでの検討. 第 56 回日本小児神経学会・学術集会 浜松 5/29-31/2014
- 13) 辻 雅弘, 圓見純一郎, 飯田秀博. MRI/PET イメージングによる低酸素性虚血性脳症の脳循環動態評価: ラットモデルでの検討. 第 50 回日本周産期・新生児医学会学術集会 浦安 7/13-15/2014
- 14) 辻 雅弘, 圓見純一郎, 森口哲朗, 越野一博, 大島麻妃子, 飯田秀博. ハイブリッド MR/PET イメージングによる小児低酸素性虚血性脳症ラットモデルの経時的解析. 第 37 回日本神経科学大会 横浜 9/11-13/2014
- 15) 辻 雅弘. 幹細胞療法の臨床応用へのみちのり シンポジウム2「HIE のこれからの治療」. 第 59 回日本未熟児新生児学会学術

集会 松山 11/10-12/2014

- 16) **辻 雅弘**. MRI/PET イメージングによる低酸素性虚血性脳症の脳循環動態と遠隔期脳障害との関連:ラットモデルでの検討 第59回日本未熟児新生児学会学術集会 松山 11/10-12/2014

〔図書〕(計 2件)

辻 雅弘, **笠原由紀子**, **田口明彦**. 再生医療の現状と将来:脳血管障害患者に対する細胞治療とその将来 *日本老年医学会雑誌* 2012; 49: 528-33

Tsuji M, Johnston MV. Cell-based therapies in neonatal stroke. p321-349. In: **Cell Therapy for Brain Injury**. Springer International Publishing, Switzerland (2015)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/regenerative_medicine/rm_008.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 雅弘 (TSUJI MASAHIRO)
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号: 80579467

(2)研究分担者

田口 明彦 (TAGUCHI AKIHIKO)
先端医療センター・再生医療研究部・部長
研究者番号: 10359276

(3)連携研究者

山原 研一 (YAMAHARA KENICHI)
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号: 50450888

飯田 秀博 (IIDA HIDEHIRO)
国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号: 30322720

圓見 純一郎 (ENMI JUNICHIRO)
国立循環器病研究センター・研究所・研究員
研究者番号: 80393205

松山 知弘 (MATSUYAMA TOMOHIRO)
兵庫医科大学・先端医学研究所 神経再生研究部門・教授
研究者番号: 10219529

早川 昌弘 (HAYAKAWA MASAHIRO)
名古屋大学・医学部 総合周産期母子医療センター新生児部門・病院教授
研究者番号: 40343206

佐藤 義朗 (SATO YOSHIAKI)
名古屋大学・医学部 総合周産期母子医療センター新生児部門・講師
研究者番号: 30435862

三島 健一 (MISHIMA KENICHI)
福岡大学・薬学部 臨床疾患薬理学・准教授
研究者番号: 00320309