

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461630

研究課題名(和文) 周産期脳障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた新規治療開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for perinatal brain injury with dedifferentiated fat cells

研究代表者

佐藤 義朗 (Sato, Yoshiaki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30435862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、周産期脳障害に対して脱分化脂肪細胞を用いた治療法開発への基礎研究を行った。新生児低酸素性虚血性脳障害モデル作製24時間後に、DFAT細胞10万個/匹を静脈内に投与した。免疫組織学的検討では、active caspase-3、ED-1、4-HNEの陽性細胞数が有意に低下した。行動試験では、回転棒試験とシリンダー試験にてDFAT治療により改善傾向を認めた。培養皮質神経細胞を用いた検討では、酸素糖欠乏による細胞死に対するDFAT条件培地(DFAT-CM)の保護効果を認めた。また、DFAT-CM中には、各種神経栄養因子が検出され、DFATを投与したモデルラット患側脳内では高値となった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to determine whether the outcome of HIE can be improved by DFAT cell treatment. 24 h after HI insult, DFAT cells were injected at 10 cells/pup into the right external jugular vein. The number of cells that stained positive for active caspase-3, ED-1, and 4-HNE decreased in the DFAT-treated group. The HI insult led to a motor deficit according to the rotarod treadmill and cylinder test, where it significantly affected the vehicle group, whereas no difference was confirmed between the DFAT and sham groups. According to in vitro experiments, the cell death rates in the DFAT-CM-treated cells were significantly lower than those in the controls. In the DFAT-CM, several neurotrophic factors, IGF-1, NGF, NT3 were detected, and these factors were increased in the ipsilateral brain after injection of DFAT. Our results indicate that intravenous injection with DFAT cells is effective for ameliorating HI brain injury, possibly via paracrine effects.

研究分野：新生児学

キーワード：低酸素性虚血性脳症 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の周産期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、生命的予後は飛躍的に改善しているが、周産期脳障害の発症率は減少しておらず、脳性麻痺の主たる原因となっている。現在のところ、有効な治療法は脳低体温療法のみであり、しかも最重症例に対しては効果が期待できない。周産期脳障害に対しての新規治療法の開発は急務である。

一方、幹細胞を用いた再生医療/細胞療法は、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。周産期脳障害に対しても動物モデルで研究が進められており、申請者ら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(コンドロイチナーゼ)の脳内同時投与が周産期低酸素性虚血性脳症(HIE)に対して有効な治療であることをラットモデルで明らかにした。近年では、採取や利用に問題が生じにくい臍帯血細胞が注目され、その有効性が示されてきている。脳内への直接投与では、投与細胞により脳正常組織のグリオシス変化をもたらすことも示されているが、臍帯血細胞は静脈内投与での効果も期待できるため臨床応用がしやすい。申請者らは、受傷後に臍帯血由来単核球を腹腔内投与したラットにおいて、急性期の酸化ストレス、アポトーシスが減少し、後の学習障害が改善することを確認している。

2. 研究の目的

上記のように、臍帯血単核球は、周産期脳障害に対する幹細胞療法の幹細胞源として期待されるが、周産期 HIE 児は分娩時仮死で出生するため自己臍帯血を採取できない例が多く、臨床応用を考えると理想的な幹細胞源とは言い難い。従って、あらかじめ準備できる幹細胞源が理想的である。

脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT) は、成熟脂肪細胞に由来する多能性幹細胞である。脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することにより得られ、骨芽細胞、血管内皮細胞、心筋細胞などへの多分化能を示す。神経系細胞への分化や神経栄養因子の分泌があることもわかってきている。その他にも、微量(1g以下)な組織採取量から、煩雑な選別操作なしで純度の高い細胞が得られる、など DFAT には優位性があり、再生医療/細胞療法用ドナー細胞として早期の臨床応用が期待できる。

本研究の目的は、臨床応用への実現可能性が高い DFAT を用い、周産期 HIE に対する新規治療の開発のための基礎的データをj得ることである。

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。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60分行い、片側の梗塞モデルを作製した。

(2) DFAT の調製

投与細胞の追跡をするために成獣 Wistar-Tg(CAG-EGFP)ラット(グリーンラット)の鼠径部の皮下脂肪組織からコラゲナーゼ処理、天井培養により調製/培養した。

(3) 静脈内投与

イソフルレン麻酔下にて、外頸静脈を露出させ、直視下にて穿刺、投与した。

(4) 治療効果評価

低酸素虚血負荷24時間後に、外頸静脈から 1×10^5 個投与した。その24時間後、免疫組織学的に、また、3週間後より行動学的検討を行った。

組織学的検討は、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定、 $5 \mu\text{m}$ のパラフィン切片を作製した。クエン酸バッファーにて抗原賦活をした後、抗 Active caspase 3 抗体、抗 ED-1 抗体、抗 4-HNE 抗体を用いて免疫組織染色を行った。陽性細胞は、 $1000 \mu\text{m}$ 離れた同部位の2切片を使用し、海馬、カウントした。

また、行動学的検討として、回転棒試験(Rotarod)、シリンダー試験を行った。

(5) 細胞培養系での検討

胎齢16日の胎仔ラット脳から神経細胞を培養し、酸素グルコース欠乏による細胞死(Oxygen glucose deprivation : OGD)を起こさせた。OGDの24時間あるいは48時間前に DFAT 条件培地(DFAT-CM)を加え、細胞死抑制を評価した。

(6) 神経栄養因子の検討

DFAT 条件培地中、および DFAT 投与後の脳内の各種神経栄養因子を ELISA 法にて測定した。

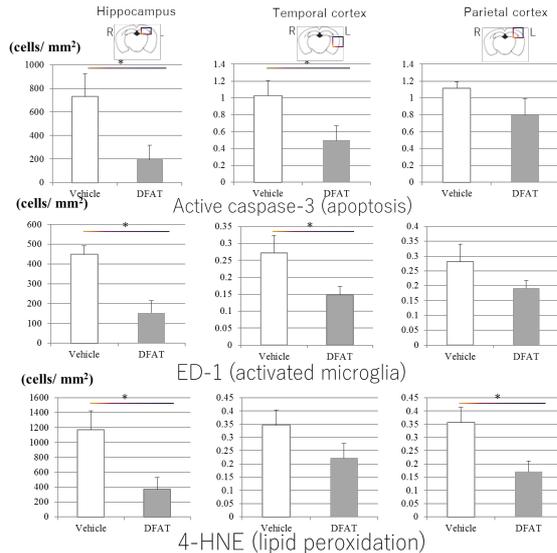
4. 研究成果

(1) ~ (3)

モデルの作製、幹細胞培養、静脈内投与は問題なく行えることを確認した。

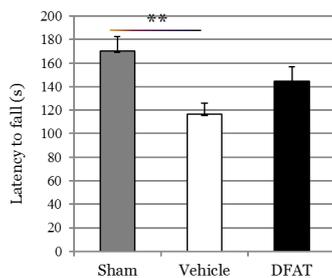
(4) 治療効果

a) 急性期評価

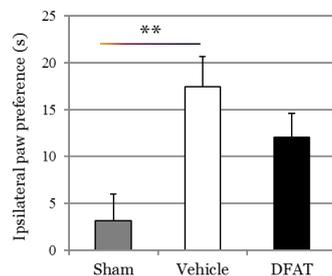


急性期の免疫組織学的評価において、DFAT を投与した群では、Vehicle 群に比べ、Active caspase 3 陽性細胞、ED-1 陽性細胞、4-HNE 陽性細胞が少なかった。DFAT 投与により、急性期のアポトーシス、ミクログリアの活性化、酸化ストレスを抑制することがわかった。

b) 行動学的評価



Rotarod (motor coordination and learning)

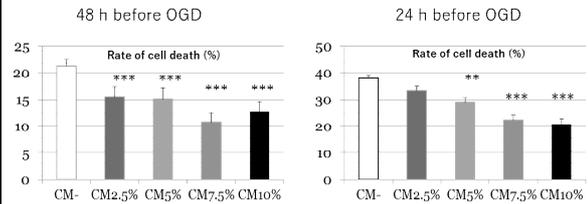


Cylinder test

回転棒試験、シリンダー試験とも DFAT

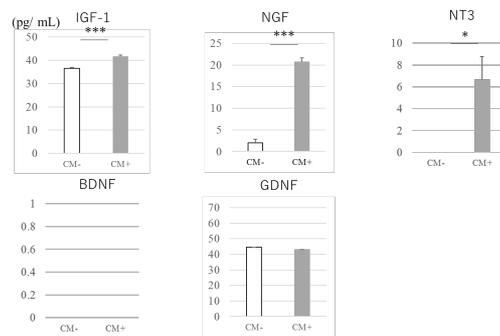
投与による改善を認めた。

(5) 細胞培養系での検討



48 時間、24 時間前投与とも DFAT-CM 投与により細胞死が抑制された。

(6) 神経栄養因子の検討



DFAT-CM 中には、IGF-1、NGF、NT3 が検出された。

また、ラットモデルで負荷後に DFAT 投与したところ、患側の IGF-1、NGF が健側より高値となった。

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 16 件)

Kato K, Kato T, Hayano S, Fukasawa Y, Numaguchi A, Hattori T, Saito A, Sato Y, Hayakawa M. Successful pneumonectomy in an infant using unilateral pulmonary arterial occlusion test. Int Heart J. 2017 in press. 査読有り
 Mikrogeorgiou A, Sato Y, Kondo T, Hattori T, Sugiyama Y, Ito M, Saito A, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Hayakawa M. Dedifferentiated Fat Cells as a Novel Source for Cell Therapy to Target Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Developmental neuroscience. 2017 in press
 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.* 2017;7:44111. 査読有り

Hattori T, Hayakawa M, Ito M, **Sato Y**, Tamakoshi K, Kanamori Y, Okuyama H, Inamura N, Takahashi S, Fujino Y, Taguchi T, Usui N. The relationship between three signs of fetal magnetic resonance imaging and severity of congenital diaphragmatic hernia. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association.* 2017;37(3):265-9. 査読有り

Ohshima M, Taguchi A, **Sato Y**, Ogawa Y, Saito S, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T, Tsuji M. Evaluations of Intravenous Administration of CD34+ Human Umbilical Cord Blood Cells in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Developmental neuroscience.* 2016;38(5):331-41. 査読有り

Ohshima M, Coq JO, Otani K, Hattori Y, Ogawa Y, **Sato Y**, Harada-Shiba M, Ihara M, Tsuji M. Mild intrauterine hypoperfusion reproduces neurodevelopmental disorders observed in prematurity. *Sci Rep.* 2016;6:39377. 査読有り

Kawashima N, Kawada JI, Nishikado Y, Kitase Y, Ito S, Muramatsu H, **Sato Y**, Kato T, Natsume J, Kojima S. Abnormal urinalysis on day 7 in patients with IgA vasculitis (Henoch-Schonlein purpura). *Nagoya journal of medical science.* 2016;78(4):359-68. 査読有り

Sato Y, Oshiro M, Takemoto K, Hosono H, Saito A, Kondo T, Aizu K, Matsusawa M, Futamura Y, Asami T, Terasaki H, Hayakawa M. Multicenter observational study comparing sedation/analgesia protocols for laser photocoagulation treatment of retinopathy of prematurity. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association.* 2015;35(11):965-9. 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(4):376-86. 査読有り

Nakano T, Kotani T, Mano Y, Tsuda H, Imai K, Ushida T, Li H, Miki R, Sumigama S, **Sato Y**, Iwase A, Hirakawa A, Asai M, Toyokuni S, Kikkawa F. Maternal molecular hydrogen administration on lipopolysaccharide-induced mouse fetal brain injury. *Journal of clinical biochemistry and nutrition.* 2015;57(3):178-82. 査読有り

Hattori Y, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Tu L, Li H, Hirako S, Ushida T, Imai K, Nakano T, **Sato Y**, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Toyokuni S, Kikkawa F. Maternal molecular hydrogen treatment attenuates lipopolysaccharide-induced rat fetal lung injury. *Free radical research.* 2015;49(8):1026-37. 査読有り

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. *Developmental neuroscience.* 2015;37(2):95-104. 査読有り

Futamura Y, Asami T, Nonobe N, Kachi S, Ito Y, **Sato Y**, Hayakawa M, Terasaki H. Buckling surgery and supplemental intravitreal bevacizumab or photocoagulation on stage 4 retinopathy of prematurity eyes. *Japanese journal of ophthalmology.* 2015;59(6):378-88. 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;263C:148-58. 査読有り

Tsuda H, Kotani T, Sumigama S, Mano Y, Hua L, Hayakawa H, Hayakawa M, **Sato Y**, Kikkawa F. Effect of placenta previa on neonatal respiratory disorders and amniotic lamellar body counts at 36-38weeks of gestation. Early human development. 2014;90(1):51-4. 査読有り
Ito M, Kidokoro H, Sugiyama Y, **Sato Y**, Natsume J, Watanabe K, Hayakawa M. Paradoxical downward seizure pattern on amplitude-integrated electroencephalogram. Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association. 2014;34(8):642-4. 査読有り

〔学会発表〕(計7件)

佐藤義朗

周産期低酸素性虚血性脳症に対する脱分化脂肪細胞を用いた新規治療法の開発
第16回日本再生医療学会総会 2017/3/7~9 仙台国際センター (宮城県仙台市)

佐藤義朗

周産期脳障害に対する幹細胞療法
日本蘇生学会第35回大会 2016/11/11~12 久留米シティプラザ (福岡県久留米市)

佐藤義朗, Alkisti Mikrogeorgiou, 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

Administration of mature adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), decreases hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats.
第36回日本神経科学大会 2016/7/20~22 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Alkisti Mikrogeorgiou, **Yoshiaki Sato**, Taiki Kondo, Yuichiro Sugiyama, Keiko Nakanishi, Masahiro Tsuji, Tomohiko Kazama, Taro Matsumoto, Koichiro Kano, Masahiro Hayakawa

Dedifferentiated fat cells as a treatment for perinatal hypoxic ischemic brain injury
10th Hershey Conference on Developmental Brain Injury, 2016/6/8-10 Paris, France.
Mikrogeorgiou Alkisti, **佐藤義朗**,

杉山裕一郎 鈴木俊彦 北瀬悠磨 近藤大貴 中西圭子, **辻雅弘**, 風間智彦, 松本太郎, 加野浩一郎, 早川昌弘

Dedifferentiated fat cells, a novel source for cell therapy to target neonatal hypoxia-ischemia
第15回日本再生医療学会総会 2015/3/17-19 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

佐藤義朗

「HIEのこれからの治療」幹細胞療法の基礎研究
第59回日本未熟児新生児学会 2014/11/10-12 ひめぎんホール (愛媛県松山市)

佐藤義朗

周産期脳障害に対する幹細胞療法
第117回日本児科学会学術集会 2014/4/11-13 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称: 多能性幹細胞による周産期脳障害の改善及び治療
発明者: **佐藤義朗**, 鈴木俊彦, 清水忍, 水野正明, 早川昌弘, 出澤真理
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: 2016-098186
出願年月日: 2016.5.16
国内外の別: 国内

名称: 多能性幹細胞による慢性肺疾患の改善及び治療
発明者: **佐藤義朗**, 鈴木俊彦, 清水忍, 水野正明, 早川昌弘, 出澤真理
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: 2016-153263
出願年月日: 2016.8.3
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

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・講師
研究者番号: 30435862

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

松本 太郎 (MATSUMOTO TARO)
日本大学・医学部・教授

研究者番号：50366580

辻 雅弘 (TSUHI 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