

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462168

研究課題名(和文) 発達脳に対する虚血および骨髄間葉系幹細胞移植の及ぼす影響の基礎的解析

研究課題名(英文) Therapeutic Effects of Intravenous Infusion of MSCs in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Rat

研究代表者

坂井 拓朗 (Sakai, Takuro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80639229

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)：本研究は、新生児低酸素性虚血性脳症の動物モデル(HIEモデル)に対して骨髄間葉系幹細胞の移植の効果を組織学的、MRI、行動学的などを用いて評価した。HIEモデルラットは、日齢7のSDラットに対して左の総頸動脈の結紮術を行い、その後8%低酸素に120分間暴露させ作成した。細胞投与群には日齢10に予め採取・培養した骨髄間葉系幹細胞を経静脈的に移植した。移植群は対照群と比較し、beam walk testでの評価で行動学的に有意な運動能力の改善を認めた。さらにMRIにおいても移植群は対照群と比較し有意に改善を認めた。組織学的評価でも詳細な検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) by histological, MRI, and behavioral analysis. At postnatal day 7, rats were underwent HI by left common carotid artery occlusion followed by 120 min hypoxia (8% oxygen). At postnatal day 10, transplantation of MSCs was performed by intravenous injection. Compared with the vehicle (control) group, the MSC infused group showed a significant improvement in athletic performance by the evaluation with the beam walk test. The MRI also demonstrated that the MSC infused group showed a significant reduction of the ischemic volume compared to the vehicle group. Collectively, intravenous infusion of MSCs might provide therapeutic efficacy in a rat model of HIE.

研究分野：新生児学

キーワード：低酸素性虚血性脳症 骨髄幹細胞 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療で用いられる幹細胞は、既存の治療法を凌駕する複数のメカニズムで治療効果を発揮することが分かってきている。その中でも特に、採取が比較的容易で、培養技術が確立している体性幹細胞である間葉系幹細胞は、骨・筋・神経などに分化することから、多疾患への臨床応用が期待され注目されている。

我々は、成体の骨髄由来の間葉系幹細胞は、脳梗塞や脊髄損傷などの実験的神経疾患モデルにおいて運動機能の改善、梗塞巣の縮小や神経脱落症状などの治療効果を有することをこれまでに数多く報告してきた。その治療効果を呈するメカニズムとして、神経栄養・保護作用、軸索損傷の再生、脱髄軸索の再有髓化、免疫調節作用、血管新生作用が関与している可能性を提唱している。

さらに、これらの基礎研究における成果を受けて、2007よりヒト脳梗塞を対象とした臨床試験（脳梗塞12症例へ自己間葉系幹細胞の静脈内移植）を行い、良好な結果を得たことより、札幌医科大学では、医師主導治験（脳梗塞：Phase III、脊髄損傷：Phase II）を実施している。

一方、今日の進歩した医療にあっても、発達脳における重症の低酸素性虚血性脳症（hypoxic ischemic encephalopathy, HIE）は、死亡率が15-25%であり、生存児の25-30%が永続的な脳障害を起こすと言われている極めて予後不良な疾患と言える。神経周産期的管理技術の向上によりその発症は減少してきているとはいえ、今なお未解決な点が多い。一旦発症したHIEに対する治療法として

は脳低体温療法を含めた集中管理が行われるが、十分な効果を得られているとは言えず、現在も様々な新たな治療法が提案されているが、現時点で臨床試験において明らかな有効性を示した治療法はほとんどない。発達脳は成熟脳に比べて、神経線維・グリアが未発達であり、新生ニューロンの産生・移動・成熟が大規模に行われるため、神経の高い可塑性を示しやすいが、虚血負荷には脆弱であるという違いがあるため、上述した骨髄間葉系幹細胞の段階的作用メカニズムを考慮すると、HIEに対する高い治療効果が期待できる。以上を踏まえ、発達脳における虚血性疾患に対する骨髄間葉系幹細胞移植による治療への期待は高まっているが、その効果メカニズムに関する基礎的データが不十分である。

2. 研究の目的

発達脳における虚血性疾患の代表であるHIEに対する動物実験において、幹細胞移植療法による治療効果の検討は、成体脳における虚血性疾患の研究と比較して、現在までにほとんど報告がない。本研究では、発達脳における虚血性疾患に対して、骨髄間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）の治療効果を検討する。我々はHIEモデルラットに対し、MSCを移植し、動物用MRI、行動学的解析、組織学的解析方法を用いて、MSCの治療効果のメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HIEモデルラットの作成

全身麻酔下の上で日齢 7 の新生 SD ラットの左総頸動脈を結紮し、その後 8 %酸素/窒素混合ガスによる低酸素環境下に 120 分間暴露させ、HIE モデルラットを作成した。日齢 8 に頭部 MRI を撮影し、虚血体積を測定し重度の虚血部位をもつラットを選択した。

(2) 実験群の設定

Group 1 : Vehicle (対照) 群 ; 培養液 (DMEM) 静脈内投与

Group 2 : 細胞移植群 ; 骨髄間葉系幹細胞静脈内投与

(3) 移植の方法

日齢 10 に無作為に vehicle(対照) 群、細胞移植群に分け、全身麻酔下の上で大腿静脈より前者には培養液 (DMEM) のみを、後者には MSC 1.0×10^6 個を静脈内投与した。

(4) 行動学的評価

Beam walk test を用いて、ラットの移動速度、平均台から脚をすべり落とす回数を測定し、運動機能を評価した。

また、Cylinder test を用いて、ラットの四肢の左右差を検討することで、運動機能を評価した。

(5) MRI

経時的に動物用 MRI (7T) を用い撮影を行った。撮影時、ラットは全身麻酔下であり、その上でラットの頭部画像解析を行った。

(6) 組織学的解析

観察期間の終了後にラットを深麻酔下で 4 %パラホルムアルデヒドにより灌流固定

し、脳組織の採取を行った。4 %パラホルムアルデヒドで後固定を行って、凍結切片の作成を行った。作成した切片の組織染色、免疫染色を各種行い、超解像共焦点顕微鏡 (ZeissLSM780, ELYRAS.1) を用いて解析を行った。

さらに投与した MSC の集積を確認する目的で、GFP トランスジェニックラットから採集・培養した MSC (GFP-MS) を定量解析する。

4 . 研究成果

(1) 運動機能の解析

Beam walk test によって、ラットの四肢の滑り落ちる回数を測定した結果、細胞移植群において、運動機能が回復し、対照群と統計学的に有意な差を認めた。

(2) MRI

全身麻酔下の上で、経時的に動物用 MRI を用いてラットの脳を撮影した。細胞移植群は、対照群と比較して画像解析上、虚血体積の有意な減少を認めた。

(3) 組織学的解析

HIE モデルラットの脳の凍結切片を用いて、ヘマトキシリンエオジン染色、くれ汁バイオレット染色、各種免疫染色などにより詳細に解析した。

また、超解像共焦点顕微鏡による解析の結果、経静脈的に移植した GFP-MS は細胞移植群のラットの脳に集積していることが明らかとなった。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 拓朗 (SAKAI, Takuro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号： 80639229

(2)研究分担者

佐々木 祐典 (SASAKI, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号： 20538136

中崎 公仁 (NAKAZAKI, Masahito)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号： 70722461

福村 忍 (FUKUMURA, Shinobu)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号： 30718341

小林 正樹 (KOBAYASHI, Masaki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号： 70592715

鰐淵 昌彦 (WANIBUCHI, Masahiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 30343388

浪岡 愛 (NAMIOKA, Ai)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号： 60748995

(平成27年4月10日より追加)

浪岡 隆洋 (NAMIOKA, Takahiro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号： 70748996

(平成27年4月10日より追加)

(3)連携研究者

本望 修 (HONMOU, Osamu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号： 90285007

(4)研究協力者

なし