

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09716

研究課題名(和文) ヒト臍帯血移植による脳性麻痺治療のメカニズム解明に向けたエクソソームの役割の検討

研究課題名(英文) The elucidation of the role of human umbilical cord blood cells derived-exosomes in therapy for cerebral palsy

研究代表者

津田 雅之 (Tsuda, Masayuki)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：90406182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳性麻痺に対する治療として自己臍帯血細胞の移植がなされているが、移植した臍帯血細胞が、脳の細胞とどのように相互作用し、機能回復させているのかは明らかにされていない。われわれは、臍帯血細胞がエクソソームを介して、脳の細胞に作用していると考えた。エクソソームの神経保護作用を評価するため、脳虚血の *in vitro* モデルとして低酸素低グルコース負荷処理をした SH-SY5Y 細胞を用いた。エクソソームは臍帯血細胞を正常または低酸素虚血脳症モデルマウスの脳組織抽出液に暴露した後に回収された。脳障害部位の抽出液に暴露されたエクソソームは、細胞の生存率を増加させ、アポトーシスによる細胞死を抑えることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Human umbilical cord blood (HUCB) cells are currently being used for autologous transplantation in the treatment of patients with cerebral palsy. However, it is unknown how HUCB cells, as a model of cell-based therapy, interact with brain parenchymal cells, and promote functional recovery. We hypothesized that HUCB cells communicate with parenchymal cells via exosomes. To investigate the neuroprotective effects of HUCB cells derived-exosomes, we used the *in vitro* oxygen-glucose deprivation (OGD) model in SH-SY5Y cells. HUCB cells were exposed to the cerebral tissue extracts from mice subjected to hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). After 48hr culture, the exosome fractions were isolated and added to OGD SH-SY5Y cells culture. We found that HUCB cells derived-exosomes exposed HIE brain extracts significantly increased the viability of and attenuated the apoptosis of SH-SY5Y cells.

研究分野：再生医学

キーワード：臍帯血 エクソソーム 脳性麻痺

1. 研究開始当初の背景

本学医学部附属病院において、脳性麻痺治療に向けた臍帯血幹細胞移植治療研究が2011年11月に厚生労働省により承認(「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」)され、臨床研究が始まった。この治療法は効果が認められるものの、そのメカニズムの詳細は不明である。われわれは治療効果メカニズムの解明とより効果の高い治療法の開発を目指して、トランスレーショナルリサーチを行っている。

われわれは脳性麻痺モデルとして学術的に汎用されている新生児低酸素虚血性脳障害モデル作製法を改良することにより独自のモデルを開発した(Wang F et al. J Matern Fetal Neonatal Med. 2015)。生後9日齢のNOD/SCID(免疫不全)マウスを用いてモデルを作製し、脳損傷3週間後にヒト臍帯血由来単核細胞を移植すると、改善効果が認められた。

脳虚血などの脳損傷における細胞移植による治癒メカニズムとして、神経再生作用、液性因子による神経保護作用、血管新生作用、炎症抑制作用、内在性の神経幹細胞の賦活化などの複数の可能性が考えられる。われわれは、モデルマウスを用いた実験で、損傷部位に局在した移植臍帯血単核細胞が内在性の神経幹細胞を賦活化し、分化した神経前駆細胞を増殖させながら損傷部位に向けて誘導していることを見出した。

2. 研究の目的

脳性麻痺に対する新規治療法として、本学医学部附属病院において日本初の脳性麻痺治療に向けた臍帯血幹細胞移植治療を開始した。有効性は認められているものの、作用メカニズムは十分に明らかにされていない。本研究では、臍帯血由来単核細胞から分泌されるエクソソームに着目し、そのエクソソームに脳障害を改善する効果があるかどうかを確かめる。さらに、エクソソームの役割を明らかに

することで、より効果的な脳性麻痺治療を目指す。

3. 研究の方法

臍帯血由来単核細胞から分泌されたエクソソームが脳性麻痺の治療効果を示すかどうかを確かめるため、神経細胞を用いた *in vitro* の系で評価した。ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y 細胞に低酸素低グルコース (Oxygen-Glucose Deprivation : OGD) による負荷を与えた後、臍帯血由来単核細胞の培養上清から超遠心法により回収したエクソソーム画分を培地に添加し、神経保護作用を評価した。さらに、脳障害部位の組織抽出液を臍帯血由来単核細胞の培養液に添加することで、障害部位に由来する刺激を与えた。刺激によるエクソソームの神経保護効果の違いを比較した。

4. 研究成果

ヒト臍帯血由来単核細胞をエクソソーム不含の血清入培地で48時間培養し、その培養上清からエクソソーム画分を回収した。回収したエクソソームは、western blot 法によるマーカー (CD9, CD63, CD81 など) 発現、電子顕微鏡による観察により確認した。単離したエクソソームによる神経保護作用の評価には、脳虚血の *in vitro* モデルを用いた。低酸素低グルコース負荷 (OGD) 処理した神経芽腫細胞株 SH-SY5Y に、単離したエクソソームを添加した後、TUNEL 染色や PI 染色などにより、細胞障害、細胞死を観察した。

エクソソーム画分の回収においては、ヒト臍帯血由来単核細胞の培養液からだけでなく、脳の障害部位に由来する刺激を単核細胞に与え、その培養液からもエクソソーム画分を回収した。具体的には、われわれの作製した脳性麻痺モデルマウスから脳を採取し、脳抽出物を培養液に添加した(培養液の1/10量)、正常マウスの脳抽出物添加や無添加群を対象とし、神経保護作用について比較した。刺激

は、脳性麻痺モデルマウスを作製後、1日、3日、1週間、3週間で脳障害部位から調整した組織抽出液を単核細胞の培養液に加えることによって行った。回収したこれらのエクソソームをOGD処置したSHSY5Y細胞の培養液に添加48時間後、細胞障害や細胞死を観察した。その結果、刺激を与えた群は未刺激群や正常脳抽出液で刺激した対照群に比べて、細胞死が抑えられた。また、脳障害後1日と3日目からの脳組織抽出液で刺激した単核細胞から得られたエクソソームで抑制効果が高かった。この結果は、臍帯血細胞を標的疾患の刺激に暴露することで、目的の治療効果をもつ分子をより多く含むエクソソームを産生させられる可能性を示唆しており、脳性麻痺治療の改善につながる成果である。

<引用文献>

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.* 28(7):842-7(2015)

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1件)

Wang F, Baba N, Shen Y, Yamashita T, Tsuru E, Tsuda M, Maeda N, Sagara Y. CCL11 promotes migration and proliferation of mouse neural progenitor cells. *Stem Cell Res Ther.* 8(1):26. (2017) 査読有
doi: 10.1186/s13287-017-0474-9.

[学会発表](計13件)

岡眞萌、馬場伸育、沈淵、山下竜幸、都留英美、津田雅之、相良祐輔、前田長正：マウス新生仔脾細胞からIgA産生細胞の選択的誘導法の検討。第17回日本再生医療学会、2018年3月21～23日、パシフィコ横浜(横

浜市)

馬場伸育、王飛霏、飯塚美知郎、高石公子、沈淵、津田雅之、山下竜幸、都留英美、宮村充彦、藤枝幹也、前田長正、相良祐輔：マウス新生仔脳虚血再灌流障害モデルに対する臍帯血細胞治療による神経再生メカニズムの検討 傷害によるケモカイン発現の変動。第5回臍帯血による再生医療研究会学術集会、2017年7月23日、宮崎観光ホテル(宮崎市)

田村友里、沈淵、馬場伸育、王飛霏、山下竜幸、都留英美、津田雅之、相良祐輔、前田長正：マウス新生仔末梢血幹細胞からNK細胞への選択的分化誘導およびその抗腫瘍活性の検討。第16回日本再生医療学会総会。2017年3月7～9日。仙台国際センター(仙台市)

山下竜幸、都留英美、王飛霏、馬場伸育、沈淵、津田雅之、前田長正、本家孝一、相良祐輔：硫酸化糖脂質サルファタイドによる間葉系幹細胞のエクソソーム分泌促進効果。第16回日本再生医療学会総会。2017年3月7～9日。仙台国際センター(仙台市)

王飛霏、馬場伸育、沈淵、山下竜幸、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により分泌されるCCL11は神経幹/前駆細胞の遊走と増殖を促進する。第16回日本再生医療学会総会。2017年3月7～9日。仙台国際センター(仙台市)

沈淵、馬場伸育、王飛霏、山下竜幸、都留英美、津田雅之、片岡佐誉、相良祐輔、前田長正：マウス新生仔末梢血を用いた移植片対宿主病抑制効果の検討。第16回日本再生医療学会総会。2017年3月7～9日。仙台

国際センター（仙台市）

山下竜幸, 仁尾景子, 矢生健一, 宮原馨, 佐藤美帆, 津田雅之, 小杉智規, 門松健治, 本家孝一: Seminolipid はセルトリ細胞の Exosome 分泌を促進して精子形成細胞へ乳酸トランスポーターMCT4 を送達する. 第 89 回日本生化学会大会. 2016年9月25~27日. 仙台国際センター（仙台市）

王飛霏, 沈淵, 山下竜幸, 馬場伸育, 都留英美, 高石公子, 飯塚美知郎, 柴垣里加子, 津田雅之, 宮村充彦, 藤枝幹也, 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における内在性神経幹細胞の遊走評価. 第4回臍帯血による再生医療研究会学術集会, 2016年7月24日, 大阪国際会議場（大阪市）

馬場伸育, 王飛霏, 高石公子, 沈淵, 津田雅之, 山下竜幸, 都留英美, 飯塚美知郎, 柴垣里加子, 宮村充彦, 藤枝幹也, 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における組織障害とヒト臍帯血細胞移植によるサイトカイン・ケモカインの発現変化. 第4回臍帯血による再生医療研究会学術集会, 2016年7月24日, 大阪国際会議場（大阪市）

山下竜幸, 仁尾景子, 矢生健一, 宮原馨, 佐藤美帆, 津田雅之, 小杉智規, 門松健治, 本家孝一: 硫酸化糖脂質 Seminolipid はセルトリ細胞の Exosome 分泌を制御する. 第57回日本生化学会中国四国支部例会, 2016年5月27~28日, 高知大学（高知県南国市）

沈淵, 馬場伸育, 王飛霏, 山下竜幸, 都留英美, 片岡佐誉, 津田雅之, 相良祐輔, 前田長正. マウス新生児血液幹細胞から機能的リンパ球の誘導(1)NK細胞の誘導とそ

の性状の解析. 第15回日本再生医療学会総会, 2016年3月17~19日, 大阪国際会議場（大阪市）

都留英美, 津田雅之, 馬場伸育, 王飛霏, 山下竜幸, 沈淵, 相良祐輔, 前田長正. 臍帯血幹細胞の未分化性維持培養の検討. 第15回日本再生医療学会総会, 2016年3月17~19日, 大阪国際会議場（大阪市）

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. 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, 2015年7月26日, シーサイドホテル芝弥生（東京都港区）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kochi-ms.ac.jp/~cbsct/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 雅之 (TSUDA, Masayuki)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授
研究者番号: 90406182

(2) 研究分担者

都留 英美 (TSURU, Emi)
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: 70380318