

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19614

研究課題名(和文) てんかん重積状態の脳傷害に対する間葉系幹細胞を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) A novel therapy using mesenchymal stem cells for brain injury caused by status epilepticus

研究代表者

西山 将広 (Nishiyama, Masahiro)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50741667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん重積状態は痙攣などのてんかん発作が持続した状態で、過剰な炎症が病態を悪化させ、不可逆的な脳傷害をきたし、高頻度に認知機能障害や難治てんかんなどの後遺症を合併するが、後遺症を防ぐ有効な治療法は未確立である。我々は、てんかん重積状態の新しい治療として間葉系幹細胞に注目して研究を行った。早産児由来の胎児付属物由来の間葉系幹細胞では正常産児由来と比べて高い増殖能を有することが明らかとなったほか、モデル動物において間葉系幹細胞により肺組織障害や炎症が抑制されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Status epilepticus is a major neurological emergency that is associated with significant morbidity and mortality. A number of treatment strategies have been attempted to improve outcomes of status epilepticus, however, there is no solid evidence for the efficacy of treatments. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been shown to have neuroprotective effects in adult animal models of many conditions such as hypoxic ischemic encephalopathy. In this research, we have clarified that the MSCs derived from human umbilical cord of preterm babies had high proliferative ability associated with WNT signaling pathways compared with those of term babies. Further, we have suggested that the lung damages and inflammation on rat model of bleomycin-induced injury was rescued by MSCs derived from human umbilical cord.

研究分野：小児科学

キーワード：mesenchymal stem cell umbilical cord lung injury inflammation status epilepticus

1. 研究開始当初の背景

てんかん重積状態は痙攣などのてんかん発作が持続した状態で、過剰な炎症が病態を悪化させ、不可逆的な脳傷害をきたし、高頻度に認知機能障害や難治てんかんなどの重篤な後遺症を合併する。てんかん重積状態の後遺症予防に有効な治療法はなく、後遺症を軽減するための安全性と汎用性の高い新たな治療方法が切望される。

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells、以下 MSCs)は傷害組織への集積・分化能、サイトカインや栄養因子産生による抗炎症・組織保護作用を発揮することが知られており、成人領域での種々の難治性疾患に対して臨床応用が試みられている。これまでの主な報告は骨髄や脂肪組織から分離された MSCs であったが、臍帯血や臍帯などの胎児付属物にも MSCs が豊富に存在することから、小児医療への臨床応用が期待される。

てんかん重積状態による脳傷害の病態には炎症と興奮毒性によるアポトーシスが強く関与しているため、MSCs は抗炎症作用と傷害組織への集積・分化能の点において有効である可能性が高い。

2. 研究の目的

新生児の胎児付属物から MSCs の分離・培養法を確立すること、胎児付属物由来の MSCs の特徴を明らかにすること、てんかん重積動物モデルを用いて、胎児付属物由来 MSCs による抗炎症効果や神経細胞死軽減効果などの有効性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

神戸大学医学部倫理委員会の承認後、神戸大学医学部附属病院で分娩を予定する妊婦において、文書による同意を得られた場合、分娩時に胎児付属物(臍帯・卵膜)を採取した。

(1) ヒト胎児付属物由来 MSCs の分離・培養
胎児付属物を物理的に粉砕し、リベラーゼを用いて細胞を単離した。間葉系幹細胞が接着細胞であるという性質から、接着培養による分離培養を行った。MSCs に特徴的な表面マーカーをフローサイトメトリーで確認した。多様な細胞になる分化能を、分化誘導特殊培養液を用いて確認した。

(2) 早産児由来の MSCs の特徴

様々な週数由来の新生児から MSCs を分離・培養し、全 RNA を抽出した後、DNA マイクロアレイシステムで網羅的遺伝子発現解析を行った。主要コンポーネント解析、および、パスウェイ解析で候補とした遺伝子について、定量的 RT-PCR にて遺伝子発現を確認した。細胞の増殖能を確認するために、Ki-67 染色による陽性細胞数の検討、MTS アッセイ

キットを用いた解析を行った。

(3) モデル動物での脳内炎症の解析
社会挫折ストレスモデルは 10 日間連続の攻撃による社会ストレスを受けたマウスを用いた。定量的 RT-PCR により炎症に関連した遺伝子発現を確認した。遺伝子発現の脳局在を解析するために、10um にスライスした脳切片を用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った。

(4) モデル動物に対する MSCs 投与の効果
カニンニン酸投与によるてんかん重積モデルラット、プレオマイシンによる急性肺障害モデルラットを用いた。MSCs の投与方法として、MSCs 細胞 1.0×10^6 個の静脈内投与を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト胎児付属物由来 MSCs の分離・培養
接着培養により、ヒトの臍帯血および臍帯由来の接着細胞の分離・培養を行った。約 1 週間後に紡錘状の接着細胞が増加したことを確認した。分離・培養された紡錘状の接着細胞に関して、CD105・CD73・CD90 が 95% 以上陽性であり、CD11b・CD14・CD19・CD34・CD79 α ・HLA-DR の陽性細胞が 5% 未満であるということを確認した(図 1)。さらに、分化誘導用特殊培養液を用いて培養することで、脂肪組織、軟骨組織、骨組織への分化を確認した(図 2)。以上により臍帯血および臍帯から分化能を有する間葉系幹細胞を得る手技が確立した。

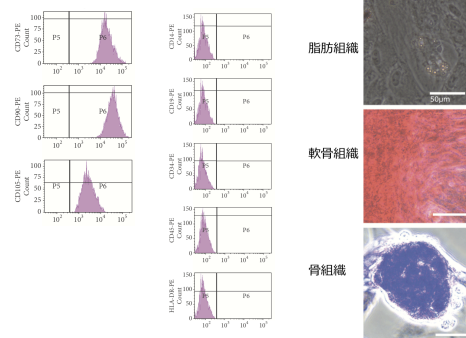


図 1 フローサイトメトリー

図 2 分化後の細胞

(2) 早産児由来の MSCs の特徴

より高い治療効果の期待できる MSCs を得るため胎児付属物由来 MSCs の特徴を解析した。胎児付属物由来 MSCs 全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイシステムにより網羅的遺伝子発現解析を行った。主要コンポーネント解析およびパスウェイ解析の結果、早産由来 MSCs では正常産由来と比べて、WNT 関連遺伝子群の発現亢進が示唆された(図 3)。定量的 RT-PCR においても早産由来 MSCs の WNT 関連遺伝子群の発現亢進を確認した。また、WNT2B と在胎週数との逆相関も示された(図 5)。さ

らに、早産児由来の MSC s では細胞増殖のマーカーである Ki-67 陽性細胞が増加すること (図 4)、培養中の細胞数増加が約 1.5 倍であったことともあわせて、早産由来 MSC s では WNT シグナル亢進に関連して高い増殖能を有することが明らかとなった。

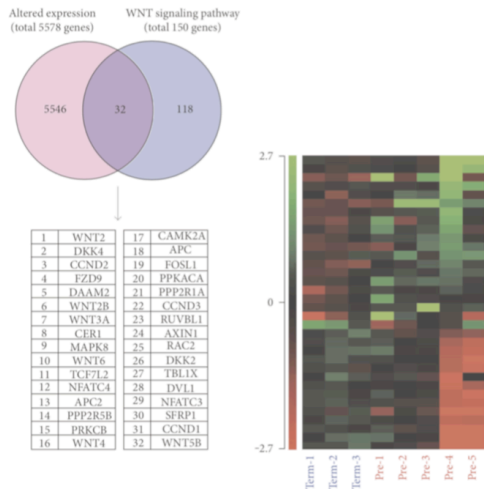


図 3 早産および正常産由来 MSCs のマイクロアレイ解析

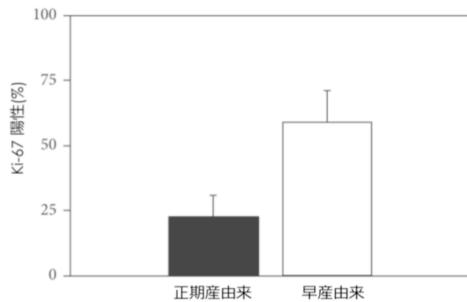
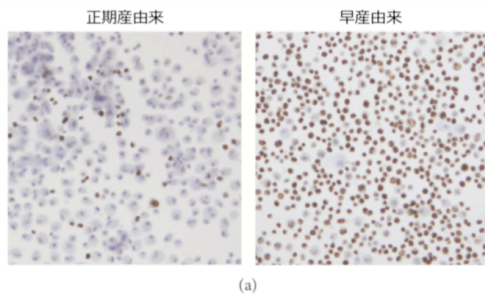


図 4 MSCs の Ki-67 染色

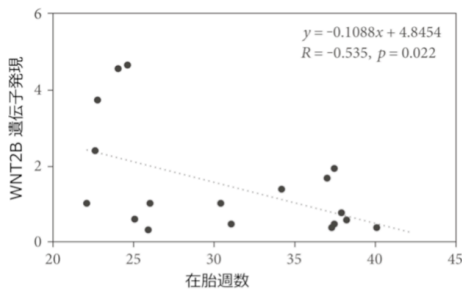


図 5 WNT2B と在胎週数

(3) モデル動物での脳内炎症の解析

てんかん重積モデル作成に難渋したため、脳内炎症が関連する他のモデル動物を用いて

炎症性サイトカインの解析を行った。反復ストレスによる社会挫折ストレスモデルマウスおよび Lipopolysaccharide (LPS) 投与マウスを対象として、炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量的 RT-PCR や in situ ハイブリダイゼーションを用いて検討した。

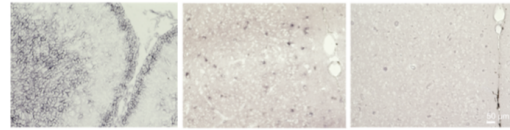


図 6 左から Reelin, P2Y12, IL1a を示す。脳内炎症との関連が報告されるミクログリアにおいて、IL1a, IL6, TNFα などの炎症性サイトカインの遺伝子発現亢進が確認されたものの、組織特異的な RNA の発現亢進を確認するには至らなかった。(図 6)

(4) モデル動物に対する MSC s 投与の効果

急性肺障害モデル動物に対して MSC s を投与し、炎症抑制効果を検討した。8 週齢の SD ラットにブレオマイシン (BLM) 気管内投与を行い、肺障害を誘導した。3 日後に MSCs または PBS を投与して、21 日後の肺組織像を検討した。

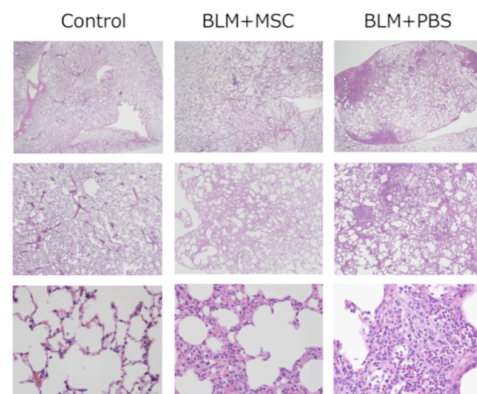


図 7 肺障害 21 日後の組織像

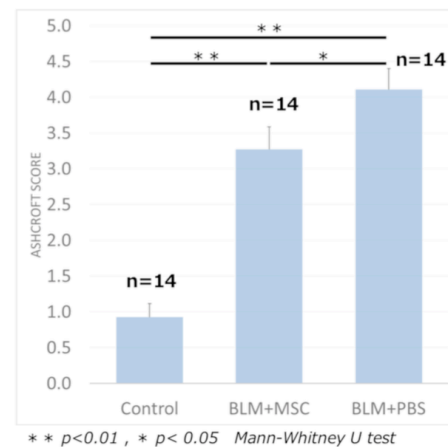


図 8 線維化や炎症細胞浸潤のスコアリング

BLM により惹起された線維化や炎症性細胞浸潤は、MSCs 投与により抑制されることが明らかとなった。(図 7, 8)

以上のように、研究期間に、ヒト胎児付属物由来 MSC s の分離・培養法の確立、早産児由来 MSC s の特徴、モデル動物を用いた脳内炎症の病態の解析、モデル動物を用いた MSC s 投与の有効性の検討を行った。炎症病態のさらなる解析、種々のモデル動物および実際の臨床における MSC s 投与効果の検証が今後の課題である。

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 6 件)

- ① Nishiyama Masahiro, Nagase Hiroaki, Tanaka Tsukasa, Fujita Kyoko, Kusumoto Mayumi, et al. Short and long-term outcomes in children with suspected acute encephalopathy. *Brain Dev.* 38, 731-737 (2016) 査読有
- ② Nishiyama Masahiro, Nagase Hiroaki, Matsumoto Masaaki, Tomioka Kazumi, Awano Hiroyuki, et al. Clinical features in very early-onset demyelinating disease with anti-MOG antibody. *Brain Dev.* 39, 756-762 (2017) 査読有
- ③ Sasaki Kaori, Nagase Hiroaki, Maruyama Azusa, Fujita Kyoko, Nishiyama Masahiro, et al. Clinical prediction rule for neurological sequelae due to acute encephalopathy: a medical community-based validation study in Harima, Japan. *BMJ Open.* E016675-e016675 (2017) 査読有
- ④ Yamaguchi Hiroshi, Nagase Hiroaki, Ishida Yusuke, Toyoshima Daisaku, Nishiyama Masahiro, et al. Diurnal occurrence of complex febrile seizure and their severity in pediatric patients needing hospitalization. *Epilepsy Behav* 80, 280-284 (2018) 査読有
- ⑤ Tomioka Kazumi, Nagase Hiroaki, Tanaka Tsukasa, Nishiyama Masahiro, Yamaguchi Hiroshi, et al. Early risk factors for mortality in children with seizure and/or impaired consciousness accompanied by fever without known etiology. *Brain Dev Epub ahead of print* (2018) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 岩谷壮太、黒川大輔、西山将広ら、臍帯由来間葉系幹細胞における児の在胎週数による転写制御解析、第 15 回日本再生医療学会、2016 年 3 月 17 日-19 日、大阪国際会議場(大阪府)
- ② 西山将広、永瀬裕朗、丸山あずさ: シンポジウム「急性脳症の治療戦略」三次救急医

療施設における脳炎脳症の治療戦略-治療内容と治療開始時期の選択-、第 59 回日本小児神経学会学術集会、2017 年 6 月 15 日-17 日、大阪国際会議場(大阪府)

- ③ 西山将広、永瀬裕朗、石田悠介ら: 有熱性けいれん重積症例における AESD および急性脳症鑑別のための AESD prediction score の有用性の検証、第 59 回日本小児神経学会学術集会、2017 年 6 月 15 日-17 日、大阪国際会議場(大阪府)
- ④ Nishiyama Masahiro, Nagase Hiroaki, Ishida Yusuke, et al. Comparison of the efficacy and complications of fosphenytoin versus continuous midazolam in children with febrile status epilepticus. 14th Asian and Oceania Congress of Child Neurology, Fukuoka Convention Center (Fukuoka), Japan, May 11 to 14, 2017
- ⑤ Tomioka Kazumi, Nagase Hiroaki, Nishiyama Masahiro, et al. Case series of fatal acute encephalopathy. 14th Asian and Oceania Congress of Child Neurology, Fukuoka Convention Center (Fukuoka), Japan, May 11 to 14, 2017
- ⑥ 岩谷壮太、山名啓司、西山将広ら、臍帯由来間葉系幹細胞における児の在胎週数による転写制御解析、第 16 回日本再生医療学会、2017 年 3 月 7 日-9 日、仙台国際センター(仙台)
- ⑦ 山名啓司、岩谷壮太、西山将広ら、ブレオマイシン誘発肺障害モデルラットにおける臍帯由来間葉系幹細胞の効果、第 16 回日本再生医療学会、2017 年 3 月 7 日-9 日、仙台国際センター(仙台)

[図書] (計 1 件)

西山将広、永瀬裕朗: 第 9 章 救急医療 けいれん重積、意識障害、改訂第 2 版 小児科診断・治療指針、中山書店、247-250、2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 将広 (NISHIYAMA Masahiro)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50741667

(2) 連携研究者

岩谷 壮太 (IWATANI Sota)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00741430

山名 啓司 (YAMANA Keiji)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80792936