

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16297

研究課題名（和文）胎児発育不全に対する新規細胞療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel cell therapy for fetal growth restriction

研究代表者

伊藤 美春 (Ito, Miharuru)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：60570083

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）：本研究の目的は、Muse細胞（Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell）を用いて胎児発育不全（FGR）の中樞神経障害に対する新規治療法を開発することである。本研究において、アメロイドコンストリクター（AC）を使用し、再現性のよいFGRモデルを作製した。このモデルを使用し、日齢4にMuse細胞、nonMuse細胞、あるいは媒体を投与し、各種行動評価を行った。FGRモデルでは、運動障害、認知障害を認めたが、Muse細胞投与によりこれらの障害は改善した。また、その効果はnonMuse細胞では乏しかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGRの重要な問題点として神経発達障害があるが、それに対し予防法や治療法はない。本研究では、Muse細胞に着目し新規治療法を開発を試みた。Muse細胞を投与することにより、FGRモデルに認めた運動障害、認知障害が改善した本研究の結果は、これまで治療がなかったFGR神経発達障害に対して大きなインパクトを与えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop a novel treatment for neurological disability in fetal growth restriction using Muse cells (multi-lineage differentiating stress enduring cells).

In this study, an ameroid constrictor (AC) was used to produce a reproducible novel FGR model. The FGR model showed motor and cognitive deficits, and these deficits were ameliorated by treatment with muse cells. However, the effect was not enough in nonMuse cells treatment.

研究分野：新生児医学

キーワード：胎児発育不全 幹細胞 神経発達障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎児発育遅延 (fetal growth restriction: FGR) の原因の一つに、妊娠中期発症の妊娠高血圧症候群 (hypertension due to pregnancy: HDP) がある。HDP に起因する FGR では、胎盤を介した「低酸素血症、栄養障害」などの慢性的な要因が複合的に作用し神経学的後障害をきたす。FGR 児は増加傾向にあるが、その神経学的後障害の治療法は確立されておらず、新規治療法の開発は急務の課題である。FGR の中枢神経障害に関して、我々は合成トロンボキササン A₂ (synthetic thromboxane A₂: STA₂) を用いた FGR モデルを開発し (Hayakawa M. *J Society Gynecol Invest* 2006)、神経細胞の遊走遅延 (Sasaki J. *Early Hum Dev* 2001)、神経栄養因子の発現低下 (Fukami E. *Early Hum Dev* 2001)、脳内特異的コンドロイチン硫酸の低下 (Saito A. *Exp Neurol* 2009) などが神経障害の病態の一部であることを解明した。しかしながら、未だ神経学的予後改善に関する管理法・治療法についての報告はない。

2. 研究の目的

中期～長期的に SGA 児が抱える問題点としては、神経学的後障害以外に乳児期～幼児期の成長障害があげられる。SGA 性低身長に対する治療として、本邦においては 2008 年に成長ホルモン (GH) 療法が承認されたが、身体発育と中枢神経予後との報告は散見されるのみである。我々はこれまで、新生児低酸素性虚血性脳症などに対して神経幹細胞 (Sato Y. *Reprod Sci* 2008、Sato Y. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009、Sato Y. *Cell Death Dis* 2013) や臍帯血幹細胞 (Hattori T. *Dev Neurosci* 2014) の有効性を報告してきた。近年、幹細胞を用いた細胞療法は様々な疾患で研究され臨床応用されつつあり、我々は今回、我々は FGR の中枢神経障害に対しても幹細胞療法が有効な治療法である可能性に着目した。以上より、重症 SGA 児が抱える成長障害と発達障害の双方を回避できる治療方法を確立するための治療法の開発を目的として、Muse 細胞 (Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell) を用いて FGR に対する有効性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) FGR モデル作製と細胞投与

FGR の中枢神経障害に関して、我々は合成トロンボキササン A₂ (synthetic thromboxane A₂: STA₂) を用いた FGR モデルを開発し、このモデルはヒト HDP の病態をよく反映し、FGR における中枢神経障害の病態解明に大きく貢献したが、モデル作製成功率が高くないことが難点であった。研究を効率よく進めるために、アメロイドコンストリクター (amerooid constrictor: AC) を子宮動脈周囲に装着することによる FGR モデルを開発した。AC は吸水すると緩徐に膨張する特徴を持つガゼインを含んでいる。本モデルは、AC 装着により緩徐に子宮動脈の血流を低下させることで「ヒト PIH に類似した病態」をつくり、FGR を誘導する。実際には SD 系ラットの母獣で、妊娠 17 日目に開腹し、4 か所の子宮動脈剥離後 AC を装着し、閉腹し妊娠を継続させる。虚血再灌流により胎仔に子宮内発育不全を誘導する。はじめに、AC の子宮に対する血流制限の効果判定として妊娠 17 日齢で AC 装着後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に開腹し、組織血流計の ω zone を使用して継時的に血流量を測定した。次に、新生仔期、幼仔期における検討を行うため通常経膈分娩にて分娩とし、母獣に哺育させた。コントロール群は、開腹して子宮を体外に出すが子宮動脈に AC は装着せず、FGR 群と同じ時間経過後に閉腹した。出生した FGR モデルラットの生後 4 日目に、右頸静脈より Muse 細胞を 1×10^4 個 (Muse 群) Muse 細胞以外の間葉系幹細胞 1×10^4 個 (nonMuse 群) あるいは、溶媒 (HBSS:

Hank's Balanced Salt Solution、Vehicle 群) を投与した。

(2) 行動解析

新生児期の反射獲得：生後 8 日 (P8) から 11 日 (P11) に行った。

・ Negative geotaxis：30 度の傾斜板に頭を下に向けて置かれたラットが、反転して昇り出すまでの時間 (秒) を測定し、0-5 点に点数化。0 = 無反応、1 = 60 秒以内に達成できない、または中途落下、2 = 60 秒未満で達成、3 = 45 秒未満で達成、4 = 30 秒未満で達成、5 = 15 秒未満で達成。

幼若齢での行動：離乳後の雄ラットにつき、生後 4-20 週齢で行動実験を行った。

・ Rotarod treadmill：4 rpm から 40 rpm へと加速する回転棒 (Med Associates Inc.) にラットを乗せ、落ちるまでの時間を測定。最大 300 秒間。3 時間空けて、1 日 2 回×連続 2 日間施行した。

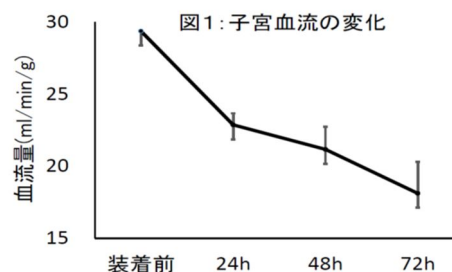
・ Novel objective recognition test：閉鎖空間に同一の構造物を 2 個設置し、一定期間記憶させ、その空間から一旦離脱させた後に、先ほどの構造物の片方を異なる構造物に置き換える。その後記憶した構造物と新規の構造物を認識する回数を比較検討した。

・ Y-maze test：同じ大きさの 3 本のアームが 120° で連結された装置を使い、自由に 8 分間移動させ、マウスのアームへの進入回数を記録した。アームへの総進入回数のうち、3 回連続して異なるアームへ進入した回数の割合を算出し、空間作業記憶 (ワーキングメモリー) を評価した。

4. 研究成果

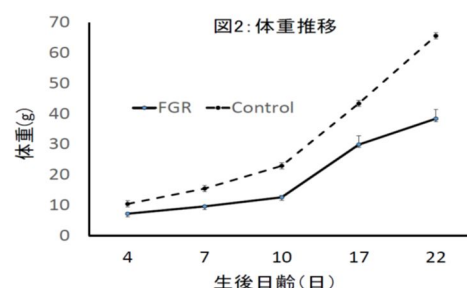
(1) 子宮血流の変化

はじめに AC の子宮に対する血流制限の効果判定として妊娠 17 日齢で AC 装着後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に開腹し、組織血流計の ω zone を使用して継時的に血流量を測定した。子宮血流量は、装着前 $29.4 \pm 0.8 \text{ ml/min/100g}$ (46.0 ± 4.8)、24 時間後 $22.9 \pm 1.6 \text{ ml/min/100g}$ (46.0 ± 4.8)、48 時間後 $21.2 \pm 2.2 \text{ ml/min/100g}$ (46.0 ± 4.8)、72 時間後 $18.1 \pm 0.3 \text{ ml/min/100g}$ (46.0 ± 4.8) と段階的に減少した (図 1)。



(2) 出生体重の変化

次に新生仔期、幼仔期における検討を行うため通常経膈分娩にて分娩とし、母獣に哺育させ飼育させた。sham 群は、開腹して子宮を体外に出すが子宮動脈に AC は装着せず、FGR 群と同じ時間経過後に閉腹した。出生した FGR の体重推移は出生後の体重推移：日齢 4：FGR 群 $7.2 \pm 0.2 \text{ g}$ 、sham 群 $10.4 \pm 0.4 \text{ g}$ 、日齢 7：FGR 群 $9.6 \pm 0.2 \text{ g}$ 、sham 群 $15.46 \pm 0.6 \text{ g}$ 、日齢 10：FGR 群 $12.6 \pm 0.7 \text{ g}$ 、sham 群 $22.9 \pm 0.7 \text{ g}$ 、日齢 17：FGR 群 $29.9 \pm 2.9 \text{ g}$ 、sham 群 $43.4 \pm 1.1 \text{ g}$ 、日齢 22：FGR 群 $38.4 \pm 3.1 \text{ g}$ 、sham 群 $65.6 \pm 1.4 \text{ g}$ であり、有意に FGR 群の体重が軽かった (図 2)。



(3) 行動評価

Negative geotaxis 試験

Negative geotaxis 試験を日齢 8~11 で行った。4 日間の平均値を比較したところ、AC 内径 0.45mm : sham 群 3.1 ± 0.1 , vehicle 群 2.6 ± 0.1 , Muse 投与群 3.4 ± 0.2 , nonMuse 投与群 2.9 ± 0.2 (sham vs vehicle, $p < 0.05$, Muse vs vehicle $p < 0.001$, Muse vs nonMuse $p < 0.05$) (図 3)

内径 0.40mm : sham 群 3.7 ± 0.1 , vehicle 群 2.5 ± 0.2 , Muse 投与群 3.8 ± 0.2 , nonMuse 投与群 3.3 ± 0.3 (sham vs vehicle, $p < 0.001$, Muse vs nonMuse $p < 0.01$) (図 4) との結果となり、Muse 細胞の有効性が明らかになった。

AC 内径 0.40mm と 0.45mm を使用し、機能改善の評価として、生後 1, 5 カ月で rotarod 試験、open field 試験をまた、1 カ月に Y-maze 試験を行った。

Rotarod 試験

rotarod 試験による評価 4 回の平均値を比較した。1 カ月、5 カ月とも、また、AC 内径 0.40mm と 0.45mm とも、Muse 細胞投与による有意な改善を認めた。

生後 1 か月

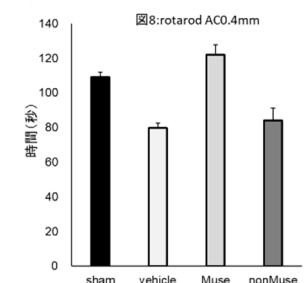
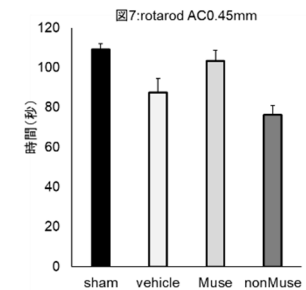
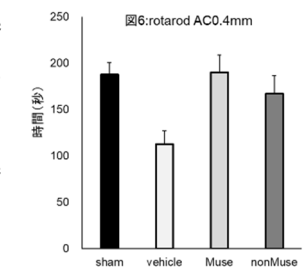
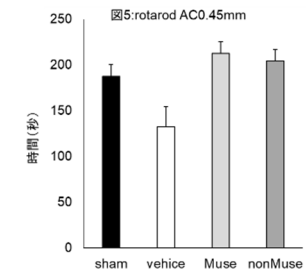
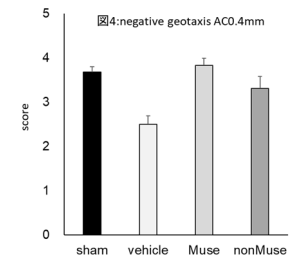
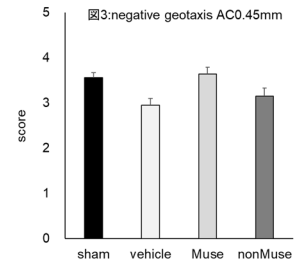
内径 0.45mm : sham 群 187.6 ± 9.9 秒, vehicle 群 132.5 ± 22.2 秒, Muse 投与群 212.4 ± 13.5 秒, nonMuse 投与群 204.7 ± 12.3 秒 (Muse vs vehicle, $p < 0.01$, nonMuse vs vehicle $p < 0.05$) (図 5)

内径 0.40mm : sham 群 187.6 ± 12.9 秒, vehicle 群 112.7 ± 14.1 秒, Muse 投与群 190.1 ± 18.4 秒, nonMuse 投与群 167.0 ± 19.9 秒 (sham vs vehicle, $p < 0.05$, Muse vs vehicle $p < 0.05$) (図 6)

生後 5 か月

内径 0.45mm : sham 群 99.8 ± 4.1 秒, vehicle 群 87.6 ± 6.7 秒, Muse 投与群 103.4 ± 5.2 秒, nonMuse 投与群 76.3 ± 4.8 秒 (sham vs vehicle, $p < 0.05$, sham vs nonMuse $p < 0.001$, Muse vs nonMuse $p < 0.01$) (図 7)

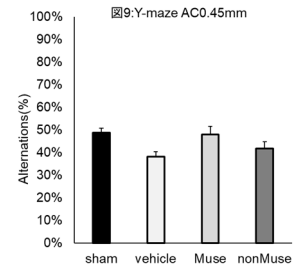
内径 0.40mm : sham 群 109.0 ± 3.0 秒, vehicle 群 79.7 ± 2.8 秒, Muse 投与群 122.1 ± 5.8 秒, nonMuse 投与群 84.0 ± 7.2 秒 (sham vs vehicle, $p < 0.001$, sham vs nonMuse $p < 0.001$, Muse vs vehicle $p < 0.001$, Muse vs nonMuse $p < 0.001$) (図 8)



Y-maze 試験

生後 1 ヶ月

内径 0.45mm : sham 群 $46.0 \pm 1.7\%$, vehicle 群 $38.2 \pm 2.2\%$, Muse 投与群 $48.1 \pm 3.5\%$, nonMuse 投与群 $42.0\% \pm 2.9\%$ (sham vs vehicle, $p < 0.05$, Muse vs vehicle $p < 0.05$)(図 9)



Open field 試験

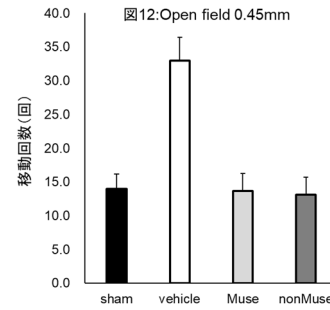
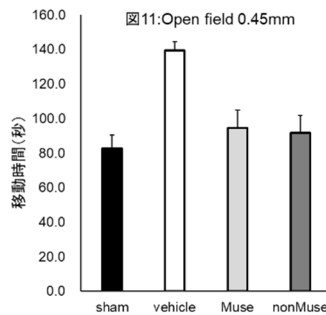
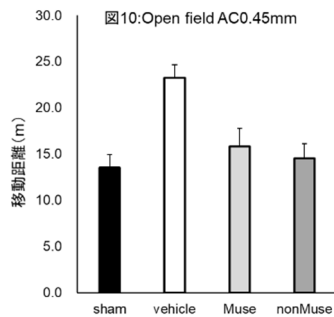
Muse 投与群, nonMuse 投与群で有意な改善を認めた。

内径 0.45mm 生後 5 ヶ月

・移動距離 : sham 群 $13.3 \pm 1.3m$, vehicle 群 $23.3 \pm 1.4m$, Muse 投与群 $15.8 \pm 1.9m$, nonMuse 投与群 $14.6 \pm 1.6m$ (sham vs vehicle, $p < 0.001$, Muse vs vehicle $p < 0.05$, Muse vs nonMuse $p < 0.01$)(図 10)

・移動時間 : sham 群 83.8 ± 7.5 秒, vehicle 群 139.5 ± 4.8 秒, Muse 投与群 205.3 ± 9.9 秒, nonMuse 投与群 91.8 ± 9.9 秒 (sham vs vehicle, $p < 0.001$, Muse vs vehicle $p < 0.01$, Muse vs nonMuse $p < 0.01$)(図 11)

・中心 ~ 周辺領域移動回数 : sham 群 13.1 ± 1.7 回, vehicle 群 33.0 ± 3.4 回, Muse 投与群 13.7 ± 2.5 回, nonMuse 投与群 13.1 ± 1.5 回 (sham vs vehicle, $p < 0.001$, Muse vs vehicle $p < 0.001$, Muse vs nonMuse $p < 0.001$)(図 12)



以上のことから FGR モデルに対する幹細胞療法について、Muse 細胞は長期的な行動への改善効果が多岐にわたり認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Terui Keita, Usui Noriaki, Tazuke Yuko, Nagata Kouji, Ito Miharuru, Okuyama Hiroomi, Hayakawa Masahiro, Taguchi Tomoaki, Sato Yasunori, Yoshida Hideo	4. 巻 61
2. 論文標題 Impact of nutrition in the treatment of congenital diaphragmatic hernia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 482 ~ 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hyodo Reina, Sato Yoshiaki, Ito Miharuru, Sugiyama Yuichiro, Ogawa Chikako, Kawai Hisashi, Nakane Toshiki, Saito Akiko, Hirakawa Akihiro, Kidokoro Hiroyuki, Natsume Jun, Hayakawa Masahiro	4. 巻 103
2. 論文標題 Magnetic resonance spectroscopy in preterm infants: association with neurodevelopmental outcomes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition	6. 最初と最後の頁 F238 ~ F244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/archdischild-2016-311403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Keiko, Sato Yoshiaki, Mizutani Yuka, Ito Miharuru, Hirakawa Akihiro, Higashi Yujiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Rat umbilical cord blood cells attenuate hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 44111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep44111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mikrogeorgiou Alkisti, Sato Yoshiaki, Kondo Taiki, Hattori Tetsuo, Sugiyama Yuichiro, Ito Miharuru, Saito Akiko, Nakanishi Keiko, Tsuji Masahiro, Kazama Tomohiko, Kano Koichiro, Matsumoto Taro, Hayakawa Masahiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Dedifferentiated Fat Cells as a Novel Source for Cell Therapy to Target Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 273 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000455836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----