

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10731

研究課題名(和文) 頭部外傷うつ病モデルラットに対する細胞移植と運動刺激の併用療法の検討

研究課題名(英文) Combination treatment of stem cell and exercise therapies in a Wistar Kyoto rat model of traumatic brain injury

研究代表者

田尻 直輝(TAJIRI, NAOKI)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：80782119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、軽症型の脳室周囲白質軟化症(PVL)の病態を良く反映する新生児低酸素虚血性白質障害(NWMI)モデルラットを確立し、PVLの根本的治療法の開発を目指している。本研究では、この疾患モデル動物を用いて、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)移植と免疫抑制剤を併用することで、移植OPCの生存・生着・分化・成熟率の増加と運動機能の改善効果を示した。また、NWMIモデルラットに対する長期の豊かな環境飼育(EE)により、運動機能改善、運動皮質菲薄化の軽減、運動マップの正常化、オリゴデンドロサイトの分化促進、ミエリン形成及びランビエ絞輪の長さの正常化が認められ、有意な改善効果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳室周囲白質軟化症(PVL)は、発達途上のオリゴデンドロサイト後期前駆細胞(pre-OL)の選択的な虚血脆弱性その原因疾患であるため、細胞移植の適応に期待が持てる。すなわち、脳内の1種類の細胞(オリゴデンドロサイト前駆細胞；OPC)が特異的に障害を受けるため、外部からOPCを補充し、運動刺激を加えることで、発達の個体が元来有する再生能との相乗的作用によって、失われた機能の再獲得に繋がる可能性が高い。我々研究グループが確立した軽症型PVL病態を反映するモデル動物を用い、細胞移植とリハビリの併用は、実臨床における再生医療の効果をさらに高めていく上で、我々の基礎研究データは大変重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia-ischemia (H-I) in preterm infants occasionally results in neonatal white matter injury (NWMI) associated with neurodevelopmental disabilities such as paralysis and cognitive dysfunction. To find out new effective treatment for NWMI, we are challenging cell therapy to NWMI model using oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) as well as focusing on the enriched environment (EE). In study 1, we investigated whether the grafted OPCs can promote motor function in NWMI model via immunosuppressant. In study 2, we examined whether EE could improve the motor dysfunction caused by NWMI, and change the microenvironment. Our data suggest that OPC transplantation during the period of development has a potency to improve deteriorated motor function and increased cell survival and cell differentiation rate of grafted cells in the NWMI model. Also, we clarified that long-term EE rearing in NWMI model, is one of treatments that can promote brain development.

研究分野：脳神経科学

キーワード：新生児低酸素虚血性白質障害 運動機能 ミエリン形成 神経細胞樹状突起 シナプス
オリゴデンドロサイト前駆細胞移植 サイクロスポリンA 豊かな環境飼育

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究実施計画では当初、頭部外傷うつ病動物モデルラットを用いて、細胞移植及びリハビリの有する神経・血管新生作用と神経保護・修復作用について研究する予定であった。しかし、所属先が異動となったため、頭部外傷うつ病モデルラットの作製が困難となった。その代案として、研究のコンセプトは変更せずに、医療ニーズが極めて高い新生児低酸素虚血性白質障害 (NWMI) を用いた細胞移植とリハビリテーション (以下、リハビリ) の研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

在胎 32 週以下の早産児に生じる脳性麻痺では、脳室周囲白質軟化症 (PVL) が多い。発達段階の中枢神経系の未熟性に、低酸素虚血 (H-I) が加わり、脳室周囲の白質が障害されることが、PVL の基本病態であると考えられている。PVL の病態は、H-I に対する未熟脳の反応性と正常な脳発達の要素とが複雑に混在している。胎児脳におけるオリゴデンドロサイトの分化段階で、ヒトにおける在胎 28 週から 32 週は、ラットでは生後 3 日齢の脳内環境に相当する。この時期に H-I を呈すると、分化途上のオリゴデンドロサイト後期前駆細胞 (pre-OL) は選択的に障害を受けやすい。つまり、pre-OL の細胞死や分化抑制が起き、オリゴデンドロサイト 前駆細胞 (OPC) の成熟障害が生じることで、PVL の危険性が高まることが知られている。髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトは、脳高次機能の発現に重要な役割を担い、pre-OL 虚血障害による髄鞘形成障害は、運動機能と認知機能の生後発達と関連している。近年の周産期医療の進歩により、脳組織欠損 (cyst) を認める重症型 PVL は激減したが、MRI でも明らかな cyst を認めない軽症型 PVL が増加している。軽症型 PVL では、運動機能障害とともに発育後の認知機能障害も臨床上的大きな課題となっており、未だに根本的治療法は存在しない。我々は、軽症型 PVL の病態を良く反映する新生児低酸素虚血性白質障害 (NWMI) モデルラットを確立し、PVL の根本的治療法の開発を目指している。本研究では、この疾患モデル動物を用いて、外部から OPC を補充することで、運動機能の改善に繋がるかどうか、移植した OPC が脳内で、生存・生着・分化・成熟するかどうかを検証した (実験 1)。また、発育期のリハビリが成熟後の運動機能にどのような影響を与えるか、リハビリの 1 つとして考えられている豊かな環境飼育 (EE) に着目し、運動機能の改善効果と作用機序について検討した (実験 2)。

3. 研究の方法

1. 疾患モデルラットの作製 (実験 1, 2)

生後 3 日齢の Wistar 系雄ラットの右総頸動脈閉塞及び 6% 低酸素処置により作製したモデルを実験に使用した。

2. 細胞移植治療 (実験 1)

緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した生後 1 日齢のラットを、混合グリア培養によって OPC を分離した。モデル作製から 2 日後に、あらかじめ調整しておいた OPC (2.0×10^5 cells/ $2\mu\text{l}$) を、脳定位固定装置を用いて脳梁に移植した。なお、移植細胞は GFP によって標識されているため、移植後の追跡を可能にする。実験群として、Sham 群 (偽手術)、NWMI 群、NWMI+培地移植群、NWMI+OPC 移植群の 4 群間で検討を行った。また、同様のプロトコールで、OPC 移植から 2 週間後に免疫抑制剤 (サイクロスポリン A ; 10mg/kg) を毎日経口投与した。実験群としては、NWMI+免疫抑制剤非投与群、NWMI+免疫抑制剤投与群、NWMI+OPC 移植+免疫抑制剤非投与群、NWMI+OPC 移植+免疫抑制剤投与群の 4 群間で検討を行った。移植から 4 週と 8 週間後に行動学的及び免疫組織学的評価を実施した。

3. リハビリ治療 (実験 2)

生後 3 日齢の NWMI モデルを作製し、離乳時期である生後 25 日まで通常環境飼育 (SE) を行った。その後、SE 群と豊かな環境飼育 (EE) 群とに分け、生後 25 日から 70 日までの 5 週間、それぞれの群間ごとに飼育した。実験群としては、Sham+SE 群、Sham+EE 群、NWMI+SE 群、NWMI+EE 群の 4 群間で検討した。

4. 運動機能評価 (実験 1, 2)

細胞移植やリハビリの治療効果があったかどうか、Hindlimb retraction、Beam walking、Elevated body swing、Rotarod、Horizontal ladder test の 5 つの運動機能評価を行った。

5. 組織学的評価 (実験 1, 2)

動物を屠殺後、組織学的改善効果が見られるかどうか、免疫染色にて評価を行った。Olig2 (オリゴデンドロサイト)、GFP (移植細胞)、Hoechst (核) による三重染色で、脳梁や運動皮質周辺部における移植細胞や内因性細胞の生存・生着率を評価した。また、PDGFR- α (幼弱オリゴデンドロサイト)、CC1・MBP (成熟オリゴデンドロサイト) 染色による移植細胞や内因性細胞の分化・成熟率や Caspr・MBP・NF200 染色によるミエリン形成の評価も行った。さらに、Iba1 (ミクログリア) や GFAP (アストロサイト) 染色でグリア細胞の評価を実施した。加えて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による形態評価、ゴルジ染色・Sholl 解析による神経細胞の形態評価を行った。

6. 電気生理学的評価 (実験 2)

EE の治療効果があったかどうか、皮質内微小電気刺激法を用いて運動マップの変化を評価した。

4. 研究成果

実験 1 より、NWMI モデル動物作製から 2 日後に、GFP 標識した OPC を脳梁部へ移植し、免疫抑制剤 (サイクロスポリン A) の非投与下において、コントロール群 (OPC 移植なし) と比較して、4 週と 8 週目において、有意な行動学的改善を示した。また、移植した OPC が、脳内で 8 週目まで生着・生存していることも確認した。しかしながら、4 週目と比較して、8 週目では移植細胞数の減少が認められた。これまでに、様々な幹細胞を用いた細胞移植に関する研究を実施してきたが、移植細胞の脳内での生着・成熟が解決すべき最優先課題であることが分かった。この課題を解決するため、移植 OPC の生存細胞増加と運動機能のさらなる回復を目的とし、NWMI モデルラットへの OPC 移植における免疫抑制剤投与による効果を検討した。同様のプロトコルで、OPC 移植から 2 週間後に免疫抑制剤を毎日経口投与し、4 週と 8 週間後に行動学的及び免疫組織学的評価を行った。その結果、免疫抑制剤投与群では、非投与群と比較して、4 週と 8 週目において、有意な行動学的改善は認められなかったが、回復傾向を示した。面白いことに、免疫抑制剤投与群では、非投与群と比較して、Olig2/GFP 陽性細胞が脳梁や運動皮質領域において 8 週目でも有意に生着・生存しており、ミエリン様構造の形成も確認された。また、免疫抑制剤投与群で CC1/GFP 陽性細胞数が、4 週目において増加傾向にあり、移植した OPC が分化・成熟していることが認められた。

実験 2 より、NWMI では、運動機能障害、障害側における運動皮質の菲薄化、運動マップの乱雑化、神経突起の増加、オリゴデンドロサイトの分化抑制、ミエリン形成の異常、ランビエ絞輪の伸長が明らかになった。一方で、発育期の EE により、運動機能改善、運動皮質菲薄化の軽減、運動マップの正常化、オリゴデンドロサイトの分化促進、ミエリン形成及びランビエ絞輪の長さの正常化が認められ、有意な改善効果が認められた。すなわち、NWMI は、pre-OL の分化を抑制することで分化障害を引き起こし、ミエリン形成時にはミエリンの間隔が広くなる。また、神経突起は異常な形態を示す。一方、EE で飼育することで、これらの障害は改善され、オリゴデンドロサイトの分化促進、ミエリン形成及び神経突起の形態が正常化されることで、NWMI の運動機能障害は改善されたと考えられる。本研究結果より、NWMI モデルラットに対する長期 EE 飼育が、低酸素虚血によって抑制された脳の発達を促進できる可能性を示した。

『OPC を用いた細胞療法とリハビリ』という PVL の新たな治療法の探索に向け、今後の展開として、軽症型 PVL の病態を反映する NWMI モデルラットを用いて、移植 OPC とリハビリとの相加・相乗効果の証明とその結果を裏付ける科学的メカニズムの証明に向けて、基礎研究データを蓄積していく次第である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ogawa Shino, Hagiwara Mutsumi, Misumi Sachiyo, Tajiri Naoki, Shimizu Takeshi, Ishida Akimasa, Suzumori Nobuhiro, Sugiura-Ogasawara Mayumi, Hida Hideki	4. 巻 29
2. 論文標題 Transplanted Oligodendrocyte Progenitor Cells Survive in the Brain of a Rat Neonatal White Matter Injury Model but Less Mature in Comparison with the Normal Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689720946092	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 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoki Tajiri, Shino Ogawa, Atsunori Hattori, Akimasa Ishida, Takeshi Shimizu, Hideki Hida
2. 発表標題 Intracerebral grafts of oligodendrocyte progenitor cells attenuate behavioral deficits in neonatal white matter injury model of rats
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideki Hida, Atsunori Hattori, Takeshi Shimizu, Naoki Tajiri
2. 発表標題 Enriched environment after hypoxic-ischemia normalizes dendrite morphology of the cortex layer II/III accompanied with oligodendrocyte differentiation in rat of neonatal white matter injury
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 直輝、小川 紫野、三角 吉代、大谷 綾乃、服部 篤紀、清水 健史、飛田 秀樹
2. 発表標題 新生仔低酸素虚血性白質障害に対するオリゴデンドロサイト前駆細胞移植による運動機能障害の回復効果
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 直輝、小川 紫野、大谷 綾乃、服部 篤紀、飛田 秀樹
2. 発表標題 新生仔低酸素虚血性白質障害へのオリゴデンドロサイト前駆細胞移植における免疫抑制剤の効果
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 直輝
2. 発表標題 損傷脳に対する神経再生療法とリハビリテーション医療の可能性
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 直輝
2. 発表標題 損傷脳に対する神経再生療法とリハビリテーション医療の可能性
3. 学会等名 Neurovascular Unit 研究会 2021（慶応義塾大学）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Tajiri, Shino Ogawa, Atsunori Hattori, Ayano Otani, Shinya Ueno, Takeshi Shimizu, Hideki Hida
2. 発表標題 Elucidation of damaged brain regeneration mechanism by cell therapy and enriched environment for neonatal white matter injury
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruka Sugiura, Ryotaro Anazawa, Ayano Otani, Shino Ogawa, Naoki Tajiri, Hideki Hida
2. 発表標題 Transplantation of oligodendrocyte progenitor cells with cyclosporine A protects from neonatal white matter injury-induced motor and histological impairments
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田尻 直輝、服部 篤紀、小川 紫野、石田 章真、清水 健史、飛田 秀樹
2. 発表標題 新生児低酸素虚血性白質障害へのオリゴデンドロサイト前駆細胞の脳内移植による運動機能回復
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飛田 秀樹、服部 篤紀、田尻 直輝、上田 佳朋、石田 章真、清水 健史
2. 発表標題 豊かな環境飼育は新生児低酸素虚血性白質障害モデルラットの樹状突起の形態とオリゴデンドロサイト分化の促進に影響する
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部 篤紀、田尻 直輝、上田 佳朋、小川 紫野、石田 章真、清水 健史、飛田 秀樹
2. 発表標題 発育期の豊かな環境飼育が新生児低酸素虚血性白質障害モデルラットに与える影響
3. 学会等名 第65回 中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田尻 直輝
2. 発表標題 脳神経外傷に対する 神経再生療法とリハビリテーション
3. 学会等名 第42回 日本脳神経外傷学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Tajiri, Atsunori Hattori, Yoshitomo Ueda, Shino Ogawa, Akimasa Ishida, Takeshi Shimizu, Hideki Hida
2. 発表標題 Enriched environment attenuates hindlimb dysfunction in neonatal white matter injury model
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress in conjunction with The 96th annual meeting of the Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsunori Hattori, Yoshitomo Ueda, Naoki Tajiri, Shino Ogawa, Akimasa Ishida, Takeshi Shimizu, Hideki Hida
2. 発表標題 Effect of environmental enrichment on neonatal white matter injury in rat
3. 学会等名 第42回 日本神経科学大会 (Neuro 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsunori Hattori, Naoki Tajiri, Yoshitomo Ueda, Akimasa Ishida, Takeshi Shimizu, Hideki Hida
2. 発表標題 Functional recovery by enriched environment in neonatal white matter injury: evidence from morphological and electrophysiological assessments
3. 学会等名 The 49th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学 大学院医学研究科・医学部 脳神経生理学教室
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/brain-physiol.dir/Researchmap>
<https://researchmap.jp/tajirin23>

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
研究分担者	飛田 秀樹 (Hida Hideki) (00305525)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	森信 繁 (Morinobu Shigeru) (30191042)	吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授 (35308)	
研究分担者	安原 隆雄 (Yasuhara Takao) (50457214)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	亀田 雅博 (Kameda Masahiro) (50586427)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------