

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08267

研究課題名(和文) 移植臍帯血幹細胞の分化と周生期大脳皮質白質損傷への応用

研究課題名(英文) Transplantation of umbilical cord blood cells and application for perinatal brain injury

研究代表者

中西 圭子 (Nakanishi, Keiko)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・客員研究員

研究者番号：50280813

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)：新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルラットにラット臍帯血幹細胞を移植すると脳障害が軽減する。移植したGFP-TGラット由来臍帯血幹細胞をラット生体内で追跡し脳障害軽減機序解明を試みた。移植した幹細胞は脾臓周囲結合組織で数多く観察され、一部はLYVE1(+)細胞に分化した。日齢2にRice-Vannucci model処理したラットでは明らかな梗塞巣は観察されず、白質損傷モデル確立には検討が必要と考えられた。臍帯血幹細胞の糖鎖組成について検討し、ヘパラン硫酸(HS)に比較しコンドロイチン硫酸(CS)糖鎖が多いこと、CS糖鎖分解酵素処理によりコロニー形成細胞の割合が減少することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)は現在もなお、脳性まひの主な原因の一つである。臨床では低体温療法が行われているが重症例に対する効果は乏しく、神経後遺症の克服のために幹細胞療法など新規治療法の開発が急務である。臍帯血は、造血幹細胞や間質性幹細胞などの組織幹細胞を含んでおり、骨髄採取が困難な新生児にとって最も安全かつ臨床応用しやすい幹細胞源である。臍帯血幹細胞移植による脳障害軽減効果は数多く報告されているが、幹細胞の特徴については未だ不明な点が多い。本研究で、梗塞軽減機序や幹細胞の特徴が明らかになれば、臨床研究のさらなる進展や効率的な移植方法の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mononuclear cells isolated from GFP-TG rat umbilical cord blood were expanded (stem cell enriched-umbilical cord blood cells; SCE-UCBCs) and administered intraperitoneally to neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) model of rats. The GFP-positive cells were detectable in the connective tissue around the spleen, some of which were positive for LYVE1. No obvious brain damage was observed in rats subjected to Rice-Vannucci model at postnatal day 2 (P2), suggesting that further validation is needed to establish a stable white matter injury model. Glycan composition of SCE-UCBCs was examined and found that SCE-UCBCs contained more chondroitin sulfate (CS) content compared to heparan sulfate (HS) content. Colony forming cell assay showed that the percentage of colony forming cells decreased after treatment with CS-degrading enzyme.

研究分野：発達小児科学

キーワード：臍帯血幹細胞 移植再生医療 周生期脳障害 白質損傷 コンドロイチン硫酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺の主な原因の一つである新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)に対し、低体温療法が広く実施されているものの、重症例には効果が限定されており、生存例6-7歳時での重度障害の発生率には有意差がないことが報告されている(Shankaran et al., NEJM, 2012)。この神経学的後遺症の克服は新生児医療にとって残された課題であり、新規治療法の開発が切望されている。自己複製能・多分化能をもつ胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞を用いた再生医療は様々な医療分野で応用が期待されているが、移植後のがん化の可能性(Rao, *Stem Cell Dev* 2007)が払拭できず、臨床応用への大きな障害になっている。

臍帯血は造血幹細胞や間質性幹細胞などの組織幹細胞を含んでおり、その起源が胎児由来であることから出生時に採取しておけば1)自家移植が可能、2)がん化をおこす心配がない、3)移植片対宿主病(GVHD)をおこしにくいなど、移植治療にとって様々な利点がある。また、血液疾患患者への臍帯血移植治療は既に臨床応用され、その採取法や投与法は確立されており、骨髄採取が困難な新生児にとって臍帯血は最も安全かつ臨床応用しやすい幹細胞源である。

米国や韓国・日本などでHIE患児や脳性麻痺児に対する臍帯血の自家移植の臨床研究は始まっており、その実行可能性については既に報告されている(Cotton, *J Pediatr* 2014)が、その効果の詳細や作用機序については未だ明らかではない。また、早期産児の脳室周囲白質軟化症(PVL)に対しては、現在のところ効果的な治療法がなく、臍帯血幹細胞移植の有効性についても明らかではない。

これまでに応募者らは、GFP-トランスジェニック(TG)ラット臍帯血幹細胞をHIEモデルラットに腹腔内投与し、臍帯血幹細胞移植による周生期脳損傷軽減効果は幹細胞が神経細胞に分化するのではなく、何らかの液性因子を介していることを明らかにしてきた(Nakanishi et al., *Sci Rep*, 2017)。

2. 研究の目的

本研究では周生期脳障害モデルラットにGFPトランスジェニック(TG)ラット臍帯血幹細胞を投与し、移植した臍帯血幹細胞がどのような細胞に分化し、どのような機序で損傷軽減効果をもたらすのかを明らかにする。また、脳室周囲白質軟化症(PVL)モデル動物を作成し、HIEのみでなく早期産児の白質損傷に対する臍帯血幹細胞移植の有効性について検討する。

3. 研究の方法

GFP-TGラットE19.5胎仔より臍帯血を採取し有核細胞層を分離し、4種のサイトカイン存在下で培養増殖させた。この増殖させた細胞(stem cell enriched-umbilical cord blood cells; SCE-UCBC)を、日齢7にRice-Vannucci model(右頸動脈結紮および低酸素処理2h)処置を行ったラットに受傷3日後腹腔内、鼻腔内へ投与し、受傷2週間後に還流固定した。組織から0.5mmごとの凍結切片を作製し、免疫組織染色を行った。

日齢2のラットに同様のRice-Vannucci model処置を行い、脳切片を作製し、KB染色、MBP免疫組織染色を行った。

SCE-UCBCより糖鎖を抽出し、コンドロイチン硫酸(CS)糖鎖およびヘパラン硫酸(HS)糖鎖分析を行なった。またコロニー形成アッセイを行なった。

4. 研究成果

(1) 脾臓周囲結合組織での臍帯血幹細胞の分化；

脾臓周囲結合組織には多くのGFP陽性細胞が観察された。組織二重染色をしたところ、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞のごく近傍にGFP陽性細胞が存在しており、一部のGFP陽性細胞はリンパ管内皮細胞マーカーLYVE1も陽性だった。共焦点顕微鏡での高解像度画像の解析から、GFP陽性細胞はリンパ管内を通過しているように観察された。以上の結果から、投与した臍帯血幹細胞は、脈管系を介して脳障害軽減作用をもたらしている可能性が示唆された。

(2) 臍帯血幹細胞の投与方法による脳障害軽減効果；

HIEモデルラットに受傷3日後腹腔内、鼻腔内へ臍帯血幹細胞を投与し、その後脳切片を作製しHE染色を行なった。鼻腔内へ投与した方が腹腔内への投与より、より効果的である傾向があった。さらに例数を増やして確認する必要がある。

(3) 脳室周囲白質軟化症(PVL)モデル動物作成の試み；

日齢2のラットにRice-Vannucci modelと同様の処置を行い、脳切片を作製し、KB染色、

MBP 免疫組織染色を行った。日齢2のラットでは同様の処置をしても脳梗塞は観察されず、明らかな白質損傷も認められなかった。近年 PVL には脳虚血のみならず炎症も関与していることが示唆されている。安定した白質損傷モデル動物の作成のために更なる検討が必要と思われた。

(4) 臍帯血幹細胞のコンドロイチン硫酸糖鎖の解析；

臍帯血幹細胞の特徴を調べるために、幹細胞リッチな細胞群 (SCE-UCBC) の糖鎖分析を行った。SCE-UCBC では、ヘパラン硫酸よりもコンドロイチン硫酸糖鎖が多く、主な CS 糖鎖は A-unit だった。また SCE-UCBC では高硫酸化型の E-unit を含んでいた。コロニー形成アッセイを行なったところ、CS 糖鎖分解酵素および CS-E 存在下でコロニー形成細胞の割合が少なかった。以上の結果から、CS 糖鎖は臍帯血幹細胞の生物学的活性に何らかの形で寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi Keiko, Higashi Kyohei, Toida Toshihiko, Asai Masato	4. 巻 17
2. 論文標題 Characterization of chondroitin sulfate in stem cells derived from umbilical cord blood in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0262854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262854	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 Nakanishi Keiko, Niida Hiroyuki, Tabata Hidenori, Ito Tsuyoshi, Hori Yuki, Hattori Madoka, Johmura Yoshikazu, Yamada Chisato, Ueda Takashi, Takeuchi Kosei, Yamada Kenichiro, Nagata Koh-ichi, Wakamatsu Nobuaki, Kishi Masashi, Pan Y Albert, Ugawa Shinya, Shimada Shoichi, Sanes Joshua R, Higashi Yujiro, Nakanishi Makoto	4. 巻 29
2. 論文標題 Isozyme-Specific Role of SAD-A in Neuronal Migration During Development of Cerebral Cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 3738 ~ 3751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhy253	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

1. 著者名 Li Dan, Johmura Yoshikazu, Morimoto Satoru, Doi Miyuki, Nakanishi Keiko, Ozawa Manabu, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 LONRF2 is a protein quality control ubiquitin ligase whose deficiency causes late-onset neurological deficits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 1001 ~ 1019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-023-00464-4	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西圭子
2. 発表標題 ラット臍帯血幹細胞のコンドロイチン硫酸糖鎖の解析
3. 学会等名 第58回周産期新生児医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 2)中西圭子、東恭平、戸井田敏彦、浅井真人
2. 発表標題 ラット臍帯血幹細胞のコンドロイチン硫酸糖鎖の特徴
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中西圭子、東恭平、戸井田敏彦、浅井真人
2. 発表標題 ラット臍帯血幹細胞のコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸糖鎖の特徴
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会(Web開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西圭子、東恭平、戸井田敏彦、浅井真人
2. 発表標題 ラット臍帯血幹細胞におけるコンドロイチン硫酸糖鎖解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会/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 Nakanishi K, Niida H, Tabata H, Johmura Y, Ueda T, Yamada K, Nagata K-I, Wakamatsu N, Kishi M, Ugawa S, Shimada S, Higashi Y, Nakanishi M
2. 発表標題 Distinct role of SAD-A and SAD-B in radial neuronal migration in the developing brain.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会/第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗
2. 発表標題 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットに投与したラット臍帯血幹細胞の分化の検討
3. 学会等名 第64回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2019年

〔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	

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		
米国	Harvard University	Virginia Tech Carilion Res Inst	