

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08280

研究課題名(和文) ミクログリアを介したヒト臍帯血移植による脳性麻痺治療のメカニズムの解明

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

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・教授

研究者番号：90406182

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)：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。我々は、これまで移植臍帯血細胞が内在性の神経幹/前駆細胞を活性化することを見出しているが、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。本研究では、中枢神経系グリア細胞の一つで、免疫細胞として働くミクログリアに着目し、脳損傷改善におけるその役割を調べることにした。脳性麻痺モデルマウスに臍帯血細胞を投与すると、神経保護性のミクログリアが増加することが分かった。さらに、増加したミクログリアが分泌するケモカインを見出し、神経幹/前駆細胞の遊走や増殖、分化に関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳性麻痺モデルマウスを用いた実験により、臍帯血投与によって増加したミクログリアが液性因子を分泌し、内在性の神経幹/前駆細胞の遊走や増殖に関与していることを見出した。臍帯血による脳性麻痺治療における脳内ミクログリアの役割を示し、治療メカニズムの一端を明らかにすることができた。この成果は、より効果の高い脳性麻痺治療法の開発や、液性因子を用いた創薬などにつながる可能性を示した。さらには、脳性麻痺以外の様々な脳疾患を対象とした臍帯血移植治療にも広がっていくと考えられる。

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. We have found that transplanted HUCB cells activate endogenous neural stem/progenitor cells, but it is unknown how HUCB cells interact with brain parenchymal cells and promote functional recovery. In this study, we focused on microglia, one of the glial cells in the central nervous system that act as immune cells, to investigate their role in improving brain injury.

When HUCB cells were administered to a mouse model of cerebral palsy, neuroprotective microglia were found to be increased. Furthermore, we found chemokines secreted by the increased microglia, which may be involved in the migration, proliferation, and differentiation of neural stem/progenitor cells.

研究分野：再生医学

キーワード：臍帯血 ミクログリア 脳性麻痺 ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高知大学医学部附属病院において、「小児脳性麻痺など脳障害に対する自家臍帯血単核球細胞輸血治療」として臨床研究を実施し、安全性・有効性を検証している。この治療法は海外においても実施されており、改善効果は認められるものの、そのメカニズムの詳細は不明である。申請者らは治癒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研究を行ってきた。

申請者らは、学術的に汎用されている新生仔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、独自の脳性麻痺モデルマウスを開発した (Wang F et al. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014)。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単核細胞を移植 (尾静脈投与) 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、神経保護作用、血管新生作用、炎症抑制作用、内在性神経幹細胞の賦活化などの複数の可能性が考えられる。申請者らは、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誘導していることを見出した。内在性神経幹/前駆細胞の賦活化は、脳損傷が起きた場合に生理的に起こる現象であるが、臍帯血移植は、より多くの神経幹/前駆細胞を損傷部位に遊走させることも分かってきた。このことは、臍帯血単核細胞が直接または間接的に神経幹/前駆細胞に作用していることを示唆している。さらに、臍帯血移植の有無により損傷部位周辺に局在するミクログリアの極性が異なることも見出した。臍帯血移植による内在性神経幹/前駆細胞の賦活化に対するミクログリアの役割を明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

脳性麻痺モデルマウスを用いたこれまでの研究から、移植臍帯血細胞・ミクログリア・神経幹/前駆細胞は相互作用することで、脳損傷を修復しているのではないかと考えた。本研究では、「ミクログリア」に焦点を当て、その役割を解析することで臍帯血細胞移植による脳性麻痺治癒メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

生後 9 日齢の免疫不全マウスを用いて脳性麻痺モデルマウスを作製し、脳損傷 3 週間後にヒト臍帯血単核細胞を静脈投与する。ミクログリアの割合やミクログリアの極性などを調べるため、脳損傷 1 週間後、3 週間後、およびヒト臍帯血細胞投与 24 時間後のマウス脳組織を採取した。モデル作製では、脳の右側のみを損傷させているため、採取した脳組織は傷害側と正常側とに分けた。その後、酵素処理により細胞を分散させ、フローサイトメトリーを用いて解析した。

さらに、脳傷害の改善には、ミクログリアが移植臍帯血細胞や他の脳内細胞と相互作用しており、その作用には、細胞間情報伝達物質であるサイトカイン・ケモカインが関与していると考えた。同様に採取した脳組織を用い、ミクログリアにおけるサイトカイン・ケモカインやそのレセプターの発現をフローサイトメトリーと免疫組織化学染色法により経時的に調べた。

4. 研究成果

脳性麻痺モデルマウス作製 (脳損傷) から 1 週間後、3 週間後、および臍帯血細胞投与 24 時間後のマウス脳組織を採取した。脳組織は障害側と正常側とに分け、酵素処理により細胞を分散させ、フローサイトメトリーを用いてミクログリアの割合を調べた。ミクログリアマーカーとして CD11b を用いた解析では、脳損傷 1 週間後に増加し、3 週間後には減少した。しかし、臍帯血

投与 24 時間後、障害側でのみその割合が再び増加した。さらに、ミクログリアの中でも神経保護に作用すると考えられている M2 型ミクログリア (CD11b、CD206 陽性) の割合についても調べた。その結果、同様に脳損傷 1 週間後に一過的に増加したが、その後低下し、臍帯血細胞投与により、障害側で再び増加が認められた。また、その割合は、脳損傷 1 週間後に比べてさらに増加していた。これらの結果から、脳損傷の改善にミクログリアが関与していると考えられた。

次に、臍帯血細胞投与後に M2 型ミクログリアが増加した原因を調べるため、ミクログリアに発現するサイトカインやケモカインレセプターをフローサイトメトリーにより解析した結果、CX3CR1 の発現が亢進していることが分かった。これまで、申請者らは臍帯血細胞による治癒にケモカインネットワークが関与していると考え、臍帯血細胞投与による脳内のケモカインについて網羅的な発現解析を行ってきた。その中で、臍帯血細胞の投与によって分泌が上昇するケモカインの 1 つとして、CX3CL1 を見出している。これは、M2 型ミクログリアで発現が亢進した CX3CR1 の特異的リガンドである。これらのことから、臍帯血細胞投与によって傷害側で分泌された CX3CL1 は、M2 型ミクログリアの増加を促進していると考えられた。

増加した M2 型ミクログリアの分泌する因子が内在性神経/前駆幹細胞に作用していると考え、ミクログリアで発現する因子(特にケモカイン)についてフローサイトメトリーにより解析した。その結果、臍帯血細胞投与群では、正常側に比べて障害側において CCL9、CXCL12、CX3CL1、CXCL16 の発現の亢進がみられた。非投与群では、発現の差は認められなかった。また、脳組織切片を用いた免疫染色においても確認された。これらのケモカインの内、CX3CL1 は神経細胞の生存や分化成熟の促進作用を、また、CXCL12 は幹細胞や未熟な細胞の誘引作用をもっていることが報告されている。

以上の結果は、臍帯血細胞投与により増加した M2 型ミクログリアが様々なケモカインを分泌し、神経幹/前駆細胞の遊走や増殖、分化に関与していることを示唆しており、脳性麻痺の治癒メカニズムの一端を明らかにした。

<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

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kikuchi H, Saitoh S, Tsuno T, Hosoda R, Baba N, Wang F, Mitsuda N, Tsuda M, Maeda N, Sagara Y, Fujieda M.	4. 巻 44
2. 論文標題 Safety and feasibility of autologous cord blood infusion for improving motor function in young children with cerebral palsy in Japan: A single-center study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 681-689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2022.08.004.	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 Tsuru Emi, Oryu Kohei, Sawada Ken, Nishihara Makoto, Tsuda Masayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Complexin 2 regulates secretion of immunoglobulin in antibody secreting cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 318 ~ 325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iid3.276	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 Baba Nobuyasu, Wang Feifei, Iizuka Michiro, Shen Yuan, Yamashita Tatsuyuki, Takaishi Kimiko, Tsuru Emi, Matsushima Sachio, Miyamura Mitsuhiko, Fujieda Mikiya, Tsuda Masayuki, Sagara Yusuke, Maeda Nagamasa	4. 巻 14
2. 論文標題 Induction of regional chemokine expression in response to human umbilical cord blood cell infusion in the neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221111	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津田正史, 津田雅之, 中山登, 中岡溪, 中岡茂
2. 発表標題 170-MRSによる慢性期脳性麻痺モデルマウスの脳内170水の観測
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 都留英美, 茂川拓紀, 溝淵雅章, 津田雅之
2. 発表標題 A novel subpopulation of B1 B cells whose secretion of natural antibodies is suppressed by complexin 2
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田正史, 津田雅之, 中山登, 中岡溪, 中岡茂
2. 発表標題 170-MRSによる慢性期脳性麻痺モデルマウスの脳内170水の観測
3. 学会等名 第50回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂川拓紀, 都留英美, 津田雅之
2. 発表標題 胚着床前後におけるマウス子宮でのレプチン受容体の発現解析
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田正史, 津田雅之, 中山登, 中岡茂
2. 発表標題 170-MRSによるマウス脳内水の観察
3. 学会等名 第49回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都留英美, 茂川拓紀, 溝淵雅章, 津田雅之
2. 発表標題 抗体の分泌機能異常がもたらすB細胞恒常性の破綻
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本修士, 樋口琢磨, 古株彰一郎, 藤田浩志, 池恩燮, 森澤啓子, 絹川勝晶, 戸高寛, 松川和嗣, 杉山康憲, 津田雅之
2. 発表標題 二本鎖RNA 結合タンパク質(RBP)による筋分化制御因子MyoD の転写活性化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都留英美, 廣木秀哉, 茂川拓紀, 溝淵雅章, 津田雅之
2. 発表標題 Complixin2欠損マウスにおける血清IgM増加の要因解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本修士, 山口輝, 森澤啓子, 樋口琢磨, Sylvia Lai, 池恩燮, 藤田浩志, 杉山康憲, 松川和嗣, 津田雅之
2. 発表標題 マイクロRNAの機能を介した骨格筋の細胞融合及び成熟化の新規制御機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井 康一郎, 馬場 伸育, 沈 淵, 王 飛罪, 山下 竜幸, 高石 公子, 津田 雅之, 都留 英美, 相良 祐輔, 前田 長正
2. 発表標題 ヒト臍帯血投与によるマウスモデル脳傷害局所でのケモカイン発現と産生細胞の変化
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都留英美, 尾立公平, 茂川拓紀, 溝淵雅章, 津田雅之
2. 発表標題 抗体分泌細胞の分化および分泌機能におけるComplexin2の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾立公平, 都留英美, 茂川拓紀, 津田雅之
2. 発表標題 Complexin2欠損マウスを用いた免疫表現型解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西森友俊, 馬場伸育, 沈淵, 王飛罪, 山下竜幸, 高石公子, 津田雅之, 都留英美, 相良祐輔, 前田長正
2. 発表標題 ヒト臍帯血細胞投与によるマウス脳傷害局所におけるケモカインレセプター発現の亢進効果
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住井杏捺, 沈淵, 馬場伸育, 山下竜幸, 王飛罪, 都留英美, 津田雅之, 相良祐輔, 前田長正
2. 発表標題 BALB/c新生仔マウスにおけるNK1.1の発現とその生物学的意義
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沈淵, 馬場伸育, 西村映実里, 山下竜幸, 王飛罪, 都留英美, 津田雅之, 相良祐輔, 前田長正
2. 発表標題 ヒト臍帯血幹細胞からNK細胞の選択的誘導培養法樹立とその抗腫瘍活性の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	都留 英美 (Tsuru Emi) (70380318)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教 (16401)	

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
---------	---------