

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17372

研究課題名（和文）早産児の代謝特性に着目した脳性麻痺への細胞治療研究

研究課題名（英文）Research on cell therapy for premature infants with cerebral palsy, focusing on their metabolic characteristics.

研究代表者

田中 えみ（Tanaka, Emi）

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60823581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：有効な治療法のない早産児脳障害について病態と治療を検討するため、低酸素虚血性脳症モデルマウスを作製した。体重増加不良や神経行動異常といった脳性まひに相当する病態を呈する良好なモデルを得た。同じ条件の虚血による低分子化合物の変化は、早産児脳の方が正期産児と比較し耐性が高いことが示唆された。早産児モデルへ傷害48時間後に細胞治療を行ったところ、神経行動を改善することが示された。脳代謝物のイメージングは分布の可視化によって治療効果の詳細を明らかにすることが出来るため、今後早産児モデルでも検討を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産児脳障害には有効な治療法がなく、細胞治療が期待されている。早産児脳障害モデルの研究は胎児羊への一過性子宮動脈閉塞による報告が散見されるが、報告数は少ない。今回使用したマウスモデルは神経行動学的評価を行うことが可能な点、脆弱性の高い早産児への細胞投与を再現し安全性を評価出来る点で意義がある。また、発達段階にある脳においてはエネルギー代謝・アミノ酸・核酸といった低分子化合物が重要と考えた。低分子化合物の網羅的解析や、質量分析イメージングなど、代謝に着目して病態を明らかにすることが新たな視点である。

研究成果の概要（英文）：To investigate the pathogenesis and treatment of brain damage in preterm infants for which there is no effective treatment, a mouse model of hypoxic-ischemic encephalopathy was created. We obtained a good model that exhibited pathological conditions corresponding to cerebral palsy, such as poor weight gain and neurobehavioral abnormalities. The results suggest that preterm brains are more tolerant of low-molecular-weight compounds under the same ischemic conditions compared to full-term brains. Cellular treatment of the preterm infant model 48 hours after injury was shown to improve neurobehavior. Mass spectrometry imaging revealed the details of the treatment effect by visualizing the distribution. We will continue to investigate metabolic imaging in preterm infant models.

研究分野：新生児学

キーワード：早産児 脳性まひ 細胞治療 代謝解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児医療の進歩に伴いこれまで救命し得なかった重症新生児も生存できるようになりつつある。特に本邦の早産児生存率は世界に誇る高さであり、NICU 退院後の脳性麻痺、高率な発達障害など早産児を取り巻く脳障害の治療と予防は喫緊の課題である。脳性麻痺の主たる原因である新生児低酸素性虚血性脳症は正期産児・早産児ともに起こり得る病態であるが、早産児への低体温療法は高い死亡率と合併症リスクのために早産児へは推奨されていない。すなわち有効な治療法のない早産児脳障害の治療に焦点をあてる必要性がある。

近年、その多様な脳保護効果と幅広い治療可能時間域から細胞治療が注目されており、脳性麻痺の治療としても期待される。これまでの研究から、臍帯由来間葉系細胞が正期産児脳障害モデルマウスへ安全に静脈注射が可能であること、免疫調整作用を主とする機序を背景に神経行動学的改善を認めることが分かった (Emi T, et al. *Front Neurol.* 2018)。申請者らはこれまで正期産モデルを用いたが、有効な治療法のない早産児脳障害についても細胞治療が期待される。早産児は脳の未熟さゆえに、脳性麻痺や発達障害が高率である。一方で、早産児脳は低酸素に強く可塑性が高いことも知られている (Li J, et al. *Front Neurol.* 2014)。この相対する特徴から、今回脳障害モデルを作製するにあたり、発達段階にある脳においてはエネルギー代謝・アミノ酸・核酸といった低分子化合物が重要と考えた。

2. 研究の目的

早産児脳障害モデルへの細胞治療の検討は少ない。当研究ではモデルを確立するとともに、早産児の脳代謝物組成および虚血脳障害による反応の特殊性について理解し、適切なプロトコールへつなげることを目的とした。

具体的には下記の2項目を検討目的とした。

- ・早産児脳障害の病態を、組織学的・生化学的・各種イメージング手法を用いて明らかにする。
- ・早産児脳障害モデルへの細胞治療プロトコールについて検討する。

3. 研究の方法

(1) <早産児脳障害モデルマウス作製>

ヒトの在胎 28 週とされる日齢 5 の、CB17/Icr wild マウスを用いた。Rice-Vannucci らの手法に基づき、左総頸動脈切断と 8%酸素負荷により早産児低酸素虚血性脳症 (Hypoxic-ischemic encephalopathy; HIE) モデルを作製した。

(2) <早産児の代謝物組成および障害への反応特性の理解>

HIE モデルを日齢 5 (早産児相当) と日齢 12 (正期産相当) で作製し、HIE 前・HIE 直後・HIE24 時間後の時系列の障害側脳と肝臓を用いた。これらのサンプルの低分子化合物を質量分析の手法 (LCMS8060) を用いて網羅的に計測した。

(3) <病態に寄与する代謝物のイメージング質量分析による可視化>

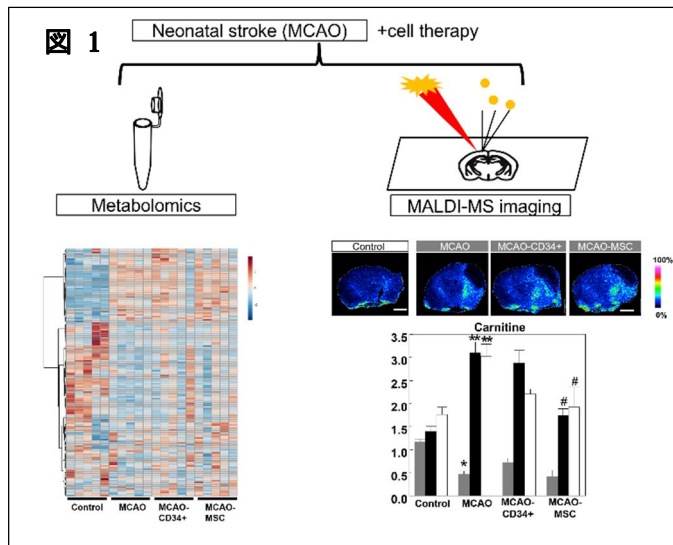
虚血脳障害に寄与する代謝物を選出し、受傷前後のイメージング質量分析を行った。イメージング質量分析では、脳切片上の各データ点のスペクトルを計測し再構成することで、1枚の脳切片から多様な物質の微量検出や可視化が可能となる。マトリックス支援レーザーイオン化法を用いてイメージング質量分析を行い、脳内の局在を可視化した。

(4) <細胞治療の最適プロトコールの検討>

早産児 HIE 作製の 48 時間後に細胞治療を行うプロトコールについて検討した。新生児へは清潔で非侵襲的投与が可能な静脈注射が適するため、顔面静脈から顕微鏡下の静脈内投与を行った。sham 群 (偽手術コントロール)、vehicle 群 (PBS を投与)、臍帯血 CD34 陽性細胞 (CD34⁺) 1×10^5 個、臍帯由来間葉系幹細胞 (MSC) 1×10^5 個の 4 群に振り分けた。

4. 研究成果

虚血脳障害モデルを用いた代謝解析を行うことを目的とし、正期産および早産の脳虚血モデルマウスを作製した。正期産モデルの研究では、正期産脳梗塞マウスモデルの脳でメタボローム解析およびイメージング質量分析で解析を行った。虚血半球脳のメタボローム解析に比べてイメージング質量分析では、微量検出と分布の可視化が可能であるため、より局所的な傷害と治療の変化が明らかになった。特にグルタミン酸は、梗塞中心部の信号強度が低下することはメタボローム解析と一致したが、梗塞周辺部は著明に上昇した。細胞治療は梗塞中心部の信号低下を改善するには至らなかったが、間葉系幹細胞は梗塞周辺部の上昇を有意に改善した。このような変化はカルニチンにおいても同様であった (図 1, Emi T, et al. *Scientific Rep.* 2020)。



早産児モデルの研究は、早産児低酸素虚血性脳症モデルマウスを作製した。このモデルでは傷害3週以降の体重増加率と大脳半球体積が有意に低下し、神経行動では Cylinder test での左右差・Rotarod test の成績不良を呈した。

早産児の代謝物組成および障害への反応特性の理解するために、低分子化合物の解析は正常産モデル・早産児モデル両方を同条件の虚血で作製し、肝臓と脳組織で比較を行った。虚血前の組織は、肝臓より脳の方で週齢の差異が大きかった。分岐鎖アミノ酸、TCA サイクル中間代謝物、乳酸等が正常産モデルの脳に有意に多かった。

虚血直後・虚血24時間後の経時的変化は肝臓と脳で異なる特徴を示した。脳は虚血直後で顕著に変化した代謝物が虚血24時間後には元に戻る経過を示し、その傾向は早産児モデルの方が明確であった(図2)。肝臓は主成分分析で明らかな変化を認めなかったが、一部の代謝物は虚血直後から24時間後にかけて上昇が進行した。この傾向は正常産児モデルの方が明確であった。同条件の虚血では早産児の方が耐性が高いことが低分子化合物の変化から推察された。また全身の虚血において肝臓での代謝変化も重要であることが分かった。

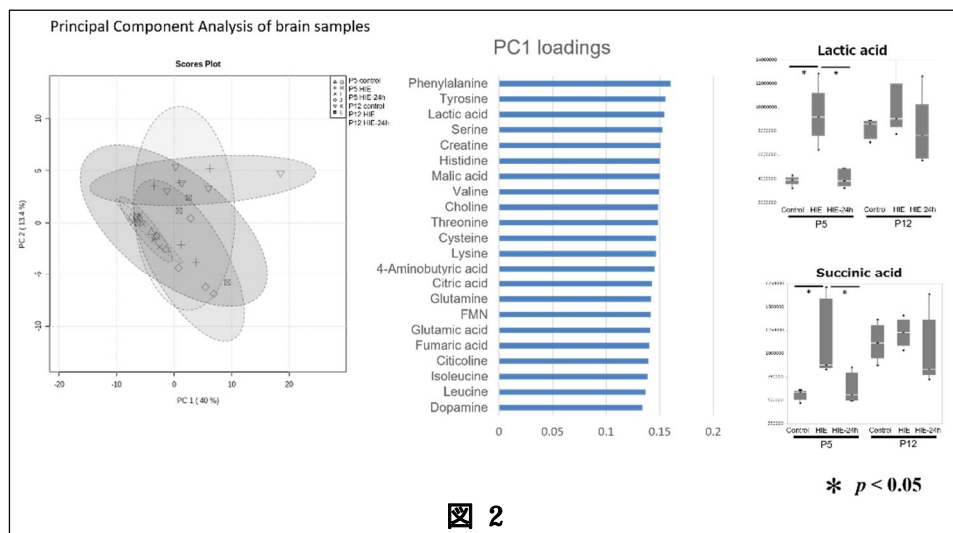


図 2

早産児低酸素虚血性脳症モデルマウスへの細胞治療は、傷害作製から48時間後での治療を検討した。臍帯血由来造血幹細胞と臍帯由来間葉系幹細胞を用いて静脈注射での投与を行った。細胞治療では体重増加率や死亡率、半球体積は改善されなかった。行動学的評価においてはいずれの細胞治療も神経行動を改善する傾向を示した。間葉系幹細胞は特に運動左右差を有意に改善させた。

今後は脳内代謝のイメージングを正常産児・早産児モデルで比較して詳細な検討を行うとともに、最適プロトコールについて投与タイミングや用量の検討を行う計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tanaka Emi, Ogawa Yuko, Fujii Ritsuko, Shimonaka Tomomi, Sato Yoshiaki, Hamazaki Takashi, Nagamura-Inoue Tokiko, Shintaku Haruo, Tsuji Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolomic analysis and mass spectrometry imaging after neonatal stroke and cell therapies in mouse brains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-020-78930-x	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 Ogawa Yuko, Tanaka Emi, Sato Yoshiaki, Tsuji Masahiro	4. 巻 337
2. 論文標題 Brain damage caused by neonatal hypoxia-ischemia and the effects of hypothermia in severe combined immunodeficient (SCID) mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 113577 ~ 113577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.expneurol.2020.113577	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中えみ、辻雅弘、大西聡、新宅治夫、濱崎考史
2. 発表標題 脳性まひに対する幹細胞治療：早産児低酸素性虚血性脳症モデルマウスでの検討
3. 学会等名 第66回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 えみ, 辻 雅弘, 新宅 治夫, 濱崎 考史
2. 発表標題 脳性まひに対する臍帯血由来造血幹細胞治療：早産児低酸素性虚血性脳症モデルマウスでの検討
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中えみ、大西聡、野々村光穂、新井那摘、濱崎考史
2. 発表標題 低酸素性虚血性脳症マウスモデルにおける低分子化合物の経時変化と週齢の比較
3. 学会等名 第59回日本周産期・新生児医学会学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------