

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07846

研究課題名(和文) 脳性麻痺に対する臍帯血移植治療のメカニズムを臍帯血の制御性機能から解明する

研究課題名(英文) Unveil the regulatory functions of cord blood in the therapeutic mechanism of cord blood transfusion against cerebral palsy

研究代表者

馬場 伸育 (BABA, NOBUYASU)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：30711296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：臍帯血細胞が発揮する制御性機能に着目して臍帯血による再生医療のメカニズムを解明した。臍帯血に含まれる細胞分画、すなわち、単球分画や幹細胞分画などが、組織傷害環境に応じて分泌因子を発現増強または抑制させた。臍帯血各種細胞分画が傷害組織環境において共通して産生を増強した分子としてCXCL8やIL-18などをとらえた。また、ヒト臍帯血細胞はマウスミクログリアに直接作用して、炎症促進型であるM1ミクログリアの有意な減少、免疫抑制型M2ミクログリアの増加傾向を示した。また、ミクログリアのケモカインの産生プロファイルが変化し、臍帯血細胞がミクログリアの細胞機能を調節する作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織再生の環境をコントロールする臍帯血細胞の制御機能を明らかにすることで治療メカニズムに対する問いを解決して、治療効果の更なる向上や適応の拡大など新規治療法として発展・確立することができる。本研究により得られた成果、すなわち、臍帯血細胞の特徴や脳障害に反応する臍帯血細胞の制御機能に関する知見は、特定の細胞種を分離精製して移植細胞として用いたり、治療メカニズムに関わる分子を組み合わせたより効果的な治療法を開発して、脳性麻痺をはじめ様々な難治疾患に対する安全で新しい再生医療の創造に示唆を与える。

研究成果の概要(英文)：The study has unveiled the regulatory functions of cord blood cells in the mechanisms of regenerative medicine. Cellular fractions of cord blood, such as monocytes, stem cells changed their secretory functions in the tissue damage condition. Commonly up-regulated molecules upon tissue damage stimulation on cord blood cells and fractions included CXCL8 or IL-18. Cord blood cells directory interacted with microglia, and pro-inflammatory M1 microglia was significantly down-regulated but immune-regulatory M2 microglia seemed up-regulated. Microglia had changed their chemokine secretion profile upon co-culture with cord blood cells. This means cord blood cells regulate cellular function of microglia.

研究分野：再生医療学 免疫学

キーワード：臍帯血 再生医療 脳性麻痺 サイトカイン ケモカイン ミクログリア

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児脳性麻痺は胎児期または出生後の脳損傷に起因する運動機能障害であり、生涯にわたり身体と精神の機能を著しく損なう難治性疾患である。脳性麻痺に対する根本的な治療法はなく、リハビリテーションなどの対症療法を行っているに過ぎず有効な新規治療法の開発が望まれている。

臍帯血移植は白血病など悪性血液疾患や先天性代謝異常症に対する治療法として骨髄移植を補うものとして発展してきたが、近年、米国において脳性麻痺患者に対する臍帯血移植治療により症状の改善効果があることが報告された (Sun JM et al. Stem Cells Transl Med. 2017)。高知大学医学部附属病院においても小児脳性麻痺など脳障害に対する自家および同胞間 (きょうだい間) 臍帯血細胞輸血の臨床研究が行われ、新たな再生医療の安全性と有効性の評価が進められている。

臍帯血に含まれる細胞は再生医療に応用可能な新たな幹細胞源として注目されている。すなわち臍帯血中には造血幹細胞をはじめ多数の幹細胞が存在する (Ballen KK et al. Blood. 2013) ことに加えて、臍帯血細胞は細胞の分化や増殖を制御する成長因子やサイトカインなどを豊富に分泌する能力を持つことが知られている (Paczkowska E et al. PLoS One. 2013)。しかし、臍帯血を用いた再生医療の治療機序を説明するための基礎医学研究が不足している。

移植した臍帯血細胞は、組織修復に必要とされる細胞種に自らが分化して症状を改善する可能性のほかに、傷害部位へ到達した移植臍帯血細胞が傷害組織の環境を整えて、ダメージを受けた細胞を保護したり、修復に関わる内在性幹細胞の遊走や分化をサポートする制御性の機能を持つと考えられる。組織再生の環境をコントロールする臍帯血細胞の制御機能を明らかにすることで治療メカニズムを解明できると考えられる。

2. 研究の目的

臍帯血細胞が発揮する制御性機能に着目して、脳性麻痺に対する臍帯血を用いた再生医療において、組織損傷により引き起こされる炎症の制御、傷害局所における神経細胞の生存や保護作用、そして、幹細胞や前駆細胞の遊走、増殖、分化を制御するメカニズムを解明することを目的とする。

本研究により得られた成果を基に、特定の細胞種を分離精製して移植細胞として用いたり、治療メカニズムに関わる分子を組み合わせた、より効果的な治療法を開発して、脳性麻痺をはじめ様々な難治疾患に対する新たな再生医療の創造へとつなげることを目指す。

3. 研究の方法

< 脳傷害部位へ選択的に集積する移植臍帯血細胞の評価 >

ヒト臍帯血細胞移植を施したマウス脳性麻痺モデル (免疫不全マウス) を用いて、移植後の傷害脳組織を検体として移植細胞を追跡した。傷害部位に選択的に遊走した移植臍帯血細胞が治療メカニズムに直接関与すると考えられることから、その特徴や機能をさらに詳細に検討した。すなわち、傷害脳組織から酵素処理によって脳細胞を単離して、ヒト抗原の検出と組み合わせて各種血球系マーカーや幹細胞マーカー、活性化マーカーの発現をフローサイトメトリー法により測定して、傷害脳に集積した移植細胞の出現頻度、表現型を定量的に評価した。

< 臍帯血細胞分画の制御能の評価 >

移植臍帯血細胞のなかで特異的に脳傷害部位に集積している特定の細胞種について、磁気細胞分離法により分離精製した。また、臍帯血に存在する造血幹細胞などの幹細胞分画にも着目して同様に分離精製した。分離精製した各種臍帯血細胞分画をマウス傷害脳組織の抽出物で刺激培養した。臍帯血細胞が発揮する傷害組織の炎症抑制や組織修復のための環境形成、脳組織細胞の保護やマウス内在性神経幹細胞の分化誘導を統制する作用を評価した。すなわち、臍帯血細胞が産生するサイトカインなど制御性情報伝達因子の産生能を Beads Array 定量法により解析した。

また、脳傷害部位におけるミクログリアが病態の形成のみならず、臍帯血による脳障害治療のメカニズム、すなわち組織再生や機能改善に関与する重要な細胞種であると考えられることから、臍帯血細胞がもつミクログリアに対する制御機能をこれら細胞の共培養系で評価した。共培養後のミクログリアの分化表現型やサイトカイン産生能を評価した。

4. 研究成果

ヒト臍帯血細胞移植を施したマウス新生仔脳虚血再灌流障害モデルを用いて、移植後のマウス生体内におけるヒト移植細胞の追跡を試みた。移植後24時間、48時間、72時間、96時間の時点で、脳傷害部にて検出されるヒト細胞の経時的変化をヒト抗原の発現を指標に評価したところ、最も高頻度にヒト移植細胞が検出されるのは移植後24時間であった。このヒト移植細胞の割合は脳全体の細胞のうち1%程度ととても微小であったが、同一マウスの正常脳組織と比較して有意に多く検出された。これらヒト移植細胞は血球系マーカーであるCD45陽性および陰性の分画を含んでいた。また、単球の表現型を示すCD14陽性分画の存在が特徴的であった。

一方、ヒト臍帯血細胞移植を施した脳障害マウスの脾臓においては、経時的にヒト移植細胞の存在割合が減少する傾向が見られたが、移植4週間においても脾臓全体の10%程度の割合でヒト移植細胞の存在を検出した。マウス脾臓に見られた移植ヒト細胞は主にCD45陽性であり、これらはCD14陰性HLA-DR陽性の表現型を示す非単球系の抗原提示細胞や活性化した血球系の細胞と考えられた。脳傷害部位、または脾臓のいずれにおいても、CD3陽性Tリンパ球、CD19陽性Bリンパ球などの分化細胞やCD34陽性造血幹細胞は検出されなかった。

ヒト臍帯血単核球細胞から、磁気細胞分離法によりCD34陽性細胞、CD14陽性細胞、CD45陰性細胞を分離濃縮して、マウス新生仔脳虚血再灌流障害モデルの傷害脳組織から抽出したtissue lysateを加えて刺激培養した。培養上清中に産生されたヒトの分泌因子をBeads Array法により定量した。

無刺激の培養条件において、臍帯血全体の細胞(単核球)と比較して幹細胞分画(CD34陽性、CD45陰性)の分泌因子の産生能が優位であった。この中には、炎症促進性のサイトカインや成長因子に分類される分子が含まれていた。また、傷害脳刺激に反応して臍帯血単核球は分泌因子の産生を増強させたが、増強効果が最も強く見られたのはCD14陽性細胞であった。この中には、IL-1bのほか、CXCL1などいくつかのケモカインも含まれていた。一方、CD45陰性細胞は傷害組織の刺激を受けて分泌因子の産生を抑制する作用を示した。臍帯血全体の細胞、および、分離濃縮した上記3種類の細胞分画において、共通してダイナミックに産生が増強したサイトカインの絞り込みを行ったところ、CXCL8やIL-18など治療メカニズムに関与する可能性のある候補因子をとらえることができた。

脳傷害部位におけるミクログリアが病態の形成のみならず、臍帯血による脳障害治療のメカニズム、すなわち組織再生に関与する重要な細胞種であると考えられることから、臍帯血細胞がもつミクログリアに対する制御機能をこれら細胞の共培養系で評価した。マウスミクログリアはヒト臍帯血細胞との共培養により、ミクログリア全体における存在比において、炎症促進性M1タイプのミクログリアの有意な減少、免疫抑制型M2タイプのミクログリアの増加傾向を示した。また、CCL4やCXCL2などの産生が抑制されるなどミクログリアのケモカイン産生プロファイルが変化し、臍帯血細胞がミクログリアの細胞機能を調節する作用が認められた。

脳障害に対する臍帯血細胞移植による治療メカニズムには、臍帯血に含まれる各種細胞分画が組織傷害刺激に応じて分泌因子を発現増強または抑制する複合的な機能が関与すると考えられた。

ヒト臍帯血細胞が脳傷害組織環境において産生する分子のうちIL-18は、先行研究の成果から、マウス脳障害モデルの傷害組織において急性期に発現が高く、時間の経過とともに発現が減弱する分子であったことから、枯渇した有効分子を臍帯血治療によりフィードして組織再生や機能回復を誘導する可能性が考えられた。

さらに、ヒト臍帯血細胞はマウスミクログリアに直接作用して、ミクログリアの分化極性やケモカイン産生機能を調節することで治療メカニズムに関与することが考えられた。

以上より、臍帯血細胞を用いた再生医療の治療メカニズムには、臍帯血細胞が持つ傷害組織環境の調節を通して神経ネットワークの再構築に作用して、組織修復や機能回復が促進される可能性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 1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(10)
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬場伸育、松島幸生、渡邊理史、王飛霏、相良祐輔、前田長正
2. 発表標題 マウス新生仔脳虚血再灌流障害モデルに対する臍帯血細胞移植による再生治療メカニズムの検討—傷害組織の刺激を受けた臍帯血細胞のサイトカイン産生プロファイルの評価
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場伸育、王飛霏、永井立平、平川充保、大黒太陽、相良祐輔、前田長正
2. 発表標題 マウス傷害脳組織環境の刺激を受けた臍帯血細胞分画の機能を分泌因子の産生能から評価する
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬場伸育、王飛霏、沈淵、山下竜幸、吉井智加、津田雅之、藤枝幹也、相良祐輔、前田長正
2. 発表標題 マウス新生仔脳虚血再灌流障害モデル傷害脳組織環境におけるヒト臍帯血細胞の分泌因子産生能評価
3. 学会等名 第8回臍帯血による再生医療研究会（招待講演）
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
研究分担者	沈 淵 (Shen Yuan) (50294830)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・講師 (16401)	
研究分担者	王 飛霏 (Wang Feifei) (10629033)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教 (16401)	
研究分担者	山下 竜幸 (Yamashita Tatsuyuki) (30571038)	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
---------	---------