

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591204

研究課題名（和文） 新生児虚血脳に対する自己神経幹細胞移植

研究課題名（英文） Autologous transplantation of neural stem cells in neonatal hypoxic ischemic brain injury in rats

研究代表者

岩井 正憲（IWAI MASANORI）

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80467993

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、仔ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルにおいて、虚血低酸素負荷 3 日後の虚血障害組織から強い増殖能を持つ神経幹細胞/神経前駆細胞が採取された。しかし虚血障害部位からの吸引による組織採取の結果、頭部 MRI 撮影により虚血障害部位の拡大傾向、運動機能検査の悪化傾向が認められた。そこで自己神経幹細胞移植から、EGF 及び FGF2 の脳室内投与により、SVZ 及び虚血障害部位内の神経幹細胞/神経前駆細胞の増殖賦活に方針を変更した。同法では低酸素虚血負荷 7 日後に SVZ、脳梁脳梁下縁、虚血障害部位周囲に BrdU 陽性細胞の増加を認めたが、ほとんどが DCX、GFAP 及び O4 の神経 3 系統の細胞マーカーとは 2 重染色されず、未分化な状態にあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, neural stem/neural progenitor cells with strong mitotic ability were obtained from the ischemic brain lesion at 3 says after neonatal hypoxic ischemic insult in rats. However, aspiration of ischemic tissue from neonatal brain led to expand of ischemic lesions on MRI image and worsen of motor function test. Therefore, we changed the therapeutic method of this study from autologous transplantation to enhancement intrinsic neural stem/ neural progenitor cells in the subventricular zone (SVZ) and ischemic lesions with intraventricular injection of EGF and FGF which were usually used on neurosphere culture method. This method led to increase bromodeoxyuridine (BrdU) labeled cells in the SVZ, lower edge of corpus callosum and around of ischemic lesion. Histological investigation of brain tissue at 7days after hypoxia ischemia, almost all BrdU labeled cells were double labeled with neural progenitor maker DCX, astrocyte maker GFAP and oligodendrocyte progenitor maker O4, respectively. Therefore, BrdU labeled cells were seemed to still undifferentiated stage in this analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：脳梗塞巣、新生児低酸素性虚血性脳症、神経幹細胞、自己移植、Neurosphere 法

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、新生児低酸素性虚血性脳症の臨床に携わり、当院新生児集中治療室において 2008 年から低体温療法を導入し実践してきた。同療法は新生児低酸素性虚血性脳症の中等症例に効果が認められるが、重症例には効果が不十分であり、中枢神経保護療法の限界が示された。

一方、研究代表者は本邦及び米国において、成体および新生児脳虚血モデルを用いて、虚血後脳内の内在性神経幹細胞/神経前駆細胞の動態を研究し、同細胞の増殖、移動、分化の各段階の経時的変化を明らかにしてきた。さらに新生児低酸素性虚血性モデルを用いて、中枢神経再生療法の研究を展開し、エリスロポエチンによる血管新生促進および内在性神経幹細胞/神経前駆細胞の増殖賦活効果から、同症での中枢神経再生療法の可能性を示してきた。

一連の研究の中で、脳虚血障害部位にどの程度の神経前駆細胞が存在するか明らかにできたが、特異的マーカーの存在しない神経幹細胞に関しては、脳組織障害部位に存在するのか、存在するとすればどの程度の数が存在し、どのような性質を持ち、かつどのような動態を示すのかは不明であった。

仔ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルを用いた予備的研究によって、低酸素虚血負荷後 1～7 日の脳梗塞巣から組織を採取培養し、同部に神経幹細胞が多数存在していることを確認できた。

新生児低酸素性虚血性脳症は、分娩 500～1,000 件に 1 例の割合で発生し、脳性マヒの主な原因疾患となっていること、臨床応用された中枢神経保護療法である新生児低体温療法の治療効果の限界が示されたことから、中枢神経再生療法の開発が必要と考えられ、同症の虚血障害部位に存在する神経幹細胞を用いた自己移植を計画した。

## 2. 研究の目的

仔ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルを用いて、虚血障害部位からの自己神経幹細胞移植の可能性について

- A) 最適な神経幹細胞採取時期
- B) 採取された神経幹細胞の増殖、分化に関する性質
- C) 採取による脳虚血障害領域及び神経学的予後に関する影響
- D) 最適な自己神経幹細胞移植時期
- E) 自己神経幹細胞移植を行う脳虚血障害領域に対する最適な移植前治療法

の各検討を行うことを本研究の目的とした。研究成果の概要で述べたように、本研究の目的 C) において、神経幹細胞採取は脳虚血障害

領域の拡大及び運動機能の悪化が示唆されたため、目的 D) および E) は研究中止とし、F) EGF および FGF2 の脳室内投与による、新生児低酸素虚血後脳での神経幹細胞増殖賦活療法の検討を行うことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、仔ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルとして確立し汎用されている Levine 変法モデルを使用した。日齢 7 の仔ラットの左総頸動脈を結紮離断後、8%O<sub>2</sub> の低酸素負荷を 2 時間行い、低酸素性虚血性脳症を作成した。研究の各目的を検証するために以下の方法により研究を遂行した。

### A) 最適な神経幹細胞採取時期

予備実験によって本モデルの虚血障害領域からの組織吸引による神経幹細胞採取時期は低酸素虚血負荷後 3 日付近と考えられたが、確実な採取部位と最適な時期を検証するために、低酸素虚血負荷後 3、5、7 日の脳を採取、2mm 厚の冠状断スライスを作成し、虚血障害領域の大脳皮質、線条体および SVZ について直径 2mm の円形パンチアウト組織を採取、homogenize 後に Neurosphere 法により 4 日間培養し、各組織から得られた細胞から最も多くの cell cluster を形成した時期を最適な採取時期とした。

### B) 採取された神経幹細胞の増殖、分化に関する性質

虚血障害領域の SVZ から上記 A) と同様に得られた細胞について、MTT assay 法により増殖能力を検討した。

また、分化能については neurosphere 法で 4 日間培養し、産生された cell cluster を EGF および FGF-2 を除去したラミニンコート培地で 1 週間培養し、分化誘導を行った。

### C) 採取による脳虚血障害領域及び神経学的予後に関する影響

低酸素虚血負荷日に頭部 MRI 撮影を行った後、虚血障害領域から組織を 20・1 吸引し、吸引 4 日後に再度頭部 MRI を撮影し、虚血障害領域の変化について検討した。

また吸引 4 日後、11 日後に foot fault test を行い、運動機能評価を行った。

### D) 最適な自己神経幹細胞移植時期

### E) 自己神経幹細胞移植を行う脳虚血障害領域に対する最適な移植前治療法

上記研究については、C) の結果を受けて中止とした。

### F) EGF および FGF2 の脳室内投与による、新生児低酸素虚血後脳での神経幹細胞増殖賦活療法

本モデルにおいて低酸素虚血負荷 3 日後に虚血反対側の脳室内に EGF および FGF2 を各々

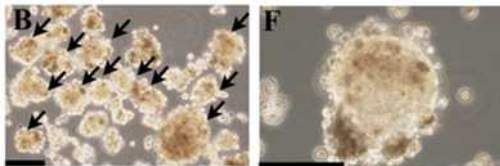
10・g、100・g をハミルトンシリンジで投与し、低酸素虚血負荷 4~6 日に BrdU を腹腔内投与、低酸素虚血負荷後 7 日に脳を採取し、冠状断面を作成し、neural progenitor cell のマーカーである DCX、astrocyte のマーカーである GFAP、oligodendrocyte progenitor

のマーカーである O4、および activated microglia のマーカーである Iba1 を用いて、各々 BrdU との 2 重染色を行うことで、BrdU 陽性細胞の各細胞への分化について検討した。

#### 4. 研究成果

##### A) 最適な神経幹細胞採取時期

虚血障害領域の脳皮質、線条体、SVZ から得られた細胞について neurosphere 法により培養を行った結果、全領域から虚血低酸素負荷後 3 日及び 5 日の各組織から cell cluster が形成された。



最も多くの cell cluster が形成されたのは虚血低酸素負荷後 3 日後の虚血障害領域の各組織から得られた細胞からで、脳皮質  $193.33 \pm 32.49$  clusters/well (n=6)、線条体  $253.83 \pm 73.74$  clusters/well

(n=6)、SVZ  $279.17 \pm 65.76$  cluster/well (n=6) であった。これらの cell cluster は、EGF 及び FGF2 の除去後 1 週間の培養により、 $\beta$  III-tubulin 及び MAP2、GFAP、O4 の神経 3 系統の細胞を含んでおり、neural stem cell を含んでいることが確認された。

また、虚血低酸素負荷後 7 日の各組織から得られた細胞に対する neurosphere 法では、形態およびマーカー解析でほとんどが血管内皮前駆細胞と判断された。

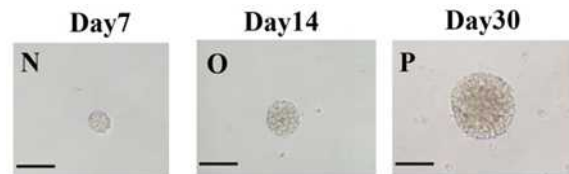
以上の結果から、脳虚血障害領域からの最適な神経幹細胞採取時期は、虚血低酸素負荷後 3 日と判明した。また採取部位は cell cluster の形成数から虚血障害領域の SVZ、線条体、脳皮質の順であった。

##### B) 採取された神経幹細胞の増殖、分化に関する性質

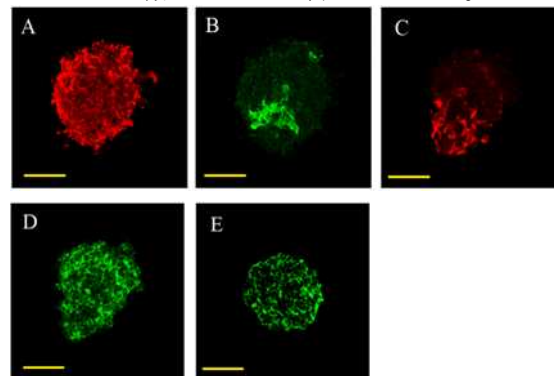
虚血障害領域側の SVZ から得られた細胞、虚血障害領域対側の SVZ から得られた細胞、および低酸素負荷を行っていない同日齢ラットの SVZ から得られた細胞の増殖能を MTT assay 法によって比較した。低酸素負荷を行っていない同日齢ラットの SVZ から得られた細胞の吸光度を 1 とすると、虚血障害領域側の SVZ から得られた MTT assay の吸光度は

$2.56 \pm 0.20$ 、虚血障害領域反対側の SVZ の吸光度は  $1.19 \pm 0.07$  で、虚血障害領域側の SVZ では増殖能が賦活されていることが示された。

また、自己複製能について虚血障害領域の脳皮質から得られた細胞を 4 日間 neurosphere 法で培養して得られた cell cluster の細胞を単離し、1cell/well として再度 neurosphere 法を行うことで、neurosphere の形態を示す cell cluster が形成されることを示した。

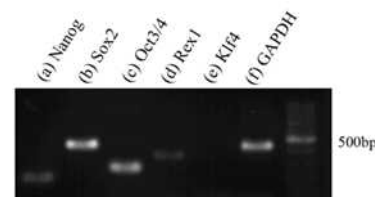


また、虚血障害領域の脳皮質から得られた細胞を neurosphere 法で 4 日間培養後に得られた cell cluster には nestin (A)、NG2 (B)、GFAP (C)、 $\beta$  III-tubulin (D)、O4 (E) の各マーカーに陽性の細胞が含まれていた。



この結果により虚血障害領域の脳皮質内に神経幹細胞が存在することを再確認された。

さらに RT-PCR 解析により、培養 4 日後の cell cluster には、Nanog、Sox2、Oct3/4、Rex1 の mRNA の発現が確認された。



##### C) 採取による脳虚血障害領域及び神経学的予後に関する影響

低酸素虚血負荷後 3 日の仔ラットの頭部 MRI を撮影した後、脳梗塞領域から 27G 針とハミルトンシリンジを使用して  $20 \mu$  l の脳組織を吸引した。虚血負荷後 7 日 (吸引後 4 日) の頭部 MRI ではむしろ脳梗塞領域の拡大傾向が認められ、運動機能検査も悪化傾向が

認められた。脳梗塞領域での内在性神経幹細胞の働きの1つに、神経保護興効果が報告されており、今回の結果も新生児虚血脳において同様の働きがみられていることを示唆していると考えられる。

D) については研究計画変更に伴い実施せず。  
E) については研究計画変更に伴い実施せず。

F) EGF および FGF2 の脳室内投与による、新生児低酸素虚血後脳での神経幹細胞増殖賦活療法

低酸素虚血後7日に脳を採取し行った組織学的検討では、BrdU陽性細胞は側脳室から脳梁を介して虚血辺縁近くに達するBrdU陽性細胞の集簇像をEGFとFGF2を脳室内投与した群の一部に認めた。これらのBrdU陽性細胞について、DCX(未熟神経細胞)、GFAP(アストロサイト)、NG2(早期オリゴデンドロサイト前駆細胞)、Iba1(活動性ミクログリア)の各細胞マーカーを用いて二重染色を施行したが、二重標識される細胞はほとんどなく、まだ未分化な状態で残っている可能性がある。また、虚血反対側のSVZや海馬歯状回のsubgranular zoneでもBrdU陽性細胞が増加しているが、その分化の方向については今後の検討課題となった。

今回のEGFとFGF2の脳室内投与は脳梗塞の体積には影響を及ぼさなかった。EGFとFGF2の脳室内投与による神経学的予後の改善効果については、今後の検討課題となった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

- (1) Jun Kido, Masanori Iwai, Shirou Matsumoto, Hiroko Tajiri, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo: Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from infarct area in neonatal rat brain. International Stroke Conference 2012. 2012. 2. 2. New Orleans, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩井 正憲 (IWAI MASANORI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80467993