

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 3 月 31 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591213

研究課題名（和文） 糖鎖修飾した臍帯血幹細胞移植による周生期脳障害の克服

研究課題名（英文） Umbilical cord blood-derived cell therapy for perinatal brain damage

研究代表者

中西 圭子（ NAKANISHI KEIKO ）

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・主任研究員

研究者番号：50280813

研究成果の概要（和文）：

新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)など周生期脳障害に対する臍帯血由来幹細胞の有用性について、ラットモデルを用いて検討した。ラット胎仔より臍帯血有核細胞層を採取し、増殖因子存在下で培養増殖させた。この細胞を HIE モデルラットに投与したところ、個体差はあるものの、脳梗塞面積の軽減、運動能力の改善が観察された。HIE に対し、臍帯血由来幹細胞が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the therapeutic effect of umbilical cord blood-derived cells (UCBC) on neonatal hypoxia-ischemia encephalopathy (HIE) model in rats. Mononuclear cells isolated from rat umbilical cord blood were propagated in culture using growth factors and the cells were administered to HIE model of rats. Administration of UCBC decreased the infarct size and improved motor functions. These results indicate that administration of UCBC is a promising therapy for neonatal hypoxia-ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学、新生児学

科研費の分科・細目：胎児・新生児学

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症、臍帯血幹細胞、

1. 研究開始当初の背景

新生児医療の進歩に伴い病的新生児の救命率は飛躍的に向上しているものの、新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)など周生期脳障害による神経学的後遺症の頻度は高く、新生児医療にとって残された課題である。HIE に対して脳低温療法はあるものの重症例にはあまり有効でなく(Gluckman PD *et al.*: *Lancet*,

2005)、新規治療法の開発が切望されている。

近年、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、中枢神経損傷をはじめこれまで治療のなかった様々な医療分野で応用が期待されている。しかし、ES 細胞や iPS 細胞を用いた動物実験では移植後にガン化を高率に引き起こし (Rao M: *Stem Cell*

Dev.,2007)、臨床応用への大きな障害になっている。これまでに我々は、HIEモデルラットにおいて、神経幹細胞とともにコンドロイチン硫酸糖鎖切断酵素を脳室内投与すると、脳梗塞が軽減することを報告した(Sato et al.: *Reprod. Sci.*, 2008)。しかし、臨床応用を考えると、脳室内投与は非現実的である。

臍帯血は胎盤とともにその多くは廃棄されるが、造血幹細胞や間質性幹細胞を含んでおり、出生時に採取しておけば自家移植が可能なこと、ガン化をおこす心配のないこと、移植片対宿主病(GVHD)をおこしにくいこと、静脈内や腹腔内投与でも脳内へ移行できることなど、骨髄採取が困難な新生児にとって最も安全かつ臨床に応用しやすい幹細胞源である。

2. 研究の目的

本研究では、新生児において最も安全かつ簡便に採取できる幹細胞源である臍帯血幹細胞を用いて、周生期脳障害に対する効率的な再生医療法を開発するとともに、その分子基盤を明らかにすることを目的とする。具体的には、ラット臍帯血由来幹細胞をHIEモデルラットに投与し、その効果や糖鎖修飾による影響を検討する。

3. 研究の方法

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(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日後に腹腔内投与し、受傷3週間後に行動学的、形態学的に評価した。

また、ラットE19.5胎仔の胎盤をPFA固定し、パラフィン切片を作製、CS56抗体染色を行った。

4. 研究成果

1) 増殖させたラット臍帯血幹細胞(UCBC)の評価(表1):

表1 臍帯血由来細胞の増殖前後の比較

培養	0日目	10日目
総細胞数 (1腹, $\times 10^6$ 個)	0.72 \pm 0.44	10.7 \pm 3.4
コロニー形成細胞 (CFU-GM アッセイ, %)	0.90 \pm 0.27	20.2 \pm 2.1
コロニー形成細胞総数 (1腹, $\times 10^4$ 個)	0.77 \pm 0.48	234 \pm 81
CD133+/dapi (%)	54.7 \pm 21.5	77.0 \pm 16.1
CD34+/dapi (%)	16.4 \pm 8.9	3.8 \pm 0.6

10日間の培養で、総細胞数は17.5倍に、造血幹細胞コロニーアッセイ(Colony forming unit-granulocyte/macrophage (CFU-GM) progenitors assay)でのコロニー形成細胞総数は433倍に増加した。幹細胞マーカーであるCD133陽性細胞は77%、CD34陽性細胞は3.8%であった。

2) HIEモデルラットに対するラット臍帯血幹細胞(UCBC)投与の効果:

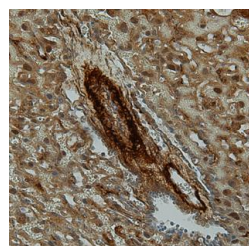
増殖させたラット臍帯血由来細胞(UCBC)を投与した群の患側/対側脳面積は59 \pm 22%(mean \pm SD, n=14)であり、対照群(40 \pm 10%, n=15)に比較して有意に(p<0.01)残存脳面積が大きかった。またCylinder testでの患肢の使用は、対照群では33 \pm 19%であったのに対し、UCBC投与群では49 \pm 12%であり、左右差が減少していた。さらにRotarodでの落下までの時間は対照群では48.2 \pm 38.7秒であったのに対し、UCBC投与群では65.1 \pm 38.9秒であり、運動機能は改善していた。

以上のことから、臍帯血幹細胞の投与はHIEの治療法として有用である可能性が示唆された。しかし、その効果の程度は個体差が大きいことから、今後臨床に応用していくためには、幹細胞による梗塞軽減機序の解明が必要であると考えられた。

3) 胎盤・臍帯におけるコンドロイチン硫酸糖鎖の存在(図1):

図1に示すように、胎盤内の臍帯動静脈血管壁にコンドロイチン硫酸糖鎖が発現していることが確認できた。この結果は、コンドロイチン硫酸糖鎖により臍帯血幹細胞の増殖分化が制御されている可能性を示唆するものである。

図1 ラット胎盤のCS56免疫染色



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)

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

① Ichinohashi Y, Sato Y, Saito A, Ito M, Watanabe K, Hayakawa M, Nakanishi K, Wakatsuki A, Oohira A. Dexamethasone administration to the neonatal rat results in neurological dysfunction at the juvenile stage even at low doses. *Early Hum Dev.* 2012 Nov 12. doi:pii:S0378-3782(12)00250-2.10.1016/j.earlhumdev.2012.10.007. [Epub ahead of print] (査読有)

② Nakanishi K, Ito M, Sato Y, and Oohira A. A highly-sulfated chondroitin sulfate, CS-E, adsorbs specifically to neurons with nuclear condensation. *Neurosci. Res.* 74(3-4): 223-9, 2012. doi: 10.1016/j.neures.2012.08.009. (査読有)

③ Harada N, Watanabe Y, Yoshimura Y, Sakumoto H, Makishima F, Tsuchiya M, Nakanishi K, Nakanishi M, Aoki Y. et al., Identification of a checkpoint modulator with synthetic lethality to p53 mutants. *Anticancer Drugs*, 22(10): 986-94, 2011. doi: 10.1097/CAD.0b013e328349dd43. (査読有)

④ Yamada Y, Yoshida F, Hemmi H, Ito M, Kakita H, Yoshikawa T, Hishida M, Iguchi T, Seo T, and Nakanishi K. Atypical social development in NICU survivors at 12 months. *Pediatrics International*, 53(6): 858-866, 2011. doi: 10.1111/j.1442-200X.2011.03367.x. (査読有)

⑤ Nakanishi K, Tokita Y, Aono S, Ida M, Matsui F, Higashi Y, and Oohira A. Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor. *Neurochem. Res.* 35: 1131-1137, 2010. doi: 10.1007/s11064-010-0164-9. (査読有)

⑥ Yamada K, Miura K, Hara K, Suzuki M, Nakanishi K, Kumagai T, Ishihara N, Yamada Y, Kuwano R, Tsuji S, and Wakamatsu N. A wide spectrum of clinical and brain MRI findings in patients with SLC19A3 mutations. *BMC Medical Genetics* 11:171-178, 2010. doi:10.1186/1471-2350-11-171 (査読有)

〔学会発表〕 (計 11 件)

① 山田 憲一郎, 福原 弥生, 水野 誠司, 内木 美沙子, 木村 礼子, 山田 裕一, 中西 圭子, 若松 延昭: BRESEK/BRESHECK 症候群の病因遺伝子 (MBTPS2) の脳発達

における機能解析. 日本生化学会(福岡)2012.12.15.

② 中西 圭子, 伊藤美春, 佐藤義朗: 新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞投与. 日本未熟児新生児学会・学術集会 (熊本) 2012.11.26.

③ 服部哲夫, 佐藤義朗, 杉山裕一郎, 伊藤美春, 近藤大貴, 齊藤明子, 津田弘之, 藤巻英彦, 一ノ橋祐子, 小谷友美, 中西 圭子, 早川昌弘: 新生児低酸素性虚血性脳症に対するヒト臍帯血由来単核球を用いた幹細胞療法. 日本未熟児新生児学会・学術集会 (熊本) 2012.11.26.

④ 一ノ橋祐子, 佐藤義朗, 齊藤明子, 伊藤美春, 渡辺貴美, 早川昌弘, 中西 圭子, 若槻明彦, 大平敦彦: 新生仔ラットにおける低用量デキサメサゾンによる神経発達. 日本神経科学大会 (名古屋) 2012.9.19.

⑤ 中西 圭子, 伊藤美春, 佐藤義朗, 大平敦彦: 高硫酸化コンドロイチン硫酸CS-Eの神経保護活性. 日本神経科学大会 (名古屋) 2012.9.18.

⑥ 中西 圭子, 伊藤美春, 佐藤義朗, 大平敦彦: 高硫酸化コンドロイチン硫酸CS-Eの神経保護活性に関する研究. 日本生理学会大会 (松本) 2012.3.30.

⑦ 山田憲一郎, 三浦清邦, 原賢寿, 鈴木基正, 中西 圭子, 熊谷俊幸, 石原尚子, 山田裕一, 桑野良三, 辻省次, 若松延昭: 多様な臨床症状と脳MRI画像を呈するSLC19A3異常症、東海臨床遺伝・代謝懇話会 (名古屋) 2011. 2. 1.

⑧ Yamauchi S, Nakanishi K, Aono S, Matsui F, Tokutome S, Higashi Y, Oohira A, Tokita Y: Molecular interaction between FGF and brain specific chondroitin sulfate proteoglycan. 日本分子生物学会大会 (神戸) 2010. 12. 7.

⑨ 中西 圭子, 時田義人, 青野幸子, 松井ふみ子, 東雄二郎, 大平敦彦: 脳特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ニューログリカンCはプレイオトロフィンと結合する、日本神経科学大会・日本神経化学学会大会・日本神経回路学会大会 (神戸) 2010. 9. 4.

⑩ 山田恭聖, 中西 圭子, 孫田みゆき, 垣田博樹, 伊藤美春, 立花貴史, 寺澤かずみ, 鈴木基正, 丸山幸一, 井口敏之, 瀬尾智子: NICU退院児の非定型的な社会性発達

(12ヶ月齢におけるMCHAT評価の試み) 第46回 日本周産期・新生児医学会学術集会 (神戸) 2010. 7. 13.

- ⑪ 佐藤義朗, 中西圭子, 大平敦彦, Blomgren Klas, 服部哲夫, 早川昌弘: 中枢神経疾患に対する幹細胞療法-周産期脳障害の救世主となりうるか-, 第52回日本小児神経学会総会 (福岡) 2010. 5. 20.

[図書] (計 2 件)

①Sato Y, Nakanishi K, Hattori R, Ichinohashi Y, Blomgren K, Oohira A, Hayakawa M. Stem cell therapies CNS diseases—can they save babies with brain injuries? No To Hattatsu 43:201-205, 2011.

②Nakanishi K, Sato Y, Oohira A. Biological activities of highly sulfated chondroitin sulfate polysaccharides on neural cells. Res. Adv. in Neurochemistry 1, pp1-10, Global Research Network, Kerala, India, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 圭子 (NAKANISHI KEIKO)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周産期学部・主任研究員
研究者番号: 50280813

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号:

研究協力者:

東雄二郎 (HIGASHI YUJIRO)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周産期学部・部長

大平敦彦 (OOHIRA ATSUHIKO)
名古屋大学・小児科・研究員

佐藤義朗 (SATO YOSHIAKI)
名古屋大学・総合周産期母子医療センター・新生児科・病院助教

伊藤美春 (ITO MIHARU)
名古屋大学・総合周産期母子医療センター・新生児科・医師