

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592402

研究課題名(和文) 新生児脳障害に対する臍帯血移植の実現をめざして - 有効な移植法とメカニズムの解析 -

研究課題名(英文) A trial of the establishment of the umbilical cord blood stem cell transplantation for the neonatal brain injury: a search for the effective transplantation -

研究代表者

金川 武司 (Kanagawa, Takeshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40346218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：周産期医療の進歩は著しいが、胎児仮死や新生児仮死による周産期脳障害は未だ大きな問題点として残されている。これを減少させることは、周産期医療における大きな課題である。今回、周産期脳障害を軽減させるべく新生児脳障害に対する臍帯血移植の実現をめざして、有効な移植法とメカニズムの解析を検討した。そこで、低酸素性虚血性脳障害モデルを用いて、カフェインによる前治療は、次に起こる脳障害を軽減させることを見出し、それらはNF- $\kappa$ Bを介して脳障害を軽減させていることを証明した。

研究成果の概要(英文)：The Perinatal brain damage due to the fetal distress or neonatal distress remains the most important problem although the perinatal care develops rapidly remarkably. The aims of this research are the decrease the perinatal damage. In this research, we discovered that the short-term treatment of caffeine induced the neuroprotection which is attributed from the activation of NF- $\kappa$ B.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：新生児低酸素虚血性脳障害 胎児付属物 幹細胞 カフェイン NF- $\kappa$ B プレコンディショニング

### 1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩により、低出生体重時の救命率は飛躍的に改善されてきているが、その一方で超低出生体重児、胎児仮死や新生児仮死による周産期脳障害は未だ大きな問題点として残されている。今までに、われわれの研究グループは、周産期脳障害に対して有効な治療法を模索し、低体温療法が脳障害に対し有効である基礎的研究を報告した (Kanagawa T, Tomimatsu T, 2003)。そして、これらの基礎的研究につづき、現在では臨床応用がなされており、一定の効果を上げている。しかし、これは脳障害の進展をくい止めるには有効かもしれないが、一旦おこってしまった脳障害に対しては無効である。そこで、着目したのが神経細胞の再生・移植である。それらをふまえて、われわれの研究グループは、この数年、未熟脳における神経再生や移植について研究をしてきた。以下の点について明らかにした。

未熟脳においては、成熟脳とは比べものにならないほど神経幹細胞が存在しており、これらが盛んに分裂している。この点は、成熟脳とは非常に異なる点であり、成人とは異なる治療戦略が必要かもしれない。

新生児低酸素虚血性脳障害において、セフトリアキソンナトリウム (抗生物質) は、脳障害に対して抵抗性を付加し (Mimura T, Kanagawa T, 2010; 研究業績欄参照)、脳障害時に発生する炎症マーカーCRP そのものにより、脳障害は助長される (Kinugasa Y, Kanagawa T, 2010; 研究業績欄参照)。

新生児脳再生において、あらゆる因子により神経幹細胞の増殖は調節されている。ステロイドホルモンにより神経幹細胞の増殖は抑制され (Kanagawa T, 2005; 研究業績欄参照)、脳障害 進展をくい止めるはずの低体温療法は実は神経幹細胞の増殖を抑制する (Kanagawa T, 2006; 研究業績欄参照)。これらの変化は、成熟脳に比して著明に影響を受けていた。

新生児虚血性脳障害モデルにより虚血後、神経細胞がさかんに再生している。

虚血性脳障害後における再生によってできた神経細胞はほとんどが減少していき、一ヶ月後には、脳障害を受けていない脳における新生によってできた神経細胞数と、ほぼ同等になる。

すなわち、未熟脳は神経再生が盛ん起きているが、未熟脳でさえも、虚血性脳障害後における神経再生だけでは、脳障害の器質的・機能的治癒には不十分であることも同時に見いだされた。

一方、この数年、胚性幹細胞細胞 (ES 細胞) による再生を主とした治療、すなわち脳障害 (パーキンソン病、脊椎損傷) を含む心筋梗塞、白血病、糖尿病、肝臓病疾患に対する幹細胞移植が着目されているのは周知のとおりである、また最近では、iPS 細胞も再生医療における供給源として有望視されている。しか

し、ES 細胞は、受精卵から作られるため生命倫理の問題、供給源の問題、移植・宿主間の拒絶反応の問題点があり、日本においては、ヒト臨床で応用するにはまだまだ時間が必要である。また、iPS 細胞は、生命倫理の問題、供給源の問題、拒絶反応の問題点を解決する有望な移植供給源であるが、遺伝子導入に伴う癌化の問題等あり、臨床応用するには、ほど遠いものと思われる。そこで、われわれは、臍帯血由来間葉系幹細胞に再度、着目した。しかしながら、臍帯血由来間葉系幹細胞を用いた研究は、すべて成人疾患を対象としたもので、新生児疾患を想定した研究はまだ不十分である。また、単純に移植を行った報告はあるものの、実際は限られた量しか採取できないため、臨床応用にはほど遠い。これを打破するための、鍵となるだろう神経栄養因子や血管増殖因子の検討については今までなされていない。

### 2. 研究の目的

そこで、われわれは、ラット新生児低酸素性虚血性脳障害モデルを用いて、

新生児脳障害において、臍帯血間葉系幹細胞が脳神経細胞により有効に誘導される方法を

上記における神経栄養因子や血管増殖因子の関与やメカニズムの解析

以上の2点について明らかにすることを目的として、研究を行った

### 3. 研究の方法

ラット新生児低酸素性虚血性脳障害モデル (図1)としては、以下を作成し、検討した。すなわち、生後7日目の Wister 新生仔ラットを吸入麻酔下に左総頸動脈を露出・結紮する。総頸動脈を露出するも、結紮しない群 (sham 群) も作成する。術回復1時間後、ラットを 8%酸素、環境温 37 のチャンパー内に収容し、低酸素負荷を課すことにより新生児低酸素性虚血性脳障害モデルを作成する。

低酸素性虚血性脳症モデル

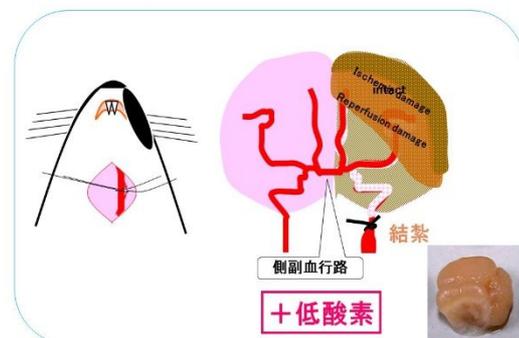


図1 ラット新生児低酸素性虚血性脳障害モデル

このモデルに、以下のことについて検討した。

カフェインによる脳障害軽減効果についての検討。

日齢 4~6 日に PBS を投与してシャム手術を行った群 (sham 群) カフェイン 25mg 腹腔内投与した群 (caff25 群) カフェイン 50mg 腹腔内投与した群 (caff50 群) PBS を投与して頸動脈結紮手術を行った群 (HI 群) の 4 群に分けて、脳障害の程度について MAP-2 染色を用いて評価した。

カフェイン投与群と PBS 投与群により、HIF-1、NF- $\kappa$ B の動態について ウェスタンブロッティング法を用いて検討した

NF- $\kappa$ B の活性阻害する IMD 0354 を投与することにより、脳障害軽減効果が減弱するか検討した

#### 4. 研究成果

カフェインによる脳障害軽減効果についての検討。

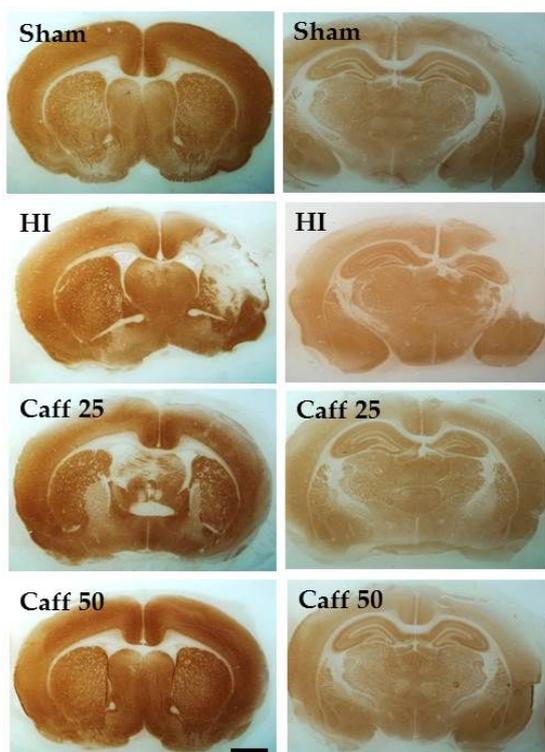


図 2. The hippocampus area stained with microtubule associated protein-2 (MAP-2).

カフェイン投与群は、PBS を投与して頸動脈結紮手術を行った群に比較して、有意に MAP-2 染色領域が多く、左右脳重量比も保たれていた (図 2,3)。このことは、カフェインの前投与によって、次に来る低酸素虚血による脳障害を軽減できることが示された。

NF- $\kappa$ B の動態について ウェスタンブロッティング法を用いて検討

カフェイン投与群は、シャム群に比較して、有意に NF- $\kappa$ B-p65 が活性化されていた (図 2)。NF- $\kappa$ B-p65 のタンパク質量は、カフェイン 25mg/kg 前投与群とカフェイン 50mg/kg 前投与群は、コントロールに比較して、0.98 倍、1.24 倍 ( $p=0.01$ ) と有意に上昇していた。このことは、カフェインの前投与により、NF- $\kappa$ B が誘導され、これにより、低酸素虚血脳障害の軽減が起こっている可能性が示唆

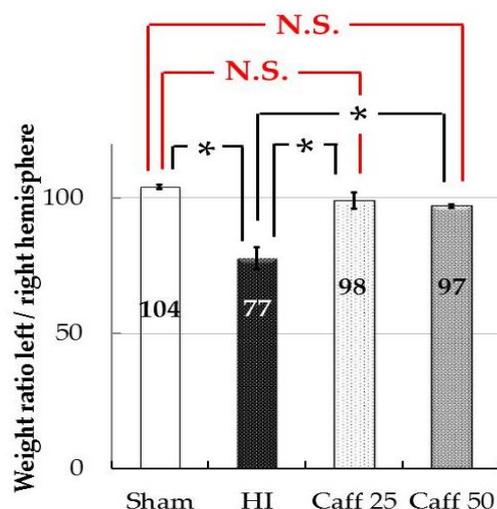


図 3. The brain ipsilateral hemisphere weight as percent of the contralateral hemisphere.

された。そのことを証明するため、NF- $\kappa$ B の活性阻害する IMD-0354 を投与することにより、脳障害軽減効果が減弱するか検討した

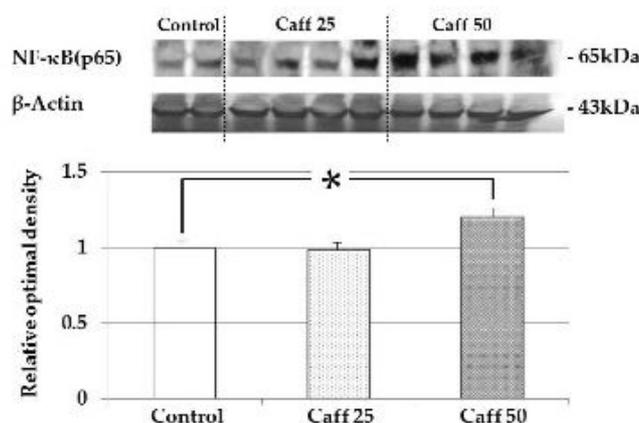


図 4. NF- $\kappa$ B expression after the short-term treatment of caffeine on the postnatal day 7 (P7).

NF- $\kappa$ B の活性阻害する IMD 0354 を投与することにより、脳障害軽減効果が減弱するかどうかの検討

NF- $\kappa$ B の活性阻害する IMD 0354 を投与することにより、脳障害軽減効果を証明するために、カフェイン 25mg/kg 前投与してから低酸素虚血を行った群 (Caff 群) カフェイン 25mg/kg 前投与に加え、IMD-0.354 投与して、その中に低酸素虚血にした群 (Caff +IMD-0354 群) 低酸素虚血のみ行った群 (HI 群) の 3 群に分けて、検討した。(図 5 上段)。Caff +IMD-0354group 群は、Caff 群に比して、有意に脳重量が低下し、HI 群と比較して差が認められなかった (図 5 下段)。このことは、NF- $\kappa$ B の活性阻害する IMD 0354 を投与することにより、脳障害軽減効果が減弱し、HI 群と同等の脳障害になった。このことは、カフェインによる脳障害軽減効果は、NF- $\kappa$ B の誘導によって、引き起こされていること示唆さ

れた。

以上の研究は、胎児脳障害を受けやすい時期がわかっている(例えば分娩時) 事前に母体にカフェインを投与することによって、次に来る脳障害を軽減できることが示唆された。

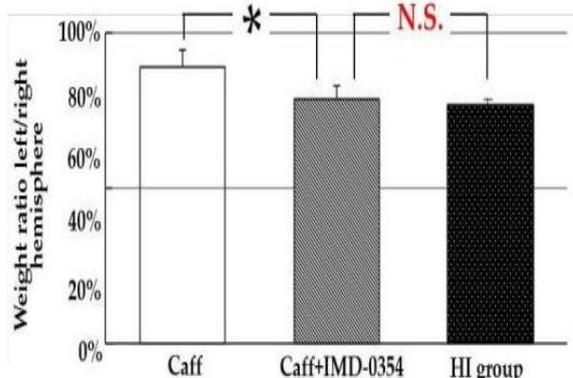


図 5. The effect of the pre-treatment of the NF- $\kappa$ B inhibitor IMD-0354 before insult.

以上の研究は、胎児脳障害を受けやすい時期がわかっている(例えば分娩時) 事前に母体にカフェインを投与することによって、次に来る脳障害を軽減できることが示唆された。

#### 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)

[雑誌論文](計 21 件)

Otgonbaatar J, Kanagawa T, Minato K, Mimura K, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Tomimatsu T, Kimura T. Short-term treatment of caffeine attenuates hypoxic ischemic brain damage in neonatal rats. Medical journal Osaka University, 2013. 55: 1-23 査読有

Kakigano A, Mimura K, Kanagawa T, Nakayama M, Kanayama T, Fujita S, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Tomimatsu T, Kimura T. Imbalance of angiogenic factors and avascular edematous cystic villi in a trisomy 13 pregnancy: A case report. Placenta. 2013. 34:628-630 査読有

Minato K, Tomimatsu T, Mimura K, Jugder O, Kakigano A, Kanayama T, Fujita S, Taniguchi Y, Kanagawa T, Endo M, Kimura T. Hypoxic preconditioning increases triiodothyronine (T3) level in the developing rat brain. Brain Res. 2013. 1501:89-97. 査読有

Tomimatsu T, Fujime M, Kanayama T, Mimura K, Koyama S, Kanagawa T, Kimura T. Maternal arterial stiffness in normotensive pregnant women who

subsequently deliver babies that are small for gestational age. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013. 169:24-27. 査読有

Tomimatsu T, Kakigano A, Mimura K, Kanayama T, Koyama S, Fujita S, Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Maternal carbon dioxide level during labor and its possible effect on fetal cerebral oxygenation: mini review. J Obstet Gynaecol Res. 2013. 39(1):1-6. 査読有

Okaue Y, Koyama S, Kanagawa T, Taniguchi T, Kimura T. Central aortic blood pressure and augmentation index during normal pregnancy. Hypertens Res. 2012. 35(6):633-8. 査読有

Koyama S, Tomimatsu T, Kanagawa T, Kumasawa K, Tsutsui T, Kimura T. Reliable predictors of neonatal immune thrombocytopenia in pregnant women with idiopathic thrombocytopenic purpura. Am J Hematol. 2012. 87(1):15-21. 査読有

11. Tomimatsu T, Kakigano A, Mimura K,

Kanayama T, Koyama S, Fujita S, Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Maternal hyperventilation during labor revisited: its effects on fetal oxygenation. Reprod Sci. 2012. 19:1169-1174 査読有

Usui N, Kamiyama M, Tani G, Kanagawa T, Fukuzawa M. Use of the medical information on the internet by pregnant patients with a prenatal diagnosis of neonatal disease requiring surgery. Pediatr Surg Int. 2011. (12):1289-93 査読有

19. Kinugasa-Taniguchi Y, Ueda Y, Hara-Ohyagi C, Enomoto T, Kanagawa T, Kimura T. Impaired delivery outcomes in pregnancies following myomectomy compared to myoma-complicated pregnancies. J Reprod Med. 2011. 56:142-148. 査読有

Mimura K, Tomimatsu T, Minato K, Otgonbaatar J, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Nozaki M, Yanagihara I, Kimura T. Ceftriaxone preconditioning confers neuroprotection in neonatal rats through glutamate transporter 1 upregulation. Reprod Sci. 2011. 18:1193-1201. 査読有

金川武司、他、東京医学社、周産期医学

2013.3月 査読無

[学会発表](計 件)

富松拓治、味村和哉、谷口友基子 金川武司、下屋浩一郎、木村正. 成熟児の asphyxia と cerebral palsy その疫学と

予防 胎児脳循環からみた分娩管理  
胎児二酸化炭素分圧の重要性 日本周  
産期・新生児医学会第 31 回周産期学シ  
ンポジウム 1.25-26/13 大阪  
高橋恵、味村和哉、松崎慎哉、熊澤恵一、  
橋本香映、谷口友基子、金川武司、遠藤  
誠之、木村正。第 65 回日本産科婦人科  
学会 5.10-12/13 札幌  
味村和哉、金川武司、金山智子、藤田聡  
子、谷口友基子、遠藤誠之、川村菜都美、  
柿ヶ野藍子、木村正。当院における Term  
で分娩になった胎児発育不全症例の転  
帰 第 86 回日本超音波医学会  
5.24-26/13 大阪  
金山智子、富松拓治、柿ヶ野藍子、藤田  
聡子、味村和哉、谷口友基子、金川武司、  
木村 正。正常血圧妊婦の子宮内胎児発  
育遅延と動脈スティフネスとの関連性  
の後方視的解析 第 64 回日本産科婦  
人科学会 4.13-15/12 神戸  
富松拓治、柿ヶ野藍子、味村和哉、金山  
智子、藤田聡子、脇本 哲、石井貴子、  
谷口友基子、湊 健志、金川武司、木村  
正。分娩中の母体過換気が臍帯静脈血ガ  
ス所見と胎児脳組織酸素化に及ぼす影  
響 経皮二酸化炭素分圧モニターによ  
る検討 第 64 回日本産科婦人科学会  
4.13-15/12 神戸  
金川武司。新技術応用のための B モード  
画像の勘所 第 85 回日本超音波医学会  
5.25-27/12 東京  
金山智子、富松拓治、藤田聡子、柿ヶ野  
藍子、味村和哉、谷口友基子、金川武司。  
妊娠高血圧症候群発症予知に対する子  
宮動脈波形と動脈スティフネスの併用  
効果の解析 第 85 回日本超音波医学会  
5.25-27/12 東京  
富松拓治、味村和哉、谷口友基子、金川  
武司、木村 正。成熟児の asphyxia と  
cerebral palsy その疫学と予防 胎児  
脳循環からみた分娩管理 胎児二酸化  
炭素分圧の重要性 第 48 回日本周産  
期・新生児医学会 7.8-10/12 さいたま  
金山智子、富松拓治、柿ヶ野藍子、藤田  
聡子、味村和哉、谷口友基子、金川武司、  
谷口 武、木村 正。妊娠高血圧症候群発  
症予知に対する動脈スティフネスと子  
宮動脈波形の併用効果の前方視的解析  
第 32 回日本妊娠高血圧学会  
10.21-22/11 金沢

〔図書〕(計 2 件)

金川武司、村田雄二 他、メディカ出版、  
改訂 2 版 産科合併症 2013。  
金川武司、吉川史隆、倉智博久、平松祐  
司、他、産科婦人科疾患最新の治療  
2013-2015,南江堂 2013、80-81  
金川武司、他、文光堂、目でみる妊娠と  
出産、2013、52-53、164-166、220-221、  
239

6. 研究組織

(1)研究代表者

金川 武司 (KANAGAWA TAKESHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40346218

(2)研究分担者

谷口友基子 (TANIGUCHI YUKIKO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：60423175

(3)研究分担者

味村 和哉 (MIMURA KAZUYA)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：50437422

(4)研究分担者

富松 拓治 (TOMIMATSU TAKUJI)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30346209