

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791220

研究課題名(和文) 周産期脳障害に対する骨髄幹細胞を用いた新規治療開発

研究課題名(英文) Developing a novel therapy with bone marrow mononuclear cells for perinatal brain injuries

研究代表者

佐藤 義朗 (SATO, YOSHIKI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30435862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：周産期低酸素性虚血性脳症に対する新規治療法の開発は急務である。本研究では、周産期脳障害に対して最も理想的な幹細胞源と考えられる骨髄単核球を用いた治療法開発への基礎研究を行った。まず、骨髄単核球の採取、調製、また、外頸静脈からの静脈内投与方法を確立させた。投与後の動態評価では、骨髄間葉系細胞に比べ肺への集積は少なく、肺塞栓のリスクは低いと考えられた。また、骨髄単核球を投与すると急性期のアポトーシスを抑制し、能動回避学習試験において、回避率が改善する傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：It is urgent to develop novel therapies for infants with perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). In the present project, we have performed basic experiments to develop a novel therapy with bone marrow mononuclear cells (BM-MNC), which is most ideal source of stem cells for the treatment against perinatal brain injuries. We evaluated the effect of administration of BM-MNC on perinatal HIE rat. We injected BM-MNC intravenously after hypoxic-ischemic insult. The injected BM-MNC was detected in the lung less than when we administered bone marrow mesenchymal stem cells. BM-MNC administration exerted an anti-apoptotic effect, and tended to ameliorate learning impairment induced by HIE.

研究分野：新生児学

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：周産期脳障害 骨髄単核球

## 1. 研究開始当初の背景

近年の周産期医療のめざましい進歩により、早産児や重症新生児の生存率、生命的予後は飛躍的に改善しているが、脳性麻痺の発症率は減少していない。脳性麻痺の主たる原因である周産期低酸素性虚血性脳症(HIE)による国内での死亡及び後遺症症例は1800人/年と推定されているが、現在のところ、有効な治療法は脳低温療法のみであり、しかも最重症例に対しては効果が期待できない(Gluckman PD et al.: *Lancet*, 2005)。周産期脳障害に対しての新規治療法の開発は急務である。

一方、幹細胞を用いた再生医療/細胞療法は、様々な臓器や疾患に対し研究され、臨床応用されつつある(Sato Y, Oohira A.: *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009)。周産期脳障害に対しても、動物モデルで、胚性幹細胞(ES細胞)由来の神経幹細胞の脳室内投与などにより、行動異常の軽減などの効果が示されている。我々も、胎児脳から培養した神経幹細胞とコンドロイチン硫酸分解酵素の脳内同時投与が周産期HIEに対して有効な治療であることをラットモデルで明らかにした(Sato Y, et al.: *Reprod Sci*, 2008, 特許第5279491号)。しかしながら、臨床応用を考えた際、胎児脳由来の神経幹細胞、ES細胞を使った治療は倫理面で、また、脳内直接投与による治療は、安全面での問題を残す。骨髄幹細胞は、採取の際の侵襲はあるものの、採取に関する倫理的問題は少ない上、自己の細胞を移植すれば免疫拒絶反応に対する危惧も生じない。また、血液脳関門を通ることが証明されており、脳内直接投与ではなく、血管内投与で効果が期待できる。さらに、臍帯血と違い、いつでも本人から採取できるという利点もある。骨髄幹細胞は、周産期脳障害における最も理想的な幹細胞ソースと言える。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、最も理想的な幹細胞ソースと考えられる骨髄幹細胞を用い、周産期HIEに対しての新規治療法開発を目指すことである。

新生仔HIEモデルラットを用い、骨髄幹細胞を投与し、その治療効果を確認する。これまで技術的な問題により、新生仔ラットへの薬剤/細胞投与では、腹腔内投与を用いていたが、本研究では、臨床応用を見据え、静脈内投与方法の確立を目指す。また、細胞の静脈内投与において肺塞栓の危険性が言われている。細胞の静脈内投与の安全性の確認の一貫として、長期的追跡以外に投与直後からの動態の確認も行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 周産期脳障害モデルの作製

周産期HIEモデルは、国際的に汎用されているRice-Vannucciモデルを用い、ラットの新生仔で作製した。生後7日目の新生仔ラットの片側頸動脈を結紮し、その後8%低酸素負荷を60分行い、片側の梗塞モデルを作製した。

### (2) 骨髄幹細胞採取

骨髄幹細胞採取に関しては、生後3週齢のGFP-Tgラット大腿骨および腓骨から採取した細胞を、Ficoll Paque法を用い単核球分画に分離した。

### (3) 静脈内投与

静脈内投与方法を確立するために、イソフルレン麻酔下にて、静脈の露出、穿刺、投与が可能かどうかを検討した。

### (4) 安全性の確認

#### 生存率、体重増加

細胞投与によって、生存率や体重増加が低下しないかを確認した。

#### 投与後動態

骨髄単核球(BM-MNC)の他、比較対象として骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)も用いた。BM-MSCは、BM-MNCからの培養により得た。BM-MSC、あるいは、BM-MNCを細胞膜のみに染色される蛍光色素(DiR)でラベルし、上記方法で低酸素虚血負荷した生後7日齢のラットの外頸静脈から $1 \times 10^5$ 個投与した。その後の体内動態を4週間後まで経時的にIVIS® Imaging Systemにて評価した。

### (5) 治療効果

低酸素虚血負荷6時間、あるいは24時間後に、外頸静脈から $1 \times 10^5$ 個投与した。その24時間後、免疫組織学的に、また、3週間後より行動学的検討を行った。

組織学的検討は、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定、5 $\mu$ mのパラフィン切片を作製した。クエン酸バッファーにて抗原賦活をした後、抗Active caspase 3抗体を用いて免疫組織染色を行った。陽性細胞は、500 $\mu$ m毎の切片を使用し、カウントした。

また、行動学的検討として、能動回避学習試験と回転棒試験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 周産期脳障害モデルの作製

私達がこれまで行ってきた上記作製法において問題なくモデルができることを確認した。

### (2) 骨髄幹細胞採取

採取した細胞において顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 (GFU-GM) 数を評価し、細胞の質が問題無いことを確認した。

### (3) 静脈内投与

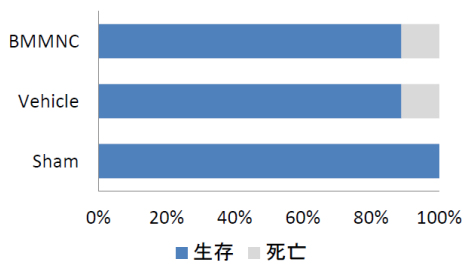
イソフルレン全身麻酔下にて外頸静脈を露出させ、35G 針にて穿刺、投与する静脈内投与方法を確立した。

### (4) 安全性の確認

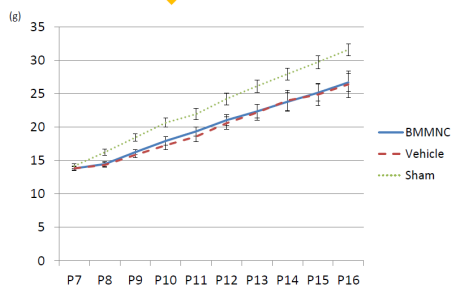
#### 生存率、体重増加

生存率、体重増加とも細胞投与により変化がなかった。

#### 生存率



#### 体重増加

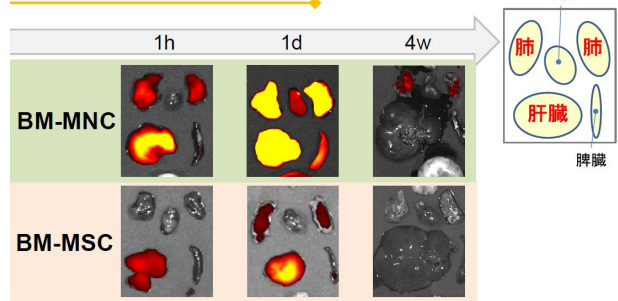


#### 投与後動態

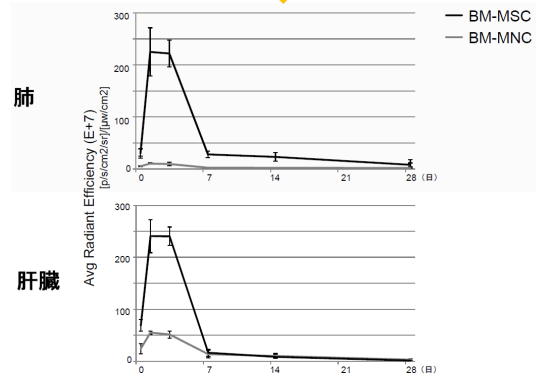
両細胞とも投与後2日をピークに、肝臓を中心に多臓器において検出され、その後徐々に減少した。BM-MSCでは、肺への集積も多く認められた。BM-MSCに比べ、BM-MNCでは肺への集積は少なく、肺塞栓のリスクは低いと考えられた。両細胞とも脳内では検出できなかった。また、観察期間において死亡したラットは

いなかった。

### 投与細胞の体内分布



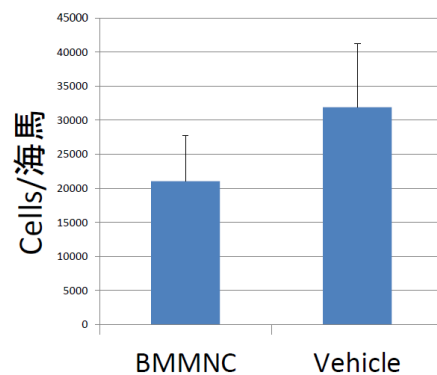
### 移植細胞の体内動態



### (5) 治療効果

低酸素虚血負荷 6 時間後投与では、治療効果を認めなかった。24 時間後投与では、急性期の免疫組織学的評価において、BM-MNC を投与した群では、Vehicle 群に比べ、海馬の Active caspase 3 陽性細胞が少なかった。BM-MNC 投与により、急性期のアポトーシスを抑制することが示唆された。

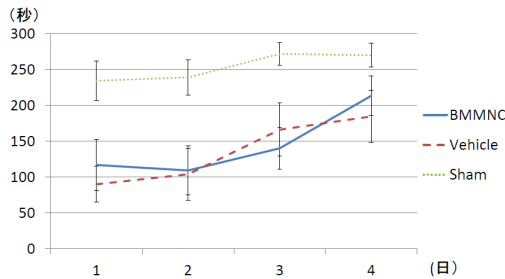
#### Activated Caspase 3 陽性細胞



能動回避学習試験では、BM-MNC 投与により回避率が改善する傾向を認めた。しかしながら、回転棒試験では、Vehicle 群で Sham 群より持続時間の短縮を認めたが、BM-MNC 投与による改善を認めなか

った。

#### 回転棒試験



BM-MNC による治療効果を示唆する結果が得られたが、今後、他の急性期傷害マーカーの検討と詳細な行動評価が必要である。

#### 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13件)

1. Ito M, Kidokoro H, Sugiyama Y, Sato Y, Natsume J, Watanabe K, Hayakawa M. Paradoxical downward seizure pattern on amplitude-integrated electroencephalogram. *J Perinat Med.* 2014 in press. 査読あり
2. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34 cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience.*2014;263C:148-58:10.1016/j.neuroscience.2014.01.018. 査読あり
3. Tsuda H, Kotani T, Sumigama S, Mano Y, Hua L, Hayakawa H, Hayakawa M, Sato Y, Kikkawa F. Effect of placenta previa on neonatal respiratory disorders and amniotic lamellar body counts at 36-38weeks of gestation. *Early Hum Dev.* 2014;90(1):51-4:10.1016/j.earlhumd ev.2013.10.005. 査読あり
4. Watanabe Y, Tsuda H, Kotani T, Sumigama S, Mano Y, Hayakawa M, Sato Y, Kikkawa F. Amniotic lamellar body count and congenital diaphragmatic hernia in humans and in a rat model. *Pediatr Res.* 2013;73(3):344-8:10.1038/pr.2012.187. 査読あり
5. Sato Y, Shinjyo N, Sato M, Osato K, Zhu C, Pekna M, Kuhn HG, Blomgren K. Grafting of neural stem and progenitor cells to the hippocampus of young, irradiated mice causes gliosis and disrupts the granule cell layer. *Cell Death Dis.* 2013;4:e591:10.1038/cddis.2013.92. 査読あり
6. Sato Y, Kawataki M, Hirakawa A, Toyoshima K, Kato T, Itani Y, Hayakawa M. The diameter of the inferior vena cava provides a noninvasive way of calculating central venous pressure in neonates. *Acta Paediatr.* 2013;102(6):e241-6:10.1111/apa.12247. 査読あり
7. 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.* 2013;89(5):283-8:10.1016/j.earlhum dev.2012.10.007. 査読あり
8. Ibi D, Nagai T, Nakajima A, Mizoguchi H, Kawase T, Tsuboi D, Kano S, Sato Y, Hayakawa M, Lange UC, Adams DJ, Surani MA, Satoh T, Sawa A, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K. Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia.* 2013;61(5):679-93:10.1002/glia.22461. 査読あり
9. Nakanishi K, Ito M, Sato Y, Oohira A. A highly-sulfated chondroitin sulfate, CS-E, adsorbs specifically to neurons with nuclear condensation. *Neurosci Res.* 2012;74(3-4):223-9:10.1016/j.neures.2012.08.009. 査読あり
10. Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Sato Y, Hayakawa M, Tsuchiya H, Tainaka T, Ono Y, Kaneko K, Ando H, Sato K, Kojima S. Congenital pancreatoblastoma associated with beta-catenin mutation. *Pediatric blood & cancer.* 2012;58(5):827:10.1002/pbc.23337. 査読あり
11. 佐藤義朗, 中西圭子, 服部哲夫, 一ノ橋祐子, Blomgren K, 大平敦彦, 早川

昌弘. 中枢神経疾患に対する幹細胞療法. 脳と発達. 2011;43(3):33-7. 査読なし

12. 佐藤義朗. 周産期脳障害に対する幹細胞療法. 周産期医学. 2011;11:1531-6. 査読なし
13. Hayakawa M, Sato Y, Hattori T, Ichinohashi Y, Nakayama A, Yamamoto H, Hemmi H, Ito M, Ieda K, Kojima S. Carbohydrate and energy metabolism in the brain of rats with thromboxane A2-induced fetal growth restriction. *Pediatr Res.* 2011;70(1):21-4:10.1203/PDR.0b013e31821b9d7c. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

1. 杉山裕一朗 佐藤義朗 近藤大貴 鈴木俊彦 山本徳則 鈴木哲 中西圭子 辻雅弘 早川昌弘  
新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおける各種細胞別の投与後体内動態の検討第13回日本再生医療学会総会 2014年3月4日~6日 京都市 国立京都国際会館
2. T. Hattori, Y. Sato, T. Kondo, Y. Ichinohashi, S. Suzuki, M. Yamamoto, T. Kotani, H. Hirata, K. Nakanishi, M. Hayakawa  
Administration of human umbilical cord blood cells reduce hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat  
*Neuroscience* 2013 2013/11/9 - 13 San Diego, USA
3. 佐藤義朗  
新生児低酸素性虚血性脳症に対する幹細胞療法  
第39回日本小児神経学会東海地方会 2013年7月20日 名古屋市 名古屋大学医学部 特別講演
4. 近藤大貴 佐藤義朗 杉山裕一朗 見松はるか 伊藤美春 齊藤明子 服部哲夫 藤巻英彦 一ノ橋祐子 中西圭子 早川昌弘  
新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットを用いた移植細胞体内動態の検討  
第49回日本周産期・新生児医学会学術集会 2013年7月14日~16日 横浜市 パシフィコ横浜
5. 中西圭子、伊藤美春、佐藤義朗、東雄二郎  
新生児脳障害モデルラットに対するラット臍帯血幹細胞投与の検討  
第49回日本周産期・新生児医学会学術集会 2013年7月14日~16日 横浜市 パシフィコ横浜
6. Yoshiaki Sato

Stem cell therapies for perinatal brain injuries

XI World Congress of Perinatal Medicine 2013/6/19-22 モスクワ、ロシア

招待講演

7. 服部哲夫、佐藤義朗、杉山裕一朗、津田弘之 伊藤美春、近藤大貴、齊藤明子、藤巻英彦、一ノ橋祐子、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  
第57回日本未熟児新生児学会学術集会 2012年11月25日~27日 熊本市 ホテル日航熊本
8. 佐藤義朗  
周産期低酸素性虚血性脳症に対する幹細胞療法  
12th Conference for BioSignal and Medicine 2012年8月31日~9月2日 志摩市 ヴィラ伊勢志摩 招待講演
9. 服部哲夫、佐藤義朗、杉山裕一朗、伊藤美春、近藤大貴、齊藤明子、藤巻英彦、一ノ橋祐子、山本美知郎、小谷友美、平田仁、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  
第12回日本再生医療学会総会 2012年3月21日~23日 横浜 パシフィコ横浜

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 低酸素性虚血性脳症の予防又は治療剤及びその利用

発明者: 佐藤義朗 齊藤明子

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2014 - 22411

出願年月日: 2014.2.7

国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 脳損傷抑制剤

発明者: 大平敦彦、佐藤義朗、中西圭子、前田 浩

権利者: 愛知県、生化学工業株式会社

番号: 特許第 5279491 号

取得年月日: 2013.5.31

国内外の別: 国内

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 義朗 (SATO YOSHIAKI)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30435862

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし