

低酸素性虚血性脳症モデルラットへのヒト臍帯血由来幹細胞投与による行動学的異常改善に関する研究

研究分担者 佐藤義朗 名古屋大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター新生児部門
協力者 藤戸祥太 名古屋大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター新生児部門

研究要旨

本研究の目的は、低酸素性虚血性脳症（HIE）モデルラットに対し、X線照射後ヒト臍帯血由来造血幹細胞（XR細胞）を亜急性期に静脈内投与することで、造血幹細胞がもたらす血管再生促進の機序、有効性および安全性を明らかにし、HIEに対する新規治療法の開発につなげることである。本年度は、HIE受傷後72時間にXR細胞を投与したモデルラットを用いて、生後1～2か月にかけて行動学的評価を実施した。運動機能に関してはシリンダー試験および水平梯子試験、認知機能に関しては能動回避反応試験を用いて評価した結果、XR細胞投与群はVehicle投与群と比較して、有意な機能改善を示した。

A. 研究目的

脳性麻痺の原因となる周産期低酸素性虚血性脳症（HIE）に対しての新規治療法の開発は急務である。幹細胞を用いた細胞療法が様々な疾患で研究されており、周産期HIEに対しても自己臍帯血由来幹細胞の臨床試験が行われている（Cotton CM, The Journal of Pediatrics. 2014）。しかし、仮死分娩で発生する周産期HIE事例では自己臍帯血の採取が困難であることが多い。従って、幹細胞源としてはあらかじめ保存・製剤化が可能な幹細胞が望まれる。X線照射後臍帯血由来造血幹細胞（XR細胞）はX線を照射することで安全に他家移植が可能であり、X線照射前と同等の効果を発揮することができる。さらに凍結保存も可能であるため（Yasui K, Ogawa Y, Sci Rep, 2024）、臨床応用に適した幹細胞源と言える。そこで本研究では、新たな幹細胞源であるXR細胞を用いて、周産期HIE受傷後の亜急性期に対する新規治療法開発のための研究を行う。

B. 研究方法

HIEモデルラットに対して、XR細胞がもたらす血管再生促進能の機序、有効性、安全性を、動物実験から検討する。モデル動物としては、生後7日目のWistarラットに対して左頸動脈を結紮後、8%低酸素負荷を60分かけて作製したHIEモデルラットを使用する。

①XR細胞の採取・投与

臍帯血に15GyのX線を照射後、比重遠心分離を行い、単核球分画（XR細胞分画）に分離する。分離した細胞は凍結保存する。凍結保存したXR細胞を融解して、亜急性期（受傷後72時

間後）にHIEモデルラットの外頸静脈から投与する。

②脳障害に対するXR細胞の有効性、機序の評価

- ・行動学的評価：1～2ヵ月齢時に行動学的評価（シリンダー試験、オープンフィールド試験、能動的回避反応試験等）を行い、XR細胞投与による行動異常の改善を検証する。
- ・免疫組織学的評価：神経新生、髄鞘形成、血管新生、梗塞体積等について、それぞれに特異的なマーカーを用いて評価する。
- ・細胞の生着の評価：IVIS® Imaging Systemを用いて、XR細胞の投与後の動態を評価する。
- ・gap結合を介した血管内皮細胞への作用の証明：XR細胞に量子ドットを取り込ませ、二光子顕微鏡を用いた脳のin vivoイメージングを行う。
- ・生化学的評価：標的タンパク質の網羅的評価を行う。

③安全性の確認

腫瘍形成の危険性に関しては、病理学的及びIVIS® Imaging Systemにて評価する。また、長期的に飼育することで、成獣期の行動異常、生存期間短縮を来さないかを確認する。

（倫理面への配慮）

- ・動物実験計画については、その妥当性や安全性、倫理的配慮について、名古屋大学医学部附属動物実験施設内の審査機関から審査を受け、実施許可の承認を得ている（承認番号M240206-004）。

・臍帯血については、中部さい帯血バンクから提供を受けた臍帯血もしくは名古屋大学医学部附属病院で分娩となった妊婦から提供を受けた臍帯血を使用する。倫理的配慮等について、名古屋大学医学部附属病院内の審査機関から審査を受け、実施許可の承認を得ている。(試験番号 2024-0250)。

C. 研究結果

本年度は、第一に XR 細胞の採取を行った。中部さい帯血バンクから提供を受けた新鮮臍帯血を使用した。X 線照射装置 (MBR-1520R-3、HITACHI パワーソリューションズ製) を用いて 15Gy の X 線照射後に、比重遠心分離を行い、単核球分画 (XR 細胞分画) に分離した。分離した細胞は凍結保存し、今後必要時に凍結融解して使用する体制を整えた。

第二に HIE モデルラットの亜急性期に、融解した XR 細胞を経静脈的に投与し、治療効果について行動学的評価を行った。生後 9 日目 (低酸素虚血負荷後 48 時間頃) に MRI (T2 強調画像) を撮像し、それを基に群分けを行った。生後 10 日目 (低酸素虚血負荷後 72 時間頃) に 1×10^5 cells / 個体を外頸静脈から投与した群を XR 細胞投与群、乳酸リンゲル液を投与した群を vehicle 群、偽手術群を sham 群とした。運動機能に関しては、水平梯子試験 (生後 30~33 日施行) およびシリンダー試験 (生後 35~37 日施行) を実施し、Vehicle 群と比較して XR 細胞投与群で有意な運動機能の改善を認めた (Dunnet 検定、シリンダー試験: $p < 0.01$ 、水平梯子試験: $p < 0.05$)。不安関連行動に関しては、オープンフィールド試験 (生後 42~43 日施行) を実施し、3 群間に有意な差は認めなかった。記憶・学習能力に関しては、能動回避反応試験 (生後 49~50 日施行) を実施し、Vehicle 群と比較して XR 細胞投与群で有意な改善を認めた (Dunnet 検定、 $p < 0.05$)。

D. 考察

XR 細胞は臍帯血に 15Gy (輸血製剤に対して使用されている線量) の X 線照射を行い、幹細胞としての増殖能を抑制することで GVHD や過剰免疫反応、癌化のリスクを抑制し、他家移植が可能となった臍帯血由来の造血幹細胞である。治療機序としては、ギャップ結合を介して、障害されてエネルギー源が枯渇している血管内皮細胞に対して低分子メタボライトを供与し、血管内皮細胞のエネルギー代謝を活性化させ、その結果、血管再生を促すことで脳障害に対する効果を発揮することが証明されている。(Kikuchi-Taura A, Ogawa Y, Stroke. 2020)。X 線照射で幹細胞としての増殖能を抑制した細胞でも、その治療効果は照射

前と変わらないという特徴を示す。共同研究グループにおいて、亜急性期の脳梗塞モデルラットに単回投与し治療効果を確認している (Yasui K, Ogawa Y, Sci Rep, 2024)。

本研究では、HIE モデルラットに亜急性期に XR 細胞を投与することで、行動学的評価の改善を認めた。特に運動面における顕著な改善を確認した。今後は、XR 細胞の作用機序について、さらなる研究を進めていく予定である。

E. 結論

HIE モデルラットを用いた実験において、亜急性期に XR 細胞を投与することで、ラットの行動学的異常が改善する知見を得た。今後は、XR 細胞の血管再生・神経再生の機序解明について研究を進めていく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表

佐藤義朗
新生児の再生医療
第 1 回 ICU for Kids
2024.9.21-22 熱海

Yoshiaki Sato
Stem cells therapy for perinatal brain injuries
International Neonatology Conference Kiev
2024. 11. 28-29 Kiev, Ukrainian (Web)

佐藤義朗
低酸素性虚血性脳症に対する幹細胞療法～次世代の治療戦略～
第 60 回日本周産期・新生児医学会 学術集会
シンポジウム 酸素性虚血性脳症に対する次世代の治療戦略
2024 年 7 月 13 日 (土) ~15 日 大阪

佐藤義朗
周産期脳障害に対する幹細胞療法
第 66 回日本小児神経学会学術集会
シンポジウム 神経変性・神経代謝疾患の病態に基づいた新しいモダリティによる治療開発
2024 年 5 月 30 日 (木) ~6 月 1 日 (土) 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) 該当なし