

主論文の要旨

Administration of umbilical cord blood cells transiently decreased hypoxic–ischemic brain injury in neonatal rats

〔 臍帯血細胞の投与は新生仔ラットにおいて
低酸素性虚血性脳障害を一過性に軽減した 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

服部 哲夫

【背景】

低酸素性虚血性脳障害(HI)は周産期医療において重要な疾患であり、現在も十分な治療が確立されていない。近年新しい治療として細胞療法が期待され、様々な幹細胞を用いた治療が研究されている。本研究では HI モデルラットを用い、臍帯血単核球(UCBC)の投与が、低酸素性虚血性脳症を軽減するか否か、更にはその作用機序について調べる事を目的とした。

【対照・方法】

動物

Wistar/ST ラットを用いた。

UCBC の採取・保存

血液保存パックを用い、ヒトの娩出直後の胎盤から臍帯血を採取した。Ficoll-Hypaque 法で単核球を分離し、RPMI 培養液に懸濁した。その後凍害防御物質を加え凍結保存し、投与直前に再融解、洗浄後、培養液で再懸濁した。

HI 負荷と UCBC 投与

麻酔下に日齢 7 の仔ラットの左総頸動脈を結紮・切離し、1 時間回復の後、37°C で 8% 酸素に 60 分間暴露した (HI 負荷)。

HI 6 時間後に、 1×10^7 個の UCBC を腹腔内投与した。コントロール群には同量の培養液を投与した。Sham 群は HI 負荷を受けないものとした。

組織学的・免疫組織化学的評価

ラットを深麻酔下に灌流固定後、脳を摘出し、パラフィンに包埋し、冠状断で 5 μ m 厚の薄切片を作製した。脱パラフィン・再水和、抗原賦活、ブロッキングの後、一次抗体として active caspase-3、apoptosis-inducing factor 1 (AIF)、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)、nitrotyrosine、ED1 に対する各抗体で一晩反応させた。翌日ビオチン化二次抗体で 1 時間反応させ、avidin-biotin-peroxidase complex 処理の後、DAB 法にて発色させた。

細胞数の計測

海馬歯状回の顆粒細胞層の面積を測定し、同部位の active caspase-3、AIF、4-HNE、nitrotyrosine、ED1 陽性細胞を計量した。陽性細胞数を面積で除して、細胞密度で表記した。

行動学的評価

歩容解析

CatWalk[®]を用い運動麻痺を評価した。CatWalk[®]は、ガラス板上をラットに歩行させ、下部のカメラで足跡を撮影し歩行を解析する。各ラット 3 回の歩行を記録し、足跡から歩行に関する各パラメーターを計算した。

能動回避学習試験

Shuttle avoidance test を用い学習能力を評価した。2 分割された部屋の床面に電気の流れるバーが敷かれ、5 秒間の警告に続き 0.5mA の電流が流れる。各 20 セッションを 4 日連続で行い、ラットが条件を学習し回避する率を調べ、各獣の日毎の回避率を計算した。

脳容量測定・立体解析による細胞計測

行動実験終了後、前述と同様に脳切片を作製した。脳梁は 750 μ m 毎、海馬は 375 μ m 毎の切片を、それぞれ抗 MBP 抗体、抗 NeuN 抗体を用いて染色した。各陽性細胞の領域を基に、脳梁、海馬の断面積を計測し、それを積分し各領域の体積を算出した。また顆粒細胞下層を含む海馬歯状回全体の NeuN 陽性細胞数を計測した。

統計学的解析

データは、平均±標準誤差で表記した。二群間比較は Student の t 検定、3 群間比較は Steel-Dwass テストを用いた。p < 0.05 をもって有意差ありとした。

【結果】

HI 後の急性障害マーカー

HI24 時間後のアポトーシス、酸化ストレス、活性型ミクログリアの各マーカーを評価した。海馬の顕微鏡写真の例を Fig. 1 に示す。顆粒細胞層のアポトーシス(active caspase-3, 53%, p < 0.05、AIF, 58%, p < 0.01)、酸化ストレス(4-HNE, 36%, p < 0.05、nitrotyrosine, 42%, p < 0.01)、活性型ミクログリア(ED1, 51%, p < 0.05)マーカー陽性細胞はいずれも UCBC 群で有意に低下していた(Fig. 2)。

行動実験

歩様解析

運動麻痺を評価するため、受傷後 14 日(日齢 21)に CatWalk[®]を用いて歩様解析を行った。各パラメーターは sham、コントロール、UCBC の三群間で有意な差を認めなかった(Fig. 3)。

能動回避学習試験

学習障害を評価するため、HI 後 21 - 24 日(日齢 28 - 31)に能動回避学習試験を行った。各群の回避率の平均値を検査日毎に算出した(Fig. 4)。各群の回避率は日がすすむにつれ上昇したが、各群間に有意差はなかった。

組織学的変化

行動実験終了後に全脳の切片を作製し、皮質・脳梁・海馬の体積を評価した。抗 NeuN 抗体を用いて染色した切片の例を Fig. 5a、b に示す。いずれも患側の著明な萎縮を認めるが、コントロール、UCBC 群で、皮質、脳梁、海馬の容積に有意な差を認めなかった。(Fig. 5c - e)。更に、海馬における NeuN 陽性細胞数も、両群間で、有意差を認めなかった。(Fig. 5f)

【考察】

今回の研究では、HI モデルラットに対する UCBC の腹腔内投与によって、抗アポトーシスおよび抗酸化ストレス作用、ミクログリア活性化の抑制の面で一時的な効果を認めたが、永続的な効果を認めなかった。

周産期 HI では、一次および二次細胞死の 2 つの段階が脳障害に関与するが、後者を軽減させることが治療戦略の中心となる。二次細胞死は受傷数時間後に発生し炎症

や活性酸素が関与する。本研究では、UCBC 投与によって活性化ミクログリアの減少を認め、HI による炎症を抑制したことが示された。また酸化ストレスを UCBC が抑制したことが示されたが、HI ラットモデルでこの効果を示したのは、本研究が初めてである。更に、最も虚血に脆弱な部位とされる海馬歯状回に焦点をしぼり、同部位においてアポトーシスが抑制されたことも示した。

一方で UCBC の運動麻痺、学習障害に与える影響は明らかでなかった。組織学的変化、神経細胞数にも有意な差を認めなかった。類似のプロトコルの先行研究でも、差を認めたものと、認めなかったものが混在している。多くの研究は、 1×10^7 個の細胞を受傷 24 時間後に投与しているが、今回は二次細胞死に対する戦略から早期投与を選択した。少量の(2×10^6)細胞をより早期(3 時間後)に投与した Pimentel-Coelho は組織学的・行動学的効果を報告しており、プロトコルの相違が結果に影響したかは断定できないが、HI 障害の深度や他の条件が結果の相違につながった可能性はある。

今回は小動物でも投与が確実で、多くの先行研究が採用している腹腔内投与を選択した。我々が行った他の研究では、静脈内投与も腹腔内投与も脳に達する細胞は僅かであり、腹腔内投与した細胞は長く腹腔内にとどまった。今回の効果は、細胞の直接的な作用より、UCBC が分泌する神経栄養因子/成長因子による可能性が高いと考えられる。

【結論】

HI モデルラットに対する、UCBC 由来単核球の早期・単回投与は、酸化ストレス、アポトーシス、ミクログリア活性を抑制した。しかし永続的な組織学的、神経学的改善を認めず、治療効果のためには反復投与もしくは他剤併用が検討される必要がある。