

主論文の要旨

Systemic administration of clinical-grade multilineage-differentiating stress-enduring cells ameliorates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats

臨床グレードの multilineage-differentiating stress-enduring cells の
全身投与は新生児ラットの低酸素性虚血性脳障害を改善する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

上田 一仁

【緒言】

新生児低酸素性虚血性脳症 (hypoxic ischemic encephalopathy, HIE) は、新生児死亡や重篤な神経学的後遺症を引き起こす疾患である。有効な治療は低体温療法のみであり、新規治療法の開発が求められている。

Multilineage-differentiating stress-enduring cells (Muse 細胞) は、骨髄や末梢血、結合組織などに存在し、多能性分化能と組織修復能を有する間葉系幹細胞である。これまでに、我々は HIE モデルラットに対する Muse 細胞の治療効果を明らかにしてきた。そこで今回、臨床応用に向け、臨床グレードの Muse 細胞製品 (nafimestrocel) を用い、HIE への治療効果や細胞の分布を検討した。

【方法】

7 日齢の Wistar/ST ラットを用いて HIE モデルを作製した。ラットの左頸動脈を結紮切離後、8%濃度酸素による低酸素曝露を 60 分間行った。受傷 72 時間後 (10 日齢)、MRI-T2 強調像により病側大脳を評価し、中等度の受傷が認められるラットを抽出した。

これらのラットを「受傷 3 日後に nafimestrocel を投与する群 (1×10^6 個/個体、M3 群)」、「受傷 7 日後に nafimestrocel を投与する群 (1×10^6 個/個体、M7 群)」、「HBSS 投与群 (V 群)」に割り付け、右外頸静脈からの投与を行った。

投与後の評価として、5 週齢から 8 週齢にかけてシリンダー試験、オープンフィールド試験、水迷路試験による行動学的評価を、10 週齢時に脳の病理組織学的評価を行った。同時に、観察期間中、死亡などの有害事象の有無を評価した。

また、細胞分布の検討のために、Chromium-51 radionuclide (^{51}Cr) で標識した nafimestrocel を 10 日齢の HIE モデルラットに投与し、投与後 24 時間、72 時間、168 時間での脳組織の放射線分布を評価した。

さらに、マイクログリアとの共培養系を用いた *in vitro* での評価を行った。マイクログリアを nafimestrocel と 24 時間共培養した後、リポポリサッカライドを添加し細胞受傷を行った。添加から 3 時間後と 24 時間後に定量 PCR を行い、tumor necrosis factor- α (TNF- α) や inducible nitric oxide synthase (iNOS) を評価した。

【結果】

行動学的評価では、シリンダー試験において、M3 群、M7 群では V 群と比較して、溶媒群よりも有意な改善効果を認めた (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$) (Figure 1)。オープンフィールド試験では、移動距離において、M7 群は V 群よりも有意な改善を示した ($p < 0.05$) (Figure 1)。水迷路試験では、HIE モデルラットにおいて遊泳距離の改善傾向を認めた (Figure 1)。

脳の病理学的評価では、M3 群、M7 群の脳の健側の神経線維束において、萎縮の発現頻度が有意に低下した (Figure 2)。また、M7 群の脳室拡大のグレードは、V 群と比べて有意に低かった。さらに、安全性評価としては、M3 群、M7 群とも死亡や肺の病

理学的変化などの有害事象は認められなかった。

放射線分布試験では、HIE モデルラットの両側の脳半球から放射線が検出された (Figure 3)。病側では生後 168 時間まで放射線が検出された。また、健側では、脳から線条体を含む断面では生後 72 時間まで、海馬から視床を含む断面では生後 168 時間まで放射線が検出された。

ミクログリアを用いた *in vitro* での評価では、nafimetrocel と共培養したミクログリアにおいて、TNF- α は傷害発生から 3 時間後と 24 時間後の双方で抑制された。また、傷害発生から 24 時間後の iNOS の産生も同じく抑制されていた (Figure 4)。

【考察】

本研究では、HIE モデルラットにおいて、nafimetrocel が脳組織へホーミングし、投与 168 時間後も脳内に残存することが示された。行動学的評価では、nafimetrocel 投与により、運動機能や異常行動が有意に改善された。さらに、病理組織学的評価では、健側の脳における神経線維束の萎縮が有意に改善していた。このことから、nafimetrocel が全身投与後、脳組織へホーミングし、治療効果をもたらすことが明らかとなった。

Muse 細胞は、S1P-S1PR2 システムによって、損傷組織に選択的にホーミングすることが知られている。さらに本研究で用いた HIE モデルでは、両側の脳に受傷が生じることが分かっている。今回も nafimetrocel は S1P-S1PR2 システムにもとづき、脳半球にホーミングしたと考えられる。

また、本研究でのミクログリアとの共培養系を用いた評価では、nafimetrocel は TNF- α と iNOS の産生を抑制した。これまでの報告では、Muse 細胞は抗アポトーシス作用や抗炎症作用などを有していることが知られている。また、我々はこれまでの研究で、Muse 細胞が興奮毒性脳内グルタミン酸代謝産物を抑制し、ミクログリアの活性化を抑制していることを報告している。今回の結果からは、活性化ミクログリアが誘導する TNF- α と iNOS の産生を nafimetrocel が抑制することで治療効果をもたらしていると考えられた。

さらに、生後 10 週までの観察期間中、nafimetrocel を投与したラットにおいて、死亡、体重減少、肺の病理組織学的変化などの副作用はいずれも認められなかった。このことは、成人よりも脆弱である新生児に対しても nafimetrocel が安全であることを示唆している。

なお、今後、検討すべき点としては、低体温療法との併用による治療効果の検討や詳細な作用機序の解明、nafimetrocel の投与タイミングや投与回数の検証などが挙げられる。本研究は HIE を発症した新生児における nafimetrocel の有効性と安全性を初めて明らかにしたものであり、基礎データとなるものである。

【結論】

Muse 細胞製品 (nafimetrocel) は、投与後に脳に分布し、受傷 3 日後のみならず、

7日後においても HIE モデルへの治療効果を示した。また、nafimestrocel の投与による有害事象は認められず、nafimestrocel の投与は HIE に対する有力な新規治療となると考えられた。