

主論文の要旨

**Intravenous Administration of Bone Marrow-Derived
Mesenchymal Stem Cell, but not Adipose Tissue-
Derived Stem Cell, Ameliorated the Neonatal Hypoxic-
Ischemic Brain Injury by Changing Cerebral
Inflammatory State in Rat**

同種骨髄由来間葉系幹細胞の静脈内投与は、ラット脳における炎症状態を変化させ新生児低酸素性虚血性脳障害を改善させるが、脂肪由来間葉系細胞は改善させない

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発達・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

杉山 裕一郎

【緒言】

新生児仮死に伴う新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）は、現在においても出生 1000 に対し 1-2 例に発症しており、新生児の神経学的後遺症や死亡の主な原因である。治療法には唯一低体温療法が存在するものの、重症例に対する治療法は存在しない。このため新たな治療法として再生医療が期待されている。中でも間葉系幹細胞を用いた治療は、臨床応用に近いと目されているが、特に新生児領域での最適な細胞種、治療効果や安全性に関する知見は未だ乏しい。本研究では、新生児 HIE モデルラットを用い、同種骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSC）及び脂肪由来間葉系幹細胞（ADSC）投与の安全性と効果、および体内動態について比較検討を行った。

【方法】

モデル作製：BM-MSC および ADSC は生後 4-5 週の GFP-Tg Wistar/ST ラットより採取・培養し、いずれも第 2-3 継代細胞を用いた。日齢 7 の Wistar/ST ラットの左総頸動脈を結紮切離後、60 分の 8%低酸素負荷を行って新生児 HIE モデル（Rice-Vannucci モデル）を作製した。細胞投与は、BM-MSC または ADSC の各細胞をそれぞれ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個、0.1mlPBS に懸濁し顕微鏡下に右外頸静脈から投与した。

投与後死亡率：低酸素負荷 4 時間または 24 時間後に Vehicle（PBS）0.1mL または BM-MSC または ADSC の各細胞をそれぞれ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個投与し、投与後 24 時間以内の死亡率を検討した。

脳組織学的評価：低酸素負荷後 24 時間で各細胞 1×10^5 個を投与し、さらにその 24 時間後に脳パラフィン切片を作製し、免疫組織学的に海馬におけるアポトーシスマーカー active caspase-3 や、海馬や皮質 penumbra、基底核において汎ミクログリアマーカー Iba-1、細胞障害型ミクログリアマーカー iNOS を評価した。

血清学的評価：同じく各細胞投与 24 時間後の血清サイトカイン、ケモカインを MILLIPLEX（Millipore 社）を用い測定した。

体内動態評価：体内動態の解析のため、低酸素負荷 24 時間後に蛍光色素（DiR）でラベルした BM-MSC、ADSC を 1×10^5 個静脈内投与し、その体内動態を IVIS[®] Imaging System を用いて、ex vivo イメージングで 4 週間観察した。解析には蛍光度の組織/背景比を用いた。また、各臓器への影響を検討するため、投与後死亡や呼吸障害などの症状が出やすい低酸素負荷 4 時間後のタイミングにおいて、BM-MSC または ADSC を $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個投与し、投与 15 分後に安楽死させたのち肺、肝臓、腎臓の切片を作製して病理学的に検討した。

【結果】

投与後死亡率：低酸素負荷から 4 時間後での細胞投与では、ADSC 投与群のみ死亡率がコントロールに比べ有意に高かった。負荷から 24 時間後の投与では、コントロールおよび両細胞とも死亡率に差がなかった。（表）

脳組織学的評価：負荷から 24 時間後に細胞を投与した場合、コントロール群に比

べ BM-MSc 群においてのみ、受傷側の海馬歯状回およびアンモン角 (CA3) における anti-active caspase-3 の総陽性細胞数が有意に減少していた (共に $p < 0.05$)。 (図 1) また、皮質 penumbra における細胞障害型ミクログリアマーカー iNOS 陽性細胞数、iNOS/Iba-1 比率も、BM-MSc 群においてのみ有意に低下していた (共に $p < 0.05$)。海馬、基底核でも同様の傾向が見られた。 (図 2)

血清学的評価：同じく BM-MSc 群において有意に、マクロファージ誘導ケモカイン 血中濃度 (CCL3、CCL5、CXCL2) の減少と、抗炎症性サイトカイン (IL-2、IL-12p70) の上昇を認めた。ADSC 群ではこれらの血中サイトカイン、ケモカイン濃度にコントロール群との差を認めなかった。 (図 3)

体内動態の評価：投与後 1、3 日目の肺における集積は、BM-MSc 群の方が多かったが ($p < 0.05$)、7、14、28 日目では ADSC 群において有意に多く、ADSC 群の肺への集積が遷延していた ($p < 0.05$)。肝臓や腎臓においては両細胞について集積に差がなかった。脳への集積は BM-MSc、ADSC 群ともに認めなかった。 (図 4) 病理学的検討では、ADSC 群において、 1×10^6 個の細胞を投与した場合、肺の大血管内における投与細胞の集積ならびに炎症所見であるフィブリン析出を認め、肺塞栓の像であると考えられた。 1×10^5 個の ADSC を投与した場合、BM-MSc 群よりも肺胞内出血を著しく強く認めた。 (図 5)

【考察】

低酸素負荷後 4 時間後の細胞投与では、ADSC 群において有意に死亡率が上昇した。低酸素負荷 24 時間後の細胞投与では、どちらの細胞種でも死亡率は変わらなかった。低酸素負荷 24 時間後の同種 BM-MSc の静脈内投与により、ラット新生児 HIE モデルの海馬における脳細胞のアポトーシスが軽減された。作用機序として、BM-MSc の脳への集積は乏しく、また、BM-MSc 投与により血中のマクロファージ誘導性サイトカインの低下と抗炎症性サイトカインの上昇を認め、さらに脳におけるミクログリア極性の変化を認めたことから、細胞投与により液性因子を介して脳内の細胞障害性マクロファージ活性を低下させ、脳細胞損傷を軽減する機序が推察された。ADSC 投与は死亡率も高く、短期的な脳受傷軽減効果も認めなかった。その一因として ADSC は肺血管内で残存し、炎症性変化および肺出血を惹起する機序が考えられた。

【結語】

HIE モデルラットにおいて、同種 BM-MSc の静脈内投与は、脳における炎症状態を変化させ脳障害を改善させる。一方同種 ADSC の投与では、肺塞栓・肺出血を惹起し、脳障害を改善させないことが示唆された。