

## 新生児低酸素虚血性白質障害に対する細胞移植と運動刺激による機能再建の解析

田尻直輝 (PT, PhD)<sup>1)</sup>, 飛田秀樹 (MD, PhD)<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 名古屋市立大学 大学院医学研究科・医学部 脳神経生理学

キーワード：新生児低酸素虚血性白質障害, オリゴデンドロサイト前駆細胞移植, リハビリテーション

### はじめに

在胎 32 週以下の早産児に生じる脳性麻痺では、脳室周囲白質軟化 (Periventricular leukomalacia: 以下, PVL) が多い。発達段階の中樞神経系の未熟性に、低酸素虚血 (Hypoxia-ischemia: 以下, H-I) が加わり、脳室周囲の白質が障害されることが、PVL の基本病態であると考えられている。PVL の病態は、H-I に対する未熟脳の反応性と正常な脳発達の要素とが複雑に混在している。胎児脳におけるオリゴデンドロサイトの分化段階で、ヒトにおける在胎 28 週から 32 週は、ラットでは生後 3 日齢の脳内環境に相当する。この時期に H-I を呈すると、分化途上のオリゴデンドロサイト後期前駆細胞 (Late oligodendrocyte progenitor cell: 以下, pre-OL) は選択的に障害を受けやすい。つまり、pre-OL の細胞死や分化抑制が起き、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (Oligodendrocyte progenitor cell: 以下, OPC) の成熟障害が生じることで、PVL の危険性が高まることが知られている。髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトは、脳高次機能の発現に重要な役割を担い、pre-OL 虚血障害による髄鞘形成障害は、運動機能と認知機能の生後発達と関連している。近年の周産期医療の進歩により、脳組織欠損 (以下, cyst) を認める重症型 PVL は激減したが、MRI でも明らかな cyst を認めない軽症型 PVL が増加している。軽症型 PVL では、運動機能障害とともに発育後の認知機能障害も臨床上的大きな課題となっており、未だに根本的治療法は存在しない。

我々は、軽症型 PVL の病態を良く反映する新生児低酸素虚血性白質障害 (Neonatal white matter injury: 以下, NWMI) モデルラットを確立し、PVL の根本的治療法の開発を目指している。本研究では、この疾患モデル動物を用いて、外部から OPC を補充することで、運動機能の改善に繋がるかどうか (実験 1) を検討した。また、発育期のリハビリテーション (以下, リハビリ) が成熟後の運動機能にどのような影響を与えるか (実験 2) についても焦点をあてた。

### 方 法

#### 1. 疾患モデルラットの作製 (実験 1, 2)

生後 3 日齢の Wistar 系雄ラットの右総頸動脈閉塞および 6% 低酸素処置により作製したモデルを実験に使用した。

#### 2. 細胞移植治療 (実験 1)

緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein: 以下, GFP) で標識した生後 1 日齢のラットを、混合グリア培養によって OPC を分離した。モデル作製から 2 日後に、あらかじめ調整しておいた OPC ( $2.0 \times 10^5$  cells/ $2\mu\text{l}$ ) を、脳定位固定装置を用いて脳梁に移植した。なお、移植細胞は GFP によって標識されているため、移植後の追跡を可能にする。実験群として、Sham 群 (偽手術), NWMI 群, NWMI+ 培地移植群, NWMI+OPC 移植群の 4 群間で検討を行った。また、同様のプロトコルで、OPC 移植から 2 週間後に免疫抑制剤 (サイクロスポリン A; 10 mg/kg) を毎日経口投与した。実験群としては、NWMI+ 免疫抑制剤非投与群, NWMI+ 免疫抑制剤投与群, NWMI+OPC 移植 + 免疫抑制剤非投与群, NWMI+OPC 移植 + 免疫抑制剤投与群の 4 群間で検討を行った。移植から 4 週と 8 週間後に行動学および免疫組織学的評価を実施した。

#### 3. リハビリ治療 (実験 2)

生後 3 日齢の NWMI モデルを作製し、離乳時期である生後 25 日まで通常環境飼育 (Standard environment: 以下, SE) を行った。その後、SE 群と豊かな環境飼育 (Enriched environment: 以下, EE) 群とに分け、生後 25 ~ 70 日までの 5 週間、それぞれの群間ごとに飼育した。実験群としては、Sham+SE 群, Sham+EE 群, NWMI+SE 群, NWMI+EE 群の 4 群間で検討した。

#### 4. 運動機能評価 (実験 1, 2)

細胞移植やリハビリの治療効果があったかどうか、Hindlimb retraction, Beam walking, Elevated body swing, Rotarod, Horizontal ladder test の 5 つの運動機能評価を行った。

#### 5. 組織学的評価 (実験 1, 2)

動物を屠殺後、組織学的改善効果が見られるかどうか、免疫染色にて評価を行った。Olig2 (オリゴデンドロサイト), GFP (移植細胞), Hoechst (核) による三重染色で、脳梁や運動皮質周辺部における移植細胞や内因性細胞の生存・生着率を評価した。また、PDGFR- $\alpha$  (幼弱オリゴデンドロサイト), CC1・MBP (成熟オリゴデンドロサイト) 染色による移植細胞や内因性細胞の分化・成熟率や Caspr・MBP・NF200 染色によるミエリン形成の評価も行った。さらに、Iba1 (ミクログリア) や GFAP (アストロサイト) 染色でグリア細胞の評価を実施した。加えて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による形態評価、ゴルジ染色・Sholl 解析による神経細胞の形態評価を行った。

## 6. 電気生理学的評価（実験2）

EE の治療効果があったかどうか、皮質内微小電気刺激法を用いて運動マップの変化を評価した。

## 結 果

実験1より、NWMIモデル動物作製から2日後に、GFP標識したOPCを脳梁部へ移植し、免疫抑制剤（サイクロスポリンA）の非投与下において、コントロール群（OPC移植なし）と比較して、4週と8週目において、有意な行動学的改善を示した。また、移植したOPCが、脳内で8週目まで生着・生存していることも確認した。しかしながら、4週目と比較して、8週目では移植細胞数の減少が認められた。これまでに、様々な幹細胞を用いた細胞移植に関する研究を実施してきたが、移植細胞の脳内での生着・成熟が解決すべき最優先課題であることがわかった。この課題を解決するため、移植OPCの生存細胞増加と運動機能のさらなる回復を目的とし、NWMIモデルラットへのOPC移植における免疫抑制剤投与による効果を検討した。同様のプロトコルで、OPC移植から2週間後に免疫抑制剤を毎日経口投与し、4週と8週間後に行動学および免疫組織学的評価を行った。その結果、免疫抑制剤投与群では、非投与群と比較して、4週と8週目において、有意な行動学的改善は認められなかったが、回復傾向を示した。面白いことに、免疫抑制剤投与群では、非投与群と比較して、Olig2/GFP陽性細胞が脳梁や運動皮質領域において8週目でも有意に生着・生存しており、ミエリン様構造の形成も確認された。また、免疫抑制剤投与群でCC1/GFP陽性細胞数が、4週目において増加傾向にあり、移植したOPCが分化・成熟していることが認められた。

実験2より、NWMIでは、運動機能障害、障害側における運動皮質の菲薄化、運動マップの乱雑化、神経突起の増加、オリゴデンドロサイトの分化抑制、ミエリン形成の異常、ランビエ絞輪の伸長が明らかになった。一方で、発育期のEEにより、運動機能改善、運動皮質菲薄化の軽減、運動マップの正常化、オリゴデンドロサイトの分化促進、ミエリン形成およびランビエ絞輪の長さの正常化が認められ、有意な改善効果が認められた。すなわち、NWMIは、pre-OLの分化を抑制することで分化障害を引き起こし、ミエリン形成時にはミエリンの間隔が広がる。また、神経突起は異常な形態を示す。一方、EEで飼育することで、これらの障害は改善され、オリゴデンドロサイトの分化促進、ミエリン形成および神経突起の形態が正常化されることで、NWMIの運動機能障害は改善されたと考えられる。本研究結果より、

NWMIモデルラットに対する長期EE飼育が、低酸素虚血によって抑制された脳の発達を促進できる可能性を示した。

## 結 論

『OPCを用いた細胞療法とリハビリ』というPVLの新たな治療法の探索に向け、今後の展開として、軽症型PVLの病態を反映するNWMIモデルラットを用いて、移植OPCとリハビリとの相加・相乗効果の証明とその結果を裏付ける科学的メカニズムの証明に向けて、基礎研究データを蓄積していく次第である。

## 発表実績（学会発表）

- 1) Naoki Tajiri, Shino Ogawa, Atsunori Hattori, Akimasa Ishida, Takeshi Shimizu, Hideki Hida: Intracerebral grafts of oligodendrocyte progenitor cells attenuate behavioral deficits in neonatal white matter injury model of rats. 第43回日本神経科学大会. 神戸. 2020, 7, 8 (ポスター発表)
- 2) 飛田秀樹, 服部篤紀, 清水健史, 田尻直輝: 新生仔ラット低酸素虚血性白質傷害後の豊かな環境飼育による大脳皮質II/III層樹状突起の形態変化とオリゴデンドロサイトの分化促進. 第63回日本神経化学学会大会. 東京. 2020, 9 (ポスター発表)
- 3) 田尻直輝, 小川紫野, 三角吉代, 大谷綾乃, 服部篤紀, 清水健史, 飛田秀樹: 新生仔低酸素虚血性白質障害に対するオリゴデンドロサイト前駆細胞移植による運動機能障害の回復効果. 日本脳神経外科学会第79回学術総会. 岡山. 2020, 10 (口頭発表)
- 4) 田尻直輝, 小川紫野, 大谷綾乃, 服部篤紀, 飛田秀樹: 新生仔低酸素虚血性白質障害へのオリゴデンドロサイト前駆細胞移植における免疫抑制剤の効果. 第67回中部日本生理学会. 愛知県. 2020, 10 (口頭発表)
- 5) 田尻直輝: 損傷脳に対する神経再生療法とリハビリテーション医療の可能性. 第25回日本基礎理学療法学会学術大会. 仙台. 2020, 12 (招待講演: シンポジウム)
- 6) 田尻直輝: 損傷脳に対する神経再生療法とリハビリテーション医療の可能性. Neurovascular Unit研究会2021 (慶応義塾大学). 東京. 2021, 1 (招待講演)
- 7) Naoki Tajiri, Shino Ogawa, Atsunori Hattori, Ayano Otani, Shinya Ueno, Takeshi Shimizu, Hideki Hida: Elucidation of damaged brain regeneration mechanism by cell therapy and enriched environment for neonatal white matter injury. 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会. 名古屋. 2021, 3 (公募シンポジウム)
- 8) Haruka Sugiura, Ryotaro Anazawa, Ayano Otani, Shino Ogawa, Naoki Tajiri, Hideki Hida: Transplantation of oligodendrocyte progenitor cells with cyclosporine A protects from neonatal white matter injury-induced motor and histological impairments. 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会. 名古屋. 2021, 3 (ポスター発表)