

X線照射した臍帯血細胞で維持される組織修復能

保井 一太¹⁾ 小川 優子²⁾ 斉野 織恵²⁾ 赤松 理恵²⁾ 瀧崎 晶弘¹⁾
入江與利子¹⁾ 鍋谷まこと³⁾ 田中 光信¹⁾ 瀧原 義宏¹⁾ 田口 明彦²⁾
木村 貴文¹⁾

幹細胞を用いた再生治療は、幹細胞の増殖能や分化能に影響されると考えられているが、この再生効果の分子的・細胞的メカニズムは十分に解明されていない。我々は最近、脳梗塞モデルマウスにおいて、造血幹・前駆細胞治療後にギャップジャンクションを介した小分子代謝物が血管内皮細胞へ速やかに移動することを見出している。そこで、造血能が完全に消失する15Gy以上のX線を照射した臍帯血細胞において、臍帯血細胞が有する組織修復能が維持されるかを調べた。本研究では、X線照射した臍帯血から調製した単核球をXR細胞とした。XR細胞では造血能は消失していたが、組織修復能は維持されており、XR細胞を投与した脳梗塞モデルマウスの脳機能は回復した。また、XR細胞投与後10分間でXR細胞からエネルギー源として供給される低分子代謝産物によって損傷した脳血管内皮細胞や血管周囲アストロサイトが修復され、梗塞部位の血流回復とそれに続く神経新生という治療メカニズムが考えられる。XR細胞は、細胞の自律的な再生作用を介するのではなく、新神経血管新生を誘発することによって、組織修復能力を発揮する可能性がある。

キーワード：臍帯血細胞、血管新生、組織修復、X線照射、脳梗塞

この論文記事は、Nature リサーチ誌の許可のもと、Scientific Reports 誌 (2024, 14; <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57328-z>) に最初に報告された研究に基づくものである。(Kazuta Yasui, Yuko Ogawa, Orié Saino, Rie Akamatsu, Akihiro Fuchizaki, Yoriko Irie, Makoto Nabetani, Mitsunobu Tanaka, Yoshihiro Takihara, Akihiko Taguchi, Takafumi Kimura. Scientific Reports (2024, 14; <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57328-z>))

はじめに

細胞を用いた再生医療は、近年急速に発展している新しい医療である。様々なヒト細胞の中でも、特に臍帯血はそのいくつかの利点から再生医療の細胞ソースとして注目されている。臍帯血に含まれる造血幹細胞や間葉系幹・前駆細胞は、骨髄や成人末梢血に含まれるものに比べ、*in vitro* および *in vivo* の両方で優れた増殖能を有することが示されている^{1)~4)}。さらに、臍帯血は他の造血細胞源と比較して同種免疫に反応しにくいことも臨床的に証明されている¹⁾³⁾。また、臍帯血中の造血幹・前駆細胞が低酸素性あるいは虚血性による脳血管障害において、組織修復を強力に促進する能力を有していることは、臨床的にも実験的にも実証されている⁵⁾。実際、脳梗塞モデルマウスに臍帯血由来のCD

34⁺細胞を静脈内投与したところ、傷害部位の脳容積が顕著に回復するとともに、身体能力および認知能力に有意な回復効果が見られた⁶⁾。しかしながら、投与された臍帯血由来のCD34⁺細胞がどのように組織再生効果を発揮するかは不明である。我々は最近、静脈内投与した同種マウスの骨髄単核球が、わずか投与10分後にはモデルマウスの脳梗塞部位において、ギャップジャンクションを介して内皮細胞に低分子メタボライトを移行させることを見出した⁷⁾。この知見から、投与した幹細胞や前駆細胞が造血活性を失っていても組織再生するのではと考えた。そこで我々は、造血活性と組織修復能の関係を明らかにするため、15Gy以上のX線照射を行い、UCB細胞の増殖能を奪うことで、UCB細胞の組織修復能が影響を受けるかどうかを調べた。

1) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

2) 神戸医療産業都市推進機構脳循環代謝研究部

3) 淀川キリスト教病院小児科

連絡責任者：保井 一太, E-mail: kazuta-yasui@kk.bbc.jrc.or.jp

〔受付日：2024年9月6日, 受理日：2024年10月31日〕

方 法

XR 細胞の調製

臍帯血は、提供していただいた母親全員からインフォームド・コンセントを得た上で、正期産児から採取した。臍帯血を用いた実験はヘルシンキ宣言に従い、日本赤十字社、神戸医療産業都市推進機構、クレア株式会社の倫理委員会の承認を得て実施した。すべての臍帯血は採取後 72 時間以内のものを使用し、必要に応じて X 線照射 (MBR-1530A-TW ; FUJIFILM Healthcare co., Tokyo, Japan) で種々の線量の X 線を照射した。臍帯血からの単核球分離は Ficoll-Paque PREMIUM (Cytiva, MA, USA) 密度勾配溶液による比重遠心法にて実施した。凍結保存する場合、単核球を凍結保護液 (Stem Cell Banker GMP grade ; Takara Bio co., Kusatsu, Japan) に 2×10^6 /ml の濃度で懸濁し、プログラムフリーザー (VIA Freeze Research ; Cytiva, MA, USA) で 4°C から -60°C まで 1 分間に 2°C ずつ滴下しながら凍結し、得られた細胞を液体窒素で保存した。凍結サンプルの使用時には、サンプルを 37°C の水浴中で急速解凍した。

脳卒中モデル

動物実験は、ARRIVE ガイドライン (PLoS Bio 8 (6), e1000412, 2010) を遵守し、神戸医療産業都市推進機構の施設動物実験委員会により承認されたプロトコルに従って実施した。脳梗塞モデルマウスには、生後 7 週齢の雄性 SCID マウス (CB-17/lcr-scld/scldJcl ; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を用いた。同マウスにインフルラン吸入麻酔 (導入 3%, 維持 2%) し、バイポーラ鉗子を用いて左中大脳動脈 (MCA) 遠位部を永久結紮・切断し、永続的局所脳虚血を誘発した。手術中は実験動物の直腸温をモニターし、フィードバック制御加温パッドを用いて $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に維持した。MCA の脳血流 (CBF) もモニターし、MCA 閉塞 (MCAO) 直後に CBF が 75% 以上低下したマウスを実験に用いた (モデルマウス作成の成功率は 100% であった)。

細胞投与

MCAO 実施 48 時間後に 18 匹の実験マウスを無作為に 6 匹ずつ 3 群 : PBS 投与群、臍帯血単核球 (1×10^5 cells/mouse) 投与群、X 線照射臍帯血単核球 (XR-細胞) (1×10^5 cells/mouse) 投与群に分けた。単核球または XR-細胞は 50 μl の PBS に懸濁し、35G の注射針で左総頸動脈 (CCA) より投与した⁸⁾。

行動試験

実験デザインを Fig. 3a に示す。運動機能を評価するため、MCAO 後のマウスに以下の行動検査 (ワイヤーハングテスト、ロータロッドテスト、オープンフィールドテスト) を行なった。すべての行動テストは、予備研究であらかじめ決めた至適時間で実施した。

ワイヤーハングテスト

各マウスを金網プレートの上に置き、5 秒間環境に順応させた後、金網プレートを静かに反転させ、オープントップのガラス箱 (25 \times 25 \times 25cm) の上部に固定した。落下までの時間を測定し、最大試行時間を 3 分として、1 分間隔で 5 回試行を繰り返した。

ロータロッドテスト

感覚運動能力を評価するためこの試験を実施した。各マウスを静止したロータロッドドラム (Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) の上に 5 秒間置いた後、ロータを回転させた。その後、5 分間かけて回転ドラムを 4rpm から 40rpm まで加速し、各マウスが回転ドラムから落下するまでの時間を記録した。この実験を 1 分間隔で 5 回繰り返し、5 回の落下の平均時間を統計解析に用いた。

オープンフィールドテスト

この試験は自発活動評価のために行った。実験マウスを 25 \times 25 \times 25cm の箱 (Taiyo Electric Co., Ltd) に入れ、明るい環境で 30 分間、暗い環境で 30 分間自由に行動させた。赤外線ビームを X, Y, Z の各バンクに水平および垂直に一定間隔で設置し、各動物についてビームを横切った回数をカウントし、水平移動についてはロコモーションとしてスコア化した。

メタボローム解析

細胞治療 24 時間後にメタボローム解析用の脳サンプルを採取した。マウスを安楽死させた後、断頭し、頭部全体を直ちに液体窒素に浸した。頭蓋骨を取り除いた後、脳をドライアイス上で梗塞部位の同側と対側の 2 つの切片に分けた。全組織標本の重量は 35.5~40.4 mg で、測定まで -80°C で保存した (n=5)。測定はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社に依頼して行った。

XR 細胞からの物質移行

XR 細胞に 5 $\mu\text{mol/l}$ の 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethylester (BCECF-AM ; Dojindo, Kumamoto, Japan) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。細胞に取り込まれた BCECF-AM は細胞質で BCECF に変換され、BCECF を負荷した XR 細胞は *in vivo* 実験に使用する前に PBS (-) で 2 回洗浄した。細胞移植後 10 分、30 分、1 時間、3 時間後にマウスを安楽死させ、同マウスから頭部回収をした (n=3)。頭蓋骨から脳を取り出した後、ビブラトーム (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて冠状に切開し (20 μm)、CD31 (BD Biosciences, NJ, USA) およびグリア線維酸性タンパク質 (GFAP ; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に対する抗体で染色した。一次抗体を Alexa Fluor 555 または 647 標識二次抗体 (Molecular Probes, OR, USA) を用いて可視化し、細胞核は 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI ; Kirkegaard & Perry

Laboratories, MD, USA) で染色した。

脳血流量測定

イソフルラン麻酔下で頭皮を切開し、2次元レーザー血流計 (OmegazoneOZ-1; OMEGAWAVE 株式会社) により脳血流 (CBF) を測定した。同側半球の梗塞領域とそれに対応する対側半球の領域を関心領域 (ROI) として定義した。1秒ごとに5枚の連続した画像を取得し、平均して、データを同側/対側の CBF 比として以下のように示した: 1週間 (MCAO-PBS, n=3; MCAO細胞治療, n=3) および5週間 (MCAO-PBS, n=7; MCAO細胞治療, n=9)。

ゴルジ染色と樹状突起スパインの測定

ゴルジ-Cox 染色は、SuperGolgi キット (Bioenno Lifesciences, CA, USA) を用い、プロトコールに従い実施した。簡単に説明すると、細胞治療5週間後にマウスの脳を取り出し、生理食塩水で5分間灌流した後、A液に10日間浸した。その後、脳を蒸留水で洗浄し、室温で2日間B液に浸した。ビブラトーム (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて脳を冠状切片 (100 μ m) に切り出し、メーカーのプロトコールに従い染色と洗浄を行なった。神経突起の分岐を測定するために、前大脳動脈灌流領域の梗塞境界から300 μ m以内においてマウス1匹につき10個の神経細胞を無作為に選択し、BZ-X800 L 蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて20倍の倍率で1次および2次分岐を計測した。樹状突起スパイン密度を評価するため、各脳サンプルから上記と同じ領域の神経細胞10個を100倍の油浸対物レンズで数え、密度はスパイン数/樹状突起長20 μ mで表した。

免疫磁気ビーズによる CD34⁺細胞の精製

CD34⁺細胞の精製のため、臍帯血由来の単核球をメーカーの指示に従って human CD34 Microbead kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて免疫磁気分離を実施した。5% ウシ血清アルブミン (BSA) および5mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加した PBS (-) (PBS-BSA-EDTA) を 1×10^8 個の臍帯血単核球に対して300 μ l を添加し、懸濁後に100 μ l の FcR ブロッキング試薬および100 μ l の CD34 抗体結合マイクロビーズを加え、6 $^{\circ}$ C で30分間インキュベートした。同細胞懸濁液を PBS-BSA-EDTA で洗浄し、標識細胞を30 μ m のナイロンメッシュ (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) で濾過し、磁場中に設置したカラム (Miltenyi Biotech) に上層した。捕捉された細胞はカラムから磁場外で溶出し、回収した細胞は2本目のカラムに上層し、精製ステップが繰り返した。FACSCanto II (Becton Dickinson, CA, USA) を用いたフローサイトメトリー (FCM) による評価では、単離した CD34⁺細胞純度は概ね95%以上であった。

免疫磁気ビーズによる T リンパ球精製

T リンパ球の分離のために、臍帯血単核球から Human-Pan T cell Isolation kit (Miltenyi Biotech 社製) をプロトコールに従い、免疫磁気ビーズによる精製を行なった。簡単に説明すると、 1×10^7 個の臍帯血単核球を40 μ l の PBS (-) に懸濁し、CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, および CD235a (グリコフォリン A) に対するビオチン標識モノクローナル抗体を10 μ l 添加し、冷蔵庫 (2~8 $^{\circ}$ C) 中で5分間インキュベートした。さらに、30 μ l の PBS-BSA-EDTA を加えた後、同細胞懸濁液にアビジン標識マイクロビーズを10 μ l 加えてさらに冷蔵庫内で10分間インキュベートした。PBS-BSA-EDTA で洗浄後、標識細胞を30 μ m のナイロンメッシュで濾過し、磁場中に置いたカラムにロードした。分離された CD3⁺T リンパ球の純度は、FCM で評価したところ、概ね95%以上であった。

コロニー形成 (CFU) アッセイ

臍帯血から精製した CD34⁺細胞は、照射の有無にかかわらず、2% ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific) を含む Iscove 改変ダルベッコ培地 (IMDM; Thermo Fisher, MA, USA) に $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml の濃度で懸濁した。同細胞懸濁液を10容量のメチルセルロース系半固形培地 (MethoCult H4034 Optimum; StemCell Technologies, Vancouver, Canada) と混合し、2週間培養した。各シャーレは、赤血球形成単位 (BFU-E)、顆粒球-マクロファージコロニー形成単位 (CFU-GM)、および混合系コロニー形成単位 (CFU-mix) コロニーについてスコア化した。

T リンパ球活性化アッセイ

臍帯血から単離した T リンパ球を照射の有無にかかわらず40 μ l あたり 1×10^7 個の濃度で PBS (-) に懸濁した。この T リンパ球を、抗 CD3/CD28 モノクローナル抗体 (mAb) コート Dynabeads (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28; Thermo Fisher) を用いて、5 μ l あたり 1×10^7 個の濃度で培養した。培養開始時にインターロイキン2 (IL-2; Chiron, Emeryville, CA, USA) を最終濃度100g/ml になるように添加した後、10% ウシ胎児血清 (FCS; Thermo Fisher Scientific), L-グルタミン (Thermo Fisher), ペニシリン+ストレプトマイシン (Thermo Fisher) を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Thermo Fisher Scientific) 中で急速増殖期に3日ごとに細胞を継代した。培養 T リンパ球の CD3 抗原発現は、アロフィコシアニン (APC) 標識抗 CD3 抗体 (Becton Dickinson) を用いた FCM で評価した。培養 T リンパ球のアポトーシスの動態は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 annexin-V (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と 7AAD (Becton Dickinson) による2色免疫標識で評価した。

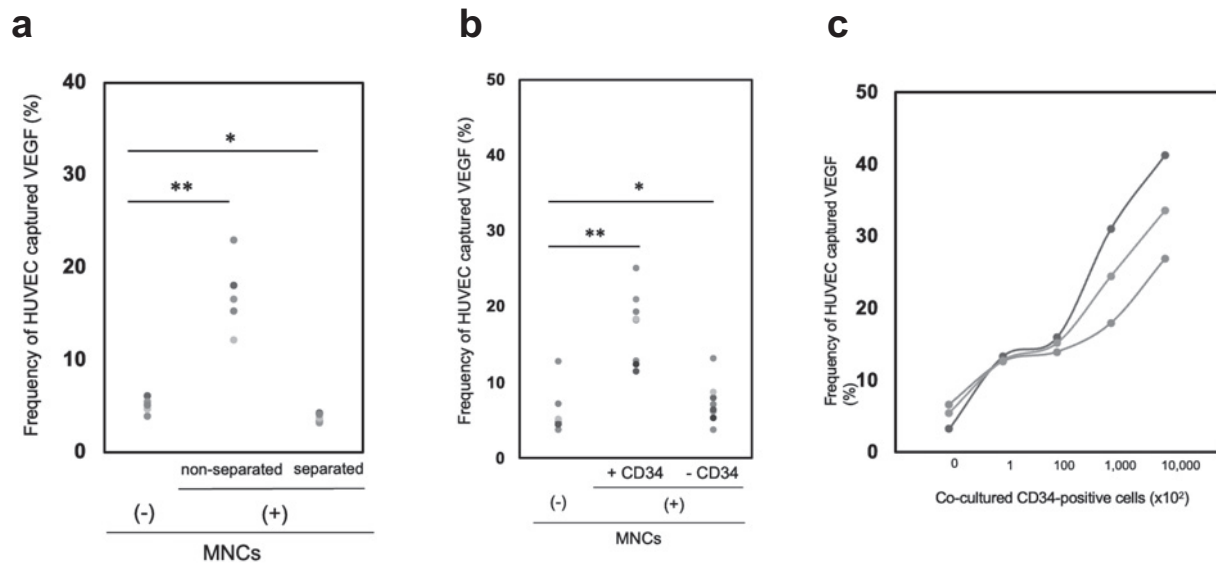


Fig. 1 Umbilical cord blood (UCB)-derived CD34⁺ cells promote angiogenesis *in vitro*

(a) Vascular endothelial growth factor (VEGF) uptake by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) without coculture with UCB-derived mononuclear cells (MNC) is shown. A significant increase in the VEGF uptake by monolayered HUVEC cocultured with UCB-derived-MNC was observed, with very little uptake when MNC were cultured separately in semipermeable chambers (n = 5). (b) When the levels of VEGF uptake by HUVEC cocultured with CD34⁺ cells or CD34⁺ cell-depleted MNC were measured, a significant increase in the allophycocyanin (APC) fluorescence was observed in HUVEC cocultured with CD34⁺ cells but not with CD34⁺ cell-depleted MNC (n = 7). (c) VEGF uptake by HUVEC gradually increased in a CD34⁺ cell dose-dependent manner (n = 3). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The symbols * and ** denote $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いたヒト血管内皮増殖因子 (VEGF) の取込み試験⁷⁾

HUVEC (Kurabo, Osaka, Japan) をメーカーのプロトコールに従って HuMedia-EB2 (Kurabo, Osaka, Japan) 中で培養し、6 継代までの HUVEC を使用した。組換えヒト VEGF (rhVEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) は、以前に記載された方法で評価した⁷⁾。簡単に説明すると、ビオチン標識 VEGF をストレプトアビジン標識 APC (Becton Biosciences) と分子比 4 : 1 で 10 分間、室温下でインキュベートした。HUVEC を回収し、1% FBS を含む PBS に 1×10^5 cells/ml の密度で懸濁した。合計 1×10^6 個の臍帯血由来の単核球、または臍帯血から単離された CD34⁺ 細胞 ($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 個) と APC 標識 VEGF (最終濃度 10nM) を同時に 1×10^5 個の HUVEC に添加し、37°C で 3 時間インキュベートした。HUVEC と単核球または CD34⁺ 細胞は半透膜チャンバー (Costar, TN, USA) を挟んでインキュベートし、HUVEC による VEGF 取り込みに対する体液性因子の影響を評価した。混合細胞懸濁液を PBS で 2 回洗浄し、PE 標識抗ヒト CD31 抗体 (Becton Dickinson), FITC 標識抗ヒト CD45 抗体 (Becton Dickinson), および 7-AAD で染色した。CD31⁺CD45⁻7AAD⁻ の HUVEC における APC 蛍光について、FCM を用いて評価した。

遊走アッセイ

トランスウェルの上部と下部のコンパートメントは、フィブロネクチンをコーティングしたフィルターを用いて分離した。細胞を上部のコンパートメントに加える前に、コーティングされたトランスウェルをアッセイ培地 (0.25% BSA を含む IMDM) で 3 回洗浄した。0.1ml のアッセイ培地に懸濁した臍帯血 CD34⁺ 細胞 (1×10^5 個) を上部コンパートメントに加え、SDF-1 (200 ng/ml, PeproTech, NJ, USA) の存在下または非存在下の 0.6ml のアッセイ培地を下部コンパートメントに加えた。予備実験によると、臍帯血 CD34⁺ 細胞のトランスウェル遊走を誘導する SDF-1 の最適濃度は 200ng/ml であった。トランスウェルプレートを 37°C, 5% CO₂ で 4 時間インキュベートし、下のコンパートメントに移動した細胞を顕微鏡で計測した。

SCID マウスを用いた長期造血能の評価

5 週齢の NOD.Cg-Prkdcscid112 rgtm1 Sug / ShiJic (NOG/SCID) マウスを実験動物中央研究所 (Kawasaki, Japan) から入手した。すべてのマウスは無菌状態で取り扱われ、株式会社クレアジャパンの実験動物施設で無菌アイソレーターで維持され、移植実験も株式会社クレアジャパンにて実施した。具体的には、X 線照射した 1×10^6 臍帯 CD34⁺ 細胞 (試験サンプル) または 5×10^4 未照射臍帯血 CD34⁺ 細胞 (陽性コントロール) を、

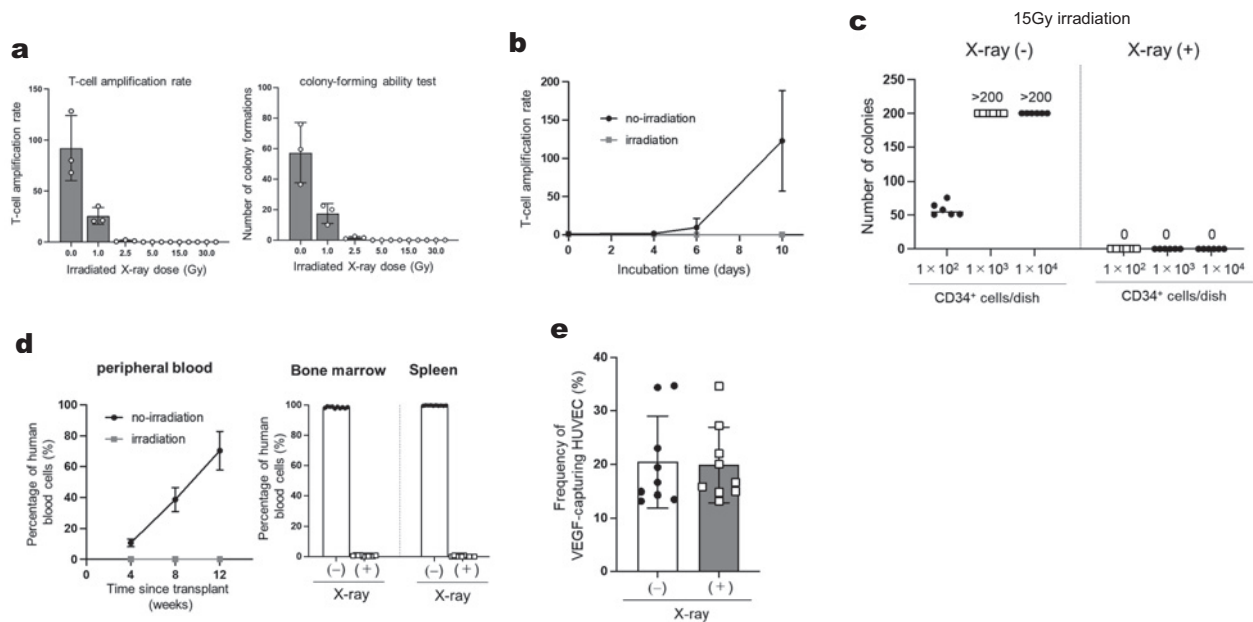


Fig. 2 Characteristics of X-ray irradiated umbilical cord blood (UCB)-derived mononuclear cells (MNC)

(a) T-cells or CD34⁺ cells were purified from UCB, which was irradiated with 0, 1, 2.5, 5, 15, or 30 Gy of X-rays, the optimal dose of which was pre-determined. Proliferative capacity of the cells was assessed by T lymphocyte activation and colony-forming unit (CFU) assays (n = 3). (b) Irradiation with 15 Gy of X-rays completely inhibits the proliferation of UCB-derived T lymphocytes (n = 6). (c) CFU-assays were used to evaluate the short-term hematopoietic ability of hematopoietic progenitor cells in UCB-derived MNC. Hematopoietic colony formation was compared between pre-irradiated and irradiated UCB-derived MNC (n = 6). (d) Ten of the 20 NOD/Shi-scid/IL-2R γ KOJic (NOG) mice received 5.0×10^4 MNCs and the remaining 10 received 1.0×10^6 XR cells via the tail vein. The percentage of human CD45⁺ cells was measured by flow cytometry (FCM) 4, 8 and 12 weeks after transplantation for human cells in peripheral blood and 12 weeks after transplantation for human cells in bone marrow and spleen. (e) Either pre- or post-irradiated UCB-MNCs and HUVECs were co-cultured and the amount of VEGF incorporated into HUVECs was compared (n = 12). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

可溶性致死線量 (2Gy) の X 線を照射したマウスに尾静脈から注入した。CD34⁺細胞注入 12 週後にマウスを安楽死させ、各マウスの末梢血を 10% FCS を含む α Minimum Essential Medium (MEM) で洗浄した。マウス末梢血中のヒト CD45⁺細胞の割合を FCM を用いて分析した。マウスの全骨髄細胞の 1% 以上がヒト CD45⁺細胞であった場合、マウスは陽性とみなした。

統計解析

Fig. 1 および 2 の統計分析は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) を使用して実施した。代謝物の結果は、平均 \pm 平均の標準誤差 (SEM) とし、対応のある t 検定を行った。p 値が 0.05 未満の結果は統計的に有意であるとみなした。

Fig. 3~7 の統計分析は、GraphPad Prism9 (GraphPad Software) を使用した。in vitro テスト、行動テスト、脳血流比、および免疫組織学的染色の結果は、平均 \pm 標準偏差 (SD) とし、すべてのテストでグループ間の差異は、多重比較の補正のために Bonferroni テストを使用した。これらの結果は正規分布していなかったため、Kruskal-Wallis 検定と Dunn の多重比較検定を

使用して評価した。代謝物の結果は平均 \pm 平均の標準誤差 (SEM) として表され、Dunn 検定による一元配置分散分析を使用した。p 値が 0.05 未満の結果は統計的に有意であるとみなした。

結果

臍帯血単核球の血管内皮細胞との細胞間相互作用

血球細胞の血管新生促進能力を in vitro で評価することを目的とし、血球細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とを共培養し、HUVEC に取り込まれる血管内皮増殖因子 (VEGF) の増加をフローサイトメトリーで検出する検査法を確立している⁷⁾。以前の骨髄単核球と HUVEC との共培養結果⁷⁾と同様に臍帯血単核球においても HUVEC による VEGF 取り込みの有意な増加が観察されたが、臍帯血単核球を半透性チャンバーで培養した場合 (臍帯血単核球と HUVEC とは直接結合しない) は、VEGF の取り込みはほとんど見られなかった (Fig. 1a)。これらの結果は、HUVEC による VEGF の顕著な取り込みには、臍帯血単核球との直接的な細胞-細胞相互作用が不可欠である可能性を示唆してい

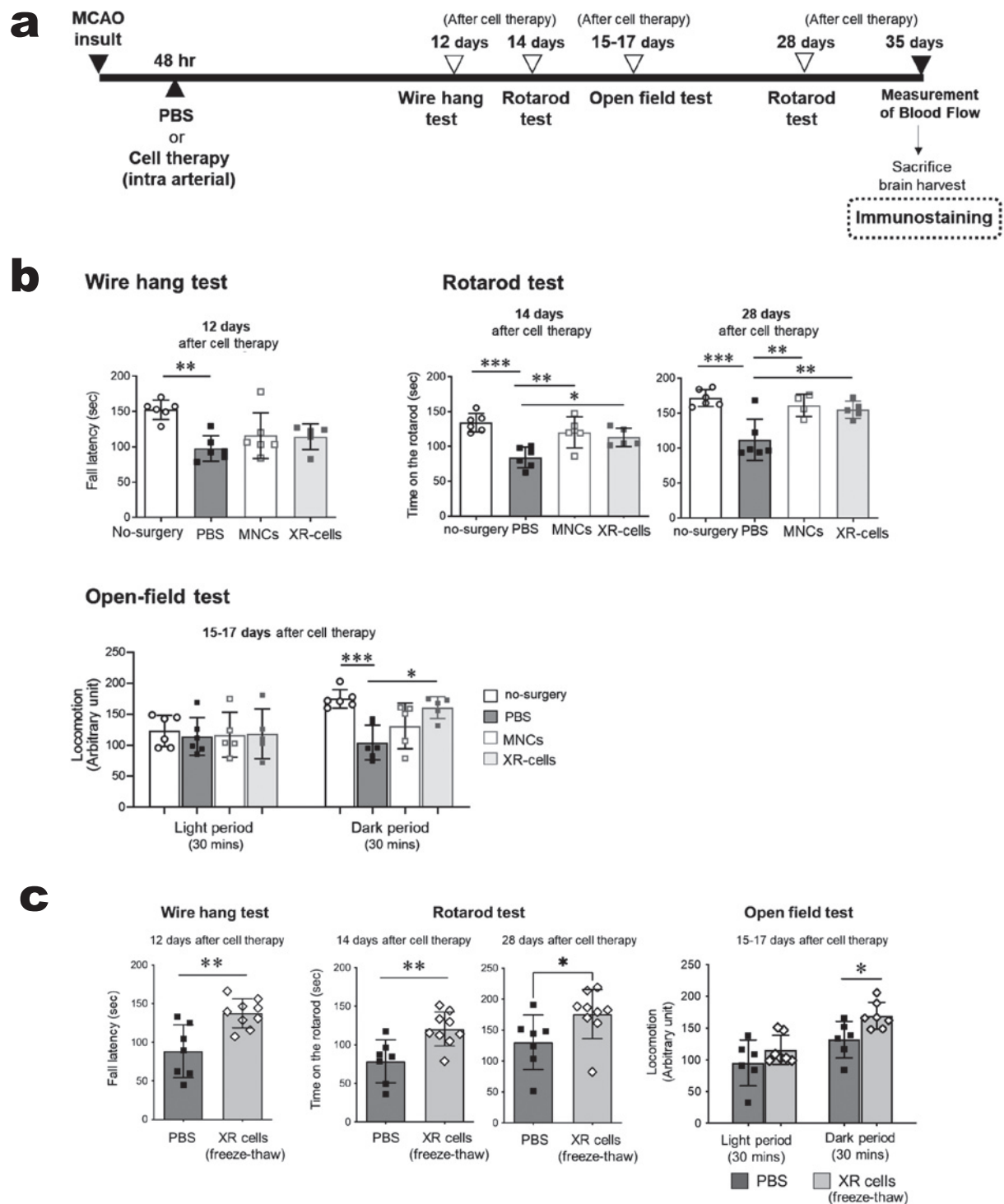


Fig. 3 Effects of X-irradiated mononuclear cells (XR-MNCs) on a mouse model of stroke

(a) The experimental design is shown. (b) To assess motor function, mice were subjected to behavioural tests in the wire-rope test, rotarod test and open field test after MCAO procedure. All behavioural tests were performed at the optimal time based on a preliminary study. (c) Behavioural tests were performed with freeze-thawed XR-MNCs. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The symbols *, **, and *** denote $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

る。さらに、HUVECをCD34⁺細胞を含む単核球と共培養した場合にはVEGFの著明な取り込みの増強がみられたが、CD34⁻細胞分画(単核球から免疫磁気ビ-

ズでCD34⁺細胞を除去した細胞分画)では、わずかな変化しかみられなかった(Fig. 1b)。さらに、HUVECによるVEGF取り込みは、CD34⁺細胞の細胞数依存的

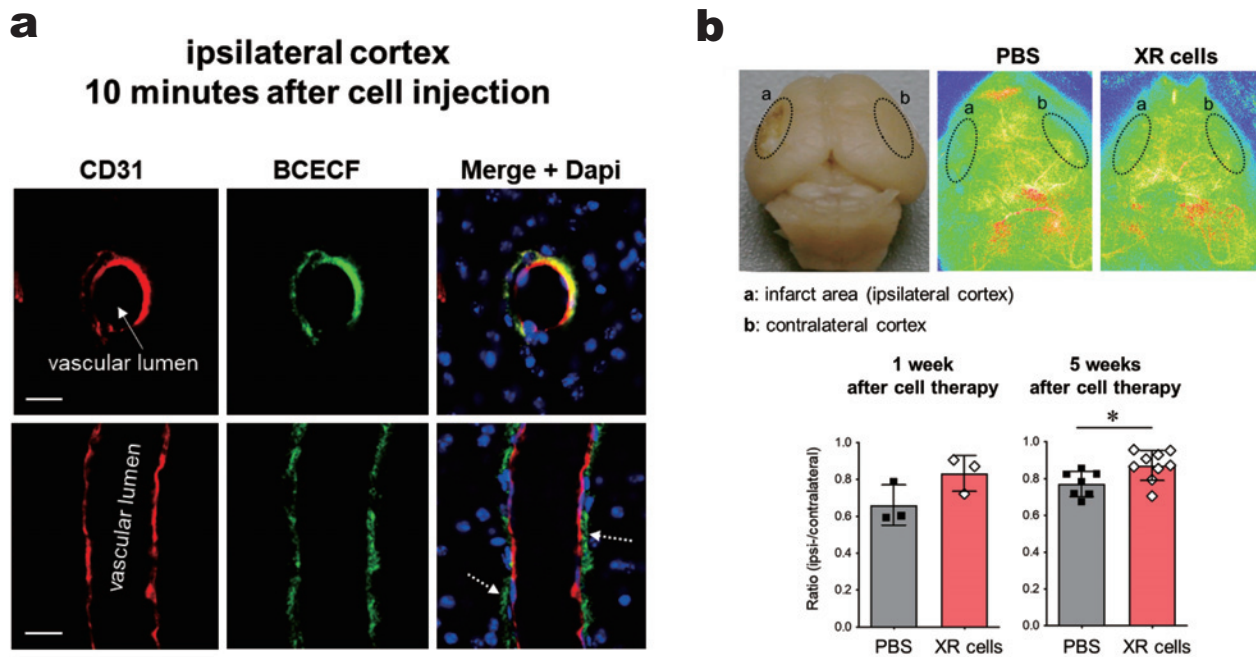


Fig. 4 Delivery of small molecules from X-irradiated mononuclear cells (XR) to vascular endothelial cells at the injured side (a) The BCECF-signals in the cerebral vascular endothelial cells from the ipsilateral cortex were evaluated using fluorescence microscopy. (Upper row) Transferred BCECF-positive signals (green) observed in the endothelial cells 10 min after XR cell transplantation. (Lower row) Transferred BCECF are also visible in non-endothelial cells located outside the vasculature. Scale bars = 10 μ m. (b) Cerebral surface blood flow was measured in the mouse model of stroke using a laser speckle flowmetry imaging system (1 week: MCAO-PBS treatment, n=3 and MCAO-XR cell treatment, n=3; 5 weeks: MCAO-PBS, n=7 and MCAO-XR cell treatment, n=9). Representative images in 5 weeks are shown in the top row, and their quantitative results are shown in the bottom row. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The symbols * denote $p < 0.05$.

に増加した (Fig. 1c). これらの結果は、ヒト血管内皮細胞が臍帯血単核球、特に CD34⁺細胞との直接的な細胞間相互作用によって活性化されたことを示唆している。

X線照射が臍帯血単核球に及ぼす影響

次に、XR細胞 (X線照射した臍帯血単核球) の増殖能力を評価した。15Gy以上のX線照射は、Tリンパ球と造血細胞の両方の短期増殖能力を完全に抑制した (Fig. 2a~c)。さらに、免疫不全マウスにおけるヒト造血の長期再構築能も完全に消失させた (Fig. 2d)。注目すべきことに、XR細胞は、照射前の単核球と同程度に HUVEC による VEGF の取り込みを促進した (Fig. 2e)。これらの発見は、臍帯血単核球の血管新生を促す能力は増殖能とは独立して存在することが示唆される。また、XR細胞に増殖刺激を加えなければ X線照射後少なくとも 48 時間はアポトーシス形態を示すことはほとんどなかったが、増殖刺激が加わった場合は同細胞は急速にアポトーシスに陥った。

XR細胞による血管および神経再生

これまでの研究で⁶⁾、臍帯血 CD34⁺細胞は脳梗塞モデルマウスにおいて強力な血管新生および神経細胞の活性化効果を発揮した。しかし、同細胞による脳機能改

善がどのようなメカニズムかは正確には解明されていない。そこで、脳梗塞モデルマウスに XR細胞または未照射の臍帯血単核球を投与し、そのメカニズム解明を試みた。この移植実験では 77 匹のマウスを使用し、そのうちの 71 匹のマウスに対して脳梗塞モデルマウスの作成し、すべてのモデル作成手術に成功した。脳梗塞発症後 37 日まで生存させたマウス 36 匹のうち 2 匹が死亡した。XR細胞群のマウス 1 匹は細胞療法の 3 日後に死亡し、非照射 MNC 群のマウス 1 匹は細胞療法の 2 週間後に死亡した。細胞投与から死亡まで時間が経過しているため、死亡は細胞療法の投与に直接起因したものではないと考えられた。また、行動評価したマウスについて細胞治療 5 週間後に病理学的剖検を行なった。肺、肝臓、消化器、脾臓、腎臓、生殖器官に腫瘍形成や炎症などの異常所見は視覚的に観察されなかった。行動評価は Fig. 3a に示すスケジュールに従って実施した。運動機能を評価するため、MCAO 処置後にマウスにワイヤーハンゲテスト、ロータロッドテスト、オープンフィールドテストの行動テストを実施した。すべての行動テストは、予備研究に基づいて最適な時間に実施した。XR細胞を投与したグループはすべての行動テストで有意な治療効果を示し、その治療効果は

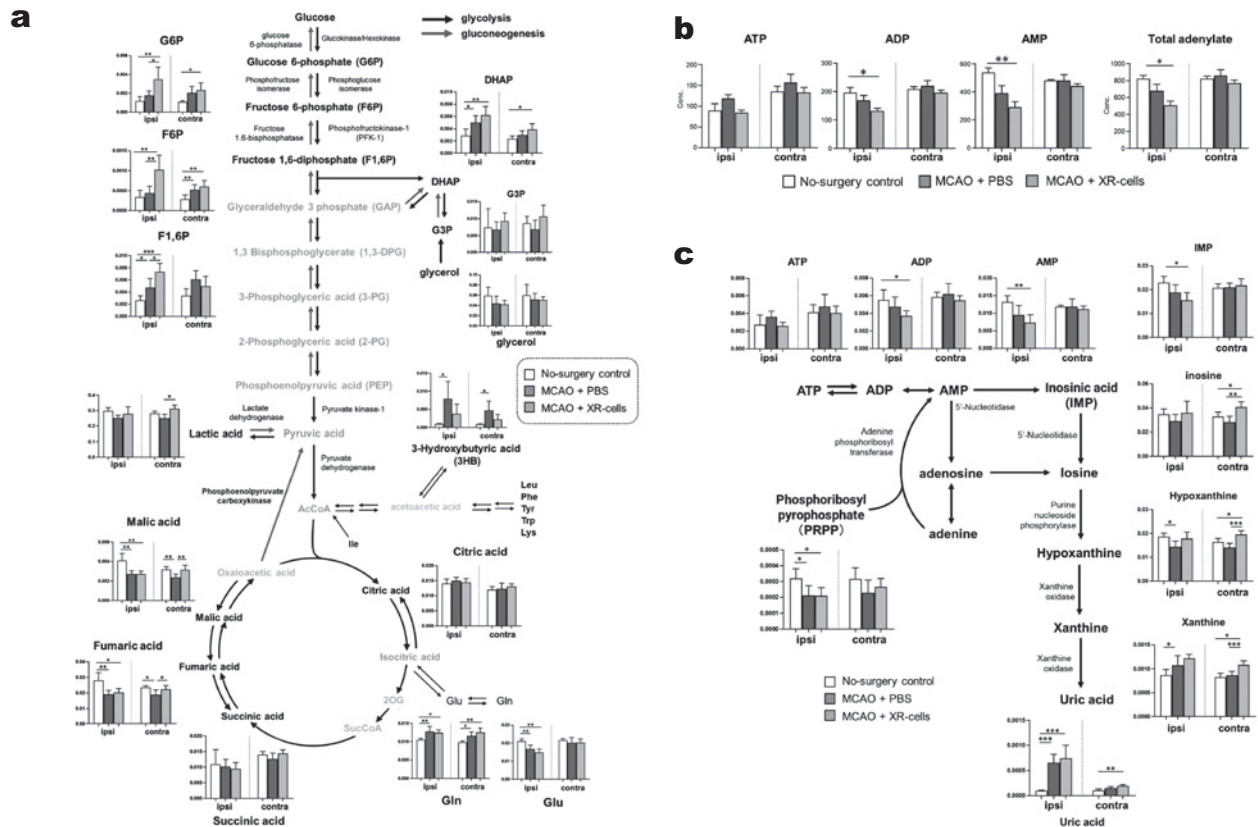


Fig. 5 Metabolites 24 hr after X-irradiated mononuclear cells (XR) therapy in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) mouse brain model-1

(a) Map of the central metabolic pathway and comparative visualization of the metabolites involved in XR cell therapy. (b) Total adenylate and adenylate energy change. Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate. (c) *de novo* synthesis of purine nucleotides after cell therapy. Differences in the levels of metabolites among the no-surgery control, MCAO-phosphate-buffered saline (PBS), and MCAO-XR cell groups are presented as bar graphs. 'Ipsi' represents the ipsilateral side, and 'contra' represents the contralateral side of the mouse brain. Black font indicates substances that were detected, and gray font indicates substances that were not detected in all groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The symbols *, **, and *** denote $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

未照射臍帯血単核球を投与したマウスと同等であった (Fig. 3b). また, XR 細胞の効果は凍結融解操作後も保たれていた (Fig. 3c).

細胞間代謝物移動による脳内の代謝変化

XR 細胞の治療メカニズムを調査した. 凍結融解後に 2,7'-bis-[2-carboxyethyl]-5-[6]-carboxyfluorescein (BCECF) を充填した XR 細胞を中大脳動脈閉塞 (MCAO) を発症させた 48 時間後にマウスに輸注した⁷⁾. 細胞輸注から 10 分後に, XR 細胞の細胞質から梗塞側の血管外に位置する血管内皮細胞と非内皮細胞への BCECF シグナル伝達が観察された (Fig. 4a). これらのデータは, XR 細胞が未照射臍帯血単核球と同様に 10 分と極めて短い時間で損傷した脳血管内皮細胞に低分子量代謝物を提供できると考えられる. X 線照射の影響を受けない細胞治療メカニズムと考えられる.

次に, 初期の低分子メタボライトの移行が 24 時間以内に脳の代謝状態にどのような変化をもたらすかを評

価した. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) 投与群と比較して, XR 細胞投与群は投与後 24 時間で解糖系にシフトしていた (Fig. 5a). 一方, XR 細胞投与群は PBS 投与群よりも総アデニル酸レベルが低値であった (Fig. 5b). 次に, アデニル酸の分解および合成経路を調べた (Fig. 5c). 分解経路は分解産物である尿酸が未処理群と XR 細胞処理群で有意に高く, 合成経路はプリン塩基合成の出発点である PRPP と IMP が両群で低値を示した. 損傷側では, 無治療群と細胞投与群の間で, エネルギー源としての Arg, Leu, Phe, Pro などのいくつかのアミノ酸の量に有意な差も見られた (Fig. 6a). さらに, 未投与群ではエネルギー代謝物 3-HB (ケトン体) が増加したが, 細胞投与群では G6P や F6P などの初期解糖中間体が増加した (Fig. 6b). また, 脳梗塞モデルマウスでは尿酸代謝に関与するオルニチンが増加していることを観察した (Fig. 6c). 造血幹/前駆細胞 (HSPC) は, 解糖系が活性化した状態で高エネルギー状態を維

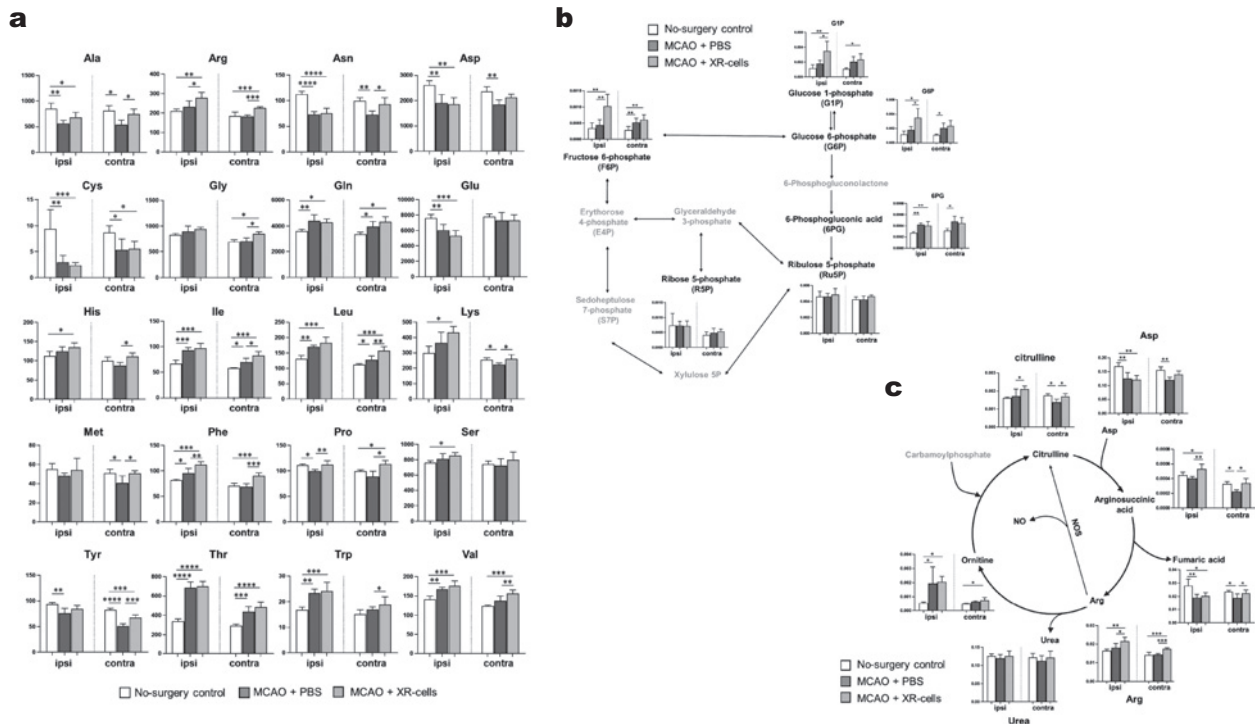


Fig. 6 Metabolites at 24 hr after X-irradiated mononuclear cells (XR) therapy in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) mouse brain model-2

(a) Amino acid concentration after cell therapy. Differences in the levels of metabolites among the no-surgery control, MCAO-phosphate-buffered saline (PBS), and MCAO-XR cell groups are presented as bar graphs. 'Ipsi' represents the ipsilateral side, and 'contra' represents the contralateral side of the mouse brain. Abbreviations: Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartic acid; Cys, cysteine; Gln, glutamine; Glu, glutamic acid; His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Ser, serine; Thr, threonine; Trp, tryptophan; Tyr, tyrosine; and Val, valine. (b) Pentose phosphate pathway metabolites after cell therapy (n=5). (c) Urea cycle metabolites after cell therapy. Black font indicates the detected substances, and gray font indicates substances that were not detected in all groups (n=5). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The symbols *, **, and *** denote $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

持っている⁹⁾。おそらく、XR細胞(特にCD34⁺細胞)由来の代謝産物が損傷した内皮細胞に移行することで、レシピエントマウスの脳内でエネルギー代謝が活性化されると考えられる。

XR細胞投与による血管新生の誘導

代謝活性化と同時に、XR細胞を投与したマウスの梗塞部における血流が著しく改善することを明らかにした(Fig. 4b)。具体的には、XR細胞を投与したグループでは1週間後に血流が改善するが、PBS(-)を投与したグループではその改善は観察されなかった。さらに、XR細胞グループとPBS(-)グループ間の脳表面血流を比較すると、輸注後1週間では有意差は見られなかったが、投与後5週間ではXR細胞グループで有意な増加が観察された。すなわち、梗塞部における血流改善は、臍帯血単核球(特にCD34⁺細胞)による血管新生の影響を受けている可能性が考えられる⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

XR細胞による神経細胞の活性化

XR細胞による神経機能回復についても調べた。CD34⁺

細胞は、損傷した血管周辺組織から放出される Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) などの走化性因子刺激に反応して損傷組織に向かって移動することが報告されている¹²⁾¹³⁾。X線照射した臍帯血CD34⁺細胞は、未照射の同細胞と同様にSDF-1に反応して遊走能を示した(Fig. 7a)。とりわけ、投与後3時間でXR細胞から移行した物質の蛍光シグナルが血管内皮細胞だけでなく、血管内皮細胞に隣接するアストロサイトでも観察されたことは重要である(Fig. 7b)。さらに、梗塞境界領域におけるシナプスの可塑性を調べたところ、XR細胞投与後、樹状突起およびスパイン数が有意に増加していた(Fig. 7c)。これらの結果は、XR細胞投与による神経細胞の活性化は血管新生促進能に加えて、アストロサイトとの直接作用による可能性も示唆している。

考察

近年、臍帯血を用いた細胞治療の臨床的有効性は、さまざまな虚血性脳疾患を対象とした臨床試験でも確

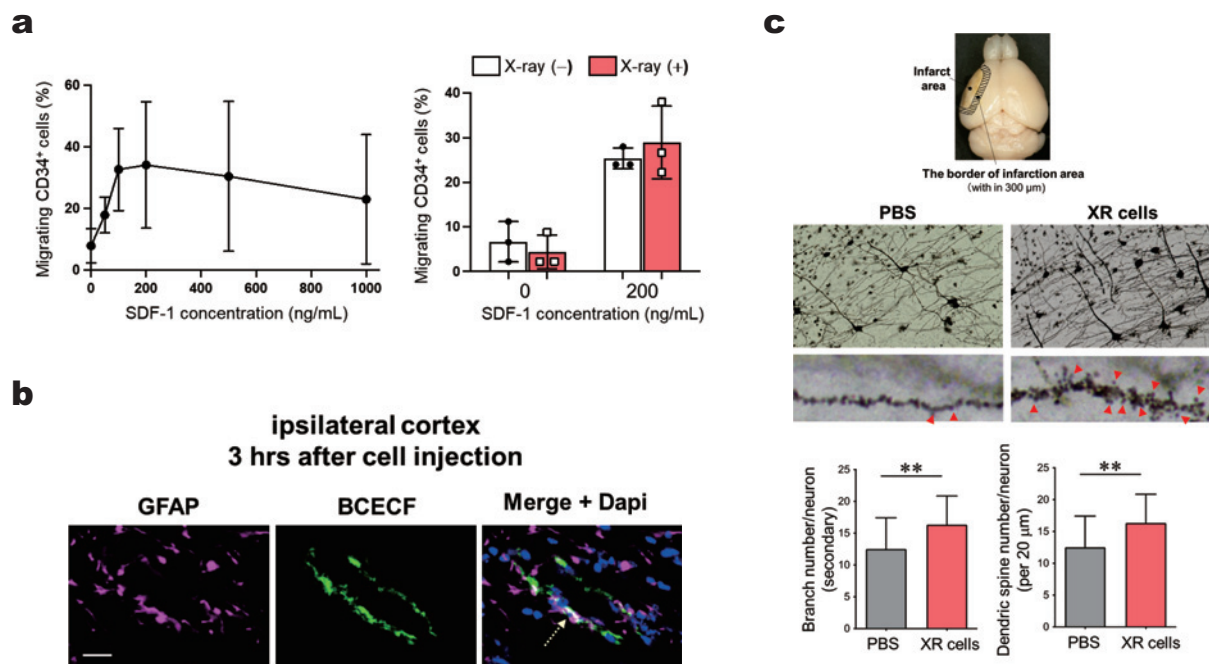


Fig. 7 Nerve repair through direct interaction between X-irradiated mononuclear cells (XR) and astrocytes (a) The optimal concentration of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) to maintain the migratory ability of umbilical cord blood (UCB) CD34⁺ cells was evaluated (left panel) and irradiated and non-irradiated CB UCD34⁺ cells both exhibited comparable migratory ability after SDF-1 stimulation (n=3). (b) BCECF dye was transferred into astrocytes, and BCECF signals (green) were observed in glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes (violet). (c) To measure neurite branching, 10 neurons were randomly selected from the anterior cerebral artery perfusion area within 300μm of the border of the infarction area from each mouse, and primary and secondary branching were counted under 20× magnification. To evaluate the spine density, 10 neurons from each brain sample were placed in the same area where the dendritic structure was digitized using an oil immersion of 100× magnification. The spine density is presented as the number of spines/20μm dendritic length (1 week; MCAO-PBS, n=3 and MCAO-XR cell treatment, n=3; 5 weeks; MCAO-PBS, n=7 and MCAO-XR cell treatment, n=9). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All results are expressed as the mean ± standard deviation (SD). The symbols ** denote $p < 0.01$.

認されている⁵⁾⁶⁾¹⁴⁾。さらに、臍帯血中の成熟細胞ではなく CD34⁺細胞が脳梗塞モデルマウスに対して治療効果があることも実証されている⁶⁾。しかし、損傷した脳組織修復と神経機能回復における臍帯血 CD34⁺細胞の役割は完全には解明されていない。本研究では、臍帯血単核球は 15Gy の X 線照射後も脳梗塞モデルマウスに対する組織修復効果を維持していた (Fig. 2e および Fig. 3)。この現象は、臍帯血単核球 (特に CD34⁺細胞) の造血能とは独立した組織修復能によるものと考えられる。

我々は、脳梗塞における CD34⁺細胞の組織修復メカニズムは以下のように考えている。脳梗塞発症後、梗塞巣および梗塞周辺領域では血流障害により酸素とエネルギー源が不足し、脳血管内皮細胞においてオートファジーが生じる⁷⁾。そこにグルコースやアミノ酸などの低分子量のエネルギー源を豊富に含む造血幹細胞が投与されると、ギャップジャンクションを介して障害された脳血管内皮細胞にエネルギー源となる低分子メタボライトが供与され、脳血管内皮細胞がレスキュー

される。脳梗塞発症後も内因性神経幹細胞が動員されることが知られているが、動員部位に足場となる血管がなければ、動員された神経幹細胞はニューロンに分化できず、生着もしない。しかし、投与された臍帯血 CD34⁺細胞が障害側における血管の脱落を防ぐことで神経機能の回復にも重要な役割を果たす。また、ギャップジャンクション以外にトンネルナノチューブによる物質移動が考えられる。実際に、カルシウムイオン、microRNA、高分子量タンパク質、ミトコンドリアなどの細胞小器官などがトンネルナノチューブを介して移動する¹⁵⁾¹⁶⁾。サイトカインやケモカインなどの他の体液性因子も考慮する必要もあるが、直接的な細胞間接触は、解糖系への代謝シフトを通じて、CD34⁺細胞の治療効果に不可欠であり、その結果、血管新生や神経細胞の活性化が促進されると考えられる¹⁷⁾。

私たちは以前、ギャップ結合を介して造血幹細胞・前駆細胞から血管内皮細胞へグルコースなどのエネルギー源を送達することが脳梗塞における血管再生に重要であることを報告した⁷⁾。また、XR 細胞輸注後に解

糖基質が増加するが (Fig. 5a), 総アデニル酸レベルは低下することを観察している (Fig. 5b). 総アデニル酸が低い原因としては, アデニル酸の合成抑制とアデニル酸の積極的分解の2通りが考えられるが, メタボローム解析結果のみではその判別は難しい. アデニル酸は, サルベージ経路 (尿酸の分解と再合成) と *de novo* 経路の2経路で合成されるが, これらの合成経路の機能低下により総アデニル酸レベルを維持できない可能性がある. また, 脳梗塞モデルマウスにおける高尿酸値と PRPP および IMP の低値も, サルベージ経路と *de novo* 経路の機能低下によるものと考えられる. 一方, 脳梗塞モデルマウスと健常マウスとの ATP レベルは差がなかった. ATP レベルを維持するために ADP と AMP から ATP が合成されるが, その合成経路は未治療群と XR 細胞治療群で異なる可能性がある. 未治療群はケトン体を吸収して ATP 産生するのに対し, XR 細胞治療群はグルコースを吸収して ATP を産生する可能性が考えられる. XR 細胞治療における要因は, 梗塞部位周辺血管内皮細胞での解糖系への代謝シフトであり, これにより多くの ATP 産生が可能になると考えられる. 本研究では, XR 細胞が血管内皮細胞に直接結合し, その代謝を変化させることで血管新生を促進し, それにより血流回復および神経再生する可能性を示した. さらに, XR 細胞とアストロサイトとの相互作用も明らかにした (Fig. 5b). XR 細胞とアストロサイトの相互作用のメカニズムは不明であるが, Na⁺/K⁺-ATPase⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾ を介した神経細胞の活性化が考えられる. また, XR 細胞とアストロサイトとの相互作用は, 神経細胞再生において血管新生を介した経路とは別の重要な経路と考えられる.

我々は脳梗塞モデルマウスへの骨髓単核球移植後に血管内皮細胞において hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の発現増強を報告している⁷⁾. 新生児マウスは成体とは異なり損傷した心臓を再生することが出来るが, この再生能力は生後7日目までに失われる²⁰⁾. また, ゼブラフィッシュや尾状両生類などの低酸素環境に生息する生物は, 生涯を通じて心臓を再生することが可能である. 成人の心臓は好気性代謝によってエネルギー生産し, 胎児, 新生児, ゼブラフィッシュの嫌気性解糖系代謝によるエネルギー生産とは異なる. さらに Otsuらは, 低酸素または低血糖刺激を受けたヒト末梢血由来単核球が脳梗塞モデルラットに顕著な治療効果を示したことを報告している²¹⁾. これらの結果は, XR 細胞による神経回復が CD34⁺細胞による嫌气的解糖への代謝変化によることを支持している.

今後症例数の増加に伴い, 臍帯血単核球投与後の免疫反応, とりわけ同種疾患である移植片対宿主病 (GVHD) について注意を払う必要がある²²⁾. 脳梗塞患者の多くは

高齢で, 身体機能の低下が多岐にわたるため, GVHD 予防のための免疫抑制剤を安全に使用することが困難な場合がある. 本研究では, 15Gy で X 線を照射することで T リンパ球の増殖力 (Fig. 2b) が, CD34⁺細胞の短期 (Fig. 2c) および長期 (Fig. 2d) の造血能が, それぞれ完全に消失することを確認している. したがって, XR 細胞は GVHD や腫瘍形成のリスクなしに, 神経および血管再生効果が期待でき, 今後の再生医療への応用が期待できる.

CD34⁺細胞が造血幹・前駆細胞として働く骨髓微小環境は造血ニッチと呼ばれ, 造血活性の維持と発揮に大きな影響を与えることが知られている²³⁾. しかし, 造血幹・前駆細胞が既存のニッチに入るのか, それとも自らでニッチを積極的に形成するのかについては結論が出ていない. 造血幹・前駆細胞が血管および神経組織を再生する能力を考慮すると²⁴⁾, 造血幹・前駆細胞が積極的に血管内皮細胞, 周皮細胞 (間葉系幹細胞に類似した性状²⁵⁾), 神経細胞の再生を誘導し, ニッチを形成していることが考えられる²⁶⁾. XR 細胞で観察された現象は, 少なくとも脳梗塞など血管修復を必要とする場合では, 造血幹・前駆細胞のニッチ形成能と造血能とは無関係と考えられる. また, 成人末梢血にも少数の CD34⁺細胞が存在するか^{27)~30)}, その増殖・分化能力は臍帯血 CD34⁺細胞に比べて低く, その存在意義は明らかにされていない. 成人末梢血 CD34⁺細胞の主な役割が組織修復と仮定すると, 同細胞の減少によって脳 (脳梗塞患者の予後不良, 高齢者の認知機能低下), 心臓 (慢性心不全などの心血管疾患の予後不良), その他の疾患を説明することが可能である³⁰⁾. 同様に, 臍帯血 CD34⁺細胞は新生児造血の主役であるだけでなく, 出生後の急速に拡大する血管網の促進因子とも考えられる. 結論として, 造血幹・前駆細胞によって引き起こされる組織修復プロセスを正確に解明することは, 今後の再生医療の発展に重要である.

著者の COI 開示: 保井一太, 小川優子, 田口明彦, 木村貴文は研究費については日本学術振興会, 国立研究開発法人日本医療研究開発機構から研究資金の提供を受けた. 本研究内容について日本赤十字社と神戸医療産業都市推進機構とで特許の共同出願中である. また, 著者の内, 保井一太, 瀧崎晶弘, 入江利子, 田中光信, 瀧原義宏, 木村貴文は関連企業の日本赤十字社職員である.

文 献

- 1) Panch SR, Szymanski J, Savani BN, et al: Sources of hematopoietic stem and progenitor cells and methods to optimize yields for clinical cell therapy. *Biol Blood Marrow Transpl.* 23: 1241—1249, 2017.

- 2) Matsumoto T, Mugishima H: Non-hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. *Int. J. Stem Cells*, 2: 83–89, 2009.
- 3) Kim YJ, Broxmeyer HE: Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance. *Cirt. Rev. Oncol. Hematol.*, 79: 112–126, 2011. doi: 10.1016/j.critrevone.2010.07.009.
- 4) Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, et al: In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells*, 18: 196–203, 2000. doi: 10.1634/stemcells.18-3-196.
- 5) Laskowitz DT, Bennett ER, Durham RJ, et al: Allogeneic umbilical cord blood infusion for adults with ischemic stroke: Clinical outcomes from a phase I safety study. *Stem Cells Transl. Med.*, 7: 521–529, 2018.
- 6) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al: Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.*, 114: 330–338, 2004. doi: 10.1172/JCI20622.
- 7) Kikuchi-Taura A, Okinaka Y, Takeuchi Y, et al: Bone marrow mononuclear cells activate angiogenesis via Gap junction-mediated cell-cell interaction. *Stroke*, 51: 1279–1289, 2020.
- 8) Ogawa Y, Okinaka Y, Kikuchi-Taura A, et al: Pre-clinical proof of concept: Intra-carotid injection of autologous CD34-positive cells for chronic ischemic stroke. *Front. Med.*, 9: 681316, 2022. doi: 10.3389/fmed.2022.681316.
- 9) Ogawa Y, Okinaka Y, Takeuchi T, et al: Intravenous bone marrow mononuclear cells transplantation improves the effect of training in chronic stroke mice. *Front. Med.*, 2020. doi: 10.3389/fmed.2020.535902.
- 10) Myojin K, Taguchi A, Umetani K, et al: Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 28: 953–957, 2007.
- 11) Umetani K, Yagi N, Suzuki Y, et al: Observation and analysis of microcirculation using high-spatial-resolution image detectors and synchrotron radiation. *Proc. SPIE*, 3977: 522–533, 2000.
- 12) Rosenkranz K, Kumbruch S, Lebermann K, et al: The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to the ‘homing’ of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain. *J. Neurosci. Res.*, 88: 1223–1233, 2010. doi: 10.1002/jnr.22292.
- 13) Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, et al: The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY 720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells. *Blood*, 103: 4478–4486, 2004.
- 14) Permana A, Bajamal AH, Parenrengi MA, et al: Clinical outcome and safety of stem cell therapy for ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *Surg. Neurol. Int.*, 13: 206, 2022. doi: 10.25259/SNI_1174_2021.
- 15) Zou X, Hou X, Xu J, et al: Mitochondria transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which CD133+ scattered tubular cells eliminate hypoxic tubular cell injury. *BBRC*, 522: 205–212, 2020. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.006.
- 16) Heisterkamp P, Borsch O, Lezama ND, et al: Evidence for endogenous exchange of cytoplasmic material between a subset of cone and rod photoreceptors within the adult mammalian retina via direct cell-cell connections. *Exp. Eye Res.*, 2022. doi: 10.1016/j.exer.2022.109033.
- 17) Peplow PV: Growth factor- and cytokine-stimulated endothelial progenitor cells in post-ischemic cerebral neovascularization. *Neural Regen. Res.*, 9: 1425–1429, 2014. doi: 10.4103/1673-5374.139457.
- 18) Kurauchi Y, Noma K, Hisatsune A, et al: Na⁺, K⁺-ATPase inhibition induces neuronal cell death in rat hippocampal slice cultures: Association with GLAST and glial cell abnormalities. *J. Pharmacol. Sci.*, 138: 167–175, 2018.
- 19) Zhang X, Lee W, Bian JS: Recent advance in the study of Na⁺/K⁺-ATPase in neurodegenerative disease. *Cells*, 11: 4075, 2022. doi: 10.3390/cells11244075.
- 20) Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, et al: The Oxygen rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell cycle arrest through DNA damage response. *Cell*, 157: 565–579, 2014.
- 21) Otsu Y, Hatakeyama M, Kanayama T, et al: Oxygen-glucose deprived peripheral blood mononuclear cells protect against ischemic stroke. *Neurotherapeutics*, 20: 1369–1387, 2023.
- 22) Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, et al: Acute graft versus host disease: A comprehensive review. *Anticancer Res*, 37: 1547–1555, 2017.
- 23) Pinho S, Frenette PS: Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 20: 303–320, 2019.

- 24) Mahla RS: Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int. J. Cell Biol.*, 2016: 6940283, 2016. doi: 10.1155/2016/6940283.
- 25) Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, et al: Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells*, 33: 1962—1974, 2015.
- 26) Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, et al: Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*, 147: 1146—1158, 2011.
- 27) Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, et al: Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation*, 109: 2972—2975, 2004.
- 28) Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, et al: Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 28: 445—449, 2008. doi: 10.1038/sj.cbfm.9600541.
- 29) Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, et al: Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: A pooled analysis. *PLoS ONE*, 5 (7): e11488, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0011488.
- 30) Shimizu Y, Kawashiri S, Nobusue K, et al: Association between circulating CD34-positive cell count and height loss among older men. *Sci. Rep.*, 12: 7175, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-11040-y.

X-IRRADIATED UMBILICAL CORD BLOOD CELLS RETAIN THEIR REGENERATIVE EFFECT IN EXPERIMENTAL STROKE

*Kazuta Yasui*¹, *Yuko Ogawa*², *Orie Saino*², *Rie Akamatsu*², *Akihiro Fuchizaki*¹, *Yoriko Irie*¹, *Makoto Nabetani*³, *Mitsunobu Tanaka*¹, *Yoshihiro Takihara*¹, *Akihiko Taguchi*² and *Takafumi Kimura*¹

¹Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

²Department of Regenerative Medicine Research, Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe

³Department of Pediatrics, Yodogawa Christian Hospital

Keywords:

umbilical cord blood cell, angiogenesis, tissue repair, X-ray irradiation, stroke

©2025 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <https://yuketsu.jstmct.or.jp/>