

令和元年6月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09603

研究課題名(和文) 先天代謝異常症(ライソソーム病)に対する新規細胞治療法の開発

研究課題名(英文) New cell therapy of Inborn error of metabolism

研究代表者

石毛 美夏 (ISHIGE, Mika)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：90420950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：臍帯血移植における生着促進と神経再生を目的として、臍帯組織の間葉系幹細胞(MSC)および神経幹細胞の局在について検討した。p75NTR陽性細胞の分布およびin vitro解析より、臍帯動脈周囲組織由来の細胞は神経細胞の再生により高効率に利用できると考えられた。また、胎盤由来組織において移植後の体内環境を再現したリンパ球増殖抑制試験および炎症性サイトカイン刺激下での免疫抑制因子発現を検討したところ、臍帯WJ由来MSCが最も免疫抑制効果が高いことが判明した。以上より、臍帯由来細胞は、ライソソーム病の細胞治療において、臍帯血の生着促進や移植後の免疫反応軽減、神経再生に有効であると結論できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、臍帯動脈周囲組織由来の細胞は神経細胞の再生が期待できる移植ソースであること、臍帯組織には間葉系幹細胞(MSC)が存在し同部位由来MSCは免疫抑制機能が高く移植後の免疫反応抑制が期待できることが判明した。これより、臍帯は造血幹細胞移植を行う先天代謝異常症、特に神経再生を期待するライソソーム病の細胞治療に有用であると結論でき、新たな治療法の開発の可能性が高まった。

研究成果の概要(英文)：We examined the localization, phenotype and functional property of mesenchymal stem cells (MSC) and neural stem/progenitor cells in umbilical cord (UC). UC is very useful source of new cell therapy for the patient of inherited metabolic disease, particularly lysosomal disease, to neuronal regeneration, enhance engraftment of hematopoietic stem cells transplantation, and allogeneic cell-based therapy of immune disorders included graft-versus-Host disease (GVHD).

研究分野：再生医療

キーワード：細胞治療 先天代謝異常症 ライソソーム病

1. 研究開始当初の背景

先天代謝異常症の代表的な疾患であるライソソーム病は、一部の疾患では酵素補充療法 (Enzyme Replacement Therapy: ERT) の開発によって予後は改善されたが、生涯にわたり頻回の投与を必要とするため莫大な治療費がかかるようになった。また、症例が蓄積するにつれて ERT の効果は血流の豊富な臓器に限定され、血液脳関門 (Brain Blood Barrier: BBB) の存在のため、予後に最も重要である神経障害を引き起こす中枢神経の病変には効果がないことがわかってきた。ERT 開発以前は、ライソソーム病の一部に対しては造血幹細胞移植による永続的な欠損酵素補充療法が行われていた。神経症状の発現前で BBB が未完成の乳児期早期に造血幹細胞移植を行えば、神経障害にも有効で継続的に移植後の細胞から体内で酵素が補充されるため根治療法となりうるが、家族内ドナーがいない場合には迅速に移植を行うことは難しい。また、先天代謝異常症では家族内で HLA が一致してもドナーが保因者や同じ疾患であり十分な移植効果が期待できないという問題もある。非血縁移植においては、移植コーディネートの迅速性や HLA 一致率が低くても移植が可能であることから臍帯血が移植細胞源の候補となるが、臍帯血移植では免疫能が正常な先天代謝異常症では拒絶や生着不全が多いという問題点がある。加えて、移植には移植前の化学療法による治療関連毒性に加え、移植後の移植片対宿主病 (Graft versus Host disease : GVHD) などの重篤な移植関連合併症があり、それによる治療関連死のリスクもある。

これらの問題点に対し、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) が新たな細胞治療ソースとなる可能性が示唆されている。MSC の同時移植による造血幹細胞の生着促進効果が報告されており、また、移植関連合併症の治療として、MSC による免疫細胞治療が注目されている。さらに、血液悪性疾患による造血幹細胞移植と異なり、先天代謝異常症であるライソソーム病では進行性の神経障害の状況が予後に重要であり、MSC はその多分化能から神経障害に対しても神経修復・神経再生作用が期待できるためである。

2. 研究の目的

本研究では、様々な組織から MSC や間葉系細胞を調整し、その免疫寛容誘導能の検討及び造血幹細胞生着に関する作用機序の解明を行い、造血幹細胞移植における拒絶低下・生着促進・免疫細胞治療細胞としての適性および神経細胞障害に対する保護・再生作用を明らかにすることにより、乳児期早期のライソソーム病患者に対する臍帯血移植をはじめとした造血幹細胞移植における拒絶低下・生着促進・GVHD 軽減と神経再生を目的とした新規細胞治療法の確立と予後改善をめざすものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯組織における MSC および神経幹細胞の局在について、臍帯を採取後 24 時間以内に生理食塩水で洗浄し、4% の 4% パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した後、OCT コンパウンドにて包埋した。10 μ m 厚の組織切片標本作製し、神経堤マーカー (p75NTR)、MSC マーカー (CD90、CD105、CD146、platelet-derived growth factor receptor : PDGFR) を一次抗体として、蛍光免疫染色法による免疫組織学的検討を行った。2 次抗体は Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 594 (Invitrogen) を、核染色には 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) を用いた。抗 human von Willebrand factor (vWF) を用いて血管内皮細胞を検出し、臍帯動脈周囲、臍帯静脈周囲、Wharton jelly (WJ) の 3 部位に大別し、多焦点蛍光顕微鏡 (Fluoroview FV10i, オリンパス) で観察し、これらマーカーの局在を検討した。さらに、臍帯を細切後、コラゲナーゼおよびディスパーゼで 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応させて細胞を分離し、250 μ m のメッシュで組織片を取り除いた。細胞をメディアムに回収して遠心分離し、 1×10^4 個/100 μ l を epidermal growth factor (EGF)、fibroblast growth factor-2 (FGF-2)、recombinant mouse leukemia inhibitory factor (LIF) を添加した DMEM/F12 (Invitrogen) 培地で 7-10 日間培養し、ニューロスフェアアッセイおよび神経分化誘導を行った。

(2) ヒト臍帯および胎盤組織における MSC の免疫制御能について、胎盤羊膜上皮由来 MSC (以下 AEC)、羊膜間質由来 MSC (以下 AMC)、臍帯 WJ 由来 MSC (以下 WJ-MS) を調整して検討した。胎盤羊膜は機械的に上皮と間質に分離し、ディスパーゼとコラゲナーゼで酵素処理を行った後、2~3 週間培養し、80% confluent 以上でトリプシン処理にて回収した細胞を継代した。臍帯は機械的に血管を除去した後、メスにて細切し、Explant 法にて WJ-MS を調製した。2~3 週間培養後、80% confluent 以上でトリプシン処理にて回収した細胞を継代した。臍帯および胎盤は採取後 2 時間以内に調整を開始し、培養後はともに 5 継代以内の細胞を用いた。これら MSC と末梢血単核球を共培養し、リンパ球増殖抑制試験 (CFSE-assay) を行った。さらに、胎児付属物由来幹細胞の免疫制御関連因子の発現を定常状態および Th1 lymphokine (TNF, IFN) 刺激下で real-time RT-PCR により検討した。

なお、本研究では、倫理委員会で承認をうけ、提供者に書面によるインフォームドコンセントを十分に行った上で提供された、正常分娩および予定帝王切開術におけるヒト臍帯および胎盤を使用した。

4. 研究成果

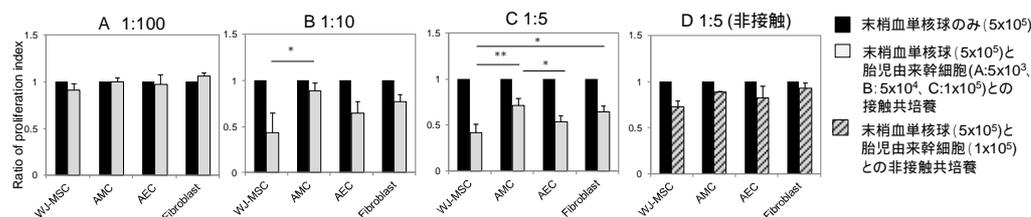
(1) 臍帯組織における MSC の分布および神経幹細胞の局在と神経分化能の検討

ヒト臍帯の組織免疫染色では MSC マーカー陽性細胞の多くは臍帯動脈内皮直下から筋層付近および血管周囲の WJ に多く分布する傾向があり、p75NTR 陽性細胞は臍帯動脈内皮細胞直下に限局して認められた(下表)。臍帯動脈から単離した細胞は神経幹細胞の存在を示唆するニューロスフェアを形成した。そのスフェアから双極性に長い突起を伸ばし、機能性神経細胞マーカーを陽性に示す細胞や紡錘形の形態を示し機能性グリア細胞マーカーを陽性に示す細胞が誘導された。よって、臍帯動脈周囲組織由来の細胞はライソソーム病の神経細胞の再生に高効率に利用できると考えられた。

	臍帯動脈			臍帯静脈			Wharton jelly		羊膜
	内皮近傍	内皮直下	筋層	内皮近傍	内皮直下	筋層	血管周囲	WJ	
p75NTR	ND	+	ND	ND	±	ND	ND	ND	ND
CD90	ND	+	++	ND	+	++	+	ND	ND
CD105	+	+	+	+	+	+	++	+	+
CD146	ND	++	++	ND	++	++	+	ND	ND
PDGFRβ	ND	++	+	ND	++	+	+++	+++	ND

(2) 臍帯、胎盤羊膜上皮および羊膜間質由来 MSC の免疫制御能の比較検討

直接共培養によるリンパ球増殖抑制試験 (CFSE-assay) において、MSC の細胞濃度依存性にすべての MSC でリンパ球増殖が抑制され、個体差はあるものの、リンパ球増殖抑制作用は WJ-MSC で高く、AMC では弱い傾向を認められた(下図)。さらに、MSC では定常状態および Th1 lymphokine (TNF, IFN) 刺激により、免疫制御関連因子 PTGS2, HGF, HLA-E, IDO1, TGF-1, TRAIL の発現がみられており、それぞれの発現は個体差が大きかったが、臍帯由来 MSC が免疫抑制因子の発現が強い傾向がみられ、胎盤由来 MSC における免疫抑制効果は WJ-MSC が最も高いことが推測できた。よって、臍帯 WJ 周囲由来 MSC は臍帯血移植時の免疫制御に有用であり、ライソソーム病の細胞治療に利用可能であると考えられた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

マウス急性移植片対宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果. 村井 健美, 石毛 美夏, 風間 智彦, 加野 浩一郎, 高橋 昌里, 麦島 秀雄, 松本 太郎. 日本大学医学部総合医学研究所紀要 5:46-48, 2017 (査読無)

マウス急性移植片対宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の治療効果. 村井 健美, 松本 太郎, 石毛 美夏, 風間 智彦, 加野 浩一郎, 麦島 秀雄. 日大医学雑誌 76(4-5):187-194, 2017 (査読有)

Ishige-Wada M, Kwon SM, Eguchi M, Hozumi K, Iwaguro H, Matsumoto T, Fukuda N, Mugishima H, Masuda H, Asahara T. Jagged-1 Signaling in the Bone Marrow Microenvironment Promotes Endothelial Progenitor Cell Expansion and Commitment of CD133+ Human Cord Blood Cells for Postnatal Vasculogenesis. PLoS One. 11(11): e0166660, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0166660. (査読有)

Kato S, Yabe H, Takakura H, Mugishima H, Ishige M, Tanaka A, Kato K, Yoshida N, Adachi S, Sakai N, Hashii Y, Ohashi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Tabuchi K. Hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of metabolism: A report from the Research Committee on Transplantation for Inborn Errors of Metabolism of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Pediatr Transplant. 20(2):203-14, 2016. doi: 10.1111/ptr.12672. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Yamaguchi Keiko, Ishige Mika, Ogawa Erika, Takano Chika . A case report of the primary caregivers ' experience of diet therapy of children with hepatic glycogen storage diseases in Japan . ICIEM Annual Symposium of 2017, Rio de Janeiro, Brazil, 2017.9

Erika Ogawa, Mika Ishige, Chika Takano, Rie Okubo, Yoko Nakajima, Tetsuya Ito, Tatsuo Fuchigami, Shori Takahashi . Asymptomatic inflammatory bowel disease-like colitis in a GSD-Ib patient receiving long term G-CSF treatment . International Glycogen Storage Disease Conference 2017, Groningen, Netherlands, 2017.6

Erika Ogawa, Mika Ishige, Chika Takano, Hiromi Usui, Misao Owada, Tatsuo Fuchigami, Shori Takahashi . Control status of Phenylketonuria (PKU) patients born after 1995: a single center experience in Japan . SSIEM Annual Symposium of 2016, Roma, Italy, 2016.9

谷川 俊太郎, 大熊 啓嗣, 金澤 剛二, 西川 英里, 下澤 克宜, 平井 麻衣子, 谷ヶ崎 博, 高橋 昌里, 風間 智彦, 松本 太郎 . 臍帯血生着不全モデルマウスに対する胎児付属物由来幹細胞移植の生着促進効果. 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会(山梨) 2015.11

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松本 太郎

ローマ字氏名：MATSUMOTO, Taro

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：50366580

研究分担者氏名：谷ヶ崎 博

ローマ字氏名：YAGASAKI, Hiroshi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90378141

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。