

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09708

研究課題名(和文) 子宮内感染による臍帯由来間葉系幹細胞プロファイル変化と脳白質損傷治療効果への影響

研究課題名(英文) profile analysis of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell by intrauterine infection and influence on the treatment effect for brain white matter injury

研究代表者

滝 敦子 (Taki, Atsuko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20614481

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)：ラット脳室周囲白損傷モデルにおいて、臍帯由来間葉系幹細胞およびその上清の効果を検討したところ、間葉系幹細胞投与において認められた白質損傷抑制作用を間葉系幹細胞培養上清では認めなかった。in vitroで培養された間葉系幹細胞が放出するパラクライン因子と炎症環境である体内に投与された間葉系幹細胞が放出するパラクライン因子の違いを検討するため、培養中の臍帯由来間葉系幹細胞にIFN γ 刺激を行なったところ、TSG6、IDOの発現が著明に増強した。ラット脳室周囲白損傷モデルへのIFN γ 刺激間葉系幹細胞培養上清投与により白質量が増加し、in vivoにおいても治療効果を増強させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の医学的進歩により早産児の生存率は上昇したが、超低出生体重児の神経学的予後は十分とはいえない。脳室周囲白質軟化症は早産児の神経学的予後を悪化させる主要な疾患であり、脳性麻痺や発達の遅れの原因となるが、有効な治療法はない。間葉系幹細胞投与は動物実験において脳障害に対する効果が示されているが、臨床的にはまだ研究段階であり、投与する幹細胞の種類や投与方法については明らかになっていない。本研究において臍帯由来間葉系幹細胞をIFN γ で前処置をすることにより、間葉系幹細胞の培養上清にも効果がみられたことは、効果的な治療方法の開発や細胞を用いない治療方法の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether mesenchymal stem cells and conditioned media possess neuroprotective property in a lipopolysaccharide (LPS)-induced neonatal rat periventricular leukomalacia (PVL)-like brain injury. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell (UCMSC) administration had an effect of suppressing white matter injury, but no effect was observed in UCMSC-conditioned media (CM). In order to compare the profiles of UCMSC in normal condition and those in inflammatory environment, we stimulated mesenchymal stem cells by IFN γ in vitro and examined paracrine factors. IFN γ -pretreatment increased TSG-6 and IDO expression in UCMSCs compared to control. We examined whether IFN γ -preconditioning of UCMSCs could improve the effect of UCMSC-CM in LPS-induced brain injury. IFN γ -UCMSC significantly increased white matter area compared to control.

研究分野：新生児学

キーワード：子宮内感染症 臍帯由来間葉系幹細胞 早産児 脳室周囲白質軟化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

早産児の脳性麻痺の主要な原因である脳室周囲白質軟化症は子宮内感染、神経細胞や血管の未熟性、虚血と再灌流、サイトカインによるマイクログリアの活性などが複合的に加わり、オリゴデンドロサイトの前駆細胞が障害を受け、髄鞘の形成不全がおこることにより生じる疾患である。早産児の 2-4% に発症する頻度の高い疾患にも関わらず、有効な治療法が未だ確立されていない。

間葉系幹細胞を用いた治療は、近年さまざまな疾患に対して有望な治療法として注目されており、動物実験において、脳室周囲白質軟化症に対する臍帯由来間葉系幹細胞 (umbilical cord mesenchymal stem cell : UCMSC) の有効性が報告されている。間葉系幹細胞の中でも、UCMSC は非侵襲的に採取可能であり、分娩時に採取しておくことで、出生後に発症した疾患に対して自家移植が可能となり得る。脳室周囲白質軟化症に対して UCMSC 治療を行う場合、自家移植と他家移植のいずれも候補となるが、子宮内感染を認める場合には、子宮内炎症にさらされた UCMSC の自家移植では治療効果に影響する可能性が考えられる。UCMSC の臨床応用に向けて、子宮内環境による臍帯血間葉系幹細胞の性質の変化や治療効果への影響について検討する必要がある。

2. 研究の目的

- (1) ラット脳室周囲白質損傷モデルを作成し、UCMSC およびその培養上清による治療効果を検討する。
- (2) 炎症環境における UCMSC のプロファイル変化と、炎症環境におかれた UCMSC による脳室周囲白質軟化症への治療効果を検討することにより、子宮内環境が UCMSC に与える影響を検討し、脳室周囲白質軟化症の治療のためにより有効性の高い UCMSC 移植方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ラット脳室周囲白質損傷モデルの作成

ラットの日齢 4 はヒトの妊娠 26、27 週前後に相当し、この時期にオリゴデンドロサイトの前駆細胞が脳室周囲に増えるといわれている。脳室周囲白質軟化症は虚血、炎症が原因となり発症することから、日齢 4 のラットに LPS15mg/kg を腹腔内投与し、脳室周囲白質軟化症モデルを作成した。日齢 12 に、脳組織を採取し、組織切片の M Myelin Basic Protein (MBP) 免疫染色を行い、脳室周囲白質量を評価した。

(2) 脳室周囲白質損傷モデルに対する UCMSC およびその上清の治療効果

東大医科学研究所から提供を受けたヒト UCMSC 10^6 個/匹を使用した。培養上清は、同じ量の UCMSC を無血清培地にて培養し、48 時間後に培養上清を回収して、20 倍濃縮して使用した。

脳室周囲白質損傷モデルは日齢 4 に LPS を腹腔内投与して作成し、対象群は生食を日齢 4 に生理食塩水を腹腔内投与した。UCMSC 治療群は、脳室周囲白質損傷モデルに日齢 4 に UCMSC を投与 (10^6 個/匹)、MSC-CM 治療群は同日から連日 4 日間 MSC-CM (100 μ L) を投与した。治療群のコントロールとして無血清の培地のみを同様に投与した。

脳組織を日齢 6 と 12 に採取し、日齢 6 に RT-PCR によるサイトカインの解析、日齢 12 に組織切片の免疫染色により白質障害を評価した。

- (3) UCMSC の脳への直接の作用を調べるために、ルシフェラーゼを発現する MSC を用いて in vivo imaging にて MSC の腹腔内投与後の動態を測定した。

- (4) in vitro で培養された間葉系幹細胞が放出するパラクライン因子と炎症環境である体内に投与された間葉系幹細胞が放出するパラクライン因子の違いを検討するため、LPS を投与された仔ラットの血清中で上昇していた IFN- γ (10 ng/ml) を in vitro で MSC に投与した。これらの培養上清を cytokine array と growth factor array を用いて比較した。

- (5) IFN- γ で刺激された MSC の培養上清を脳室周囲白質損傷モデルに投与し、治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) ラット脳室周囲白質損傷モデルの作成

日齢 4 のラットに LPS15mg/kg を腹腔内投与した。日齢 12 に、脳組織を採取し、組織切片の M Myelin Basic Protein (MBP) 免疫染色を行い、MBP 陽性領域の割合を算出し、脳室周囲白質量を評価した。LPS 投与群では、生食投与を行なったコントロール群と比較しての MBP 陽性領域有意な減少を認めた。

(2) 脳室周囲白質損傷モデルに対する UCMSC およびその上清の治療効果

LPS-MSC 群では、LPS-control 群と比較し、MBP 陽性領域が有意に増加した。(図 1)

LPS-MSC-CM は、LPS によって減少した MBP 陽性領域を増加させなかった。(図 2) また、脳組織中の IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 は LPS-control 群において有意に上昇した。LPS-MSC 群と

LPS-MSC-CM 群では TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 の発現レベルが LPS-control 群よりも低い傾向にあった。特に LPS-MSC 群における IL-1 β の上昇は有意に抑制された。

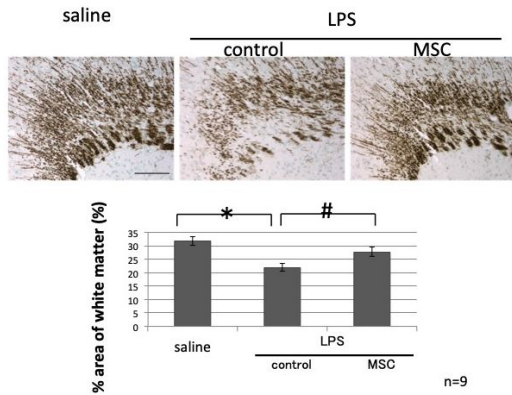


図 1. UCMSC 投与による MBP 陽性領域の変化

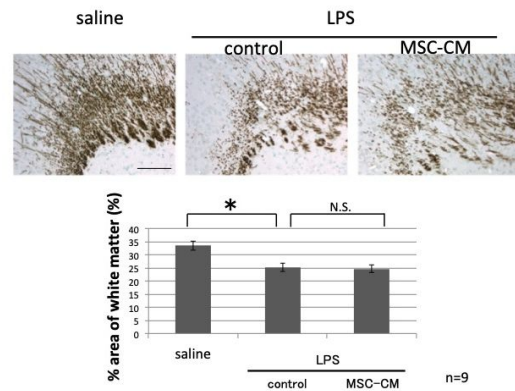


図 2. UCMSC-CM 投与による MBP 陽性領域の変化

(3) UCMSC の腹腔内投与後の動態

腹腔内に投与した UCMSC は約 8 日間~10 日間、腹腔内にとどまり、脳への遊走はみられなかった。(図 3)

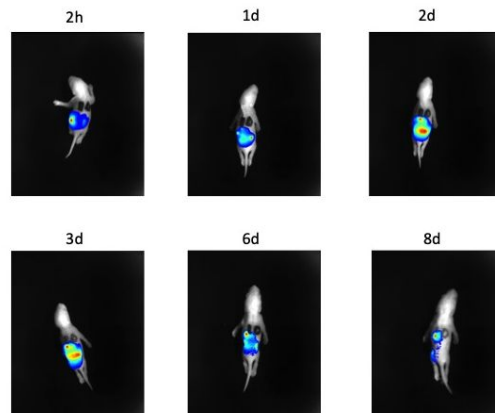


図 3. MSC 腹腔内投与後の in vivo imaging

このことから、UCMSC 腹腔内投与による脳室周囲白質損傷モデルへの治療効果は、UCMSC が脳に遊走し分化することによるものではなく、パラクライン因子が炎症や免疫反応を制御することにより発揮されたものであると考えられた。

(4) IFN- γ 刺激による UCMSC の分泌するパラクライン因子の変化

cytokine array では、IFN- γ 刺激により、UCMSC の分泌するパラクライン因子に変化が生じ、sICAM-1(抗炎症作用)、MCP-1(内在性幹細胞誘導作用)が上昇していることがわかった。(図 3) RT-PCR 法にて IFN- γ 刺激後の UCMSC の遺伝子発現を検討したところ、MSC の強力な抗炎症作用として最近注目されている TSG-6 と免疫調整作用をもつIDO の発現上昇を認めた。(図 4) このことは、炎症をおこしている体内中に投与した UCMSC は、局所環境において、より治療効果のあるパラクライン因子を放出している可能性を示唆している。

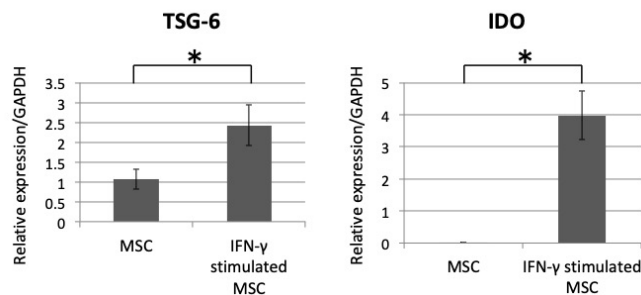


図 4. IFN- γ 刺激 MSC の RT-PCR

(5) IFN- 刺激後の MSC 培養上清による脳室周囲白質損傷治療効果の検討

脳室周囲白質軟化症モデルに対する IFN- 刺激後の MSC 培養上清投与により、白質量増加を認めた。(図5)

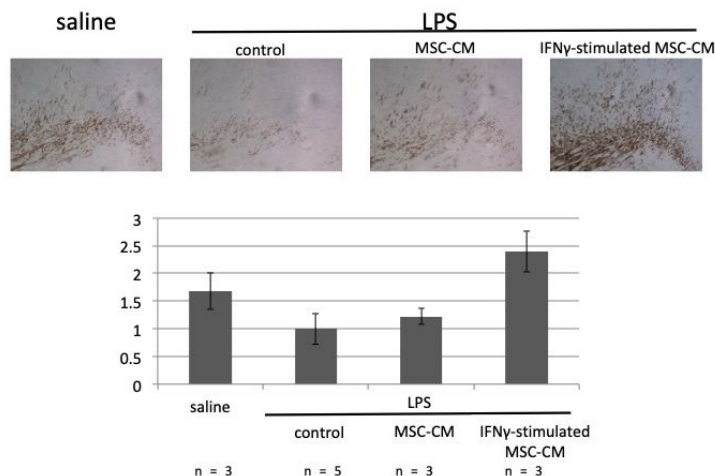


図5. IFN- 刺激 MSC-CM 投与による MBP 陽性領域の変化

本研究において、炎症に起因した脳室周囲白質軟化症に対し UCMSC 腹腔内投与は脳室周囲損傷を改善させる効果をもつが、UCMSC 培養上清を用いて行なった同様の実験では、明らかな白質量の改善を認めないことを示した。一方、腹腔内投与された UCMSC は障害部位にはほとんど生着せずに腹腔内に留まったことから、過去の報告と同様にパラクライン因子が炎症や免疫反応を制御することにより治療効果を発揮していると考えられた。UCMSC 培養上清の治療効果を認めなかった原因として、炎症が起きている体内に投与された間葉系幹細胞が放出するパラクライン因子は、*in vitro* で培養された間葉系幹細胞が放出するパラクライン因子とプロファイルが異なるのではないかと考え、IFN- で刺激した UCMSC のプロファイルを検討した。IFN- 刺激 UCMSC では、TSG-6、IDO、sICAM-1、MCP-1 などの抗炎症、再生促進因子の分泌が増加し、また IFN- で刺激した UCMSC 培養上清ではより効果的に脳室周囲白質軟化症モデルの白質損傷を改善させた。今後症例数を増やして、さらに検討をすすめていきたいと考えている。

また、本研究期間において、子宮内感染症を有するヒトにおける臍帯由来間葉系幹細胞のプロファイル変化についても検討するため、東京医科歯科大学を主施設として、都立多摩総合医療センター、川口市立医療センター、土浦協同病院との共同臨床研究「子宮内環境による臍帯血および臍帯由来間葉系幹細胞のプロファイル変化についての基礎的研究」を開始した。本研究期間内には十分な症例数が集まらず解析できなかったが、引き続き検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Matsuda N, Taki A, Tsuji A, Nakajima K, Takasawa K, Morioka C, Minosaki Y, Oku K, Kashimada K, Morio T.

Perinatal factors affecting growth and development at age 3 years in extremely low birth weight infants born small for gestational age.

Clin Pediatr Endocrinol. 2018;27(1):31-38.

DOI 10.1297/cpe.27.31

Morioka C, Komaki M, Taki A, Honda I, Yokoyama N, Iwasaki K, Iseki S, Morio T, Morita I.

Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on periventricular leukomalacia-like brain injury in neonatal rats.

Inflamm Regen. 2017.37:1-10

DOI 10.1186/s41232-016-0032-3

Komaki M, Numata Y, Morioka C, Honda I, Tooi M, Yokoyama N, Ayame H, Iwasaki K, Taki A, Oshima N, Morita I.

Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis.

Stem Cell Res Ther. 2017.8:219.

DOI 10.1186/s13287-017-0660-9

〔学会発表〕(計4件)

森丘 千夏子、本多 泉、滝 敦子、森尾 友宏、森田 育男

UCMSC を用いた脳室周囲白質軟化症の治療効果とその機序の解明

第 51 回日本周産期・新生児医学会 2015 年 7 月 10-12 日 福岡

森丘 千夏子、本多 泉、滝 敦子、森尾 友宏、森田 育男

脳室周囲白質軟化症モデルラットに対する間葉系幹細胞培養上清投与による治療効果の検討

第 53 回日本周産期・新生児医学会 2017 年 7 月 16-18 日 横浜

本多 泉、森丘 千夏子、滝 敦子、宮坂 尚幸、森田 育男

マウス早産モデルに対する間葉系幹細胞培養上清の治療効果の検討

第 53 回日本周産期・新生児医学会 2017 年 7 月 16-18 日 横浜

本多 泉、滝 敦子、松田 美奈子、齋藤 茉祐子、大城 早紀子、曾我 江里、高原 めぐみ、羅
ことい、馬場 慎司、中村 浩敬、伊田 勉、小池 和範、谷口 義実、近藤 昌敏、光山 聡

早産児の UCMSC 初代培養の試み

第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2018 年 7 月 10 日

〔図書〕(計 1 件)

滝 敦子、絨毛膜羊膜炎と新生児合併症 別冊 Bio Clinica: 慢性炎症と疾患 2017;
6(4):163-166

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 本多 泉

ローマ字氏名: HONDA IZUMI

所属研究機関名: 東京都立多摩総合医療センター

部局名: 産婦人科

職名: 医員

研究者番号 (8 桁): 80780303

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。