

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10669

研究課題名(和文)胎児期免疫寛容誘導の難治性皮膚疾患治療への応用

研究課題名(英文)In utero Immune tolerance induction for Severe Congenital skin diseases

研究代表者

遠藤 誠之(ENDO, MASAYUKI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30644794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：出生後の細胞移植治療を効果的に行うため、免疫システム確立前の胎児に、特定の細胞を暴露させることで、それらに対する免疫寛容を効率的かつ安全に誘導する方法を開発することを目的として研究を行った。
マウスモデルを用いて、絨毛内細胞移植により、胎児にその移植した幹細胞に対する免疫寛容が誘導できることを示し、論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：Induction of immunological reactions is a major problem in replacement therapies for inherited protein deficiencies. Tolerance created in utero can facilitate postnatal treatment. In this study, we show that cell transplantation into the chorionic villi under ultrasound guidance in the earliest gestation can induce immune tolerance towards a foreign protein within rodent models.

研究分野：胎児治療

キーワード：胎児治療 免疫寛容 幹細胞 移植 マイクロキメリズム

1. 研究開始当初の背景

先天性表皮水疱症 (DEB) は、VII 型コラーゲンやラミニンなどの皮膚基底膜の接着因子の欠損によって起こる。重症例では出生直後から症状を呈し、皮膚の剥離を繰り返すことによって、指の癒合、関節の拘縮、最終的には皮膚有棘細胞癌を高頻度に発症する。根治療法はなく対症療法のみで、予後は不良である。

近年、DEB に対して骨髄移植治療が臨床レベルで試みられ、症状の改善が認められたと報告されている。当施設でも昨年度より、成人 DEB 患者に対して、母体由来の骨髄細胞移植の臨床試験が行われている。しかし、骨髄細胞移植療法の最大の問題点は、移植細胞あるいはその細胞が産生する新生蛋白に対する免疫反応により、拒絶反応が起こり、治療効果が時間経過とともに消失することである。

申請者グループは、マウスモデルで、妊娠中期の胎児に直接骨髄細胞を静脈内投与することで、胎児に移植細胞に対する免疫寛容が誘導されることを示した。(Chino et al. 2008) さらに、移植した細胞の一部 (おそらく間葉系幹細胞) が、線維芽細胞へ分化し、VII 型コラーゲンを産生することも示した。この方法を DEB モデルマウス (DEB-COL7) に応用し、生存日数がのびることも示した。しかしながら、将来的に本方法を臨床応用する場合、ヒト胎児期で安全に移植細胞を静脈内へ投与できるのは妊娠 18 週前後である。しかし、ヒト胸腺内での T 細胞の成熟が、妊娠 7-12 週頃から起こることを考慮すると、より妊娠早期からの介入が望ましい。

現在、ヒト胎児診断・治療で、最も早期に施行される妊娠子宮への侵襲的手技は絨毛検査である。一般的に妊娠 11-13 週の間に行われる。その時期には、ヒト胎児では、胸腺は発生段階にあり、未だ免疫系は確立していない。よって、その時期に移植細胞を暴露させることができれば、胎児に移植細胞、またその移植した細胞が産生する蛋白に対する免疫寛容を誘導させることが理論的に可能である。

2. 研究の目的

出生後の細胞移植治療を効果的に行うため、免疫システム確立前の胎児に、特定の細胞を暴露させることで、それらに対する免疫寛容を効率的かつ安全に誘導する方法を開発することを目的とする。そのために、

1. 絨毛検査 (CVS) の手技を応用して免疫システムが確立する前の胎児に細胞を暴露させて、細胞あるいはそれが産生する新生蛋白に対する免疫寛容を誘導させること。
2. 絨毛内に各種幹細胞 (骨髄細胞・血液幹細胞・間葉系幹細胞) および非幹細胞を移植してそれぞれの免疫寛容誘導の特徴を比較すること。

3. 自然現象である妊娠中の母子間細胞移行が免疫寛容誘導に応用できるかを検討すること。

3. 研究の方法

皮膚移植の生着

GFP 骨髄細胞 (H2K^{b+}) を妊娠発生初期 (妊娠 10 日目) の BALB-C 胎仔マウス (H2K^{d+}) の絨毛内に同系細胞移植する。出生後 1 ヶ月後に、GFP トランスジェニックマウス (H2K^{b+}) の皮膚を移植して、異系移植片の生着率を調べる。Positive Control として、細胞移植後 BALB-C マウス (H2K^{d+}) に BALB-C マウス (H2K^{d+}) の皮膚を同系移植し、Negative Control として、Naïve の生後 1 ヶ月 BALB-C マウス (H2K^{d+}) に、GFP トランスジェニックマウス (H2K^{b+}) の皮膚を異系移植して、生着率を比較する。

特定タンパクに対する免疫寛容誘導の確認。

抗 GFP 抗体の測定

上記方法にて、GFP 骨髄細胞を妊娠発生初期 (妊娠 10 日目) の C57BL6 胎仔マウスに細胞移植する。出生 6 週間後に、GFP トランスジェニックマウスの皮膚を移植する。Negative Control として、Naïve の C57BL6 マウスを用いる。それぞれ皮膚移植後 4 週間後に採血し、血中の抗 GFP 抗体価を ELISA によって測定する。

GFP に対する Cytotoxic T-Cell (CTL) Assay

上記方法にて、GFP 骨髄細胞を妊娠発生初期 (妊娠 10 日目) の C57BL6 胎仔マウスに細胞移植する。出生 10 および 11 週間後に GFP 骨髄細胞を用いて boost し、出生後 13 週間後に脾臓より T リンパ球を採取し、GFP 骨髄細胞を用いて、ELISPOT アッセイを行い、GFP 蛋白に対する細胞免疫寛容の有無を調べる。

4. 研究成果

超音波高解像度イメージングシステムを用いて胎仔マウスへのインジェクションシステムを確立し、安定して妊娠初期の胎盤内へ細胞移植できるようにした。

上記システムを用いて、妊娠初期マウス胎盤内に GFP 陽性骨髄細胞を移植し、出生マウスに GFP に対する免疫寛容が誘導されることを示した。

胎盤内細胞移植による免疫誘導のためには、胎児側胎盤に細胞移植する必要があることを示した。

C57BL6 の生後 1 日目の新生仔マウスを用いた細胞移植による免疫寛容誘導実験により、免疫寛容の誘導のためには、幹細胞の移植が必要であり、非幹細胞では免疫寛容が誘導されないことを示した。

同モデルを用いて、間葉系幹細胞によっても免疫寛容が誘導されることを示した。

同モデルに PDGF KI マウスの血液幹細胞と間葉系幹細胞をそれぞれ細胞移植するこ

とにより、特定の蛋白に対する免疫寛容を誘導するためには、その特定蛋白を発現している、あるいは分化後に発現する幹細胞を移植する必要があることを示した。

PDGF KI 雌マウスと C57BL6 雄マウスを交配させることで、間葉系幹細胞に特化した母体胎児間マイクロキメリズムマウスモデルを作成した。

同モデルにより、一部の F1 マウスに母体胎児間マイクロキメリズムによる間葉系幹細胞に由来する免疫寛容誘導があることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Sawada M, Matsuzaki S, Nakae R, Iwamiya T, Kakigano A, Kumasawa K, Ueda Y, Endo M, Kimura T.

Treatment and repair of uterine scar dehiscence during cesarean section. Clin Case Rep. 2017.19;5(2):145-149. doi: 10.1002/ccr3.766.

Owa T, Mimura K, Kakigano A, Matsuzaki S, Kumasawa K, Endo M, Tomimatsu T, Kimura T. Pregnancy outcomes in women with different doses of corticosteroid supplementation during labor and delivery. J Obstet Gynaecol Res. 2017. 43(7):1132-1138. doi: 10.1111/jog.13336.

Matsuzaki S, Yoshino K, Endo M, Tomimatsu T, Takiuchi T, Mimura K, Kumasawa K, Ueda Y, Kimura T.

Successful anticoagulant therapy for disseminated intravascular coagulation during conservative management of placenta percreta: a case report and literature review.

BMC Pregnancy Childbirth. 2017. 29;17(1):443. doi: 10.1186/s12884-017-1634-8.

遠藤誠之.

胎児期幹細胞移植の現状と将来
医学のあゆみ 261:1229-1234, 2017

遠藤誠之.

胎児遺伝子治療
周産期医学 47:571-576, 2017

遠藤誠之. 和田誠司. 荻原英樹. 佐合治彦.
フィラデルフィア小児病院での脊髄髄膜瘤
胎内手術の実際
小児の脳神経 42:247-260, 2017

Tomimatsu T, Mimura K, Endo M, Kumasawa K, Kimura T.

Pathophysiology of preeclampsia: an angiogenic imbalance and long-lasting systemic vascular dysfunction. Hypertens Res. 2017. 40(4):305-310. doi: 10.1038/hr.2016.152.

Tanaka M, Matsuzaki S, Kumasawa K, Suzuki Y, Endo M, Kimura T.

Cervical varix complicated by placenta previa: A case report and literature review. J Obstet Gynaecol Res. 2016. 42(7):883-889. doi: 10.1111/jog.12969.

Fujita S, Kashiwagi H, Tomimatsu T, Ito S, Mimura K, Kanagawa T, Endo M, Miyoshi T, Okamura Y, Tani Y, Tomiyama Y, Kimura T. Expression levels of ABCG2 on cord red blood cells and study of fetal anemia associated with anti-Jr(a).

Transfusion. 2016. 56(5):1171-81. doi: 10.1111/trf.13515.

Tanaka M, Matsuzaki S, Matsuzaki S, Kakigano A, Kumasawa K, Ueda Y, Endo M, Kimura T.

Placenta accreta following hysteroscopic myomectomy. Clin Case Rep. 2016. 20;4(6):541-4. doi: 10.1002/ccr3.562. eCollection 2016 Jun.

Sawada M, Matsuzaki S, Mimura K, Kumasawa K, Endo M, Kimura T.

Successful conservative management of placenta percreta: Investigation by serial magnetic resonance imaging of the clinical course and a literature review. J Obstet Gynaecol Res. 2016. Dec;42(12):1858-1863. doi: 10.1111/jog.13121.

Aikawa E, Fujita R, Asai M, Kaneda Y, and Tamai K.

Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signaling impairs the maintenance of bone marrow mesenchymal stromal cells in diabetic model mice. Stem Cells and Development, 2016.15;25(22):1721-1732.

遠藤誠之.

周産期医学必修知識第8版産科編 EXIT(Ex Utero Intrapartum Treatment) Procedure(解説/特集). 周産期医学 46増刊:476-479, 2016

玉井克人.
イラスト&ビジュアル「表皮水疱症」,
Clinical Derma、Vol.18 No.1:3-6、2016.

玉井克人.
表皮水疱症に対する遺伝子治療の現状と展望、今、着実に実り始めた遺伝子治療 最新研究と今後の展開、遺伝子医学MOOK30:158-163、2016.

玉井克人.
末梢循環間葉系細胞の生体損傷組織再生メカニズムを利用した再生誘導医薬開発、Bio Clinica、Vol.31(10):34-38、2016.

玉井克人.
表皮水疱症の病態, 症状, 治療~診療に必要な基礎知識~, ひ~ふ~み~, 19:4-7、2016.

Takahashi K, Endo M, Miyoshi T, Tsuritani M, Shimazu Y, Hosoda H, Saga K, Tamai K, Flake AW, Yoshimatsu J, Kimura T.
Immune tolerance induction using fetal directed placental injection in rodent models: a murine model.
PLoS One. 2015.13;10(4):e0123712.
doi: 10.1371/journal.pone.0123712.

Yamashita M, Hayashi S, Endo M, Okuno K, Fukui O, Mimura K, Tachibana Y, Ishii K, Mitsuda N, Kimura T.
Incidence and risk factors for recurrent spontaneous preterm birth: A retrospective cohort study in Japan.
Obstetric Research Collaborative in Osaka (ORCO). J Obstet Gynaecol Res. 2015. 41(11):1708-14. doi: 10.1111/jog.12786.

Aikawa E, Fujita R, Kikuchi Y, Kaneda Y, Tamai K.
Systemic high-mobility group box 1 administration suppresses skin inflammation by inducing an accumulation of PDGFR (+) mesenchymal cells from bone marrow. Sci Rep. 2015.5;5:11008.
doi: 10.1038/srep11008.

玉井克人.
51 表皮水疱症、第2章 小児皮膚アトラス、小児を診る!皮膚科医の心得、皮膚科の臨床57(6):242-249、2015.

[学会発表](計18件)

Endo, M.
Early Intra-Amniotic Gene Transfer Using Lentiviral Vectors in Murine Model
The 16th World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Congress 台北, 中華人民共和国.2017

遠藤誠之. 松崎慎哉. 熊沢恵一. 味村和哉. 瀧内 剛. 柿ヶ野藍子.
当院における妊娠中期中絶症例について
第53回日本周産期・新生児医学会.横浜.2017

遠藤誠之. 岡田愛子. 梶本恵津子. 田中博子. 小和貴雄. 川西陽子. 柿ヶ野藍子.
味村和哉. 富松拓治. 奥山宏臣. 木村正.
胎児診断された骨形成不全症(Osteogenesis Imperfecta:OI)に対し、子宮内間葉系幹細胞移植を行った1症例:出生後2年間を経過して
第15回日本胎児治療学会.川越.2017

遠藤誠之.
胎児治療:胎児を治療するということ
第52回阪神周産期勉強会.西宮.2016

遠藤誠之.
胎児治療の実際
第3回KANSAI産科麻酔症例検討会.大阪2016

遠藤誠之.
胎児治療最前線
日本臨床麻酔学会第36回大会.高知.2016

遠藤誠之.
Fetal pleural shunting for chylothorax
2016年催引産及産後出血学習班胎児医学胎児宮内治療高峰论坛会(2016年誘発分娩と産後出血学習班胎児医学と子宮内胎児治療講演会) 湖北省,中国.2016

Endo, M.
Exit
2016年催引産及産後出血学習班胎児医学胎児宮内治療高峰论坛会(2016年誘発分娩と産後出血学習班胎児医学と子宮内胎児治療講演会) 湖北省,中国.2016

Endo, M.
Immune tolerance induction using fetal directed placental injection in rodent models.
12th Congress of International Academy of Perinatal Medicine and 32nd Meeting of "Fetus as a Patient" Society Tirana, Albania.2016

Endo, M.
Fetal surgery
モンゴル国立保健センター 小児外科発足60周年記念講演会 Ulaanbaatar,Mongolia 2016

Endo, M.
In utero stem cell and gene therapy
モンゴル国立保健センター 小児外科発足60周年記念講演会 Ulaanbaatar,Mongolia

2016

Endo, M.

Prenatal diagnosis of airway obstruction improves perinatal outcomes
12th Asia Pacific Congress in Maternal Fetal Medicine. Penang, Malaysia. 2016

Endo, M.

Fetal pleural shunting for chylothorax
1st Asia Pacific Symposium on Fetal therapy. Hong Kong, 中国. 2015

Endo, M.

In utero Gene Therapy
第七届围产医学新进展高峰论坛 河南省郑州市, China. 2015

Endo, M.

USG and MRI of pelvic floor during pregnancy and postpartum
11th Asia Pacific Congress in Maternal Fetal Medicine. Taiwan, China. 2015

遠藤誠之.

Developmental stage and delivery mode determines distribution and duration of gene expression after intra-utero gene transfer using lentiviral vectors
第 21 回日本遺伝子治療学会.大阪. 2015

遠藤誠之.

CHAOS の診断と EXIT の適応と実際について
第 51 回日本周産期・新生児医学会. 福岡 2015

遠藤誠之. 高橋恵. 伊東優. 西川愛子. 小和貴雄. 梶本恵津子. 田中博子. 島津由紀子. 柿ヶ野藍子. 味村和哉. 福井温. 金川武司. 富松拓治. 奥山宏臣. 木村正.

胎児診断された骨形成不全症 (Osteogenesis Imperfecta:OI) に対し、子宮内間葉系幹細胞移植を行った 1 症例
第 13 回日本胎児治療学会. 横浜. 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 誠之 (ENDO, Masayuki)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 30644794

(2) 研究分担者

玉井 克人 (TAMAI, Katsuto)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号 : 20236730

富松 拓治 (TOMIMATSU, Takuji)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 30346209

味村 和哉 (MIMURA, Kazuya)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 50437422