

平成30年9月6日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06664

研究課題名(和文) 神経管閉鎖不全症の早期胎内分子診断法の確立

研究課題名(英文) Amniotic fluid and serum biomarkers from women with neural tube defect-affected pregnancies

研究代表者

鶴淵 隆夫 (Tsurubuchi, Takao)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70778901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト神経管閉鎖不全症(NTD)の未解明の基礎的研究を完成し、生物学的マーカーを模索し、早期胎内診断を確立することを目的とした。本研究遂行にあたり準備すべきことが多岐にわたり、平成28年度まではまだ本格的に研究が開始できていなかったが、平成29年度において体制を整え、日本で使用できる羊水幹細胞培養専用の培地として、Amniomax II培地の条件を整えた。本研究計画については、海外の学会でも報告したが十分新規性もあり、将来のエピジェネティック機序による胎内薬物治療を展開することが大いに期待できると思われる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish the useful biomarkers to detect early in the utero during pregnancy of human neural tube defect. There are many things to be prepared to start clinical studies. Due to the restriction of the special medium in Japan, we have to change the protocol about the medium to grow amniotic fluid stem cells. Amniomax II is useful medium using amniotic fluid stem cells in the world, also in Japan. Our study is on going to establish the novel in the utero therapy using small molecules to decrease the risks of neural tube defect by epigenetic mechanisms.

研究分野：小児神経外科

キーワード：羊水幹細胞 培地 培養条件 倫理委員会 協力病院

1. 研究開始当初の背景

ヒト神経管閉鎖不全症(Neural Tube Defect、以下 NTD)の中でも脊髄髄膜瘤は、水頭症に対するシャント手術、排尿障害に対する間欠的導尿、脊髄再係留に対する外科的治療をはじめ、生涯にわたり入念な管理を必要とする。出生前早期診断(超音波・染色体診断)は、患児家族に対する十分なインフォームドコンセントのために必須であるが、あくまで胎児異常の有無を調べるための準備段階の検査にとどまり、確定的なことは言えない。そこで、より信頼性のある生物学的マーカーが切望されている。さらに約3割の症例が予防的葉酸摂取に不応性で、その発症機序は不明である。

ヒトの一次神経管形成では背側マーカー(Bone Morphological Protein: BMP)と腹側マーカー(Sonic Hedgehog:Shh)の適正なバランスにより正常に神経管が閉じ脊髄が形成されると言われている。動物モデルでは、BMP 過剰や Shh 過剰による NTD の報告が散見される。最近我々は母体羊水から胎児由来の羊水幹細胞を培養して、エピジェネティックマーカーや BMP / Shh の発現程度を報告してきた(参考文献 1)。さらに葉酸不応性の二分脊椎マウスを用いて、BMP/Shh のアンバランスが葉酸不応性に関係していると報告した(参考文献 2)。一方米国の試験(Management of Myelomeningocele Study: MOMS Trial)では、妊娠 25 週前までに脊髄髄膜瘤に対する胎内手術を行っており、膀胱直腸障害や手術前にすでに進行してしまった水頭症を改善することはできなかった。本邦では出生後 48 時間以内に脊髄髄膜瘤の修復術を行い、脊髄形態の修復と髄膜炎予防を行っている。しかし、一次神経管形成の時期は胎生 1 ヶ月にすでに完成するため、胎児の神経発達のための治療を行うには、既に時期を逸していると言わざるを得ない。そこで、より信頼性のある生物学的マーカーの同定とともに、葉酸の不応

性のメカニズム解明が切望されている。

2. 研究の目的

先行研究では、ヒト NTD の早期診断のための生物学的マーカー(一次神経管形成における背腹側マーカーやエピジェネティックマーカー)について基盤的な報告を行った(鶴淵 参考文献 1,2)。本研究ではこれまでの成果を発展させ、得られたエピジェネティックマーカーに基づき、葉酸不応性の髄膜瘤発症メカニズム解明とともに、胎内における薬物的治療(エピジェネティック治療)のための基礎的研究を行っていく。ヒト神経管閉鎖不全症(NTD)の未解明の基礎的研究を完成し、生物学的マーカーを模索する。早期胎内診断を確立し、将来のエピジェネティック機序による胎内薬物治療を展開するために以下のことを研究期間内に明らかにする。1)エピジェネティックマーカーの発現 2)背腹側因子の発現 3)母体血清と羊水における各マーカー値の関連性の有無や将来の生物学的マーカーとしての有用性の模索

3. 研究の方法

研究方法の図を参照

(1)羊水および血清の採取

妊婦本人および妊婦の家族の自由意思に基づき十分インフォームドコンセントの上、当院産婦人科医により羊水穿刺を施行する。本研究の対象は、神経管閉鎖不全症児を妊娠している母体羊水及び母体血清である。これに対するコントロールとして、神経管閉鎖不全症児や染色体異常児以外の妊娠母体からの羊水・血清が対象となる。羊水穿刺の適応は、神経管閉鎖不全症が疑われるが超音波診断ではっきりと結論が出ない場合、他にも染色体分析、先天性代謝異常、前期破水の診断、子宮内感染、胎児肺成熟確認、血液型不適合、羊水過多、羊水過少が考えられる場合である。この他にも高齢出産(35 歳以上)かつ超音波検

査や新型出生前診断で異常なしと結論づけられない場合、検査を行う。羊水穿刺時の羊水 3mL 追加採取および 10mL の採血を行い、羊水および血清サンプルを採取する。

(2)羊水からの胎児由来幹細胞の分離・培養
羊水から選択的培地で培養(Amniomax II 培地で初代培養を行い、その後成長因子入りの NeuroBasal 培地で培養)することで抽出した胎児由来幹細胞からニューロスフィアを作成し、これを成長因子を除外することで分化させ、背腹側マーカーとしての Bone Morphological Protein 4(BMP4)、Muscle segment homeobox 2(Msx2)、腹側マーカーとしての Sonic hedgehog(Shh)、Oligodendrocyte transcription factor 2(Olig2)、Nk6 homeobox 1(Nkx6.1)やエピジェネティックマーカーの Histone H3(Lys4) di-methylation(H3K4m2)、Histone H3(Lys4) tri-methylation(H3K4m3)、Histone H3(Lys27) di-methylation(H3K27m2)、Histone H3(Lys4) tri-methylation(H3K27m3)、Histone H3(Lys9) acetylation(H3K9ac)、Histone H3(Lys18)acetylation(H3K18ac)、histone acetyltransferase GCN5、Lysine demethylase 6B(KDM6B)について、免疫染色と qRT-PCR を行い評価する。コントロールとして、神経管閉鎖不全症児や染色体異常児以外の妊娠母体羊水から採取した、胎児由来幹細胞から培養したニューロスフィアを用いる。

各抗体で染色したサンプルを撮影し、蛍光顕微鏡下の観察と輝度測定を行う。

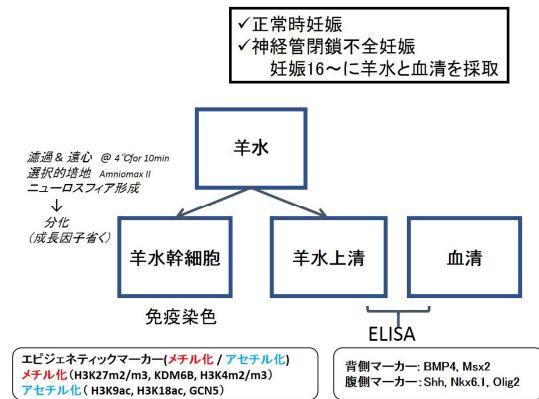
(3)母体血清および羊水の Shh/BMP 発現の評価
それぞれ抗ヒト Shh 抗体および抗ヒト BMP4 抗体の Enzyme-Linked Immunosorbent Assays(ELISA) kit を用いて母体血清および羊水中の Shh/BMP4 濃度測定する。いずれもコントロールは、神経管閉鎖不全症児や染色体

異常児以外の妊娠母体羊水および血清である。

(3)-1 ELISA kit を用いて母体血清および羊水中の Shh/BMP4 濃度を計算する

(3)-2 同様にその他の背腹側マーカー、例えば、背側：Msx2 腹側：Nkx6.1, Olig2 についても同様に濃度を計算する、

研究方法の図



4. 研究成果

本研究遂行にあたり準備すべきことが多岐にわたり、平成 28 年度まではまだ本格的に研究が開始できていなかったが、平成 29 年度において体制を整え、本研究で実施した事項を下記に示す。

妊婦からの羊水・血液提供を依頼するため、筑波大学附属病院産婦人科医の協力を得て、本研究は倫理委員会で承認された。承認まで時間を要した理由として、本研究から得られる結果に関してはすぐに何らかの臨床的意義を見出せるものではない可能性があるため、インフォームドコンセントを得る上で説明文の表記には十分な推敲を要した。通常の羊水検査を受けられる妊娠中の女性に対して、必要最低限の採血と、採取した羊水の一部を、本研究に使用する。このことを含めて十分に倫理委員会で検討を重ねる必要があったからである。

羊水幹細胞の培養条件の再検討を行った。具体的には、Chang B および Chang C 培地は日本への輸入を禁止され、日本では Chang B および Chang C 培地を使用することができなくなったためである。したがって、新たに培養条件を設定する必要が生じた。日本で使用できる羊水幹細胞培養専用の培地として、Amniomax II 培地がある。これに関してはすでに羊水幹細胞の成功および羊水幹細胞の継代が可能であることを証明する報告が海外からなされている。すなわち継代培養していく中で、羊水幹細胞のエピジェネティクスは変わることなく、また、その分化傾向に変化はなく、神経幹細胞から、あらゆる系統、すなわち、神経、乏突起星細胞、星細胞へ分化する性質が保持されていることが報告されている。以上より、本研究でも Amniomax II 培地を使用することが妥当と判断した。Poly-2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA) でコーティングしたフラスコあるいは 9 ウェルスライドガラスのプレートに Amniomax II 培地を満たしたが、コーティング面の剥離や溶解はみられなかった。これにより、これまで報告してきた研究プロトコルからの変更は最小限に留めることができた。したがって、本研究において、この培地を用いることが可能であると判断した。これらの内容は、倫理委員会でも承認済みである。

本研究計画については、海外の学会 The 29th KSPN-JSPN joint meeting(soul, 2017.5.19)でも報告した。先行研究(参考文献 2)で示したとおり、脊髄髄膜瘤妊娠母体の羊水幹細胞では H3K4me2, H3K4me3, H3K27me2, H3K27me3 のヒストンのメチル化が増大しており、かつ、脱メチル化酵素である KDM6B の活性が

低下していることが示唆された。これらのヒストンおよび酵素は、脊椎動物において脊椎をふくむ工法の体軸の発生に大いに関与しており、先行研究(参考文献 2)の結果から、メチル化が増大していること、さらに、脱メチル化が抑制されていること、という二重の意味でメチル化が増大していることを意味しており、発生にかかわるヒストンが抑制されている可能性が示唆された。。さらに、脊髄髄膜瘤妊娠母体の羊水および血清中で BMP4 レベルが増大していることが示唆されている。これまで海外からの報告では羊水幹細胞、母胎由来の中胚葉型幹細胞を持ちいた再生医療分野への応用に関する報告がある。しかしながら、神経管閉鎖不全症に関する早期胎内診断に関する報告は本研究以外には文献を渉猟するかぎり見当たらない。まだこの分野は先行研究がないため、十分新規性もあり、今後の臨床応用へ大いに期待できると思われる。

参考文献

1. T. Tsurubuchi, EV. Allender, MR. Siddiqui, KW. Shim, S. Ichi, V. Boshnjaku, B. Mania-Farnell, G. Xi, RH. Finnell, DG. McLone, T. Tomita, CS. Mayanil: A critical role of noggin in developing folate-nonresponsive NTD in Fkbp8 -/- embryos. Childs Nervous System, 30(8), 1343-1353, 2014
2. T. Tsurubuchi, S. Ichi, KW. Shim, W. Norkett, E. Allender, B. Mania-Farnell, T. Tomita, DG. McLone, N. Ginsberg, CS. Mayanil: Amniotic fluid and serum biomarkers from women with neural tube defect-affected pregnancies: a case study for myelomeningocele and anencephaly: clinical article. Journal of Neurosurgery Pediatrics

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 鶴淵隆夫、室井愛、稲垣隆介、山本哲哉、松村明: 椎弓余剰骨の急速な増大を認めた二分脊椎類縁疾患の一例. 小児の脳神経 43(1): 2018 in press

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 鶴淵隆夫、室井愛、津田恭治、稲垣隆介、井原哲、山本哲哉、松村明 脊髄髄膜瘤に伴う脊柱変形に関する臨床学的評価 第 45 回日本小児神経外科学会 2017.6.2. ~ 6.3.(神戸)
2. Takao Tsurubuchi, Shunsuke Ichi, Kyu-won Shim, William Norkett., Elise Allender, Barbara Mania-Farnell, Tadanori Tomita, David G. McLone, Norman Ginsberg, Shekhar Mayanil, Eiichi Ishikawa, Akira Matsumura. Amniotic fluid and serum biomarkers from women with neural tube defect affected pregnancies: - Case studies for Myelomeningocele and Anencephaly.The 29th KSPN-JSPN joint meeting, Seol, 2017.5.19.
3. 鶴淵隆夫、室井愛、津田恭治、稲垣隆介、井原哲、山本哲哉、松村明 脊髄髄膜瘤に伴う脊柱変形に関する臨床学的評価 第 76 回日本脳神経外科学会 2017.10.12. ~ 10.14.(名古屋)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鶴淵隆夫 (TSURUBUCHI TAKAO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 70778901