

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2016

課題番号：16H07193

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた胎児細胞移植療法の検討

研究課題名(英文) Adipose-tissue-derived stem cells could be an ideal cell source for neural regeneration when to treat a fetus in utero

研究代表者

川嶋 章弘 (KAWASHIMA, AKIHIRO)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：10783376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期より進行性の中樞神経症状を呈するダウン症などに対する細胞治療はほとんど報告がない。本研究では胎児細胞移植療法のセルリソースとして脂肪組織由来幹細胞(ADSC)の中樞神経系への有効性を明らかにする事を目的とした。CAG-EGFP Tgマウス鼠蹊部よりGFP陽性ADSCを採取し、子宮内にて胎生14.5日マウス胎仔の脳室内へ投与したところ、脳室周囲の脳実質内にGFP陽性細胞を認め、長い細胞突起を有する神経細胞様の形態を呈し、神経への分化能を有した。ADSCは胎児の中樞神経系の再生や機能補完に細胞治療の有用なリソースと考える。

研究成果の概要(英文)：Several experimental cell therapies for the fetus has been applied, but there are a few reports to use adipose tissue derived stem cells (ADSCs) as a cell source. The purpose of this study is to define their distribution after in utero ADSC transplantation. ADSCs were isolated from the mouse inguinal adipose tissue by enzymatic digestion. To clarify whether transplanted ADSCs could populate in a brain tissue, ADSCs obtained from CAG-EGFP Tg mice were injected into fetal-brain ventricle at E14.5. ADSCs have a variable appearance having neurite morphology including bulbous cytoplasm with elongated cell process like axon and/or dendrites after neural induction. The cells expressed the neuron-specific markers. The transplanted ADSCs were able to differentiate into neuron-like and astrocyte-like cells. Our data suggest that ADSCs could be a promising cell source of neural regeneration as neural stem cells.

研究分野：周産期医学

キーワード：幹細胞 胎児治療 先天性代謝疾患

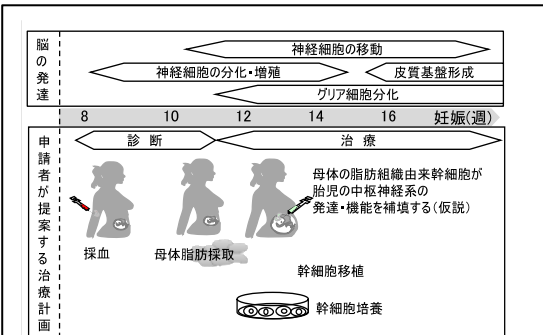
1. 研究開始当初の背景

先天性代謝異常症は臨床症状として中枢神経症状を示すことが多い。その遺伝子診断は遺伝子解析技術の進歩とともに、妊娠10週前後の母体血を用いた胎児の単一遺伝子病についても理論的に検出可能になっている。妊娠初期に母体血で先天性遺伝性疾患を胎児診断し、不可逆的な状態まで胎児の病態が形成される前段階での胎児治療が可能になることを意味する。脳神経細胞は妊娠12~20週に神経細胞の分化増殖が盛んであることが知られ、この時期の介入により中枢神経機能の大幅な改善が期待できると考えられる。幹細胞移植治療の細胞リソースには骨髄や臍帯血からの造血幹細胞や間葉系幹細胞などが用いられている。胎児の細胞治療においては造血幹細胞の胎児投与による骨系統疾患の治療が報告されているが、組織生着の不良により未だ確立されておらず以下のように多くの検討課題がある。

(1) 母体・胎仔の免疫機構からの排除されない幹細胞移植ソースの確立

(2) 移植した幹細胞の生着率、脳内への移行率、神経細胞としての分化状態の確認

(3) 胎児の発達段階からみた至適投与時期(幹細胞治療の至適時期の決定)



本研究の仮説

妊娠8週前後の母体血液内から胎児 cell-free DNA を抽出して、胎児の遺伝子診断が可能である。診断された後10週前後に母体の脂肪より脂肪組織由来幹細胞を採取後、胎児に投与を行う。胎児の脳の発達が可逆的な段階で母体由来の脂肪組織由来幹細胞を移植することで、代謝性疾患に侵された胎児の中枢神経の発達及び機能を補填できる。

2. 研究の目的

先天性代謝異常症に伴う脳機能障害に対して、胎児期の脳形成期に幹細胞を移植することでその機能を修復し、脳機能障害を軽減する新たな治療法の開発を目的に研究に取り組んでいる。診断技術の向上により早期からの胎児治療開始が可能であるが、その技術は未だ確立されていない。そこで本研究では以下の検討を行う。

(1) 細胞リソースとして脂肪組織由来幹細胞の有効性の検討

(2) 子宮内投与の時期、方法による組織生着率を検討する。

これらの遂行により大型動物を用いた胎仔治療へのステップアップを念頭においた基礎的データの取得を行う。

3. 研究の方法

(1) 脂肪組織由来幹細胞を採取し、神経分化誘導を *in vitro* に行った。神経細胞への分化の確認を、免疫組織化学的及び RT-PCR を用いて確認した。

(2) 脂肪組織由来幹細胞に GFP 発現レンチウイルスを感染させ、緑色に蛍光標識した細胞を胎生12.5日齢のマウス胎仔に経胎盤投与し、4週齢において血液中で DNA が検出されるかどうか確認した。

(3) 胎生14日に胎児脳室内に GFP 陽性脂肪組織由来幹細胞投与し生着した細胞を確認した。

4. 研究成果

(1) マウス鼠蹊部より脂肪由来幹細胞を採取し、*in vitro*において間葉系細胞への多分化能を有する事を確認した(図1)。さらに、神経分化誘導によりアストロサイト及びニューロンに分化することを明らかにした(図2)。これらの結果は脂肪組織由来幹細胞が多分化能を有するとともに神経分化能を保持していることを意味している。

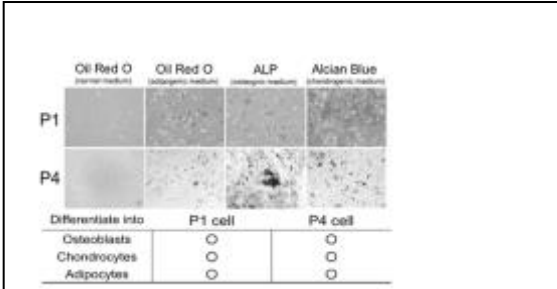


図1 脂肪組織由来幹細胞の多能性:脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化を確認した

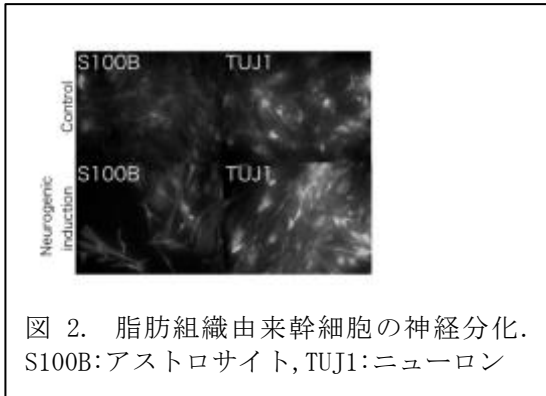


図 2. 脂肪組織由来幹細胞の神経分化.
S100B:アストロサイト, TUJ1:ニューロン

(2) 経胎盤的に GFP 遺伝子を導入した母獣の脂肪組織由来幹細胞を投与された胎仔につき生後 4 週齢で血液をサンプリングした。この血液の中で GFP 遺伝子の検出を行ったところ 5 匹中 3 匹の血液に GFP 遺伝子が検出された (図 3)。

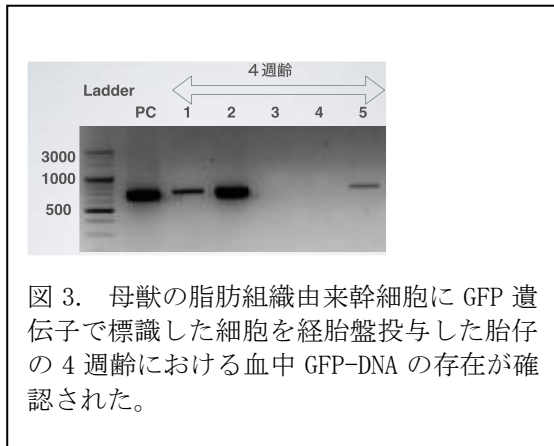


図 3. 母獣の脂肪組織由来幹細胞に GFP 遺伝子で標識した細胞を経胎盤投与した胎仔の 4 週齢における血中 GFP-DNA の存在が確認された。

(3) 全身で緑色蛍光タンパクを発現するマウス (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP); GFP 陽性マウス) より採取した脂肪組織由来幹細胞を採取し胎生 14.5 日マウス胎仔の脳室内投与したところ、胎生 17.5 日に頭蓋内に投与細胞が生着していることを認めた (図 4)。

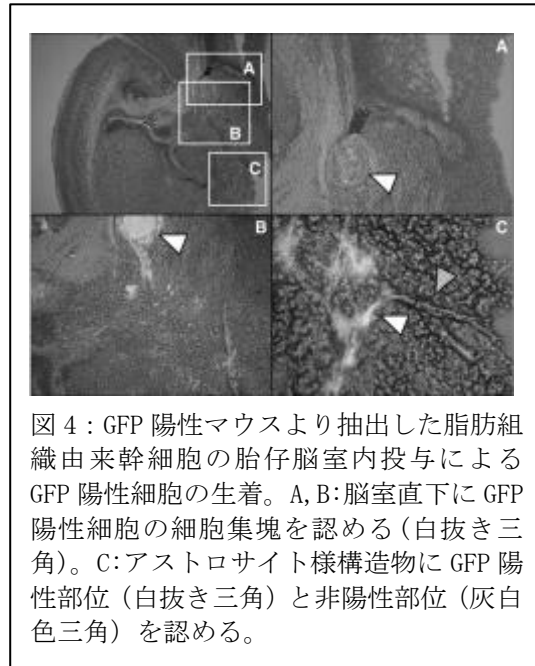


図 4: GFP 陽性マウスより抽出した脂肪組織由来幹細胞の胎仔脳室内投与による GFP 陽性細胞の生着。A, B: 脳室直下に GFP 陽性細胞の細胞集塊を認める (白抜き三角)。C: アストロサイト様構造物に GFP 陽性部位 (白抜き三角) と非陽性部位 (灰白色三角) を認める。

(1) ~ (3) の結果は、脂肪組織由来幹細胞が神経細胞への分化能を有しており、子宮内の移植により児に生着し、かつその細胞は神経細胞に分化することを示唆する。

現在の問題点として、(1) 脂肪組織由来幹細胞が神経細胞として機能するか、(2) 疾患モデルマウスに子宮内投与することで機能回復が図られるかが未検討であることが挙げられる

現在、脂肪組織由来幹細胞より *in vitro* でニューロスフィアを形成し、細胞内カルシウム濃度の測定による機能解析を行っている。またダウン症モデルマウスである Ts1Cje マウスに対して子宮内胎仔脳室内投与後に、行動解析を行うことで、脂肪組織由来幹細胞の胎仔神経機能回復に有効であることを証明したいと考えている。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Akihiro Kawashima, Akihiko Sekizawa. Adipose-derived-mesenchymal stem cells could be a promising cell source of tissue regeneration in congenital neural degeneration. 第 69 回日本産婦人科学会学術講演会. 広島、2017 年 4 月 13 日~16 日
- ② 川嶋章弘、安原理佳、美島健二、関沢明彦. 子宮内胎仔脳室内投与における脂肪組織

由来幹細胞の中樞神経系への有効性. 第
39 回分子生物学会年会、横浜、2016 年 11
月 30 日～12 月 2 日

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川嶋 章弘 (Akihiro Kawashima)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：10783376

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()