

令和元年5月24日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16307

研究課題名(和文) 早産児脳傷害への先制医療を目指した、ヒト羊水幹細胞分離・培養・調整技術の最適化

研究課題名(英文) Optimal methods for human amniotic fluid stem cells isolation, culture, and adjustment for the treatment of preterm brain injury.

研究代表者

秋葉 洋平 (Akiba, Yohei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80645812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：早産脳障害モデル動物におけるヒト羊水幹細胞(human amniotic fluid stem cells: hAFS)の有効性、および、スフェア培養、低酸素培養、事前の神経系細胞分化誘導などの事前調整による治療効果増強を目指した検討を行なった。本研究で、我々は、早産脳障害モデル動物でhAFSが有用なこと、hAFSのスフェア培養、低酸素培養は細胞生存率を低下させずに遂行可能であり、抗炎症性サイトカイン分泌や成長因子発現が増加すること、を明らかにした。今後、早産脳障害モデル動物に事前調整したhAFSを投与し、in vivoでの治療効果を検討する計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期脳障害の頻度は出生1000人に対して2-3人程度と一定で減少していない。周産期脳障害は、成熟児の低酸素虚血性脳障害と早産に伴う脳障害の2種類に大別される。実験的検討においても、成熟児の低酸素性虚血性脳障害モデルを用いた検討が中心であり、早産脳障害モデルを用いた検討は少ない。本研究にて、我々は早産脳障害モデル動物で間葉系幹細胞の1つである羊水幹細胞が、早産脳障害モデル動物に対する治療効果を有することを見出した。さらに、羊水幹細胞を調整することで抗炎症性サイトカイン分泌や成長因子発現が増加したことから、この幹細胞は投与前に事前調整を行うことで治療効果が増強する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed the examinations of the efficacy of human amniotic fluid stem cells (hAFS) as a treatment of preterm brain injury model animals. In addition, we also performed the examinations of pre-adjustments for hAFS-treatment in vivo such as sphere culture, hypoxic culture and neurologic cell differentiation. In this study, we revealed the efficacy of hAFS-treatment for preterm brain injury using rat model. Furthermore, we found sphere culture and hypoxic culture increased the secretion of anti-inflammatory cytokines and growth factors without affecting cellular survival. In the next project, we will plan to examine the effect of the preadjusted- hAFS for the treatment of preterm brain injury model animals in vivo.

研究分野：胎児医学

キーワード：早産 幹細胞 羊水 新生児

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

1. 研究開始当初の背景

周産期脳障害の頻度は出生 1000 人に対して 2-3 人程度と一定で減少していない。周産期脳障害は、成熟児の低酸素虚血性脳障害と早産に伴う脳障害の 2 種類に大別され、病理学的にも、成熟児の脳障害では灰白質障害、早産脳障害では白質障害が特徴で 2 つの脳障害は異なる。このため、動物実験でも異なるモデルを用いた検討が必要であるが、既報では、成熟児の低酸素性虚血性脳障害モデルを用いた検討が中心であり、早産脳障害モデルを用いた検討は少ない。

脳障害に対する有効な治療法として幹細胞を用いた再生医療が期待されている。しかし、癌化や免疫学的拒絶反応といった問題がある。この点で、出生当日からの iPS 細胞治療は課題が多い。臨床応用への課題が少ない細胞として間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)が注目され、成人では臨床応用されている。周産期脳障害でも、MSC を含んだ自己臍帯血を出生後早期に投与する方法が国内でも臨床試験が開始された。しかし、この方法は分娩時の臍帯血採取を前提とするため、早産では臍帯血がごく少量しか採取できない、分娩時の臍帯血採取では早期治療が困難、早期に治療開始するためには幹細胞の培養・調整が不可能、などの課題がある。

我々はこれらの欠点を補うため、妊娠中に羊水を採取・培養・調整し、得られた自己羊水由来幹細胞を用いた脳性麻痺の新規治療法開発を目指した研究を開始した。その中で、我々は既報と同様に (De Coppi et al., Nature Biotechnology, 2007)、ヒト羊水幹細胞 (human amniotic fluid stem cells: hAFS) の分離・培養を再現し、この細胞を低酸素性虚血性脳障害モデルマウスに投与し、治療効果を見出し報告してきた (Otani et al., *Pediatr Res.* 2018)。

本研究課題において、我々は早産脳障害モデル動物における hAFS の有効性、および、hAFS の事前調整 (スフェア培養、低酸素培養、事前の神経系細胞分化誘導) による治療効果増強を目指した検討を行なった。

2. 研究の目的

本研究は、早産脳障害モデル動物を用いて、hAFS の治療効果の検討を行うことを目的とした。さらに、hAFS の事前調整 (スフェア培養、低酸素培養、事前の神経系細胞分化誘導) による治療効果の増強を目指した検討を行った。

3. 研究の方法

以下の研究は、本学倫理委員会承認の下 (承認番号:20140285) 施行した。妊娠 15-17 週に当院で羊水検査を施行した患者羊水のうち約 5ml を研究用に使用した。そのヒト羊水細胞から CD117 陽性羊水細胞を、CD117 抗体単離法を用いて hAFS を分離・培養した。

(1) 早産脳障害モデル動物の作成を用いた hAFS の治療効果検討

生後 3 日目の Sprague Dawley ラットに大腸菌リポ多糖(LPS)を腹腔内投与(ip)し、LPS 誘発性敗血症モデルを作成した。

対照群、非治療群、治療群の 3 群を設定し、治療群では hAFS 溶解液(1×10^8 細胞/kg)を ip し、3 時間後に LPS 溶解液(0.25mg/kg)を ip した。非治療群では LPS 溶解液のみ ip し、対照群では hAFS, LPS 共に投与しなかった。

治療効果は、LPS 投与 48 時間後の生存率、全身臓器障害 (血液検査: AST, ALT, BUN)、脳神経炎症 (免疫染色: GFAP 及び Iba-1 陽性細胞数)、ミエリン関連タンパク発現 (免疫染色: MBP 陽性面積) にて評価した。

(2) hAFS の事前調整

スフェア培養

骨髄由来 MSC など他臓器由来の MSC では、スフェロイド化により抗炎症性サイトカインの分泌が増加し治療効果が増強する可能性が示唆されているが、hAFS では未検討である。このため、我々は hAFS をスフェロイド化し、接着培養よりも抗炎症性サイトカインの分泌が増加するとの仮説の検証を目指した。まず、hAFS を hanging drop 法、震盪培養法、スフェロイド形成用培養容器内での培養法により hAFS のスフェロイド化を試みた。次いで、安定したスフェロイド形成が可能であったスフェロイド形成用培養容器を用いて hAFS スフェロイドを作成し、接着培養した hAFS と抗炎症性サイトカイン分泌を検討した。また、hAFS スフェロイドを神経系細胞へ分化誘導し、単層培養 hAFS の分化誘導効率の比較を試みた。

低酸素培養

hAFS を酸素濃度 2.0%、37 °C のチャンバー内で 7 日間にわたって培養を行った。2 日に 1 回培地を交換し、80% コンフルエントになった時点で継代操作を行った。

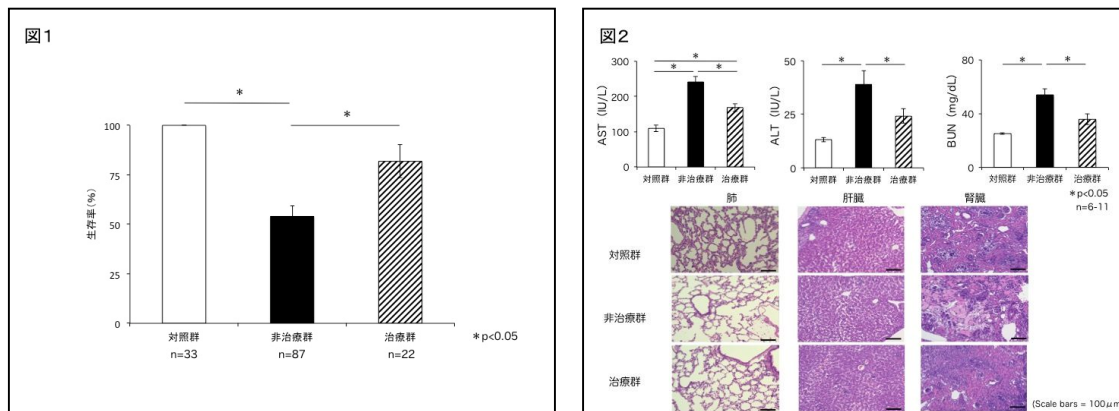
細胞の増殖速度を算出したのち、培養 2, 4, 7 日後のタイムポイントで神経系に対して治療効果をもつ成長因子である HGF の定量的 PCR 法を行った。

4. 研究成果

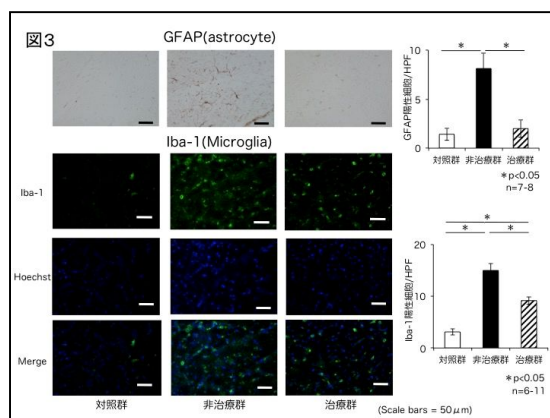
(1) 早産脳障害モデル動物を用いた hAFS の治療効果検討

LPS 誘発性敗血症モデルを作成した。同モデルの LPS 投与 48 時間後の生存率は約 50% であり、全身臓器 (脳、肺、肝臓、腎臓) に炎症性の臓器障害が生じた。しかし、治療群では非治療群と比較し、LPS 投与 48 時間後の生存率は約 80% へと有意に改善した (図 1)。

さらに、LPS 投与 48 時間後の生存率例について炎症性の臓器障害を検討したところ、一般臨床で用いられる臓器障害マーカー（AST, ALT, BUN）や肺、肝臓、腎臓の病理組織学的な臓器障害・炎症初見も、治療群と非治療群の比較において、有意な改善を認めた（図 2）。



特に、本研究課題の中心である、感染に起因した早産脳障害における脳病理組織像を模倣した炎症性の白質障害についても、LPS により惹起された神経炎症（GFAP 及び Iba-1 陽性細胞数の有意な増加）が、hAFS 投与により有意に軽減された（図 3）。

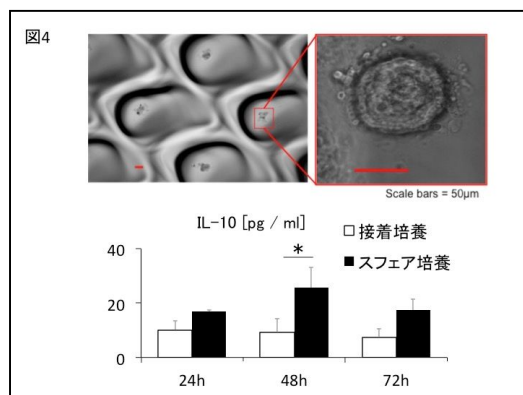


さらに、本モデルでは、新生児期においては極めて可塑性の高い oligodendrocyte の障害が生じ、LPS 投与によって代表的なミエリン構成タンパク質である myelin basic protein (MBP) が減少したが、そのミエリン障害は、hAFS 投与により有意に軽減された。

(2) hAFS の事前調整

スフェア培養による検討

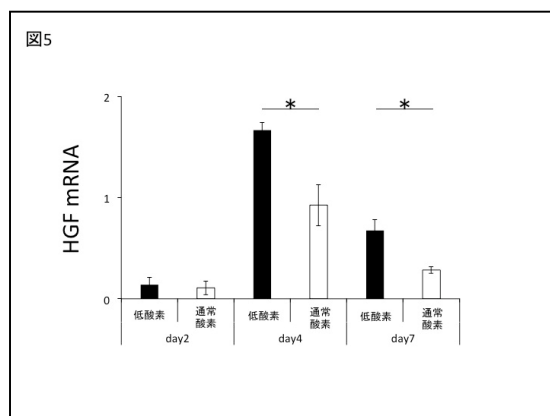
hAFS は hanging drop 法、震盪培養法、スフェロイド形成用培養容器内での培養法、のいずれの方法でもスフェロイドを形成したが、スフェロイド形成用培養容器内での培養法が最も安定で均質な hAFS スフェロイドの作成が可能であった。また、複数の抗炎症性物質を測定したなかで、hAFS スフェロイドは接着培養の hAFS と比較し、代表的な抗炎症性サイトカインの 1 つである IL-10 の分泌が有意に増加した（図 4）。



しかし、接着培養においては神経様細胞への分化誘導が可能であったが、設定した条件下では hAFS スフェロイドは神経様細胞には分化しなかった。

低酸素培養

低酸素培養によって、増殖能は有意に上昇した。これは他の MSC と矛盾しない所見である。また、HGF の mRNA 発現は培養 4 日後と 7 日後で有意に上昇していた (図 5)。



本研究課題の遂行により、早産脳障害モデル動物で hAFS が有効な治療法になること、hAFS の事前調整 (スフェア培養、低酸素培養) は細胞生存率を低下させずに遂行可能であり MSC の中心的な治療機序である抗炎症性サイトカインの分泌や HGF 発現が増加したこと、が示された。このため、hAFS の事前調整は in vivo での治療効果を増強させる可能性が示唆されたため、今後、早産脳障害モデル動物に投与し、その実験的検証を行っていきたいと考える。

5. 主な発表論文等

[論文発表] (計 5 件)

- 1) **Akiba Y**, Miyakoshi K, Ikenoue S, Saisho Y, Kasuga Y, Ochiai D, Matsumoto T, Tanaka M. Glycemic and metabolic features in gestational diabetes: singleton versus twin pregnancies. *Endocr J*. 査読あり. 2019. doi: 10.1507/endocrj. EJ18-0575.
- 2) **秋葉洋平**, 遠藤豊英, 三輪雅之, 上野和典, 池田一成, 矢久保和美. 拡張早期の心室中隔左方偏位を呈した胎児動脈管早期閉鎖の 1 例. *Jpn J Med Ultrason*. 査読あり. 2019 46(1): 83-84. doi: 10.3179/jjmu. JJMU. A. 124. Epub 2018 Oct 29.
- 3) **Akiba Y**, Miyakoshi K, Ochiai D, Kawaida M, Matsumoto T, Tanaka M. Umbilical cord hemangioma: Sonographic features by HDlive Flow. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 査読あり. 2018 Feb;221:195-196. doi: 10.1016/j.ejogrb.2017.12.011. Epub 2017 Dec 7.
- 4) Ikenoue S, Miyakoshi K, Ishii T, Sato Y, Otani T, **Akiba Y**, Kasuga Y, Ochiai D, Matsumoto T, Ichihashi Y, Matsuzaki Y, Tachikawa K, Michigami T, Nishimura G, Ikeda K, Hasegawa T, Tanaka M. Discordant fetal phenotype of hypophosphatasia in two siblings. *Am J Med Genet A*. 査読あり. 2018 Jan;176(1):171-174. doi: 10.1002/ajmg.a.38531. Epub 2017 Nov 21.
- 5) Kasuga Y, Miyakoshi K, Nishio H, **Akiba Y**, Otani T, Fukutake M, Ikenoue S, Ochiai D, Matsumoto T, Tanaka K, Minegishi K, Kuji N, Roberts R, Aoki D, Tanaka M. Mid-trimester residual cervical length and the risk of preterm birth in pregnancies after abdominal radical trachelectomy: a retrospective analysis. *BJOG*. 査読あり. 2017;124:1729-35. DOI: 10.1111/1471-0528.14688.

[学会発表] (計 15 件)

- 1) **秋葉洋平**, 宮越敬, 佐藤佑, 大谷利光, 福武麻里絵, 正木繭, 池ノ上学, 落合大吾, 松本直, 田中守. Bi-plane imaging が病型診断に有用であった大動脈離断複合の 1 症例. 第 91 回日本超音波医学会学術集会. 2018.
- 2) **秋葉洋平**, 宮越敬, 佐藤佑, 池ノ上学, 春日義史, 落合大吾, 松本直, 田中守, 青木大輔. 妊娠糖尿病合併双胎妊娠の糖代謝異常重症度に関する検討. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2018.
- 3) **秋葉洋平**, 宮越敬, 佐藤佑, 福武麻里絵, 安原潤, 正木繭, 池ノ上学, 落合大吾, 松本直, 松崎陽平, 山岸敬幸, 田中守. 腹壁誘導胎児心拍モニターにより電気信号解析を行った先天性完全房室ブロックの 1 例. 第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会. 2018.
- 4) 白橋真由, **秋葉洋平**, 遠藤豊英, 池ノ上学, 横田めぐみ, 天方朋子, 大森さゆ, 池田俊之, 矢久保和美. 片児に無脳症を合併した一絨毛膜二羊膜双胎の 1 症例. 第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会. 2018.
- 5) 玉川真澄, **秋葉洋平**, 小泉和恵, 関芳子, 天方朋子, 三輪雅之, 上野和典, 池田俊之, 池田一成, 矢久保和美. HDlive Flow が診断の一助となった胎児動脈管瘤の 1 症例. 第 41 回日本母体胎児医学会学術集会. 2018.

- 6) **秋葉洋平**, 玉川真澄, 小泉和恵, 関芳子, 天方朋子, 三輪雅之, 上野和典, 池田俊之, 池田一成, 矢久保和美. HDlive Flow により胎児動脈管瘤が明瞭に描出された2症例. 第30回日本超音波医学会関東甲信越地方学術集会. 2018.
- 7) 玉川真澄, **秋葉洋平**, 小泉和恵, 天方朋子, 上野和典, 池田俊之, 矢久保和美. 前置胎盤警告出血管理中に下肢深部静脈血栓症を合併した1症例. 第93回埼玉産科婦人科学会前期学術集会. 2018.
- 8) 玉川真澄, **秋葉洋平**, 小泉和恵, 天方朋子, 上野和典, 池田俊之, 矢久保和美. 妊娠中に判明した重複子宮及び膣閉鎖の2例. 第136回関東連合産科婦人科学会総会. 2018.
- 9) 玉川真澄, **秋葉洋平**, 小泉和恵, 天方朋子, 上野和典, 池田俊之, 矢久保和美. 心室中隔の左方偏位を呈した動脈管早期閉鎖の1症例. 第94回埼玉産科婦人科学会学術集会. 2018.
- 10) 阿部雄志, 落合大吾, 升田博隆, 大谷利光, 福武麻里絵, **秋葉洋平**, 松本直, 宮越敬, 田中守. ヒト羊水幹細胞を用いた脊髄髄膜瘤に対する新規胎児治療法の開発. 第17回 日本再生医療学会. 2018.
- 11) 阿部雄志, 落合大吾, 大谷利光, 福武麻里絵, 佐藤佑, **秋葉洋平**, 松本直, 升田博隆, 宮越敬, 田中守, 青木大輔. ラット胎仔脊髄髄膜瘤モデルを使用したヒト羊水幹細胞の羊水腔内注入による胎児治療効果について. 第70回 日本産科婦人科学会. 2018.
- 12) 大谷利光, 落合大吾, 阿部雄志, 福武麻里絵, 佐藤佑, **秋葉洋平**, 松本直, 升田博隆, 宮越敬, 田中守, 青木大輔. 新生仔低酸素虚血性脳症モデルマウスに対するヒト羊水幹細胞鼻腔内投与の治療効果に関する検討. 第70回 日本産科婦人科学会. 2018.
- 13) 大谷利光, 落合大吾, 佐藤佑, **秋葉洋平**, 福武麻里絵, 松本直, 宮越敬, 田中守. 新生仔低酸素虚血性脳症モデルマウスに対するヒト羊水幹細胞鼻腔内投与の治療効果に関する検討. 第54回 日本周産期・新生児医学会. 2018.
- 14) 落合大吾, 阿部雄志, 大谷利光, 福武麻里絵, 佐藤佑, **秋葉洋平**, 松本直, 升田博隆, 宮越敬, 田中守. ヒト羊水幹細胞の羊水腔内注入によるラット脊髄髄膜瘤の治療効果に関する検討. 第15回 日本胎児治療学会学術集会. 2017.
- 15) Fukutake M, Ochiai D, Masuda H, Sato Y, **Akiba Y**, Otani T, Kasuga Y, Ikenoue S, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M, Daisuke Aoki. Effects of human amniotic fluid amniotic fluid stem cells on cutaneous wound healing in a mouse excisional model. 69th Annual Congress of Japan society of Obstetrics and Gynecology. 2017.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

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。