

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17378

研究課題名(和文)母体の脂肪組織間葉系幹細胞を用いた胎児治療法の開発：ダウン症モデルマウスへの応用

研究課題名(英文)Development of the fetal therapy using maternal adipose-derived stem cells

研究代表者

川嶋 章弘(Akihiro, Kawashima)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10783376

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)：間葉系幹細胞による胎児治療は以前から検討されているが、胎児には母親の免疫細胞が存在し移植細胞が退治に生着する際の主な障壁になる。そこで母親の間葉系幹細胞を利用し投与した幹細胞の生着率を向上させる方法を考えた。マウスを用いた実験で母獣の脂肪由来間葉系幹細胞を胎児の脳室内に投与し生体での神経分化の有無および胎児脳への生着を検討した。結果、胎児脳へ投与した母親の脂肪組織由来間葉系幹細胞は出生後も長期に生着し成熟神経細胞様に分化した。さらに母獣より抽出した幹細胞では移植後の炎症反応が抑制された。本研究の結果は先天性中枢神経疾患の胎児治療のリソースとして母体幹細胞は有用である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脂肪組織由来間葉系幹細胞が細胞外で神経細胞様の電位変化とタンパク質を発現することを確認し、さらに投与された胎児の脳組織内で神経細胞様に分化し生着することを明らかにしてきた。

胎児期に母体脂肪組織由来間葉系幹細胞

が生着した野生型マウスにおいて非投与群との間に明らかな運動性の異常などを認めないことを確認しているため、現在ダウン症モデルマウスでの機能改善を確認し、胎児に対する幹細胞治療の臨床応用はその安全性と倫理的な問題から研究段階であるが、細胞リソースの特性や移植免疫応答を考えると母親から採取できる脂肪由来間葉系細胞を用いた胎児治療は応用が可能な幹細胞の一つとなると考え

研究成果の概要(英文)：In utero stem cell transplantation is a promising medical tool for many genetic disorders, but graft rejection caused by maternal T cells as the main barrier to engraftment limits clinical outcomes. We hypothesized that using maternal adipose-derived stem cells (ADSCs) for in utero transplantation can develop maternal-fetal chimerism, thus lowering the risk of graft rejection. Herein, fetus brain engraftment using maternal grafts was examined via in utero stem cell transplantation. ADSCs were purified using MSC markers. Fetal brain grafts grew for at least 1 month after in utero transplantation and expressed mature neuronal markers. Furthermore, maternal ADSCs reduced immune cell infiltration and suppressed the innate immune response. In conclusion, in utero maternal ADSC transplantation is beneficial for the treatment of congenital CNS diseases because of the ability of the cells to differentiate into neuronal lineages and reduce immune responses.

研究分野：胎児治療

キーワード：胎児治療 ダウン症 間葉系幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダウン症はおよそ新生児 700 人あたり 1 人に生じ 21 番染色体のトリソミーが原因となり、精神遅滞を始めとした様々な症状が認められる。ダウン症の脳では神経細胞の数と密度が減少し、アストロサイトの数が増加することが知られている。この変化は胎児期より見つかりトリソミーにより遺伝子の発現が過剰となり胎児期より病状が進行していると考えられている。検査技術の発展により妊娠 8 週前後から母体血を用いた胎児の遺伝子診断が可能となっている。胎児中枢神経系の発達する前の段階で中枢神経発達障害に伴う脳機能障害を改善し出生後に生産的な社会生活を送ることが可能とする胎児治療に注目が集まっています。既に薬剤投与や遺伝子操作で胎内治療が試みられていますが薬剤投与による治療では継続的な治療を要し、脳内の細胞に対する遺伝子操作はその後の発達に及ぼす影響が懸念されています。

移植の細胞リソースとしてほぼすべての細胞に分化が可能とされる胚性幹細胞や人工多能性幹細胞は再生医学を飛躍的に発展させ再生医療を実現可能なものになると期待されている。しかし胚性幹細胞は胚を利用して作成する必要があり倫理的制約により臨床応用に大きな制限がある。人工多能性幹細胞は生着後の発がんのリスクが考えられている。間葉系幹細胞をはじめとした体性幹細胞は、倫理的な問題点や発がんのリスクを避けて用いることができ有用だと考えられている幹細胞になります。成人の脳へ間葉系幹細胞が移植された症例では長期に渡り脳内に移植細胞が生着したことが報告され間葉系幹細胞を用いた神経疾患への治療応用が注目されています。間葉系幹細胞の一つである脂肪由来間葉系幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と比較してドナーへの侵襲が少なく大量の採取が可能であり神経保護作用及び神経分化の可能性があり中枢神経系への細胞治療に有用な可能性がある幹細胞になりうる。間葉系幹細胞を用いた幹細胞治療は多くの中枢神経疾患の治療への応用が進められている。我々は幹細胞移植の細胞ソースとして間葉系幹細胞に着目した。最近の研究では脳室内に投与された間葉系幹細胞による神経新生の促進に寄与することが報告されており、さらに乳児期における間葉系幹細胞の脳室内投与の方法は Phase I 臨床試験で安全性が確認されています(<http://www.fetaltherapies.org/>)。これらのことから胎児治療においても胎児脳室内に間葉系幹細胞を投与する方法は安全かつ有効に神経新生を促すことができる最善の方法の一つとなりうると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 脂肪組織間葉系幹細胞を胎児脳室内に投与し生着した細胞の神経分化

本研究課題の予備実験としてマウス鼠蹊部より脂肪を採取し、脂肪組織間葉系幹細胞を抽出後、*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ており、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てきた。さらに全身で緑色蛍光タンパクを発現する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 日通常マウス胎仔の脳室内投与し、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ていた。この細胞は胎仔由来の細胞と移植された脂肪組織由来幹細胞とで架橋構造を形成しており、移植された脂肪組織由来幹細胞が胎仔の既存細胞と共に脳構造を形成する可能性を示していた。本研究課題では生着した細胞の神経分化と投与後の細胞の動態に付き明らかにすることを目的とした。

(2) 母獣より抽出した脂肪組織間葉系幹細胞が生着率を向上への寄与

母体の免疫によって排除されない細胞では胎児への子宮内幹細胞移植際の幹細胞の胎児における生着率が高いと考えられた。本研究課題では母獣より抽出した脂肪組織由来幹細胞が胎児に投与後の生着率及び免疫反応の動態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題の目的を達成するために以下の 2 つの実験を行った。

(1) 脂肪組織間葉系幹細胞を胎児脳室内に投与し生着した細胞の神経分化

C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)グリーンマウスの鼠蹊部より脂肪を摘出してプラスチックプレートで培養し接着性をもつ細胞群を抽出した。マウス間葉系幹細胞のマーカーである Sca-1 と PDGFR α が共陽性である細胞をセルソーターで分離し脂肪組織間葉系幹細胞とした。組織の接着性及び組織分化能を亢進させるため液状化しているアテロコラーゲン中に採取された幹細胞を懸濁した。妊娠 12.5-14.5 日の妊娠マウスに対して吸入麻酔下に開腹し妊娠子宮の中の胎仔を直視下で確認した後に胎仔の大泉門より懸濁した幹細胞浮遊液を投与した。投与した細胞は 28 日齢時に脳を摘出し組織学的に移植した細胞を確認した。

(2) 母獣より抽出した脂肪組織間葉系幹細胞が生着率を向上への寄与

C57BL/6 マウスの非妊娠時に脂肪組織由来幹細胞を採取した後に交配させ脂肪組織間葉系幹細胞に ZsGreen1(緑色蛍光蛋白)遺伝子をレンチウイルス(pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 Vector: Takara)を用いて導入した。緑色蛍光蛋白を発現する細胞を移植後に追跡するために使用する。胎生 12.5~14.5 日に胎児に幹細胞の投与を行った、サンプルの胎仔脳の摘出を胎生 17.5 日、日齢 7 に行い非母体から抽出した脂肪組織間葉系幹細胞を対照に母体の脂肪組織由来幹細胞の生着及び周囲に対する炎症の波及を組織学的に確認した。

4. 研究成果

(1) 脂肪組織間葉系幹細胞を胎児脳室内に投与し生着した細胞の神経分化

移植された PDGFR α ・Sca-1 共陽性 ADSC は様々な形態の細胞を含む細胞集塊として脳内で確認されました (図 1A)。Oil red-O 染色ではこの細胞集塊には細胞内脂肪滴を含む細胞群の存在を認めました (図 1B)。緑色蛍光タンパク (GFP) を発現している PDGFR α ・Sca-1 共陽性 ADSCs は一部の細胞でアストロサイトマーカー S100B や成熟したニューロンマーカー NEUN (図 1C-F) の発現が確認されました。さらに細胞集塊の周囲には GFP 陰性 S100B 陽性のアストロサイト (図 1C) に囲まれていました。我々の検討から移植した PDGFR α ・Sca-1 共陽性 ADSC はアストロサイトやニューロンなどの神経系統のマーカーを発現する脳内で長期に生着することが明らかになりました。しかし神経系統マーカーを発現する PDGFR α ・Sca-1 共陽性 ADSC の数は少ないことも確認されました。中枢神経への細胞移植の動物モデルでは中枢神経系に常駐するミクログリア及びマクログリアは好中球とともに移植した部位にリクルートされる最初の細胞と報告されており、これらの細胞が移植細胞の直接的な細胞死を誘導していると考えられております。我々の結果は、PDGFR α ・Sca-1 共陽性 ADSC の移植により反応性アストロサイトの凝集を起こしてしまったことが考えられました。反応性アストロサイトは神経保護反応を有するとともに神経変性を増幅させるプロ炎症性メディエーターや神経毒性因子も分泌していることがわかっています。炎症性変化が間葉系幹細胞の異常な脂肪沈着に関与することが報告されていて我々の結果は細胞移植後の移植部周囲の炎症により移植細胞において異常な脂肪形成が促進されたと考えられました。脂肪形成を抑えることは PDGFR α ・Sca-1 共陽性 ADSC の神経細胞への分化の間に不可欠なプロセスと考えられ移植後のアストロサイトの反応性を抑えることで移植した PDGFR α ・Sca-1 共陽性 ADSC の神経新生により有利な環境になると考えられました。

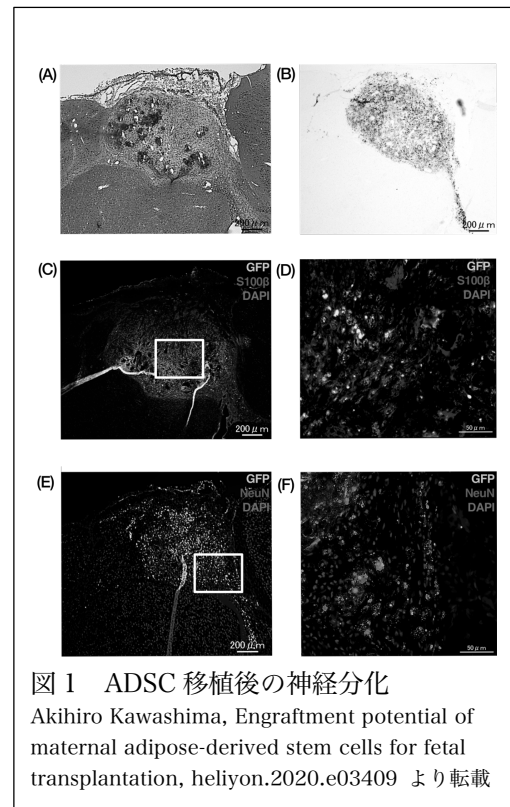


図 1 ADSC 移植後の神経分化

Akihiro Kawashima, Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation, heliyon.2020.e03409 より転載

(2) 母獣より抽出した脂肪組織間葉系幹細胞が生着率を向上への寄与

脳室内移植後 5 日目の移植脳における T 細胞応答を評価したところ母獣の ADSCs を移植した脳では CD45 陽性細胞及び CD8 陽性細胞 (図 2 A-D) の浸潤が少ないことを認めました。母獣の ADSCs を用いた場合の免疫応答についてプロ炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現を全脳中で評価しました。炎症と免疫応答の調節に重要な役割を果たすプロ炎症性サイトカイン IL1b 及び Tnfa レベルの遺伝子発現はコントロール群及び母獣の ADSC 群と比較するとグリーンマウスからの ADSC を有する群で有意に増加していました (図 2E)。抗炎症性サイトカインである Tim1 及び Il10 の遺伝子発現は他の群 (図 2E) のものよりも母獣の ADSC を移植した群で有意に高かったことも確認されました。これらの結果は母獣の ADSC を移植細胞のソースとして利用することで母の免疫を含んだレシピエントの免疫系を抑制されることを示唆していました。

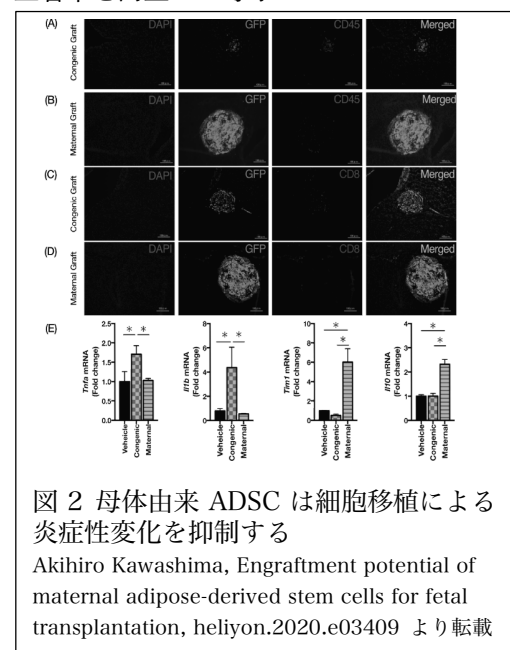


図 2 母体由来 ADSC は細胞移植による炎症性変化を抑制する

Akihiro Kawashima, Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation, heliyon.2020.e03409 より転載

本研究で得られた成果は第 72 回日本産科婦人科学術集会で congress award を受賞し、国内の周産期分野における胎児に対する細胞治療の可能性を発信した。国際学術誌への投稿及び国際学会で本研究成果を発表し、今後母体の幹細胞を用いた胎児細胞治療の可能を示せた意義は大きい。胎児に対する幹細胞治療の臨床応用はその安全性と倫理的な問題から研究段階である。しかし細胞リソースの特性や移植免疫応答を考えると母親から採取できる脂肪由来間葉系細胞を用いた胎児治療は応用が可能な幹細胞の一つとなると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawashima Akihiro, Yasuhara Rika, Akino Ryosuke, Mishima Kenji, Nasu Michiko, Sekizawa Akihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03409 ~ e03409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e03409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Akihiro, Oba Tomohiro, Yasuhara Rika, Sekiya Bunbu, Sekizawa Akihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytokine profiles in maternal serum are candidates for predicting an optimal timing for the delivery in early onset fetal growth restriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prenatal Diagnosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pd.5679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akihiro Kawashima
2. 発表標題 Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation
3. 学会等名 The 72nd Annual Congress of JSOG
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Kawashima
2. 発表標題 The Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Kawashima
2. 発表標題 Each negative alteration in early-onset fetal growth restriction changes the profile of maternal serum cytokines into a peculiar feature. We want to explore this further as an early warning system.
3. 学会等名 the 24th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関