

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591428

研究課題名(和文)臍帯血・臍帯由来幹細胞の機能評価と小児疾患に対する細胞治療への応用

研究課題名(英文)Functional evaluation of umbilical cord stem cells as a source for cell-based therapy in children

研究代表者

麦島 秀雄 (MUGISHIMA, Hideo)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：80183648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：胎児付属物に由来する幹細胞の形質および機能解析を行った。臍帯動脈内皮近傍に局在するp75NTR陽性細胞は、神経細胞への分化能を示した。同一ドナーより臍帯Wharton's jelly間葉系幹細胞(WJ-MSC)、胎盤羊膜上皮幹細胞(AEC)、胎盤羊膜間質幹細胞(AMC)を調製し、その機能を比較した結果、WJ-MSCは、高いリンパ球増殖抑制作用を示し、AECは高い造血幹細胞支持能を示した。これらのMSCをヒト臍帯血造血幹細胞と共にNOD-SCIDマウスに共移植することにより、ヒト血液細胞の生着率が増加した。胎児付属物由来MSCは、臍帯血移植に伴う生着不全予防に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined phenotypic and functional analysis of several stem cells isolated from human embryonic tissue. We found that p75NTR-positive cells, specifically localized sub endothelium of umbilical artery, expressed several neural crest markers and differentiated into neuronal and glial cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from Wharton's jelly of umbilical cord (WJ-MSCs), epithelium of placental amnion (AECs), and mesenchyme of placental amnion (AMCs) were prepared from same donors and compared their cellular function. WJ-MSCs characteristically suppressed peripheral blood lymphocyte proliferation, whereas AECs dominantly supported human hematopoietic stem cells in vitro. Co-transplantation of WJ-MSCs, AECs, and AMCs with human umbilical cord blood CD34-positive cells into NOD-SCID mice promoted the engraftment of human blood cells. These results suggest that these embryonic tissue-derived stem cells are useful to inhibit graft failure following cord blood transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植学

1. 研究開始当初の背景

臍帯血や臍帯組織中には胎児に由来する幼弱な幹細胞が多く含まれることが知られている。臍帯血中には造血幹細胞以外にも多能性細胞の存在が明らかにされ、また臍帯の結合組織(Wharton's jelly)や胎盤羊膜には間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)が存在し、骨、軟骨、心筋などの間葉系組織のみならず、神経細胞や肝細胞へ分化することが報告されている。さらに最近、脳性麻痺の小児に自己臍帯血を移植して症状が改善されたことが報告されている。これらの報告はいずれも非精製臍帯血単核球や臍帯血単核球を付着培養して得られた不均一な細胞集団を用いた検討である。このように臍帯・臍帯血にはさまざまな機能を有する未分化細胞が複数存在すると考えられているが、その局在や特異的マーカーなど不明な点が多い。我々は臍帯組織にはその局在や MSC マーカー発現プロファイルが異なる何種類かの MSC 群が存在することを明らかにした。これらの MSC の特性や機能を明確にすることにより、多くの難治性疾患に対する細胞治療に応用していくことが期待できる。

2. 研究の目的

我々は臍帯血や臍帯組織中に神経堤に由来する未分化細胞や、幹細胞マーカー発現プロファイルが異なる MSC 群など、いくつかの形質が異なる幹細胞群の存在とその局在を同定した。本研究ではこれらの幹細胞の単離増幅を行い、形質解析を行うとともに神経分化能、免疫抑制能、造血細胞維持能などの機能解析を行う。そしてこれらを細胞ソースとする小児難治性疾患を対象とした新しい細胞治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 臍帯組織に存在する神経堤由来細胞の形質および機能解析

妊婦よりインフォームドコンセントを得て提供された臍帯組織から臍帯動脈を分離後、酵素処理し、神経堤マーカーである p75NTR 陽性細胞を磁気ビーズ法を用いて選別採取した。単離した p75NTR 陽性細胞に対し、フローサイトメーターによる細胞表面抗原発現や、リアルタイム RT-PCR 法による各種神経堤マーカー遺伝子の発現を評価した。また単離した細胞をニューロスフェア法を用いて浮遊培養し、ニューロスフェア形成能を評価した。さらにこのニューロスフェアを神経細胞分化誘導培地やグリア細胞分化誘導培地で培養し、神経細胞やグリア細胞への分化能を検討した。

(2) 臍帯組織に存在する MSC の形質および機能解析

同意の得られた予定帝王切開患者から分娩後、臍帯と胎盤を採取した。凍結切片を作成し、各種幹細胞マーカー、造血ニッチマーカーに対する抗体を用いて免疫組織染色を行

い、免疫抑制性細胞や造血ニッチ細胞として機能する幹細胞の局在解析を行った。また同一ドナーに由来する臍帯と胎盤を採取し、Explant 法または酵素法により Wharton's jelly 由来 MSC (WJ-MSC)、羊膜間質由来幹細胞 (AMC)、羊膜上皮由来幹細胞 (AEC) を培養調製した。比較対照としてヒト皮膚線維芽細胞 (FB) を用いた。それぞれの細胞に対し、MSC の minimal criteria に基づく細胞表面抗原発現解析を行った。また TNF や IFN で刺激し、免疫原性、免疫制御に関する因子の発現変化を遺伝子、蛋白レベルで解析した。またこれらの細胞をヒト末梢血単核球 (PB-MNC) と共培養し、リンパ球増殖抑制能を CFSE アッセイを用いて評価した。さらにこれらの細胞を臍帯血 CD34 陽性細胞と共培養を行い、造血幹細胞の維持能をフローサイトメーターや CFU-GM アッセイなどを用いて評価した。

(3) 臍帯由来免疫抑制細胞の細胞治療への応用

レシピエントマウス (B6D2F1) に 11Gy 放射線照射を行った後、ドナーマウス (C57BL/6) 骨髄単核球と脾臓 CD3 陽性細胞を移植し、急性 GVHD モデルを作成した。このモデルに上記検討にて同定された免疫抑制能を有する細胞を経静脈内投与し、細胞を投与しない Control 群と急性 GVHD の重症度や死亡率を比較検討した。

(4) 臍帯血移植における生着促進を目的とした細胞治療の確立

放射線照射 (3Gy) を行った免疫不全 (NOD-SCID) マウスに、ヒト臍帯血造血幹細胞 (CD34 陽性細胞 1×10^4) と共に、WJ-MSC、AEC、AMC (5×10^5) をそれぞれ共移植した。移植 12 週間後に骨髄および末梢血を採取し、ヒト型血液細胞の生着率をフローサイトメーターで検討した。

4. 研究成果

(1) 臍帯組織に存在する神経堤由来細胞の形質および機能解析

臍帯動脈より磁気ビーズ法で選別した p75NTR 陽性細胞の形質解析およびニューロスフェア形成能を検討した。その結果、p75NTR 陽性細胞は、MSC マーカー PDGFR α 、CD90 陽性、ペリサイトマーカー CD146、NG2 陽性で、内皮細胞マーカー vWF 陰性、造血幹細胞マーカー CD34 陰性を示した。遺伝子発現解析において p75NTR 陽性細胞は、初期神経マーカー Nestin、Musashi-1 や、神経堤マーカー Twist、Slug、FoxD3 などの発現を認めた。また p75NTR 陽性細胞は Nestin 陽性ニューロスフェアの形成が高頻度に認められた。ニューロスフェアを神経分化誘導培地で 12 日間培養すると、NF200、MAP2 に陽性を示す神経細胞および GFAP 陽性を示すグリア細胞の誘導が確認できた。以上の結果より、臍帯動脈内皮近傍に

p75NTR 陽性で神経細胞やグリア細胞への分化能を有する神経堤由来幹細胞の存在が示唆された。

(2) 臍帯組織に存在する MSC の形質および機能解析

ヒト臍帯および胎盤組織の凍結切片を作成し、免疫組織学的に免疫抑制性細胞・造血ニッチ細胞の局在解析を行った。その結果、造血ニッチ細胞のマーカーである SDF-1 が、臍帯・胎盤周囲の羊膜や胎盤内微小血管近傍に高発現していることが明らかになった。次に同一ドナーに由来する臍帯 Wharton's jelly、胎盤羊膜上皮、胎盤羊膜間質から Explant 法または酵素法により細胞を培養調製し、特性解析を行った。フローサイトメーターによる細胞表面抗原解析では、WJ-MSC、AEC、AMC とともに、CD90 陽性、CD105 陽性、CD73 陽性を示し、MSC の minimal criteria を満たす形質を示した。WJ-MSC は AEC、AMC、FB に比べ、IFN- γ 刺激後の HLA-DR 発現レベルが有意に低いことが明らかになった。この結果より WJ-MSC は免疫原性が低いことが示唆された。リンパ球増殖抑制効果は、WJ-MSC > AEC > AMC の順に強い傾向を認めた。免疫制御関連遺伝子 (IDO-1, PTGS2, HGF, TRAIL) の発現も WJ-MSC で高い傾向があり、リンパ球増殖抑制効果の結果と正の相関が認められた。以上の結果より、WJ-MSC は、免疫抑制細胞としての機能が高い可能性が示唆された。また造血ニッチマーカー SDF-1 の発現は、WJ-MSC や AMC に比べ AEC で高く、また in vitro 共培養系において CD34 陽性造血幹細胞を保持する能力が高い傾向が認められた。これらの結果より、AEC が造血ニッチ細胞としての機能が低い可能性が示唆された。

(3) 臍帯由来免疫抑制細胞の細胞治療への応用

マウス急性 GVHD モデルに対して、WJ-MSC を経静脈内投与し、その GVHD 発症抑制効果を検討した。その結果 WJ-MSC 投与群は、MSC 非投与 Control 群に比べ、GVHD の臨床スコアや死亡率に明らかな差は認められなかった。

(4) 臍帯血移植における生着促進を目的とした細胞治療の確立

放射線照射を行った免疫不全 (NOD-SCID) マウスに、ヒト臍帯血造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) と共に、WJ-MSC、AEC、AMC をそれぞれ共移植した。移植 12 週間後に骨髄および末梢血中のヒト型血液細胞の生着率をフローサイトメーターで検討した。その結果、各 MSC 共移植群では、MSC 非投与 Control 群に比べ、ヒト型血液細胞の生着率が有意に高くなることが明らかになった。一方、これら 3 種類の MSC 間の比較では、生着率や生着した各細胞分画の比率に明らかな差は認められなかった。以上の結果より、胎児付属物由来 MSC との共移植により臍帯血造血幹細胞移植の生着率向上が

期待できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

松村昌治、松本太郎、加野浩一郎、麦島秀雄：家兔下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 自家移植の効果 査読有 72:86-92, 2013

Nagano N, Ishige M, Mugishima H et al. Diabetes caused by Kir6.2 mutation: successful treatment with oral glibenclamide switched from continuous subcutaneous insulin infusion in the early phase of the disease. *Pediatric International* 査読有 54:277-279, 2012

DOI: 10.1111/j.1442-200X.2011.03413.x.

Yagasaki H, Mugishima H et al. Treatment responses for disseminated intravascular coagulation in 25 children treated with recombinant thrombomodulin: a single institution experience. *Thrombosis Research* 査読有 130:e289-293, 2012

DOI: 10.1016/j.thromres.2012.10.004.

Obinata D, Matsumoto T, Mugishima H et al. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *International Journal of Urology* 査読有 18:827-834, 2011

DOI: 10.1111/j.1442-2042.2011.02865.x

〔学会発表〕(計 14 件)

下澤克宜、石毛美夏、谷ヶ崎博、麦島秀雄、松本太郎：ヒト臍帯、胎盤組織由来幹細胞の免疫原性および免疫制御能の解析 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3 月 4 日 京都

Hideo Mugishima: Cord Blood Banking in Japan Terasaki Festschrift 2014 2014 年 1 月 25 日 Los Angeles, USA

西川英里、松本太郎、石毛美夏、麦島秀雄：ヒト胎児付属物由来間葉系幹細胞の機能解析 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 日 横浜

手塚里奈、松本太郎、石毛美夏、麦島秀雄：臍帯動脈 p75NTR 陽性細胞の形質解析 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 7 月 5 日 福岡

手塚里奈、松本太郎、石毛美夏、麦島秀雄：臍帯動脈 p75NTR 陽性細胞の形質解析 第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 12 日 横浜

小高美奈子、松本太郎、石毛美夏、谷ヶ崎博、麦島秀雄 他：放射線照射が骨髄ストローマ機能に及ぼす影響と臍帯血生着促進を目的とした新規細胞治療 第 34 回日本造血細胞移植学会 2012 年 2 月 25 日 大阪

手塚里奈、松本太郎、麦島秀雄：ヒト臍

帯組織における幹細胞の局在および形質
解析 第 8 回日本大学幹細胞研究会
2011 年 11 月 17 日 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

麦島 秀雄 (MUGISHIMA, Hideo)
日本大学・医学部・教授
研究者番号 : 80183648

(2)研究分担者

松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)
日本大学・医学部・教授
研究者番号 : 5036580

谷ヶ崎 博 (YAGASAKI Hiroshi)
日本大学・医学部・助教
研究者番号 : 90378141

石毛 美夏 (ISHIGE Mika)
日本大学・医学部・助教
研究者番号 : 90420950