

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659537

研究課題名(和文) 胎児に対する新規の同種異系幹細胞移植システムを用いた治療戦略の創成

研究課題名(英文) Prenatal treatments with bone marrow-derived stem cells for the fetal diseases

研究代表者

林 聡 (Hayashi, Satoshi)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60425717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期に進行する疾患に対する新たな治療法として胎児治療に着目し、研究を行った。マウスを用いた胎児幹細胞移植治療モデルにより、キメラマウスを作製した。このキメラマウスに対し、細胞移植を行いドナーキメリズムの増幅について検討した。ドナーマウス由来の骨髄単核球を代謝異常症マウスの胎仔腹腔内もしくは卵黄嚢静脈内へ移植し、その生着率の向上や治療効果を検討した。これらの検討により胎児期における免疫寛容獲得のメカニズムについて検討を行い、胎児に対する細胞治療のモデルを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on a novel therapeutic approach to genetic diseases. We investigated the donor cell chimerism by implantation of hematopoietic stem cells in the disease model mice, and evaluated therapeutic effect by survival of donor cells after transplantation of bone marrow cells. We show availability of cell-based therapy on the disease model animal by demonstrating acquisition of immune tolerance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：胎児医学 免疫寛容 細胞移植 前臨床研究

1. 研究開始当初の背景

胎児期は免疫系の発達が未熟であり、外界からの抗原に対して拒絶反応が起こらず、また免疫系発達の過程において、胎児がその抗原にさらされると免疫学的寛容(免疫トレランス)が獲得される。これは、自然発生した多胎の動物において証明されており、また動物モデルにおいても胎児に移植された細胞に対する免疫トレランスが獲得されることが証明されている。これらから、胎児期に放射線、化学療法などの前処置を行わずにHLAが適合していないドナー細胞を移植しても免疫学的寛容が獲得されることが理論上可能であり、従来 of 骨髄移植に伴う危険性を少なくすることが可能であるだけでなく、HLA 適合に関わらず多くのドナー細胞が移植に利用することが可能となることが期待される。

また、最近では造血幹細胞が造血系以外の種々の細胞に分化しうるものが数多く報告され、さまざまな組織や臓器に対して造血幹細胞を利用する細胞療法・再生医療の可能性が議論されるようになった。以上より、造血幹細胞を用いた胎児移植は、出生前診断が可能である遺伝性血液疾患のみならず、筋ジストロフィーなどのさまざまな遺伝性疾患に対する胎児治療として大変期待される。遺伝性血液疾患に対する現在の有効な治療方法として造血幹細胞移植があげられるが、HLA 適合ドナー提供者が少ないこと、また放射線照射あるいは化学療法による移植前処置による副作用が問題とされている。そのためこれらの疾患に対する細胞移植治療には限界があ

るため、これらの疾患の家族歴をもつ多くの夫婦は妊娠を断念あるいは妊娠しても妊娠継続を躊躇するケースが多く、夫婦に与える精神的負担も大きい。

人工多能性幹細胞(iPS)を含む遺伝子導入技術を用いた再生医療が期待されているが、遺伝性疾患のなかには胎児期に病状が進行するため、胎内で致死や機能障害をきたすものも多く、課題が残されている。これに対して胎児期の細胞治療においては、成人に比して少ない細胞数で十分であり、あらかじめ投与する細胞を準備することができる大きなメリットがある。これまでの研究から、ドナー由来の造血幹細胞を胎児期に移植することによって生着させる手法を確立している。この免疫寛容の獲得を利用すれば、同じドナー由来の細胞や組織の移植も生後に免疫抑制剤を使うことなく可能であり、極めて理想的な移植治療となる。

実際に欧米では、遺伝性血液疾患と診断された罹患胎児に対して造血幹細胞の移植が行なわれ、1995年に初めてX連鎖SCIDにおいて行われた移植では有効な成績が得られている。最近では、骨髄や脂肪組織中に筋、神経、骨、軟骨、脂肪などに分化する間葉系幹細胞が存在することが知られ、これらの細胞治療が注目されている。これらの細胞を胎児期の移植治療に応用することが可能であれば、胎児治療は遺伝性血液疾患だけでなく、先天性代謝性疾患、骨・軟骨系疾患・筋・神経疾患に対しても治療が可能な新しい治療法として期待される。外国に

おける研究ではマウス、ラット、ヒツジ、サルなどを用いた研究が行われているが報告された論文は少数である。これまでの研究ではドナー細胞のキメリズムの成立とドナー細胞特異的な免疫トレランスの獲得については示されたが、その機序についての基礎的な研究は十分とはいえない。またこれらの動物モデルでは有効な治療結果を得るのに十分な高いレベルのキメリズムの維持は困難な結果であり、臨床に応用できる段階ではなかった。今後はトレランス獲得のメカニズムの基礎的研究とこれらの基礎研究をもとにして、治療効果が期待される高いレベルのキメリズムの獲得が可能な新しい胎児移植法の開発が課題であった。

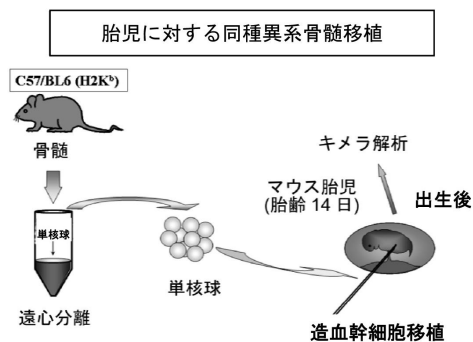
2. 研究の目的

先天性代謝異常症などの遺伝性疾患のなかには、胎児期にすでに病状が進行して胎児由来の細胞を増殖させて遺伝子導入するなどの時間的な猶予がない疾患も多い。細胞治療はあらかじめ準備することが可能であり、胎児期に進行する病態の増悪を軽減する、免疫寛容が成立しているため抗癌剤等の免疫抑制剤が不要である、細胞数が少なくてよい、癌化しないことが確認されている細胞を使用することができる等の利点がある。特に造血幹細胞が生着した場合においては、同じドナー由来の細胞や臓器が生後に拒絶されないことは特筆すべき特徴である。本研究では、ドナー造血幹細胞を胎児期の疾患動物に生着させて直接治療効果を確認、二次的なドナー由来の間葉系幹細胞の移植で、新

しい治療法を確立することが目的である。胎児期に行われる再生医療に対しては、既に確立されている幹細胞移植を応用する意義は大きい。

3. 研究の方法

マウスを用いた胎児幹細胞移植治療モデルにより、キメラマウスを作製した。このモデルは既に諸研究報告により確立されたものである。このキメラマウスに対し、侵襲の少ないプロトコルを用いた細胞移植によりドナーキメリズムの増幅について検討した。ドナーマウス由来の骨髄単核球をBALB/c マウスおよび代謝異常症マウス腹腔内もしくは卵黄嚢静脈内へ移植し、その生着率の向上や治療効果を検討した。



4. 研究成果

疾患マウスを用いた幹細胞移植モデルの確立

疾患マウスを用いて胎児幹細胞移植治療を行い、これらの治療法により疾患の症状の治療効果について検討を行った。マウス胎児への細胞移植後、免疫組織化学を用いた組織染色を行い、移植細胞の胎児への生着率を検討し、幹細胞移植モデルを確立できた。

免疫トレランスのメカニズム解明

C57/BL6 マウスの骨髄から採取した単核球を 5 or 20×10^6 細胞/胎児に調製した後、胎児疾患マウス(代謝病疾患マウス)の胎齢 14 日目のマウス胎仔の腹腔内もしくは卵黄嚢静脈内に投与を行った。胎齢 20 日に分娩となった新生仔マウスを飼育し、生後 4 週間目となる時期にマウス末梢血を採取し、単核細胞を抽出したのちドナー特異的な抗体を結合させたのち、フローサイトメトリーを用いてドナー細胞の生着率について分析を行った。

これらの検討により胎児期における免疫寛容獲得のメカニズムについて検討を行い、胎児に対する細胞治療のモデルを示すことができた。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 聡 (Hayashi Satoshi)

独立行政法人国立成育医療研究センター

生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：60425717

(2)研究分担者

梅澤明弘 (Umezawa Akihiro)

独立行政法人国立成育医療研究センター

生殖・細胞医療研究部・部長

研究者番号：70213486