

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792013

研究課題名（和文）羊膜由来幹細胞の移植による網膜機能の再生

研究課題名（英文）Regeneration of retinal function using human amnion cell-derived neural progenitors.

研究代表者

北原 由紀 (KITAHARA YUKI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30360176

研究成果の概要（和文）：

羊膜は妊娠時、母体の子宮内で胎児を包んでいる膜で、出産時に排出され、処分されるものである。帝王切開で得られた羊膜は、眼表面疾患の治療のために既に広く移植されている、臨床応用されている膜である。この羊膜からは多能性幹細胞を分離することができる。羊膜由来多能性幹細胞は、網膜下に移植することで網膜を構成する細胞へ分化する能力を持つ事が証明された。また、網膜電図上、網膜機能の回復の可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Human amniotic membrane is already broadly transplanted to the ocular surface, the supply is abundant and is easy to obtain. Human amnion cell-derived neural progenitors can be isolated and cultured from human amnion obtained during cesarean section under the informed consent. Human amnion cell-derived neural progenitors obtain long-term survival in the subretinal space and possess the potential of differentiating to retinal cells. Regeneration of retinal function was suggestive using electroretinogram.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：再生医学、網膜再生、神経幹細胞、羊膜由来幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

現在、網膜変性疾患は治療方法がなく、失明の上位をしめる。新しく神経幹細胞を移植し、変性脱落する網膜細胞に代わって、網膜を構成する細胞に分化させる事ができれば、失われた視力を取り戻すことができる可能

性がある。

欧米での網膜再生研究の分野では、死産等で得られるヒト胎児の脳や網膜から神経幹細胞を分離し、網膜移植による網膜再生が試みられている。これらの研究の多くは胎児脳や網膜由来の神経幹細胞を網膜に移植し、それらが神経幹細胞として生着し、分化する可

を主としていて、形態とマーカーで評価している段階である。網膜機能の再生を研究は未だ実現されていない。

日本国内では、死産のヒト胎児であっても、研究のために細胞を入手することは倫理上も法律上も困難である。一方で羊膜は、日本でも多量に入手可能であり、既に眼科の他分野で臨床の治療で使用されており、倫理上の問題もない。

ヒト羊膜からは神経細胞に分化する能力を持つ神経前駆細胞、SP細胞を分離することができる。しかし、これら羊膜由来の神経幹細胞を用いた網膜再生医療に関する研究の報告はない。

## 2. 研究の目的

出産により得られる羊膜を由来とする神経幹細胞を用い、変性した網膜細胞の再生、網膜機能再生が可能であるかを評価する。

本実験では、宿主にマウスを用いる。

網膜下に移植された神経幹細胞は、宿主の免疫応答を抑制すれば網膜下の移植局所で生着し、宿主網膜内に遊走し、網膜の構成細胞へと分化する可能性がある。これらの分化した細胞が、宿主のほかの網膜構成細胞とシナプスを形成し、信号の伝達が可能となれば、機能的にも網膜は再生される。特に、変性網膜内で神経幹細胞から分化した細胞が変性した細胞へと置き換わることができれば、網膜変性症は治療できる。

本研究は、量的にも、倫理的にも入手しやすい羊膜を由来とする神経幹細胞を用い、移植した神経幹細胞が生着、分化するかを評価し、さらに機能的にも網膜再生がなされるかを評価することを目標とした研究である。したがって、ES細胞や胎児細胞、患者自身の脳や眼内の神経幹細胞を用いる神経再生よりもはるかに、臨床応用化しやすく、意義が大きいと考えられる。

## 3. 研究の方法

羊膜由来神経幹細胞は、羊膜から採取した羊膜細胞を培養し、適切な条件の下で神経幹細胞への分化を誘導することによって得られる。ヒトの場合には文書によるインフォームドコンセプトのもとで、帝王切開で得られた羊膜を用いる。

現在のところ、羊膜間葉細胞とSP (side population) 細胞に神経への分化能があることがわかった。羊膜間葉細胞はそのものに神経前駆細胞としての性質があり、SP細胞は神経幹細胞としての性質を持つ事がわかっている。

本研究では宿主にマウスを用いるため、ヒト羊膜由来の細胞をドナーとすると異系移植となるため、同種異系移植モデルとしてマウス羊膜由来の細胞から神経幹細胞の分化を誘導することも同時に試みる。

網膜下で羊膜由来神経幹細胞が生着し、分化するかを検討するため、マウスを宿主とし、ヒト羊膜由来神経幹細胞をドナーとして網膜下に移植する。ドナー細胞はあらかじめ移植前にPKH26にて生体染色してマーキングして、移植後に免疫組織化学的に評価できるようにしておく。

正常免疫のC57BL/6マウスの正常(変性のない)網膜に移植することで、免疫学的拒絶反応が起こるかを検討する。マウス網膜下へのヒト羊膜由来神経幹細胞の移植後、一定期間ごとに眼球を摘出し、非特異的免疫反応をみるために好中球マーカーで切片を染色し、好中球の動態をみる。細胞性免疫をみるためにT細胞マーカー(CD4、CD8)で染色し、解析する。液性免疫をみるために宿主の血清を一定期間ごとに採取し、ドナー特異的免疫グロブリンをELISAにて測定する。(陽性コントロールとしてC57BL/6マウスにヒト羊膜由来神経幹細胞を皮下注射し、同様の期間ごとに採血をして、ドナー特異的免疫グロブリンをELISAにて測定する)。

ドナーであるヒト羊膜由来神経幹細胞が拒絶された場合には、免疫を抑制したC57BL/6マウスの正常網膜下に同様の方法でヒト羊膜由来神経幹細胞を移植し、C57BL/6マウスの正常な網膜下という環境でヒト羊膜由来神経幹細胞が生着できるか検討する。ドナー細胞が拒絶された場合に、ドナー細胞が異種移植で免疫学的拒絶反応を起こさず、生着する免疫抑制剤(シクロスポリン)の投与量はマウスを使用した予備実験ですでに分かっている。

C57BL/6マウス網膜下への移植後一定期間ごとに眼球を摘出し、神経幹細胞マーカー、神経線維マーカーなどにて染色し、ドナー細胞の生着期間と、それらが神経へ分化する能力を失わずにいるか、実際に分化していくのかを免疫組織化学的に検討する。また、網膜を構成する細胞マーカーで染色し、網膜のどの構成細胞に分化する能力を持つのかを検討する。

免疫を抑制した網膜変性モデルマウス(C57BL/6マウスのバックグラウンド)の網膜に羊膜由来神経幹細胞を移植することで変性網膜下という環境で羊膜由来神経幹細胞が生着できるかを検討する。マウスの正常網膜下移植の実験と同様に、変性網膜下移植後一定期間ごとに眼球を摘出し、神経幹細胞マーカー、神経線維マーカーなどにて染色し、ドナー細胞の生着期間と、神経へ分化する能力を失わずにいるか、実際の分化の程度、網

膜のどの構成細胞に分化するか、を検討する。羊膜が、免疫寛容組織な可能性があるため、分離したヒト羊膜由来幹細胞表面におけるPD-L1やFasL、GITR-Lといった免疫抑制性分子の発現を解析し、ヒト羊膜由来神経幹細胞自体に免疫を抑制しうる能力を持っているかも検討する。

次に、羊膜由来神経幹細胞が、障害された網膜を機能的に回復させることができるのかを検討する。網膜変性モデルマウスに既に決定した投与量のシクロスポリンで免疫を抑制し、ヒト羊膜由来神経幹細胞や、マウス羊膜由来神経幹細胞を変性網膜下に移植する。網膜下移植後一定期間ごとに網膜電図を記録する。網膜変性モデルマウスは、ヒトの網膜電図のように変性が緩やかに進行するモデルを用いるため、僚眼をコントロールとした。移植後の網膜電図の振幅や潜時を定期的にコントロールと比較し、機能が回復していくかを検討する。移植手技自体による変化を除外するために、C57BL/6マウスにPBSを注入した眼球を作成し、同様の検討を行う。網膜電図を記録した後は各々の眼球を摘出し、病理組織学的、免疫組織化学的に網膜が再生されているかを同時に評価する。また、シクロスポリンによる拒絶抑制ではなく、PD-L1やFasLといった免疫制御性分子の発現調節により拒絶抑制を試みる。更に、GITR-Lの機能調節により幹細胞拒絶部位に制御性T細胞をリクルートして免疫調整することも試みる。

#### 4. 研究成果

再生医療で使用できる可能性のある細胞のうち、ヒトの羊膜からの分離に成功している細胞には2種類ある。即ち羊膜由来神経前駆細胞、羊膜由来SP細胞(幹細胞)である。

##### <ヒト羊膜由来神経前駆細胞>

ヒト羊膜由来神経前駆細胞においては、重症免疫不全マウスの網膜下への移植では、移植された網膜下で神経幹細胞マーカーを発現しており、6ヶ月以上網膜下に生着していることが確認された。生着した神経前駆細胞の一部は、ロドプシン等の視細胞マーカーを発現することを確認できた。網膜変性疾患で変性する細胞は主に視細胞であるので、このヒト羊膜由来神経前駆細胞を使用することで網膜変性症を治療できる可能性があることになる。一方、正常免疫を持つ宿主の網膜下に同じヒト羊膜由来神経前駆細胞を移植した時には、4週間後、移植した細胞は網膜下から消失していた。このことから、免疫を抑制しな

ければ、移植細胞は拒絶されることがわかり、マウスへの異種移植を成功させるためには免疫抑制が必要であることがわかった。

##### <ヒト羊膜由来SP細胞(幹細胞)>

ヒト羊膜由来SP細胞(幹細胞)においては、*in vitro*では炎症性サイトカインを暴露することにより、免疫学的拒絶反応に関わるMHCクラスI、クラスIIが共に発現することがわかった。しかし、発現は可逆的であった。このことは、ヒト羊膜由来SP細胞の移植手術後、炎症反応が強い場合には移植細胞は拒絶される可能性があることを示唆している。しかし、炎症反応が軽微で、短時間で消炎された場合には、このヒト羊膜由来SP細胞に対しては免疫学的拒絶反応は起きない可能性もあるといえる。

*in vivo*での、ヒト羊膜由来SP細胞のC57BL/6マウスを宿主とした異種網膜下移植では、正常免疫を持つ宿主であっても4週間は移植細胞が生着し、MHC抗原を発現しなかった。このことからヒト羊膜由来SP細胞はヒト羊膜由来神経前駆細胞と異なり、異種網膜下移植においては免疫抑制を要しないことがわかった。異種移植のほうが、同種異系移植よりも免疫学的拒絶反応が起こりやすいことを考慮すると、この結果は、臨床応用を考える段階において、患者への重大な負担となる免疫抑制剤投与を要しない可能性、免疫学的拒絶反応が起こらない可能性を示唆する重要な結果である。

また、免疫を抑制した網膜変性モデルマウス(C57BL/6マウスのバックグラウンド)の網膜下へのヒト羊膜由来SP細胞の異種移植では、ヒト羊膜由来SP細胞は6カ月にわたり、長期に生着し、視細胞マーカー、特に視力や色覚、明所視(日常生活で用いられる視機能)に関わる錐体細胞のマーカーであるオプシンを発現していたことがわかった。この結果は、ヒト羊膜由来SP細胞をドナーとして網膜下に移植手術をし、その細胞が生着し、宿主網膜と共に機能した場合、光覚を取り戻せるだけでなく、形態覚、色覚など、視機能の質も獲得できる可能性が示唆される。ヒトの網膜変性の再生医療にとって非常に有用な結果である。

実際に移植されたヒト羊膜由来SP細胞が宿主網膜下で生着するだけでなく、網膜機能再生を果たせるかについては、宿主である網膜変性モデルマウスの網膜電図を測定して評価した。網膜電図を用いた機能解析においては、網膜変性モデルマウスにヒト羊膜由来SP細胞

胞を異種移植後、6か月で網膜機能の改善がみられた個体が確認され、ヒト羊膜由来SP細胞の網膜下移植により宿主の網膜機能を回復できる可能性を示唆する結果を得た。

量的にも倫理的にも入手しやすく、臨床応用しやすいヒト羊膜を由来とする神経幹細胞を用いて、免疫抑制せずに、移植により網膜の機能的な再生ができる可能性を示唆するこれらの結果は、再生医学においてその意義は大きい。

〔その他〕

日本医科大学眼科研究室のホームページ

<http://www.nms.ac.jp/nms/ganka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北原 由紀 (KITAHARA YUKI)

日本医科大学・医学部・眼科

研究者番号：30360176