

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659507

研究課題名(和文) 子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症・肺損傷に対する間葉系幹細胞治療法の開発

研究課題名(英文) New therapy for Periventricular leucomalacia using mesenchymal stem cell

研究代表者

滝 敦子 (Taki, Atsuko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20614481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新生仔SDラットにLPS15mg/kgを腹腔内投与し白質損傷モデルを作製した。対照群には同量の生理食塩水を投与した(saline群)。白質損傷ラットにMSC(LPS-MSC群)、MSC-CM(LPS-MSCCM群)をそれぞれ腹腔内投与し日齢12の脳室周囲白質量(脳切片のMyelin Basic Protein(MBP)染色量)と日齢6の脳組織の炎症性サイトカインレベルをコントロールと比較した。MBP陽性領域はLPS-MSC群で改善が認められた。炎症性サイトカインはLPS-MSCCM群、LPS-MSC群で低下した。炎症に起因する脳室周囲白質損傷に対してMSCは治療効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study we explore the therapeutic effects of MSC or MSC-conditioned medium (MSC-CM) on LPS-induced rat PVL model. Umbilical cord-derived MSC (UCMSC, Lonza) were purchased. Four-day old rats were intraperitoneally challenged with LPS to create PVL model and simultaneously treated by culture medium (control), MSC, or MSC-CM. Immuno-staining of myelin basic protein (MBP) in brain sections was used to evaluate cerebral white matter. Real time-PCR was performed to quantitate proinflammatory cytokine levels in 6-day-old rat brain. Postnatal LPS challenge caused PVL in rats, evaluated by increased inflammatory cytokines on day 6, and loss of MBP on day 12. Both MSC and MSC-CM significantly attenuated the cytokine level whereas only MSC attenuated loss of MBP. Our results showed that therapeutic potential of MSC due to anti-inflammatory effects in rat PVL model. The differences between MSC and MSC-CM suggests direct cellular effects are necessary for preventing MBP loss in PVL.

研究分野：発生発達病態学

キーワード：子宮内感染 脳室周囲白質軟化症 間葉系幹細胞 再生治療

1. 研究開始当初の背景

脳室周囲白質軟化症、慢性肺疾患は早産児の予後を悪化させる主要な合併症であり、その成因に子宮内感染症が関与している。しかし、現時点で有効な治療法は確立されていない。

2. 研究の目的

実験的子宮内感染症モデルを用いて、子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症における内在性幹細胞の障害と疾患成立への関与を検討し、間葉系幹細胞を用いた新たな治療法を開発する。

最終的には安全で効率的な再生治療法の開発を目指し、治療の鍵となる生理活性物質を同定すること、新たな創薬につなげることが目標である。

3. 研究の方法

1) 日齢4の新生仔ラットはヒトの妊娠28週前後に相当することを利用し、日齢4のラットに LPS15mg/kg を腹腔内投与し新生児白質損傷モデルを作成した。さらに日齢4に MSC を、日齢4、5、6、7に MSC の培養上清を腹腔内投与し、コントロールとして培地のみを投与した。日齢6、12の脳を採取し脳の白質量を MBP (myelin basic protein) 免疫組織染色で、脳の炎症性サイトカインを RT-PCR で評価した。

また MSC は PROMO CELL 社より購入した。

2) また、妊娠中に羊水腔内に LPS を投与し、子宮内炎症環境に曝された臍帯より得た MSC と、炎症に曝されていない正常子宮内環境より得られた臍帯 MSC を、増殖率を細胞カウント法にて、表面マーカーを FACS にて、遺伝子発現 DNA アレイにて比較した。

(倫理面への配慮)

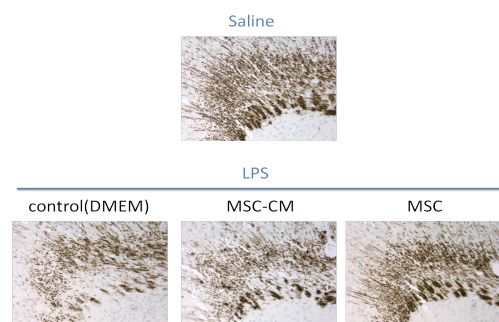
本研究は動物を対象とした実験であり、東

京医科歯科大学動物実験委員会のガイドラインに従った。文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」などの各種指針を遵守した研究を行い、動物は研究に最小限の匹数を用い、飼育保管基準をふまえて管理を行い、麻酔により最小の苦痛となるように配慮して行った。研究計画は既に倫理審査委員会の審査・承認を得ている。

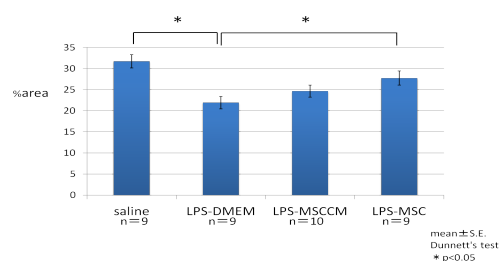
4. 研究成果

1) LPS 投与により日齢6の新生仔脳における TNF、IL1、MCP1 の炎症性サイトカイン、ケモカインの上昇を確認した。また日齢12における脳室周囲白質量の低下を確認した。MSC 投与により日齢12の白質量は有意に増加した。MSC 培養上清では有意な増加はみられなかった。また MSC 培養上清投与により日齢6の脳の炎症性サイトカインは減少した。今回の実験で MSC 培養上清が抗炎症作用を有していることが示された。また感染に起因する脳室周囲白質損傷に対して、出生後の MSC の投与が有効である可能性が示された。

MBP immunohistochemistry staining



% area of white matter (evaluated by the area of MBP-staining)



2) 子宮内炎症にさらされた臍帯から得た MSC は、正常子宮内環境より得られた臍帯 MSC よりも増殖が盛んであった。これに一致して細胞増殖に関連する遺伝子発現の増加をみとめた。また、表面マーカーにおいて CD44 の発現が低下した。DNA アレイでも上皮関連の遺伝子発現の上昇を認め、上皮間葉移行の傾向が示唆された。DNA アレイにおけるパスウェイ解析にて免疫原性上昇の可能性が示唆された。以上より、子宮内炎症にさらされているか否かで、MSC の遺伝子発現が異なることがわかった。今後遺伝子発現の違いが治療効果の違いにつながるか検討したい。

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7件)

(国内)

滝敦子、本多泉、森丘千夏子、杉江学、森尾友宏、森田育男．実験的子宮内感染症が臍帯由来間葉系幹細胞に及ぼす影響の検討、口頭、第59回日本未熟児新生児学会、2014.11.10-12、愛媛

本多泉、滝敦子、森丘千夏子、大島乃里子、鳥羽三佳代、小牧基浩、森尾友宏、宮坂尚幸、久保田俊郎、森田育男：LPS羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルにおける胎盤および新生仔の解析．第22回日本胎盤学会学術集会、2014.10.3-4、京都

森丘千夏子、滝敦子、本多泉、杉江学、森尾友宏、水谷修紀、森田育男．臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質

軟化症の治療法の開発．第50回周産期新生児学会．2014.7.13-15．千葉

Izumi Honda, Chikako Morioka, Atsuko Taki, Noriko Oshima-Sudo, Motohiro Komaki, Toshiro Kubota, Ikuo Morita. Assessment of placenta and neonatal complication in rat model of intra-uterine inflammation induced by intra-amniotic injection of lipopolysaccharide. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014.04.14-17. Kyoto.

本多泉、滝敦子、森丘千夏子、杉江学、土井庄三郎、水谷修紀、宮坂尚幸.LPS羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルを用いた研究 第1報：胎盤および新生児合併症の解析.第48回周産期・新生児医学会 2012.07.09大宮(埼玉)

滝敦子、本多泉、森丘千夏子、杉江学、宮坂尚幸、土井庄三郎、水谷修紀.LPS羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルと用いた研究：第2報：間葉系幹細胞を用いた治療法の開発.第48回周産期・新生児医学会.2012.07.08.大宮(埼玉)

本多泉、滝敦子、小牧基浩、岩崎剣吾、森田育男.ラット子宮内感染モデルを用いた新生児脳室周囲白質軟化症及び慢性肺疾患に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療の検討.第33回日本炎症・再生医学会 2012.07.06 福岡

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

滝敦子 (Taki, Atsuko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20614481

(3)連携研究者

小牧基浩 (Komaki, Motohiro)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：30401368

岩崎剣吾 (Iwasaki, Kengo)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40401351