

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659733

研究課題名(和文) ヒト臍帯血幹細胞の機能解析と脳性麻痺治療への臨床応用

研究課題名(英文) Basic science and cerebral palsy clinical research of human umbilical cord blood stem cells

研究代表者

前田 長正 (MAEDA, Nagamasa)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：60229309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：小児脳性麻痺児を対象とした自己臍帯血幹細胞輸血治療の治療メカニズムの解明を目的として、臍帯血中の幹細胞集団の同定とその出現率を解析し、治療効果の高い細胞集団の特定を行った。結果、臍帯血には未分化マーカー(Oct3/4, Nanog, Sox2, Tra-1-60, SSEA4など)を発現する特有の幹細胞が存在することが明らかとなった。また、未分化性維持培養を行うことで、未分化マーカー遺伝子の発現上昇を促し、造血幹細胞のみならず、臍帯血特有の幹細胞数を増加させることが可能となった。

研究成果の概要(英文)：To reveal the therapeutic effects of human umbilical cord blood stem cell transplantation on cerebral palsy, we identify stem cell populations in umbilical cord blood, and analyze the frequencies and percentages of the stem cell populations. We showed that unique stem cell populations expressed the stem cell markers, such as Oct3/4, Nanog, Sox2, Tra-1-60 and SSEA4. In addition, we demonstrated that stem cell marker genes were up-regulated and not only hematopoietic stem cells but also the unique stem cell populations were significantly increased under the culture for maintenance of undifferentiated state.

研究分野：生殖医学

キーワード：臍帯血 幹細胞 小児脳性麻痺 細胞輸血治療

1. 研究開始当初の背景

出産時に採取・保管された臍帯血幹細胞はその幼若性と多能性が高いことがよく知られている。

ラット脳梗塞モデル研究において、臍帯血幹細胞移植によって行動学的に改善効果があると報告がなされた。臍帯血幹細胞から神経前駆細胞、グリア前駆細胞が分化し、神経の修復や再生することが確認されており (*Cell Transplant.* 2009, 18: 985-998)、臍帯血幹細胞輸血を施行することで、損傷した側脳室周囲の神経幹細胞を賦活化することが期待されている。

また、ヒトの臨床試験でも、デューク大学で脳性麻痺等、難治性脳障害児に関する臍帯血幹細胞治療による臨床研究のオープンスタディが2004年から開始され、2009年2月で80症例が実施されている。脳性麻痺の治療効果について、臍帯血細胞投与1年後の正式な診察評価で8例中6例に改善効果がみられ、有害事象は見られなかったと報告があった。また、メキシコのRamirezらのグループは、脳性麻痺児に非自己(アロ)臍帯血を投与することにより、8例中6例(75%)に症状の改善を認めたという報告もある。

小児脳性麻痺児を対象とした自己臍帯血幹細胞輸血治療は、日本国内では高知大学が初めて「ヒト幹細胞臨床試験」として厚生労働省に認可を受けた(平成23年10月)。高知大学では小児脳性麻痺の発生確率が高まる在胎週数33週未満児を治療対象としているが、このような未熟児から採取された臍帯血幹細胞についての基礎的研究は全くされておらず、臨床研究に至るまでの治療メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1)臍帯血に含まれる幹細胞としては、造血幹細胞が一般的によく知られているが、近年、造血幹細胞以外の幹細胞として、様々な細胞系譜に分化し得る多能性幹細胞の存在について複数の報告がなされた。高知大学医学部附属病院で分娩時に採取された在胎週数の異なる臍帯血および研究用ヒト臍帯血幹細胞を用いて、臍帯血特有の幹細胞集団の同定とその出現率を解析し、治療効果の高い細胞集団の特定を行う。

(2)臍帯血幹細胞は、他の体性幹細胞と比較してその幼若性と多能性が高いことが知られているが、増殖性が低いために、臍帯血幹細胞の体外増殖培養法は未だ確立されていない。幹細胞の未分化性を維持したまま増殖させる新たな培養方法を開発することで、細胞数の少ない早産児の臍帯血であっても、安定的に幹細胞を分離・保管することが可能となれば、より効果的な臍帯血幹細胞輸血治療へ発展させることができると考えられる。

(3)基礎的解析がなされた臍帯血幹細胞を用

いて、小児脳性麻痺児の自己臍帯血幹細胞輸血治療を行うことで、臍帯血幹細胞による治療メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1)高知大学医学部附属病院で採取された臍帯血幹細胞(高知大学医学部倫理委員会承認済)および研究用ヒト臍帯血幹細胞(理研Cell Bank)を用いて下記の特性解析を行った。

未分化マーカー遺伝子の発現解析

臍帯血幹細胞からRNA精製を行い、未分化マーカー遺伝子(Oct3/4, Nanog, Sox2)について、RT-PCRによる発現解析を行った。

未分化細胞表面マーカー解析

未分化細胞表面マーカー(Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA4)については、免疫蛍光染色した後、Flow cytometryおよび共焦点顕微鏡を用いて解析を行った。

(2)新規未分化性維持培養として、フィーダーフリー培養(マトリゲルをコートした培養ディッシュ上に臍帯血幹細胞を播種)を行った。培養後、7日目の臍帯血幹細胞を用いて、特性解析を行った。

未分化マーカーの発現解析

未分化マーカー遺伝子(Oct3/4, Nanog, Sox2など)については、real time PCRを用いて解析を行った。

未分化細胞表面マーカー解析

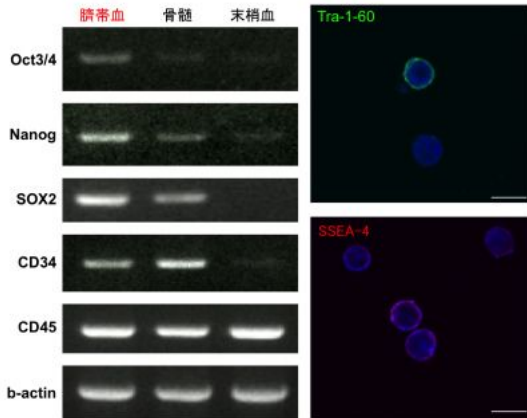
未分化細胞表面マーカー(Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA4)および間葉系幹細胞マーカー(CD44, CD73, CD90, CD105)については、免疫蛍光染色した後、Flow cytometryを用いて解析を行った。

(3)自己臍帯血幹細胞を所有する小児脳性麻痺児に対して細胞輸血治療を実施する。医師および理学療法士による臨床的評価と、頭部MRIなどの臨床検査により、臍帯血幹細胞輸血治療の安全性と有効性について解析を行う。

4. 研究成果

(1)臍帯血幹細胞を用いて未分化マーカー遺伝子の発現解析を行った結果、Oct3/4, Nanog, Sox2の発現を確認することができた(図1)。また、臍帯血幹細胞にはTra-1-60, Tra-1-81, SSEA4陽性細胞が認められたが(図1)成人末梢血単核球には認められなかったことから、臍帯血中には、特有の多能性幹細胞が存在することが示唆された。このような臍帯血特有の多能性幹細胞について、在胎週数が異なることで出現率がどう変動するのか、現在解析を進めている。

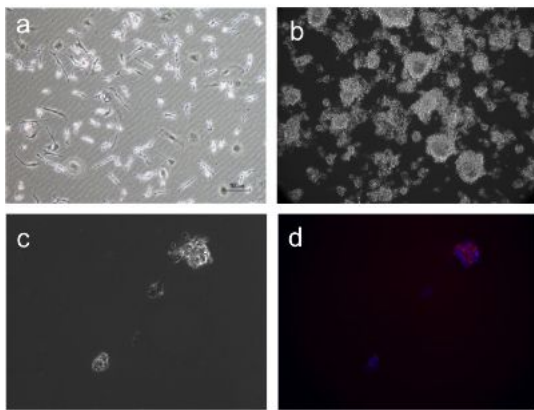
図1 臍帯血幹細胞の未分化マーカー発現解析



(2) これまでに報告されてきた培養方法に倣い (*Blood*. 2004, 103: 1669-75, *Exp. Hematol.* 2006, 34: 914-25) 臍帯血幹細胞の培養を行った。結果、幹細胞の増殖は認められず、従来の方法では臍帯血幹細胞の培養を行うことはできなかった (図 1a)。

そこで、ヒト ES 細胞などの多能性幹細胞で用いられているフィーダーフリー培養方法に倣い、臍帯血幹細胞の培養を行った。結果、多数の細胞塊の出現が認められた (図 1b)。

図2 臍帯血幹細胞の体外増殖培養

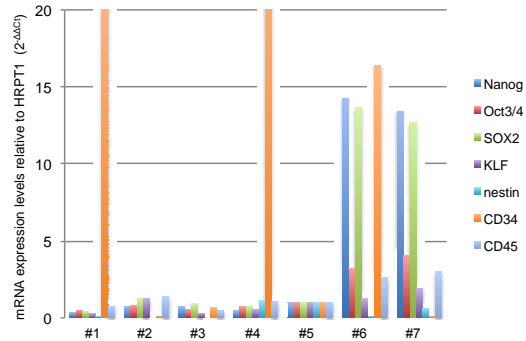


また、この細胞塊を未分化細胞マーカー抗体 (SSEA-4) で染色した結果、陽性であることが明らかとなった (図 1c, d)。

培養 7 日目に得られた個々の細胞塊について、real time PCR を用いて未分化遺伝子マーカー発現解析を行った結果、7 個の細胞塊の内 2 個の細胞塊 (#6, #7) で未分化マーカー遺伝子の高い発現が認められた (図 3)。また、一部の細胞塊 (#1, #4) では造血幹細胞マーカーである CD34 の発現が上昇していた。以上の結果より、培養によって出現する細胞塊は、個々でその特性が異なることが示唆された。

培養臍帯血幹細胞の特性について、さらに詳細に解析するために、Flow cytometry を用いて各種幹細胞の出現率を解析した。結果、臍帯血中に多く含まれることが知られてい

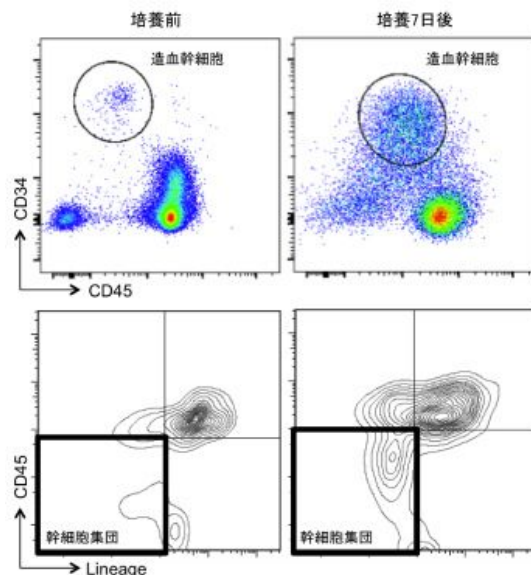
図3 培養臍帯血幹細胞の未分化マーカー遺伝子発現



る造血幹細胞 (CD34 陽性/CD45 弱陽性) については、培養前は 212 ± 30.2 細胞であったのに対し、培養後は $3,579 \pm 802.4$ 細胞 ($p < 0.01$) に増加していた。また、より未分化性の高い細胞群が含まれる幹細胞集団 (CD45 陰性/Lineage 陰性) の含有率については、培養前は $1.89 \pm 0.37\%$ であったのに対し、培養後は $11.04 \pm 3.82\%$ ($p < 0.05$) に増加していた (図 4)。

さらに、幹細胞集団中の間葉系幹細胞マーカー (CD44, CD73, CD90, CD105) や、未分化細胞マーカー (Tra-1-60, Tra-1-81) の発現について解析したところ、培養後、有意に上昇していることが明らかとなった。以上の結果より、在胎週数 33 週未満児など臍帯血量が少ない場合であっても、フィーダーフリー培養によって、造血幹細胞のみならず、未分化性の高い有用な幹細胞群も増殖させることで、より効果的な臍帯血幹細胞治療へ発展させることが可能と考えられた。

図4 培養臍帯血幹細胞の特性解析



(3) 臨床研究としては、小児脳性麻痺の発症が疑われる小児からの自己臍帯血幹細胞の採取およびその基礎的解析については順調に行われたが、現在のところ細胞治療には至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

Wang F, Shen Y, Tsuru E, Maeda N, *et al.*, Syngeneic transplantation of newborn splenocytes in a murine model of neonatal ischemia-reperfusion brain injury., *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 査読有, [Epub ahead of print], 2014, 1-6, doi: 10.3109/ 14767058.2014.935327

Maeda N, Izumiya C, *et al.*, Dienogest improves human leucocyte antigen-DR underexpression and reduces tumour necrosis factor- production in peritoneal fluid cells from women with endometriosis., *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 査読有, 177, 2014, 48-51, doi:10.1016/j.ejogrb.2014.03.019

Yamada R, Maeda N, *et al.*, Is it possible to diagnose malignancy from fluid in cystic ovarian tumors?, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 査読有, 171, 2013, 96-100, doi:10.1016/j.ejogrb.2013.08.003

Wang F, Maeda N, Tsuru E, Shen Y, *et al.*, The therapeutic potential of human umbilical cord blood transplantation for neonatal hypoxic-ischemic brain injury and ischemic stroke., *Acta Medica Okayama.*, 査読有, 66, 2012, 429-434, http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/66_6_429.pdf

〔学会発表〕(計56件)

都留英美、臍帯血幹細胞の未分化性維持培養の試み、第2回臍帯血による再生医療研究会、2014年7月12日、山王病院(東京都・港区)

前田長正、子宮内膜症発症メカニズムにおける逆流経血とその免疫学的監視機構、第66回日本産科婦人科学学術講演会、2014年4月18日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

沈淵、マウスの末梢血幹細胞からの抗腫瘍エフェクターの誘導およびその抗腫瘍効果の検討、第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

前田長正、子宮内膜症の謎を探る、第35回日本エンドメトリオーシス学会、2014年1月25日、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

都留英美、ヒト臍帯血幹細胞の同定と出現

率、第12回日本再生医療学会総会、2013年3月21日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

沈淵、マウスの脳性麻痺疾患モデルの樹立及び臍帯血幹細胞を用いた治療法開発の試み、第11回日本再生医療学会総会、2012年6月14日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kochi-ms.ac.jp/~cbsct/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 長正 (MAEDA, Nagamasa)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：60229309

(2) 研究分担者

沈 淵 (SHEN, Yuan)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：50294830

都留 英美 (TSURU, Emi)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：70380318