

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282143

研究課題名(和文) 生体機能材料としての羊膜と羊膜を新規治療デバイスとして用いた臨床応用

研究課題名(英文) Amnion as biological functional materials and the clinical application, used an amnion for as a new device

研究代表者

二階堂 敏雄 (Toshio, Nikaido)

富山大学・事務局・理事・副学長

研究者番号：50180568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト羊膜由来細胞(HAMD)は、増殖と分化能力を持ち、介入なしで容易に得られるので臨床使用に有望である。HAMDが免疫抑制因子(CD59とHLA-G)の発現で免疫抑制性能をもつ可能性がある。免疫抑制能をナチュラルキラー細胞(NK細胞)と単核球(Monocyte)の機能で評価した。HAMDは、NK細胞のK562細胞に対する細胞毒性をNK/HAMDの比率に依存して抑制し、HAMDの除去で回復した。NK細胞のNK受容体発現、IFN- γ 産生の減少、HAMDのIL-10発現、PGE2の増加の関与が見られた。Monocyteでもサイトカイン(TNF- α とIL-6)産生能が減少し、抑制能が示唆できた。

研究成果の概要(英文)：Human amnion-derived cells(HAMD) are considered to be a promising alternative cell source for clinical use because of their proliferation and differentiation ability. The cells can easily be obtained from human amnion without medical intervention. HAMD express immunosuppressive factors CD59 and HLA-G, implying that they may have an immunosuppressive function. We investigated the effect of HAMD on NK cell and monocyte function. HAMD inhibited the cytotoxicity of NK cells to K562 cells, depended on the NK/HAMD ratio. The inhibition of NK cytotoxicity was recovered by continuous culturing without HAMD. This inhibition was related to the decreasing of the activated NK receptors and the production of IFN- γ in NK cells, to the increasing of the expression of IL-10 and PGE2 in HAMD. Antibody to IL-10 or PGE2 inhibitor recovered the NK cytotoxicity. HAMD also suppressed the activity of TNF- α and IL-6 in monocytes. These data suggested that amniotic cells have immunosuppressive activity.

研究分野：人間医工学、生体医工学、生体材料学、再生医学

キーワード：ヒト羊膜由来細胞 多能性幹細胞 スフェラ形成 免疫抑制作用 NK細胞 Monocyte 抗炎症作用 乾燥羊膜

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療の技術が注目されているが、その細胞供給源として胚性幹細胞(ES細胞)やiPS細胞に注目が集まっている。しかしながらES細胞は多能性において非常に優れた細胞であるが、細胞供給源が不安定であり、拒絶反応、倫理的な問題があることから臨床応用には更なる改善が必要である。そこで我々は羊膜に着目し、羊膜細胞は神経、肝、心筋、軟骨細胞などへ分化することを明らかにしてきた。本課題では羊膜から幹細胞を同定して、羊膜幹細胞の特性を明らかにし、分化効率の改善をはかることにより、再生医療への可能性を検討する。更に羊膜自体を新規の方法で乾燥した乾燥羊膜を用いた臨床応用の用途拡大と、それに合成高分子を付加し、薬剤等を組み込んだ新規治療デバイスを開発する。

2. 研究の目的

ヒト羊膜由来細胞のナチュラルキラー細胞(NK細胞)と単球(Monocyte)に対する免疫抑制活性を検討する。

3. 研究の方法

1)NK-92MI(IL-2を発現しているヒトナチュラルキラーcell line)をeffector cell、K562(赤白血病line)をtarget cellとして用いた。NK細胞と羊膜由来細胞[不死化ヒト羊膜間葉系細胞:iHAM、不死化ヒト羊膜上皮細胞:iHAE、単離ヒト羊膜間葉系細胞:fHAM、単離ヒト羊膜上皮細胞:fHAE、増殖能を持つヒト羊膜間葉系細胞:HAM、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞:HUVEC(コントロールとして)]との間の相互関係を分析した。

2)NK細胞と羊膜由来細胞との比率を変えて1,3,5日間共に培養した。

NKの細胞毒性活性はNK細胞とK562細胞を1:2(effector/target)の比率で混ぜることでテストした。K562細胞の溶解はFACSによる5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE)染色の測定で検討した。

3)NK細胞受容体と免疫抑制因子の発現は、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)により検討した。

4)NK細胞と羊膜由来細胞を共に培養した時の培養上清中のインターロイキン-10(IL-10)andプロスタグランジンE2(PGE2)の量はELISAで検出した。

5)Human peripheral blood mono-nuclear cells(PBMC:ヒト末梢血単核細胞)はヒト羊膜由来細胞と1:10の割合でLipopolysaccharides(LPS)を加えて4hr培養した。Brefeldin AがPBMCs,LPSそしてヒト羊膜由来細胞の反応を止めるため、そしてタンパク分泌を抑制するために4hr処理した。MonocyteからのTNF-とIL-6分泌はFACS

で検討した。

4. 研究成果

1)羊膜由来細胞がNK細胞の細胞毒性の抑制をを引き起こす

NK細胞の細胞毒性をターゲットのK562細胞で解析した。羊膜由来細胞とNK細胞を10:1の割合で1,3,5日共培養した。3日目でHUVECs(Fig.1A)を除く羊膜由来細胞[iHAM cells(Fig.1B),iHAE cells(Fig.1C),HAM cells(Fig.1D)]がNK細胞の細胞毒性を抑制した。1日目で少し抑制し、5日目で

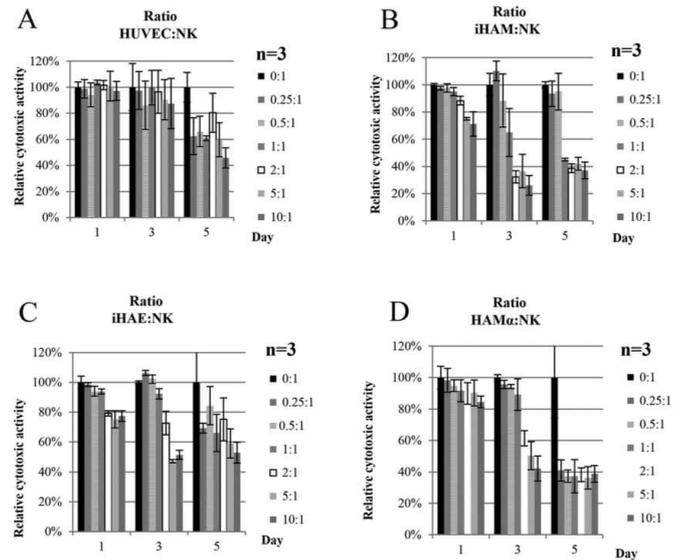


Fig.1 羊膜由来細胞を介したNK細胞毒性の抑制 NK細胞毒性の活性は、実行者(NK細胞)/標的(K562細胞)の比が1:10の割合で、HUVECs(A)、iHAM(B)、iHAE(C)、HAMa(D)とともに1,3,5日培養した後に解析された。HUVECs、羊膜由来細胞で培養されたNK細胞の細胞毒性は、NK細胞単独(100%)に対するK562死細胞の%として示された。結果は3回の実験の典型例で、平均±SEとして示した。

さらに抑制したが、NK細胞のダメージによるアーティファクトと思われた。また、その効果が羊膜由来細胞との比率(数)に依存して表れた。

2)羊膜由来細胞による活性化NKレセプターとNK機能の抑制

NKレセプター(NKp30, NKp44, NKp46, and CD69)の遺伝子発現が減少した(Fig.2)。

NKレセプターの1つNKG2Dは一部減少した。羊膜由来細胞によるNK細胞のIFN-産生遺伝子の抑制が見られた(Fig.2)。

羊膜由来細胞はNK細胞の細胞毒性を抑制し、免疫調整サイトカインのIFN-産生を抑制している。

3)羊膜由来細胞における抗免疫因子の発現の増加

NK 細胞と 1 日共培養した羊膜由来細胞では、IL-10 と COX-2 の遺伝子発現が増加した (Fig.3)。IL-4, IL-6, IL-8, HLA-G, と TGF-β は変化が無かった。□

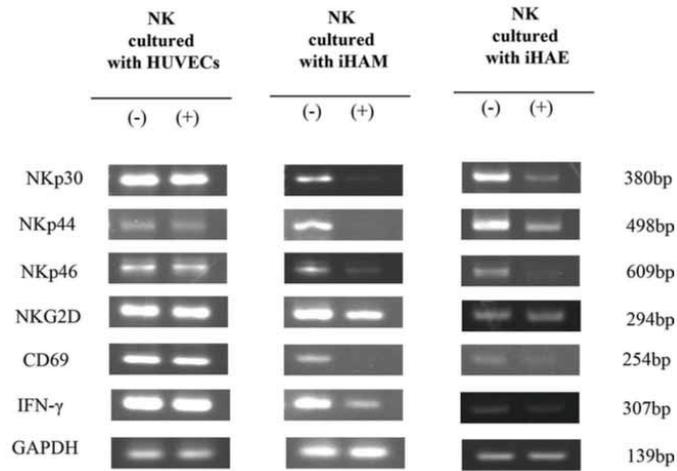


Fig.2 活性化 NK 細胞の受容体とサイトカインの発現。HUVECs (control) や羊膜由来細胞と共に 1 日培養した NK 細胞の活性化受容体 (NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D と CD69) とサイトカイン (IFN-g) の発現は、RT-PCR により調べられた。GAPDH を internal control とした。

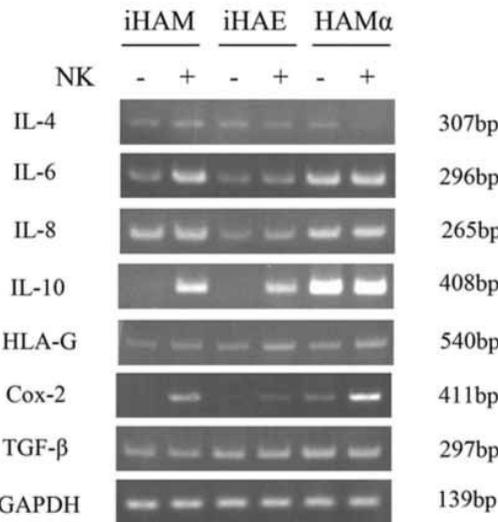


Fig.3 免疫抑制因子の発現。NK 細胞と 1 日共培養した羊膜由来細胞からの免疫抑制因子 (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, HLA-G, COX-2) の発現が調べられた。GAPDH を internal control とした。

4) ELISA による IL-10 と PGE₂ の定量
羊膜由来細胞による IL-10 と PGE₂ の分泌は、NK 細胞との共培養によって有意に増加した (Fig.4)。

5) IL-10, PGE₂ と Thioredoxin の特異的抑制剤による効果
anti-IL-10 と Indometacin を羊膜由来細胞と

NK 細胞の共培養に加えることで、NK 細胞の細胞毒性が増加した (Fig.5)。anti-Thioredoxin を共培養に加えても NK 細胞の細胞毒性は減少したままだった。

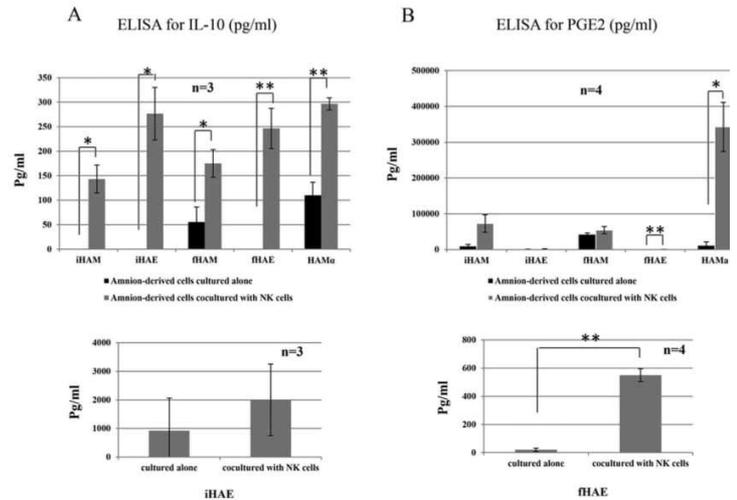


Fig.4 ELISA による IL-10 と PGE₂ の検出。NK 細胞と 3 日共培養した羊膜由来細胞からの IL-10(A) と PGE₂(B) の産生は、ELISA で調べられた。単独培養の羊膜由来細胞と NK 細胞と共培養した羊膜由来細胞の間の統計学的な有意差: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

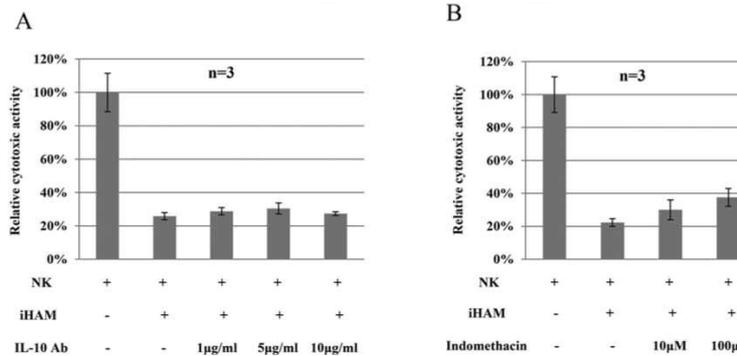


Fig.5 IL-10 と PGE₂ の特異的阻害剤によるブロック。K と iHAM 共培養に対して、IL-10 中和抗体(A)は 1, 5, 10 μ g/ml の濃度で加えられ、そしてインドメタシン(B)は 10, 100 μ M の濃度で加えられた。K 細胞の細胞毒性は、培養 3 日目に調べられた。

6) NK 細胞の細胞毒性の回復
羊膜由来細胞の NK 細胞に対する免疫抑制効果を確定するため (NK 細胞が弱ってしまったためでないことを確認するため)、共培養後の NK 細胞の回復を確認した (Fig.6A)

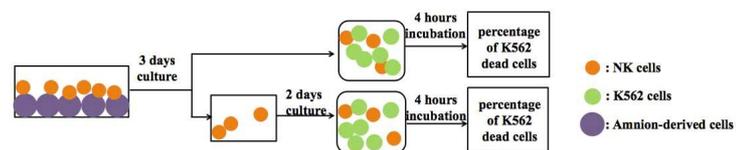


Fig.6 NK 細胞毒性の回復。K 細胞の細胞毒性は、3 日の羊膜由来細胞との共培養の後、NK 細胞が採取され、検査された。採取された NK 細胞は、羊膜由来細胞なしで再び 2 日培養された。それから、NK 細胞は細胞毒性分析のために採取された。

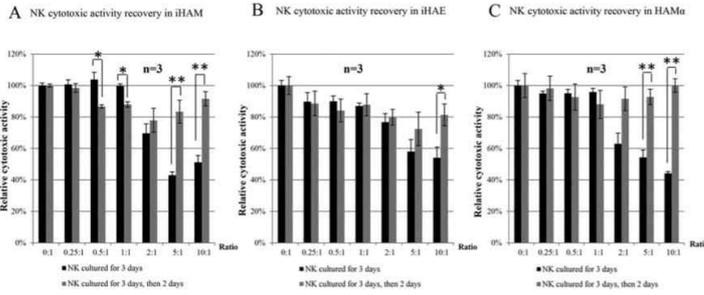


Fig.7 NK 細胞毒性の回復。NK 細胞毒性の FACS 分析は、3 日の iHAM(A)、iHAE(B)、HAMa(C)の共培養の後、2 日間の羊膜由来細胞なし(NK 細胞単独)の培養で行われた。NK 細胞の細胞毒性は、NK 細胞単独 (100%) に対して表された。3 日の抑制分析と 3 日の抑制分析 + 2 日の回復分析の間の統計学的な有意差: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

羊膜由来細胞との共培養後、羊膜由来細胞を除いて培養すると NK 細胞の細胞毒性が回復した(Fig.7)。

7) 羊膜由来細胞の Monocytes のサイトカイン分泌に対する抑制効果
Monocytes を LPS 出刺激し、羊膜由来細胞との共培養により TNF- と IL-6 の分泌を FACS で測定した(Fig.8)。
羊膜由来細胞は Monocytes による TNF- と IL-6 分泌を抑制した(Fig.9)。

以上より、羊膜細胞には免疫抑制活性があることを示した。

The production of TNF- α and IL-6 by monocyte

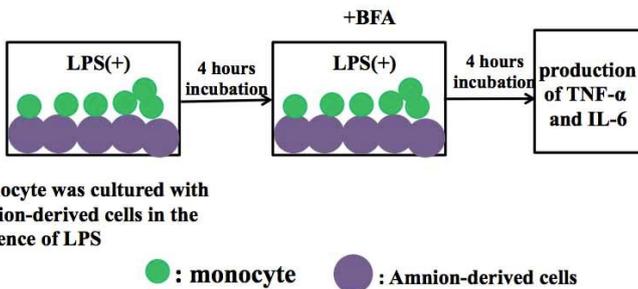


Fig.8 異なる提供者からの PBMCs は、LPS を加えた羊膜由来細胞と共培養された。iHAM、iHAE、HAM 細胞の共培養される単球の TNF- (B)と IL-6(C)の分泌は、FACS で分析された。TNF- と IL-6 の分泌は、単球単独 (100%) に対して表された。TNF- と IL-6 の羊膜由来細胞の単球に対する統計学的な有意差は、星印によって示された。

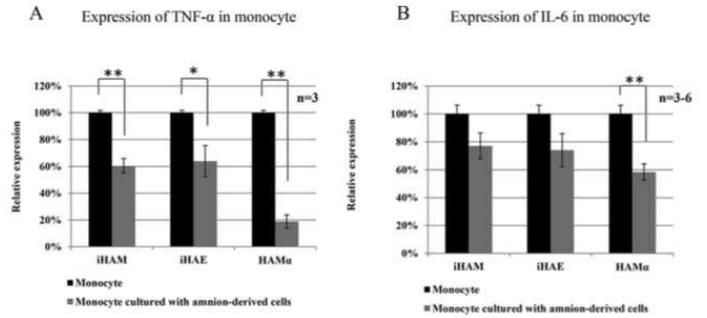


Fig.9 羊膜由来細胞がもたらす単球のサイトカイン産生の抑制。異なる提供者からの PBMCs は、LPS を加えた羊膜由来細胞と共培養された。4 時間後に、反応を止めるため、brefeldin A が加えられた。iHAM、iHAE、HAMa 細胞と単球の共培養で、TNF(A)、IL-6(B)の分泌は FACS で分析された。NF、IL-6 の分泌は単球単独 (100%) に比較して表された。膜由来細胞と単球の TNF、IL-6 の統計学的な有意差: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

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 11 件)

- 1) Hiroaki Tsuno, Makoto Noguchi, Motonori Okabe, Kei Tomihara, Toshiko Yoshida, Toshio Nikaido. Use of hyperdry amniotic membrane in operations for cleft palate: a study in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2015.01018>
- 2) 將積日出夫, 藤坂実千郎, 高倉大匡, 坪田雅仁, 金沢祐治, 館野宏彦, 岡部素典, 吉田淑子, 二階堂敏雄. 耳科手術における Hyperdry ヒト乾燥羊膜の使用経験. *耳鼻臨床*. 2014; 107(3):173-80.
- 3) Nikaido T. Characteristics of human amniotic membrane and Application to regenerative medicine. *Placenta*. 2014 Oct ; 35:A3-A4. ,DOI= 10.1016/j.placenta.2004.12.007
- 4) Tsuno H, Arai N, Sakai C, Okabe M, Koike C, Yoshida T, Nikaido T, Noguchi M. Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;117:e83-7. ,DOI=10.1016/j.oooo.2012.05.014
- 5) Koike C, Zhou K, Takeda Y, Fathy M, Okabe M, Yoshida T, Nakamura Y, Kato Y, Nikaido T. Characterization of amniotic stem cells. *Cellular Reprogramming*. 2014;16:298-305. ,DOI=10.1089/cell.2012.0021
- 6) Okabe M, Kitagawa K, Yoshida T, Suzuki T, Waki H, Koike C, Furuichi E, Katou K,

Nomura Y, Uji Y, Hayashi A, Saito S, Nikaido T. Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: physical, morphological properties, and safety as the new biological material. *J Biomed Mater Res A.*, 2014;102:862-70. ,DOI=10.1002/jbm.a.34753

7) Okabe M., Kitagawa K., Yoshida T., Koike C., Katsumoto T., Fujihara E., Nikaido T. : Application of 2-octyl-cyanoacrylate for corneal perforation and glaucoma filtering bleb leak. *Clinical Ophthalmology*, 7 :649-653, 2013., <https://www.dovepress.com/clinical-ophthalmology-journal>

8) Nakashima A., Yamanaka-Tatematsu M., Fujita N., Koizumi K., Shima T., Yoshida T., Nikaido T., Okamoto A., Yoshimori T., and Saito S. : Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. *Autophagy*, 9:303-16, 2013. ,DOI= 10.4161/auto.22927

9) Fujitani N., Furukawa J., Araki K., Fujioka T., Takegawa Y., Piao J., Nishioka T., Tamura T., Nikaido T., Ito M., Nakamura Y., Shinohara Y. : Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:2105-2110, 2013. ,DOI= 10.1073/pnas.1214233110

10) Otaka S., Nagura S., Koike C., Okabe M., Yoshida T., Fathy M., Yanagi K., Misaki T., and Nikaido T. : Selective isolation of Nanog positive human amniotic mesenchymal cells and differentiation into cardiomyocytes. *Cellular Reprogramming*, 15:80-91, 2013. ,DOI=10.1089/cell.2012.0021

11) Zhou K., Koike C., Yoshida T., Okabe M., Fathy M., Kyo S., Kiyono T., Saito S., and Nikaido T. : Establishment and Characterization of Immortalized Human Amniotic Epithelial Cells. *Cellular Reprogramming*, 15:55-67, 2013. ,DOI= 10.1089/cell.2012.0021

〔学会発表〕(計 24 件)

1) 岡部素典, 吉田淑子, 鈴木拓馬, 小池千加, 野村義宏, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. 乾燥羊膜と絹由来タンパクによる新規バイオデバイスの開発. 第 14 回日本再生医療学会総会; 2015March 19-21; 横浜.

2) Li J., Yoshida T., Koike-Soko C., Okabe M., Sugimoto J., Nikaido T. Immunosuppressive activity of amnion-derived cells. 第 14 回日本再生医療学会総会; 2015March 19-21; 横

浜.

3) 二階堂敏雄. ヒト羊膜の生物学的特性と臨床応用. 第 22 回日本胎盤学会・第 31 回日本絨毛性疾患研究会; 2014.Oct 3-4; 京都.

4) 吉田淑子, 岡部素典, 王 芳, 吉田佳奈美, 小池千加, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. ヒト羊膜間葉系細胞 (HAM) およびヒト臍帯静脈上皮細胞 (HUVEC) 移植後のマウス肝硬変モデル. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

5) 岡部素典, 北川清隆, 吉田淑子, 小池千加, 鈴木拓馬, 野村義宏, 林 篤志, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. ヒト乾燥羊膜を用いた再生医療材料の作製. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

6) 小池千加, 吉田淑子, 岡部素典, 二階堂敏雄. 羊膜由来幹細胞単離マーカーの探索. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

7) 王 芳, 吉田淑子, 岡部素典, 小池千加, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. CD24+SSEA4+human ovarian carcinoma cells possessed the nature of cancer stem cells. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

8) 李 佳麗, 小池千加, 杉本 潤, 吉田淑子, 岡部素典, 二階堂敏雄. Immunosuppressive activity of amnion-derived cells. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

9) Sang Meijie, Chika Koike, Toshiko Yoshida, Motonori Okabe, Toshio Nikaido, Human amnion epithelial cells expansion in vitro in a feeder cell dependent manner. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

10) 平田陽子, 吉田淑子, 周 凱旋, 岡部素典, 小池千加, 二階堂敏雄. 高親和性コリントランスポーター (CHT) 遺伝子導入ヒト羊膜上皮細胞の性質. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

11) 鳥越甲順, 吉田淑子, 吉田一晴. ヒアルロン酸 4 糖 (HA4) は末梢神経の再生を促進する: フィルムモデル法による検証. 第 13 回日本再生医療学会総会; 2014.Mar 4-6; 京都.

12) 吉田淑子, 岡部素典, Li Jiali, 小池千加, 吉田佳奈美, 吉田 聡, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. 羊膜上皮系幹細胞と羊膜間葉系細胞の生活習慣病に対する効果. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会; 2014.Mar 27-29; 栃木.

13) 岡部素典, 吉田淑子, 野上真紀子, 津野宏彰, 小池千加, 竹田祐治, 木村友厚, 野口 誠, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. ヒト羊膜幹細胞 問題点と特質点 . 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会; 2014.Mar 27-29; 栃木.

14) 吉田淑子. 羊膜 (プラセンタ) は生活習慣病, アンチエイジングに有効!. 第 14 回日本抗加齢医学学会総会; 2014.Jun 6-8; 大

阪.

15) 岡部素典. 羊膜を利用した再生医療はここまで進んでいる. 第 14 回日本抗加齢医学学会総会; 2014.Jun 6-8; 大阪.

16) 王 芳, 吉田淑子, 岡部素典, 小池千加, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. CD24+SSEA4+ovarian carcinoma cells exhibit self renewal ability and tumorigenicity. 第 35 回日本炎症・再生医学学会; 2014.Jul 1-4, 沖縄

17) 吉田淑子, 王 芳, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. 卵巣癌に存在する CD24(+)/SSEA4(+)細胞の特性. 第 73 回日本癌学会学術総会; 2014.Sep 25-27; 横浜.

18) 吉田淑子, Wang Fang, Zhou Kaixuan, 古市恵津子, 岡部素典, 吉田佳奈美, 齋藤 滋, 二階堂敏雄. ヒト卵巣癌由来 CD24(+)/SSEA4(+)細胞の特性. 日本解剖学会第 74 回中部支部学術集会; 2014.Oct 11-12; 石川.

19) Nikaido T. Application of Amniotic Membrane / Amnion-Derived Cells for Regenerative Medicine. 河北医科大学; 2014. Jun 5-13 ; 石家庄, 中国 .

20) Nikaido T. Application of Amniotic Membrane / Amnion-Derived Cells for Regenerative Medicine. 同済大学附属肺科医院; 2014. Jun 5-13 ; 上海, 中国 .

21) Nikaido T. Characteristics of Human Amniotic Membrane and Application to Regenerative Medicine. 浙江大学医学院附属第一医院; 2014. Dec 9; 杭州, 中国 .

22) 二階堂敏雄. 再生医学と研究倫理について. 平成 26 年度富山県試験研究機関研究員交流集会; 2014.Dec 30; 富山.

23) 二階堂敏雄. 細胞の甦り - 細胞や組織は再生可能か?. 富山大学しらゆり会総会; 2014.Aug 1; 富山.

24) 二階堂敏雄. ヒト羊膜の再生医療への応用. 第 3 回富山・バーゼル医薬品研究開発シンポジウム; 2014.Aug 12; 富山.

〔図書〕(計 1 件)

Koike C, Okabe M, Yoshida T, and Nikaido T. Therapeutic potential of amnion epithelial cells for diabetes. Perinatal Stem Cells.Springer, Editors: Atala, Anthony, Murphy, Sean V. (Eds.),2014; 23:253-257. ISBN 978-1-4939-1118-9

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: バイオコンジュゲートデバイス
発明者: 岡部素典, 二階堂敏雄, 吉田淑子, 葭田隆治, 古米 保
権利者: 国立大学法人、葭田隆治、古米 保
種類: 特許
番号: 特願 2013-136802
出願年月日: 平成 25 年 6 月 28 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称: MEDICAL SUBSTITUTE MEMBRANE, USE THEREOF, AND METHOD FOR REPAIR OF MEMBRANE TISSUE IN LIVING BODY.

発明者: 二階堂敏雄, 岡部素典, 吉田淑子, 遠藤俊郎, 林央周, 齋藤滋

権利者: 国立大学法人 富山大学

種類: 国際特許

番号: US 8,414,929

取得年月日: 9Apr13

国内外の別: USA

名称: DRIED AMNION AND METHOD FOR DRYING TREATMENT OF AMNION.

発明者: 二階堂敏雄, 吉田淑子, 岡部素典, 戸田文香, 北川清隆, 荒川雅彦

権利者: 国立大学法人 富山大学

種類: 国際特許

番号: US 8,932,641

取得年月日: 13Jan15

国内外の別: USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/saiseiigaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二階堂 敏雄 (NIKAIIDO TOSHIO)

富山大学・事務局・理事・副学長

研究者番号: 50180568

(2) 研究分担者

吉田 淑子 (YOSHIA TOSHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号: 00171421

岡部 素典 (OKABE MOTONORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号: 60283066

小池 千加 (CHIKA KOIKE)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号: 10523889

(3) 連携研究者

齋藤 滋 (SHIGERU SAITHO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号: 30254246

林 篤志 (Astushi Hayashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号: 20283773