

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462551

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた新規切迫早産治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for preterm labor using mesenchymal stem cells

研究代表者

久保田 俊郎 (Kubota, Toshiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50126223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在、対症療法しかない切迫早産や子宮内炎症によっておこる新生児の脳障害や肺障害に対して、間葉系幹細胞を用いた新規治療法の開発をめざし研究を行った。

間葉系幹細胞は、体に負担なく得られ倫理的にも問題の少ない臍帯や胎盤などから採取した。また、治療効果の高い細胞が取れる方法を検討した。今後の臨床応用に適した細胞として、臍帯由来間葉系幹細胞と絨毛膜由来間葉系幹細胞を用いることとした。ヒト絨毛膜由来間葉系幹細胞とその培養上清の早産モデルに対する治療効果の検討と、子宮内炎症が臍帯由来間葉系幹細胞に及ぼす影響について検討をおこなった。

研究成果の概要(英文)：We conducted this research to develop novel therapy for preterm labor and neonatal brain and lung complication associated with intra-amniotic inflammation.

We isolated mesenchymal stem cells from umbilical cords and placentae that could be collected by non-invasive procedure without ethical problem. We also adjusted the isolation method to get high quality cells. Umbilical cords derived mesenchymal stem cells and chorionic villi derived mesenchymal stem cells were used in this study because they were considered to suitable cells in clinical use. In the other hand, we established novel animal model of preterm labor and neonatal complications associated with intra-amniotic inflammation. Then assessed therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in these conditions. We demonstrated that mesenchymal stem cells could ameliorate local inflammation in the preterm labor model.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内炎症 間葉系幹細胞 切迫早産 脳室周囲白質軟化症 気管支肺異形成

1. 研究開始当初の背景

早産は 22 週以降 37 週未満で分娩となる周産期疾患であり、全妊娠の約 5%が早産となっている。早産の前段階である切迫早産は産科における入院患者の多数を占め、妊娠週数の早い段階でこの状態に至ると、長期入院となる事も多く、産科病床の慢性的な不足につながっている。早産の原因では感染・炎症が多くを占めるが、病原体そのものより、感染より惹起される免疫反応の過剰、炎症の遷延が根本的な病態として考えられるようになってきている。また、早産に起因する新生児後遺症には脳性麻痺や慢性肺疾患などがあり、患児の QOL を大きく損なう。これらの原因は早産にともなう未熟性、出生後の呼吸管理や感染の他に、在胎中に暴露される子宮内炎症の影響がある。切迫早産の治療には子宮収縮抑制剤が使われているが、新生児予後の改善に寄与しない。子宮内炎症の診断方法はいくつか研究が進んでいるが、治療法として娩出しかないのであれば、早産による未熟性の問題が解決できない。最良の方法は、子宮内炎症状態を解消し、子宮内環境を改善し妊娠期間の延長をはかる方法である。

一方、体の様々な部分から分離可能とわかっている間葉系幹細胞が、胎盤や臍帯などの胎児付属物からも得られることが知られている。間葉系幹細胞は、自己複製能、多分化能とともに、近年その抗炎症効果、免疫調整能で注目されている。これらの効果は、間葉系幹細胞が分泌する様々な因子により得られるとされており、幾つかはすでに切迫早産の治療として有効であったという報告がある。間葉系幹細胞の投与が切迫早産の治療に有効である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は間葉系幹細胞を用いた切迫早産の新規治療法の開発し、早産を減少させ新生児合併症を改善させることである。そのためには、治療効果の検証、より実用的な細胞の選定、安全性の確認が必要である。そこで本研究期間において臨床応用前のデータの蓄積を行った。具体的には周産期組織、培養細胞において間葉系幹細胞の抗炎症作用の確認、臨床応用可能な細胞の選定、早産動物モデルの確立、早産モデルおよび子宮内感染新生児障害モデルでの間葉系幹細胞の治療効果の検証を目的とした。

3. 研究の方法

すでに報告のある胎盤、臍帯からの間葉系幹細胞の培養方法を参考にし、質・量ともに安定して細胞が得られる方法を選択しプロトコル化した。間葉系幹細胞として矛盾しない性質を確認するため、表面マーカーの確認、分化能の確認、増殖能の確認を invitro でおこなった。得られた細胞の抗炎症作用については、混合リンパ球反応を用いた。また、

抗炎症作用については、間葉系幹細胞の分泌因子が多く含まれていると考えられる培養上清のみでも検討した。同時に、子宮内炎症にさらされた臍帯由来間葉系幹細胞と炎症に暴露されていない臍帯由来間葉系幹細胞の抗炎症作用に違いがないか、子宮内炎症ラットモデルを用いて、検討した。また、子宮頸部に炎症惹起物質であるリポポリサッカライドを局注し、子宮頸管炎から早産に至るマウスモデルを作成した。このモデルに絨毛膜板由来間葉系幹細胞を投与し、妊娠期間の延長効果を検討した。また、その培養上清を投与し、妊娠期間の延長効果を検討した。さらに、局所炎症の改善効果について、モデル動物組織を用いた定量的 RT-PCR 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) 絨毛膜板由来間葉系幹細胞の安定的採取法の確立

胎盤は、母体由来組織と胎児由来組織が複雑に入り組んでいる絨毛と胎児由来組織のみで構成される絨毛膜板、羊膜、臍帯から構成されている。組織量としては絨毛が一番多いが、ここから得られる間葉系幹細胞は分化能が低いものが含まれていた。また、母体が胎児由来の曖昧なものを臨床応用するのは難しいと考え、絨毛は除外した。絨毛膜板は胎児由来細胞がほとんどであり、組織量が得られ、酵素処理が容易であるという点で、量的に安定して採取可能であり、表面マーカーの発現、分化能が再現性良く確認できたため(図1) 有用な間葉系幹細胞源であると考えられた。また、臍帯は動物モデルにおいて確実に採取可能な組織であり、子宮内炎症の間葉系幹細胞の影響を検討する際には臍帯由来間葉系幹細胞を利用した。

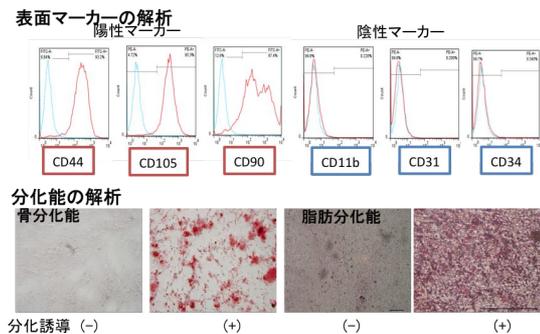


図1 絨毛膜板由来間葉系幹細胞の評価

(2) 絨毛膜板由来間葉系幹細胞とその培養上清の混合リンパ球反応による抗炎症作用の評価

間葉系幹細胞が免疫刺激により増殖する免疫細胞の増殖を抑制し、免疫調整能、抗炎症効果を発揮することは、以前より報告があった。我々の採取した細胞において、抗炎症作用があるかを、脾細胞と間葉系幹細胞の共培養の実験系で確認したところ、絨毛膜板由来間葉系幹細胞が骨髄由来間葉系幹細胞と同等に免疫細胞増殖抑制作用を有することを

確認した。しかし、培養上清だけでは、抑制効果は得られなかった。

(3) 早産モデルの作成

妊娠15日のICRマウス(妊娠期間18日間)を麻酔下に開腹し、子宮頸部に炎症惹起物質であるリポポリサッカライドを局注した。リポポリサッカライドの投与量は48時間以内にほぼ全頭が早産となるよう検討し、1μgとした。コントロールは同容量の生理食塩水の局注とした(図2)。早産の確認は、リポポリサッカライド投与後48時間後となる妊娠17日に再開腹し、初回開腹時に確認した胎嚢数が1つでも減少していた場合を、早産とした。また、胎児生存数の確認を行い、予後指標の一つとした。コントロール群(n=5)と実験群(n=6)では早産となる個体はそれぞれ0%と100%、胎児生存率は93%と56%であった。

(4) 早産モデルに対する絨毛膜由来間葉系幹細胞および培養上清の治療効果の検討

上記モデルに対し、ヒト絨毛膜由来間葉系幹細胞またはその培養上清を投与した際の早産率、胎児生存率、局所炎症抑制効果について検討した。



図2 実験の流れ

ヒト絨毛膜由来間葉系幹細胞の治療効果

ヒト絨毛膜由来間葉系幹細胞は、継代数3-5のものを使用し、 10^5 個を投与した。無知両群は溶媒を投与した。治療群(n=9)、無治療群(n=9)における早産率はそれぞれ22%、33%、胎児生存率はそれぞれ $63 \pm 12\%$ 、 $56 \pm 15\%$ (mean \pm S.E.M.)であった(図3)。有意差はえられなかった。実験間でのばらつきが大きく、有意差は得られなかったが、今後細胞の投与経路の検討、前処置による抗炎症効果の上昇などの工夫により、治療効果が期待できると考えている。

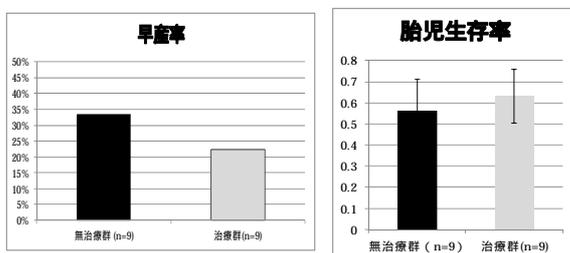


図3 絨毛膜由来間葉系幹細胞の治療効果

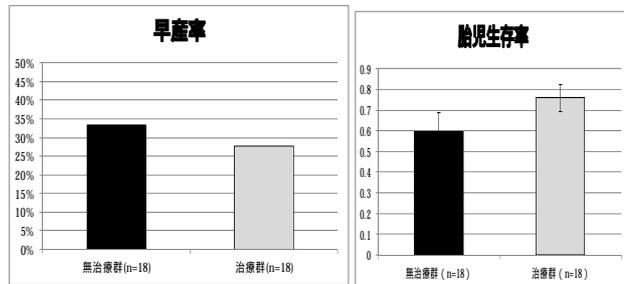
ヒト絨毛膜由来間葉系幹細胞培養上清の治療効果

母体に対する細胞治療の適応は臨床的に

ハードルが高いことを考慮し、培養上清による治療を試みた。培養上清は、培養液を無血清培地に切り替えて48時間後に回収し、20倍濃縮として使用した。概ね 10^6 個の細胞の分泌因子にあたる、 $300 \mu\text{l}$ を投与した。無治療群にはコントロールとして濃縮培地のみを投与した。

治療群(n=18)、無治療群(n=18)における早産率はそれぞれ28%、33%、胎児生存率はそれぞれ $76 \pm 7\%$ 、 $57 \pm 9\%$ (mean \pm S.E.M.)であった(図4)。有意差はないものの、治療群で胎児生存率の改善傾向を認めた。

図4 ヒト絨毛膜由来間葉系幹細胞培養上



清の治療効果

さらに、局所炎症について、子宮平滑筋および胎盤における炎症性サイトカインの発現を定量的RT-PCR法にて評価したところ、Il1b(胎盤、無治療群 4.9 ± 2.42 、治療群 1.5 ± 0.24 、子宮筋(同順) 2.6 ± 3.33 、 0.9 ± 0.53 mean \pm SEM)、Cox2(胎盤、無治療群 1.65 ± 0.41 、治療群 1.36 ± 0.36 、子宮筋(同順) 5.87 ± 3.99 、 1.06 ± 0.33 mean \pm SEM)で培養上清投与により改善傾向が見られたものの有意差はなかった。

明らかな早産率の減少を示せなかったものの、治療の可能性は示唆された。In vitroにおける抗炎症作用の結果に反して、培養上清による治療の方が胎児生存率の改善に寄与していた。これは、異種細胞の投与による免疫反応の影響で、間葉系幹細胞の炎症抑制作用がマスクされてしまった可能性があると考えている。今後、臨床応用も考慮し、培養上清による治療に主眼を置き、より抗炎症効果の高い分泌因子を得られるような細胞の前処置や、分泌因子の作用機序について検討を進めていく。

(5) 子宮内炎症が臍帯由来間葉系幹細胞に与える影響についての検討

間葉系幹細胞による治療を検討していくに当たり、より治療効果の高い細胞を選定する必要性が生じた。分娩後、新生児脳肺障害に対して胎児附属物由来間葉系幹細胞を適用する場合、自己由来間葉系幹細胞の採取が可能である。しかし、これらの細胞は児と同様の子宮内炎症に曝されていたはずである。この状況が間葉系幹細胞の培養や機能に影響しないかどうか検討を行った。以前より確立していた、ラット子宮内炎症モデルを用い、子宮内炎症に曝露された臍帯から得られた、

臍帯由来間葉系幹細胞(炎症曝露群)と正常妊娠経過で得られた臍帯由来間葉系幹細胞(正常群)の増殖率、表面マーカーを調べた。さらに、遺伝子発現を網羅的に解析した。

増殖率の違い

炎症曝露群と正常群では炎症曝露群において、増殖率が高かった(図5)。

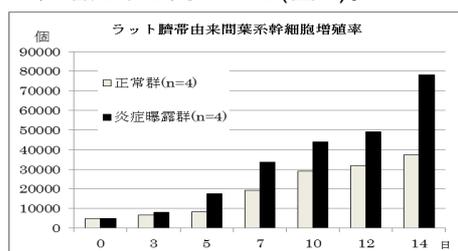


図5 ラット臍帯由来間葉系幹細胞増殖率の比較

表面マーカーの違い

表面マーカーは炎症曝露群において二峰性の発現(図6)となり、子宮内炎症曝露により新たなフェノタイプが生じている、または採取されやすくなっている可能性が示唆された。

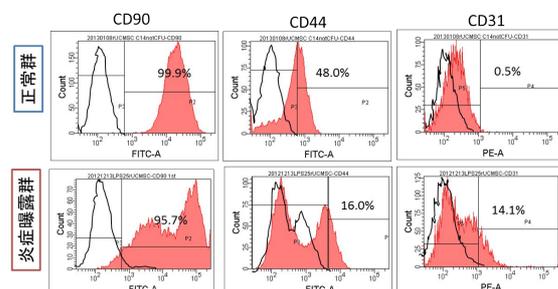


図6 ラット臍帯由来間葉系幹細胞表面マーカーの比較

遺伝子発現の違い

DNA array を行い、炎症曝露群で2倍以上上昇した遺伝子群に対する解析を行ったところ、細胞周期に関連する遺伝子群が有意に上昇していることがわかった。また上皮マーカーの発現が上昇しており、逆に上皮-間葉移行に関連する TGF、RTK などの遺伝子は低下していた。また、免疫拒絶や移植変態宿主病と関連する遺伝子群が有意に抽出されることが分かった。

炎症曝露後の組織から得られた間葉系幹細胞は正常組織から得られたものと性質が異なる可能性が示唆された。治療効果にどの程度影響するかに関しては、今後の検討課題である。

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 1件)

Izumi Honda, Atsuko Taki, Chikako Morioka, Motohiro Komaki, Naoyuki

Miyasaka, Noriko Oshima, Shachiko Iseki, Tomohiro Morio, Toshiro Kubota, Ikuo Morita Mesenchymal stem cells ameliorate intra-amniotic inflammation-related neonatal complications in rats Inflammation and Regeneration. 査読有、Vol.35, No.5, 2015, 261-268

[学会発表](計 9件)

森丘 千夏子、本多 泉、滝 敦子、森尾 友宏、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効果とその機序の解明 第51回日本周産期・新生児医学会学術集会 2015年7月10日~2015年7月12日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市)

本多 泉、大島 乃里子、宮坂 尚幸、久保田 俊郎、森田 育男 子宮内炎症環境が臍帯由来間葉系幹細胞に及ぼす影響の検討 第67回日本産科婦人科学会学術講演会 2015年4月9日~2015年4月12日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

森丘 千夏子、本多 泉、滝 敦子、杉江 学、小牧 基浩、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・新生児医学会学術集会 2014年7月13日~2014年7月15日 ヒルトン東京ベイ(千葉県・浦安市)

本多 泉、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回胎盤学会学術集会 2014年10月3日 都メッセ(京都府・京都市)

本多 泉、大島 乃里子、久保田 俊郎、森田 育男 脳室周囲白質軟化症の新規治療法の開発に向けた新生仔ラットモデルの作成と解析 第66回日本産科婦人科学会学術集会 2014年4月18日~2014年4月20日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

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 intrauterine inflammation induced by intraamniotic injection of lipopolysaccharide. The 18th International Vascular biology meeting 2014年4月14日~2014年4月17日 都メッセ(京都府・京都市)
Noriko Oshima-Sudo, Izumi Honda,

Ken-ichi Nakahama, Toshiro Kubota,
Ikuo Morita Tissue engineered
lymphatic microvessels using
cell-printing technology. The 18th
International Vascular biology
meeting 2014年4月14日~2014年4月
17日 都メッセ(京都府・京都市)
N Oshima-Sudo, I Honda, S Obayashi, M
Terauchi, K Nakahama, T Kubota, I
Morita Optimized method for
culturing endothelial colony forming
cells from human umbilical cord blood
and tissue engineered capillary
vessels using printing technology. 5th
Scientific Meeting of the Asia Pacific
Menopause Federation 2013年10月18
日~2013年10月20日 京王プラザホテル
(東京都・新宿区)
須藤 乃里子、本多 泉、久保田 俊郎、
森田 育男 リンパ管再生に向けた基礎
的検討 第21回日本血管生物医学学会学
術集会 2013年9月26日~2013年9月
28日 千里阪急ホテル(大阪府・豊中市)

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：
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

久保田 俊郎 (Kubota Toshiro)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・教授
研究者番号：50126223

(2) 研究分担者

大島 乃里子 (Oshima Noriko)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・助教
研究者番号：30611058

森田 育男 (Morita Ikuo)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・教授
研究者番号：60100129
(3) 連携研究者
()

研究者番号：