

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670515

研究課題名(和文)胎児に対する新規の同種異系幹細胞移植システムを用いた治療戦略の創成

研究課題名(英文) Exploit of an alternative stem cell transplantation in utero based on fetomaternal tolerance using allogeneic donor cells immunologically matched to the mother.

研究代表者

井原 規公 (Ihara, Norimasa)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・その他

研究者番号：50425716

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)：母子間相互に細胞が流入して長期に生着していること(microchimerism)や、臓器移植において移植片が非遺伝母由来HLA抗原(NIMA)であればHLA不適合でも生着しやすいことから、母と同系由来の幹細胞であれば良好に生着するという仮説のもと、疾患マウス胎仔への新たな移植治療法の効果を検証した。具体的にはホモのムコ多糖症マウスを妊娠した仮親に対して、母体にとっては同系であるが胎仔には異系である造血幹細胞を経静脈投与したところ、世界で初めて永続的な生着および骨格改善・寿命延長・生殖能力など画期的な治療効果が確認され、母由来の幹細胞移植の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In utero stem cell transplantation (IUSCT) has been performed in fetuses with a normal immune response, but a lifelong engraftment of allogeneic donor cells has been barely achieved. Recent studies have reported that the mechanism of immunological barriers was due to maternal responses. From this point of view, maternal cells would be advantageous as donor cells, and they are also favorable for IUSCT because immunoreactions do not occur in the mother. We performed in vitro fertilization in a MPSVII murine model and transferred affected embryos to ICR/B6-GFP surrogate mothers in cases where fetuses receiving IUSCT were all homozygous. Lineage-depleted cells from ICR/B6-GFP mice were injected intravenously. Donor cells in chimeric mice from ICR/B6-GFP mothers were detected at death, and were confirmed in several tissues including the brains of sacrificed chimeric mice. Furthermore, improvement of bone structure and rescue of reproductive ability were confirmed in our preclinical study.

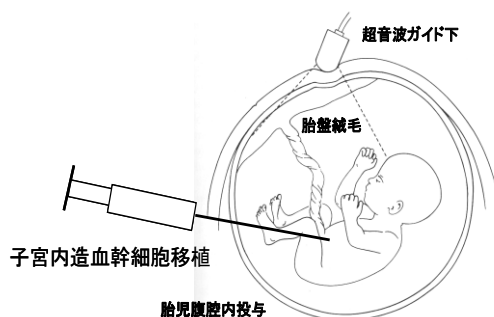
研究分野：子宮内幹細胞移植

キーワード：胎児治療 免疫寛容 造血幹細胞移植 先天性代謝異常症 microchimerism

1. 研究開始当初の背景

(1) 胸腺が成熟するまでに幹細胞を移植すると免疫寛容が誘導されてドナー細胞が生着することを利用して、1989年に初めてヒト胎児に造血幹細胞が移植された。しかしながら、治療効果を及ぼすほど十分な生着が確認されたのは先天性免疫不全症のみであり、臨床応用は前途多難であった(文献①)。ところが近年、生着阻害の要因が判明されつつあり(文献②、③)、再び胎児期の移植治療が期待されるようになった。とはいえ、対象疾患である先天性代謝異常症などの遺伝性疾患のなかには胎児期にすでに病状が進行しており、胎児自身の細胞を増殖させて遺伝子導入するなどの時間的猶予が十分でないことが多い。

子宮内造血幹細胞移植



(2) 人工多能性幹細胞(iPS)を含む遺伝子導入技術を用いた再生医療が期待されているが、癌化をしない目的の細胞を得るためには月単位の時間がかかってしまう。細胞治療はあらかじめ準備することが可能であり、一般的に出生後に行われている造血幹細胞移植に比べて出生前の投与では、①胎児期に進行する病態の増悪を軽減する、②免疫抑制剤が不要となる細胞を選択できる、③成人に比して細胞数が少なくてもよい、④癌化しないことが確認されている細胞を使用することができる等の利点がある。特に造血幹細胞が少量でも生着した場合においては、同じドナー由来の細胞や臓器を生後に再度移植した際にも拒絶されないことは特筆すべき特徴である。胎児期に行われる再生医療に対しては、既に確立されている幹細胞移植を応用する意義は大きい。

(3) 遺伝性血液疾患ではすでに生後の造血幹細胞移植による治療が行なわれているが、この造血幹細胞移植は移植前処置に伴う免疫抑制剤・放射線照射による合併症や移植後の移植片対宿主病(GVHD)などの副作用が問題とされ、安全性の高い治療法とは言い難く、この副作用を最小限に抑えるためにはHLA適合ドナーを見つけることが必要とされる。しかしHLA適合ドナーを用意するこ

とは困難であることが多く、依然、造血幹細胞移植には克服されるべき問題が残されている。また、これらの疾患の家族歴をもつ多くの夫婦は妊娠を断念あるいは妊娠しても妊娠継続を躊躇する場合が多く、夫婦に与える精神的負担も大きい。

(4) 前述のように胎児期では免疫が未熟であるため自己抗原以外に対して免疫学的トレランスを獲得することが可能であることが知られ、これが子宮内移植治療開発の出発点となった。胎児期の移植で生着させることができれば移植前治療を行わなくてもドナー細胞の生着と免疫学的トレランスの獲得が可能であり、胎児期の移植は従来の問題点を克服することが可能であると考えられてきた。ところが、ドナー造血幹細胞の生着のためには宿主の細胞と競合して生着部位を獲得することが必要であり、さらに母体免疫の影響を回避する必要があることが報告された。これらの知見から、母体と胎児どちらにおいても免疫反応を誘導しない細胞を移植すれば十分な生着が獲得できるという仮説が成立する。

(5) また、最近では造血幹細胞が造血系以外の種々の細胞に分化しうるということが数多く報告され、さまざまな組織や臓器に対して造血幹細胞を利用する細胞療法・再生医療の可能性が議論されるようになった。以上より造血幹細胞を用いた胎児移植は、出生前診断が可能である遺伝性血液疾患のみならず、先天性代謝異常症などのさまざまな遺伝性疾患に対する胎児治療として期待される。

(6) マウスにおいてはこれまでの研究から、ドナー由来の造血幹細胞を胎児期に移植することによって生着させる手法が確立されている(文献④)。この免疫寛容の獲得を利用すれば、同じドナー由来の細胞や組織の移植も生後に免疫抑制剤を使うことなく可能であり、極めて理想的な移植治療モデルとなる。

2. 研究の目的

(1) 胎児期は免疫系の発達が未熟であり、外界からの抗原に対して拒絶反応が起こらず、また免疫系発達の過程において胎児がその抗原にさらされると免疫学的寛容(免疫トレランス)が獲得される。これは、自然発生した多胎の動物において証明されており、また動物モデルにおいても胎児に移植された細胞に対する免疫トレランスが獲得されることが証明されている。これらから、胎児期に放射線、化学療法などの前処置を行わずにHLAが適合していないドナー細胞を移植しても免疫学的寛容が獲得されることが理論上可能であり、従来 of 骨髄移植に伴う危険性を少なくすることが可能であるだけでは

なく、HLA 適合に関わらず多くのドナー細胞が移植に利用することが可能となることが期待される。**本研究は、胎児期の移植免疫学あるいは発生・分化の基礎的研究を行ない、それを基にした胎児期の移植治療の開発と再生医療への応用を目的とする。**実際に欧米では、遺伝性血液疾患と診断された罹患胎児に対して造血幹細胞の移植が行なわれ、1995年に初めてX連鎖SCIDにおいて行われた移植では有効な成績が得られている(文献⑤)。

(2) 最近では、骨髄や脂肪組織中に筋、神経、骨、軟骨、脂肪などに分化する間葉系幹細胞が存在することが知られ、これらの細胞治療が注目されている。これらの細胞を胎児期の移植治療に応用することが可能であれば、胎児治療は遺伝性血液疾患だけでなく、先天性代謝性疾患、骨・軟骨系疾患・筋・神経疾患に対しても治療が可能な新しい治療法として期待される。日本ではこの分野に関する研究はほとんどない。外国における研究ではマウス、ラット、ヒツジ、サルなどを用いた研究が行われているが、報告された論文は少数である。これまでの研究ではドナー細胞のキメリズムの成立とドナー細胞特異的な免疫トレランスの獲得については示されたが、その機序についての基礎的な研究は十分とはいえない。またこれらの動物モデルでは有効な治療結果を得るのに十分な高いレベルのキメリズムの維持はこれまで困難であり、臨床に応用できる段階ではなかった。今後はトレランス獲得のメカニズムの基礎的研究とこれらの基礎研究をもとにして、治療効果が期待される高いレベルのキメリズムの獲得が可能な新しい胎児移植法の開発が課題とされる。**本研究では、これまで課題とされた新しい胎児移植治療法の確立に取り組むことが特徴とされ、さらにこの方法による治療効果に関する検討を疾患マウスで行う。**さらに、本研究では間葉系幹細胞を用いた胎児移植治療への応用も行うことも独創的な研究と考える。本研究では、ドナー造血幹細胞を胎児期の疾患動物に生着させて直接治療効果を確認、もしくは二次的なドナー由来の間葉系幹細胞の移植により、新しい治療法を確立することが目的である。

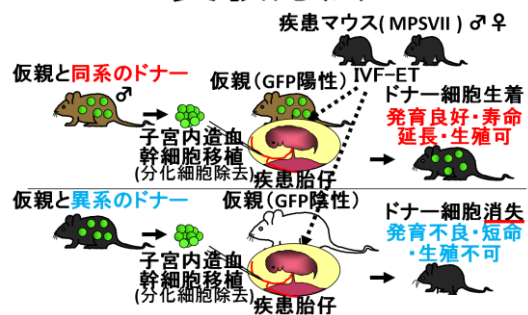
3. 研究の方法

(1) 胎児幹細胞移植治療のマウスモデルにおいて、既に諸研究報告によって確立された手法を用いてドナー細胞を生着させる(文献④)。ドナーマウス由来の骨髄単核球をBALB/cマウス胎仔の腹腔内もしくは卵黄嚢静脈内へ移植し、その生着率を検討する。具体的には、まずGFP発現c57BL/6マウス由来の細胞を胎齢14日目のBALB/cマウス胎仔の卵黄嚢静脈内に、 20×10^6 細胞/胎仔に調製して投与して、生後4週間目となる時期にマウス末梢血を採取し、単核細胞を抽出したのちフローサイトメトリーを用いてドナー

細胞の生着率について分析を行う。

(2) ホモのVII型ムコ多糖症マウス雌雄から体外受精で受精卵を作成して同種異系の仮親に胚移植することにより、全ての胎仔が疾患マウスとなるモデルを作成する。さらに、ドナーマウス由来の骨髄単核球をMACS(Miltenyi Biotec社)を用いて幹細胞の濃縮し、VII型ムコ多糖症マウス胎仔の卵黄嚢静脈内へ移植して、その生着率の向上や治療効果を検討する。仮親にはBALB/cマウスもしくは、GFP発現c57BL/6マウス(B6-GFP)とICRを交配して出生したマウス(ICR/B6-GFP)を用い、ドナーはB6-GFPもしくはICR/B6-GFPの雄マウスとする。生後4週間目となる時期にマウス末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いてドナー細胞の生着率について分析を行う。さらに、疾患マウスの治療効果を確認する。

実験方法



(3) ヒト組織から誘導された間葉系幹細胞をヒト血清ならびにヒト液性因子のみ、あるいは無血清培地を用いた培養法、フィーダー細胞を使用しない培養法を確立する。得られたヒト幹細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析や遺伝子異常の有無の確認を行う。

4. 研究成果

(1) Balb/c全胎仔の約8割(395匹)に投与し、出後4週令105匹のうち36匹がキメラマウスであった。文献④と同様の実験系ではあるが、ドナー細胞の長期の生着率が20%前後になるキメラマウスはほとんど得られなかった。

仮親・胎仔ともにBalb/cマウス

Donor cells	B6-GFP BM	B6-GFP BM
投与経路	腹腔内	静脈内
投与細胞数	$20 \times 10^6 / 20 \mu\text{l}$	$20 \times 10^6 / 20 \mu\text{l}$
ドナー由来単核球の生着率 Median (IQR) (%)	0.06(0.03, 0.08)% (0.03% - 0.24%)	2.36(0.36, 6.54)% (0.01% - 21.3%)
	Welch法 p=5.47x10e5	
離乳時のキメラ個体率(%)	83.3% (n=5)	34.3% (n=36)
	Fisher正確確率検定 p=0.025	
離乳時の生存個体率(%)	46.2% (n=6)	n=105
妊娠14.5日目の胎児数	13	477 (395 Injected)

なお、腹腔内にドナー細胞を投与する実験では投与した全胎仔 137 匹のうち 30 匹が 4 週令で生存しており、このうち 7 匹に GFP 陽性細胞が 0.1%未満程度(生着判定は通常 1%)確認されたのみであった。これまでの報告のように、子宮内造血幹細胞移植ではドナー細胞の由来や細胞数および投与経路を問わず良好に生着するわけではないことが示された。

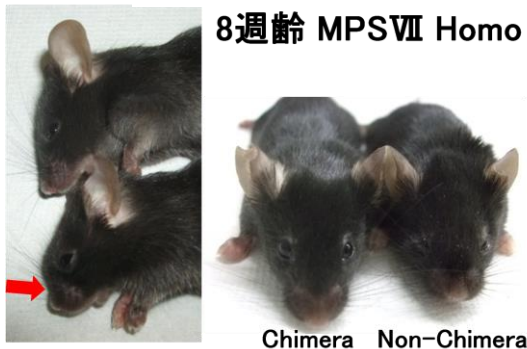
投与条件別成績

妊娠Balb/cにB6骨髄移植

Donor cells	B6 BM	B6-GFP BM	B6-GFP CD3(-)
投与経路	腹腔内	腹腔内	腹腔内
投与細胞数	5 x10 ⁶ / 5 μl	5 x10 ⁶ / 5 μl	5 x10 ⁶ / 5 μl
単核球の生着率 Median (IQR)(%) (Min - Max %)	0.03% (0.02, 0.04)% (0.01 - 0.08%)	0.02% 0.52% < 1%	0.03% (0.02, 0.04)% (0.01 - 0.92%)
離乳時のキメラ 個体率(%)	23.3% (n=7)	7.4% (n=2)	7.4% (n=9)
離乳時の生存 個体率(%)	21.9% (n=30)	22.3% (n=27)	58.1%(n=122)
妊娠14.5日目の 胎児数	137	121	210

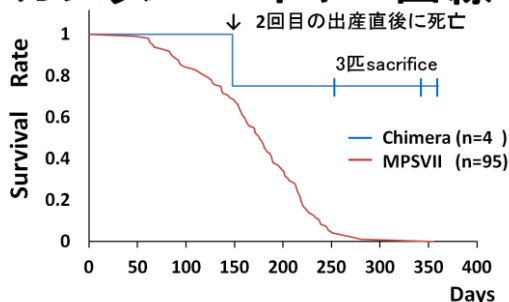
(2) VII型ムコ多糖症胎仔 16 匹中 10 匹に移植したところ、生存マウス 10 匹のうち 4 匹にドナー細胞の生着(0.20%, 0.64%, 2.17%, 4.12%)が確認された。キメラマウスでは寿命延長や体格改善が顕著であり、生殖能力を示した個体もいた。前述実験との違いはドナー細胞が母体で免疫反応を誘導させないことであり、ドナーが母親であれば有利であることを示唆する。

顔貌の正常化



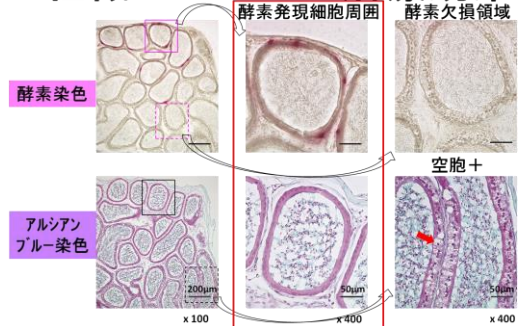
寿命の延長

Kaplan-Meier 曲線



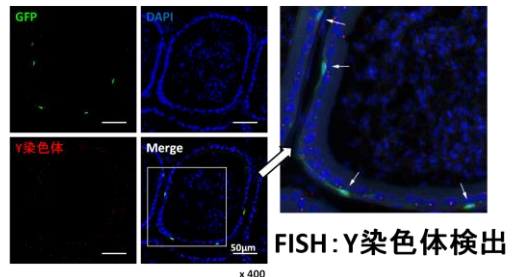
さらに、組織レベルでも治療効果が確認された。疾患マウスにおいて、ライソゾームが貯留していると細胞内に空胞として確認されるが、ドナー細胞が生着している領域では空胞は認めず、組織構造は正常であった。

組織レベルでの治療効果



なお、生着していたドナー細胞は雄由来であり、母マウス由来ではないことが確認された。

生着細胞の由来



(3) ヒト組織から誘導された間葉系幹細胞や iPS 細胞を用いて、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみ、あるいは無血清培地を用いた培養法、さらにフィーダー細胞を使用しない培養法を確立した。得られたヒト幹細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析や遺伝子異常の有無の確認を行った。得られたヒト幹細胞に対して Affimetrix 社 GeneChip による網羅的遺伝子発現解析、ならびに SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補であるモノクローナル抗体を用いて分子発現解析を行い、規格設定を行った。

<引用文献>

- ① Mattar CN, Biswas A, Choolani M et al.: The case for intrauterine stem cell transplantation. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **26**: 683-695, 2012
- ② Merianos DJ, Tiblad E, Santore MT et al.: Maternal alloantibodies induce a postnatal immune response that limits engraftment following in utero hematopoietic cell transplantation in

mice. J Clin Invest **119**: 2590-2600, 2009

- ③ Alonso-Ferrero ME, Valeri A, Yanez R et al.: Immunoresponse against the transgene limits hematopoietic engraftment of mice transplanted in utero with virally transduced fetal liver. Gene Ther **18**: 469-478, 2011
- ④ Peranteau WH, Endo M, Adibe OO et al.: Evidence for an immune barrier after in utero hematopoietic-cell transplantation. Blood **109**: 1331-1333, 2007
- ⑤ Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI et al.: Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. N Engl J Med **335**:1806-10, 1996

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 井原規公:【特集 胎児診断・治療の最前線】幹細胞を用いた胎児治療. 周産期医学 2017;47(4);567-570
- ② Takagi M, Uno H, Nishi R, Sugimoto M, Hasegawa S, Piao J, Ihara N, Kanai S, Kakei S, Tamura Y, Suganami T, Kamei Y, Shimizu T, Yasuda A, Ogawa Y, Mizutani S: ATM Regulates Adipocyte Differentiation and Contributes to Glucose Homeostasis. Cell Reports 2015;10:957-957
- ③ Ihara N, Umezawa A, Onami N, Tsumura N, Inoue E, Hayashi S, Sago H, Mizutani S: Partial rescue of mucopolysaccharidosis type VII mice with a lifelong engraftment of allogeneic stem cells in utero. Congenital Anomalies 2015;55:55-64

[学会発表] (計 3 件)

- ① 井原規公、梶原一紘、和田誠司、小澤伸晃、左合治彦: 子宮内造血幹細胞移植の成功要因の考察～先天性代謝異常症に対する胎児治療の可能性～, 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2016.4.23
- ② 井原規公: ドナー抗原の違いによる子宮内造血幹細胞移植での生着率および生

着期間の影響: 先天性代謝異常症マウスモデルでの永続的生着の達成要因の考察. 第 38 回日本母体胎児医学会学術集会, 別府, 2015.10.29

- ③ 井原規公, 梶原一紘, 藤永英志, 和田誠司, 森尾友宏, 水谷修紀, 左合治彦: 先天性代謝異常症の治療戦略: 母体に免疫反応を示さない造血幹細胞の胎児期移植. 第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 福岡, 2015.7.11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 規公 (IHARA Norimasa)
国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト
研究者番号: 50425716

(2) 研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA Akihiro)
国立成育医療研究センター・再生医療センター・再生医療センター長
研究者番号: 70213486

阿久津 英憲 (AKUTSU Hidenori)
国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・部長
研究者番号: 50347225

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

大浪 尚子 (ONAMI Naoko)
津村 秀樹 (TSUMURA Hideki)
井上 永介 (INOUE Eisuke)
林 聡 (HAYASHI Satoshi)
左合 治彦 (SAGO Haruhiko)
水谷 修紀 (MIZUTANI Shuki)