

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860845

研究課題名(和文) 新生児低酸素性虚血性脳症に対する自家間葉系幹細胞治療の開発

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell therapy for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy

研究代表者

香田 翼 (Koda, Tsubasa)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：40622882

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)：新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)は、克服すべき重篤な新生児疾患の一つである。従来の脳低温療法では十分な効果が期待できないことから、我々は新規治療法として間葉系幹細胞(MSCs)に注目した。本研究では、臍帯由来MSCs(UC-MSCs)の単離方法を確立したうえ、基礎的検討により由来個体の在胎週数が小さいほどUC-MSCsの増殖能が高く、その制御にWnt関連遺伝子群が関わっていることを明らかとした。HIEのモデル作成に難渋したが、同じく低酸素性脳症の原因となる急性肺障害モデルにおいて、由来個体の在胎週数に関わらず、UC-MSCsは肺組織における線維化や炎症細胞浸潤を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：Treatments for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy have been limited. Mesenchymal stem cells (MSCs) have significant potential for use in cell therapy for various diseases, through their ability to home to sites of injury, suppress immune responses, and undergo self-renewal and differentiation. The objective of this study is to characterize the gestational age-dependent change in MSCs from fetal tissues and to assess whether the MSCs could be useful for neonatal brain injury due to hypoxia or ischemia. First, we isolated umbilical cord-derived MSCs (UC-MSCs) from infants delivered at 22 to 40 weeks gestational age. UC-MSCs from preterm infants showed high proliferative capacity with increased levels of Wnt signaling pathway gene expression compared with those from term infants. Second, the lung injuries on rat model of bleomycin-induced hypoxemia and pulmonary fibrosis could be reduced by UC-MSCs, regardless of origin's gestation.

研究分野：小児科学

キーワード：mesenchymal stem cell umbilical cord gestational age gene expression encephalopathy lung injury

1. 研究開始当初の背景

低酸素性虚血性脳症は、克服すべき重篤な新生児疾患の一つである。現在まで脳低温療法が唯一効果的な治療法として行われているが、効果が限定的であることから、新規治療の開発が喫緊の課題である。

間葉系幹細胞 (MSCs) は傷害組織に遊走・集積するとともに抗炎症・免疫抑制作用を持つことから、多様な疾患への応用が期待されている。骨髄や脂肪組織だけでなく、臍帯や胎盤など周産期医療において通常廃棄される組織に豊富に存在することから、新生児医療における臨床応用が期待される細胞治療ソースである。

我々は新生児低酸素性虚血性脳症に対する新規治療法として、胎児付属物由来の MSCs を用いた細胞治療に注目した。

2. 研究の目的

- (1) 胎児付属物から MSCs を単離する方法を確立すること
- (2) 単離した MSCs について、由来個体の在胎週数による特徴を明らかにすること
- (3) 新生児低酸素性虚血性脳症モデル動物を用いて、単離した MSCs の有効性を検証すること

3. 研究の方法

神戸大学医学部倫理委員会の承認のもと、神戸大学附属病院および兵庫県立こども病院で娩出された新生児から臍帯および臍帯血を採取した。

(1) 胎児付属物からの MSCs の単離
臍帯組織を物理的に粉碎したうえで、リバーゼを用いて細胞を単離し、接着培養を行った。臍帯血については、モノ・ポリ分離溶液を用いて有核細胞を分離して、接着培養を行った。
上記で得られた接着細胞について、MSCs に特徴的な表面マーカーおよび分化能を有するかどうか、フローサイトメトリーおよび分化誘導特殊培養液を用いて検証した。

(2) 由来週数による MSCs の特徴解析
多様な週数の新生児から MSCs を単離し、全 RNA を抽出した。DNA マイクロアレイシステム (アジレント社) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。
また、同様に単離した MSCs について、MTS アッセイキット (プロメガ社) を用いて増殖能を評価した。

(3) モデル動物における MSCs の有効性
低酸素性虚血性モデル動物を用いて、MSCs の

有効性を検証した。

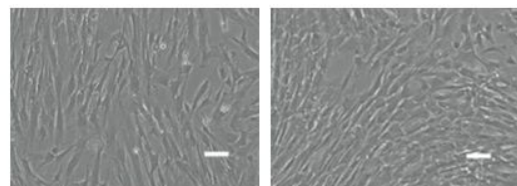
モデルは頸動脈結紮および低酸素暴露を用いた低酸素性虚血性脳症モデル、従来より我々の研究室で使用している急性肺障害モデルを用いた。

4. 研究成果

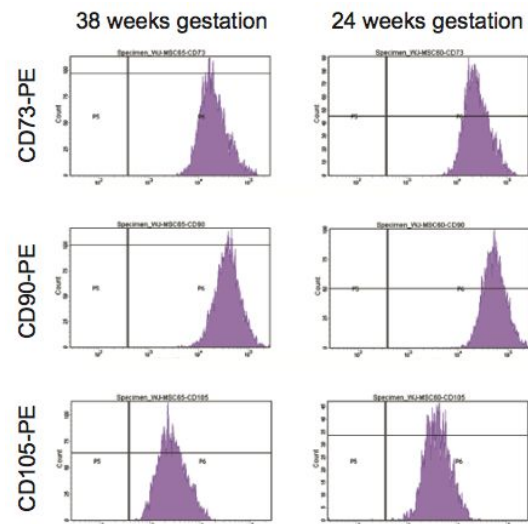
(1) 胎児付属物からの MSCs の単離

臍帯を用いた接着培養では、約 5 日程度で紡錘状の接着細胞の増加を確認した (図 1)。細胞増殖をまって凍結保存した。約 1 週間後に紡錘状の接着細胞の増加を確認した。細胞増殖をまって約 2 週間後に凍結保存した。臍帯からの単離は高率に成功したが、臍帯血からの単離成功率は低かった。

38 weeks gestation 24 weeks gestation



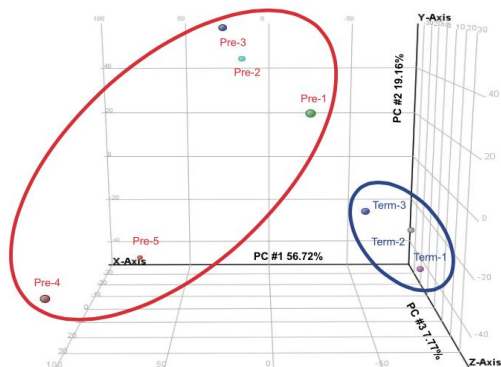
単離した紡錘状細胞について、各種蛍光抗体で標識し、フローサイトメトリーで陽性細胞の割合を解析した。いずれの細胞も MSCs に特徴的とされる CD105・CD73・CD90 が 95%以上陽性であり (図 2)、他の細胞で発現が知られる CD11b・CD14・CD19・CD34・CD79・HLA-DR の陽性細胞は 5%未満であった (図 2)。



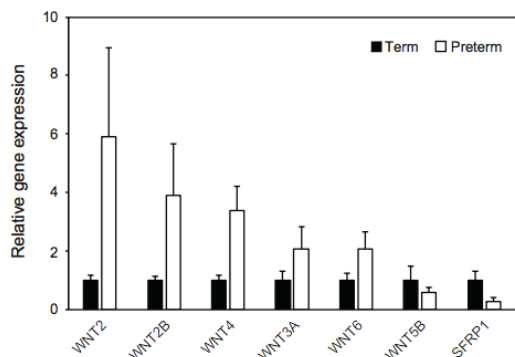
また、分化能を検証するために分化誘導用特殊培養液を用いて培養を継続したところ、いずれの細胞からも骨組織、軟骨組織、脂肪組織への分化が確認された。
以上より、臍帯および臍帯血から単離した接着細胞が純度の高い MSCs であることが示された。

(2) 由来週数による MSCs の特徴解析
高率に単離できる臍帯からの MSCs (UC-MSCs)

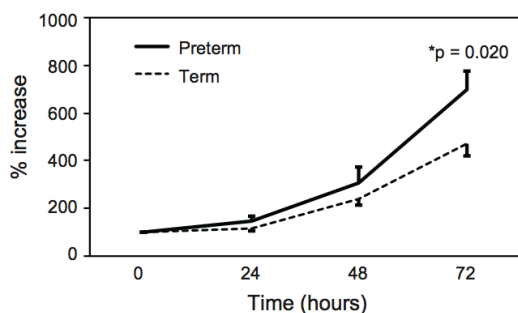
を中心に解析を進めることとした。
 まず、UC-MSCs より全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイシステムにより網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータをもとに、早産児由来 (Pre) と正期産児由来 (Term) に分類し、主要コンポーネント解析を行った。(図3)



パスウェイ解析により有意な変動を示した Wnt 関連遺伝子群に注目して解析をすすめ、リアルタイム PCR 法により早産児由来 UC-MSCs (Preterm) において正期産児由来 UC-MSCs (Term) よりも Wnt 関連遺伝子群の発現が亢進していることが確認された(図4)



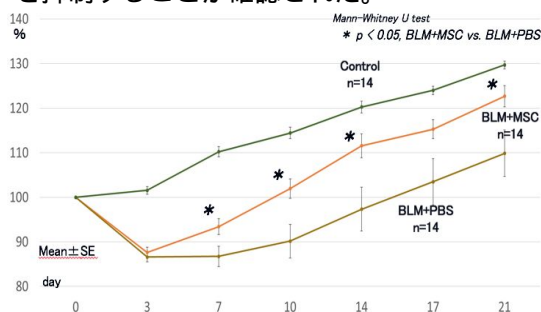
また、MTS アッセイキットにより増殖能を評価したところ、早産児由来 UC-MSCs (Preterm) は正期産児由来 UC-MSCs (Term) に比して増殖能が高いことが明らかとなった(図5)



続いて、Wnt 阻害剤を用いて増殖能の変化を検討したところ、早産児由来 UC-MSCs でのみ有意に増殖が抑制された。
 以上の結果より、Wnt 関連遺伝子群が UC-MSCs の増殖能と関連していることが示唆された。

(3) モデル動物における MSCs の有効性
 当初計画していた新生児低酸素性虚血性脳症のモデル作成に難渋したため、同じく低酸素性脳症の原因となる急性肺障害モデルラットを用いて検証した。

8週齢のSDラットにおいて、プレオマイシン (BLM) の気管内注入により急性肺障害を誘導した。3日後に UC-MSCs もしくは PBS を静脈内投与することで、体重推移や肺組織像が変化するかどうかを検討した。結果、UC-MSCs は BLM による体重減少を改善させ(図6)、さらに肺組織における線維化や炎症細胞浸潤を抑制することが確認された。



現在は UC-MSCs の由来週数による効果の違いに注目して、肺組織中の炎症性サイトカインや線維化マーカーの解析など、より詳細な追加検討を行っている。

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)

[学会発表](計4件)

(1) 岩谷 壮太、福嶋 祥代、香田 翼、森岡 一朗、西村 範行ら、臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脊髄性筋萎縮症の病態解析の試み、第52回日本周産期・新生児医学会学術集会、2016年7月16日、福岡

(2) 串田 良祐、西村 範行、岩谷 壮太、香田 翼、森岡 一朗ら、臍帯組織中に存在する非腫瘍性多能性幹細胞 Muse 細胞の機能解析、第16回日本再生医療学会、2017年3月6日、仙台

(3) 岩谷 壮太、香田 翼、森岡 一朗、西村 範行ら、臍帯由来間葉系幹細胞における児の在対週数による転写制御解析、第16回日本再生医療学会、2017年3月6日、仙台

(4) 山名 啓司、岩谷 壮太、香田 翼、森岡 一朗、西村 範行ら、プレオマイシン誘発肺障害モデルラットにおける臍帯由来間葉系幹細胞の効果、第16回日本再生医療学会、2017年3月6日、仙台

(5) 串田 良祐、西村 範行、岩谷 壮太、香田 翼、森岡 一朗ら、臍帯組織中に存在する非腫瘍性多能性幹細胞 Muse 細胞の機能解析、第122回日本解剖学会、2017年3月28日、長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香田 翼 (KODA, Tsubasa)
神戸大学大学院医学研究科・内科系講座小児
科学分野・医学研究員
研究者番号：4062882

(2) 連携研究者

岩谷 壮太 (IWATANI, Sota)
神戸大学大学院医学研究科・内科系講座小児
科学分野・助教
研究者番号：00741430

森岡 一郎 (MORIOKA, Ichiro)
神戸大学大学院医学研究科・内科系講座こども
急性疾患学・特命教授
研究者番号：80437467

西村 範行 (NISHIMURA, Noriyuki)
神戸大学大学院医学研究科・内科系講座こども
総合療育学・特命教授
研究者番号：00322719