

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791029

研究課題名（和文） 羊膜由来幹細胞の新生児脳室周囲白質軟化症への治療応用

研究課題名（英文） Therapeutic application to neonatal PVL of amnion-derived cells

研究代表者 佐々木 禎仁（SASAKI YOSHIHITO）

独立行政法人国立循環器病研究センター・周産期・婦人科部

研究者番号：50396389

研究成果の概要（和文）：

約 20 症例のヒト羊膜を帝王切開後の症例より入手した。羊膜細胞を培養後、フローサイトメトリーにてセルソーティングを行った。現在のところ幹細胞の候補として抽出を試みている細胞分画は 0.02% 程度とごく少ない細胞数である。幼若ラットを用いて新生児低酸素性虚血性脳症モデルを作成した。これらの細胞を浮遊液の状態に脳室内投与した。次に、培養細胞を細胞シート状態で移植した。細胞移植による有意な脳障害の改善は現在のところ認めていない。異なる投与経路や、細胞ソースを検討する準備を行っている。

研究成果の概要（英文）：

We have obtained human amnion during caesarian section from 20 volunteers. After the culture, amniotic cells were sorted by flow cytometry. The cell fraction that we consider containing stem cells is no more than 0.02% of total cells. A neonatal rat model with hypoxic-ischemic brain injury was prepared. We injected these cells suspended in a solution into the lateral ventricle of the brain. We also applied the cells as a form of cell sheet directly onto the injured cerebral cortex. Neuroprotective effects of the cell therapies have not been observed so far. We continue analyzing other methods of cell delivery and other cell sources.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：若手研究（B）

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：胎児医学

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

脳室周囲白質軟化症 (periventricular leukomalacia; PVL) は、早産児に最も頻度が高く脳性麻痺の原因とされている。このPVLの発症の有無が、新生児医療における新生児予後を大きく左右する。PVLは脳組織自体つまり、脳室周囲や皮質下白質部位の血管構築の未熟性、乏突起膠細胞の未熟性といった内因に、低酸素虚血や感染に伴う炎症などの外因が作用し病変を構築するとされている。PVLの組織所見は、壊死性病変であり、肉眼的には白質の空洞形成や白色の線維化組織として認められる。低酸素虚血、炎症などによって誘導される興奮性のアミノ酸、ミクログリアの活性化で放出される炎症促進物質が乏突起膠質細胞、乏突起膠細胞の前駆細胞を選択的に障害する。髄鞘形成に大きく関与する乏突起膠細胞が障害され、大脳皮質から深部白質への興奮伝達が阻害されることで、脳性麻痺の臨床症状を呈するとされている。現在有効な治療法はなく、低体温療法などの対症療法が主流であり、治療成績に大きな改善はみられていない。したがって今後はこのPVL病変の拡大を発症後いかに防ぐかが治療の重要なポイントになると考えられる。現在パーキンソン病などの神経変性疾患の分野で盛んに研究されている幹細胞移植は1つの有効な治療法になりえると考えられた。現在、多くの研究機関で胎児付属物である羊膜、胎盤からの幹細胞研究がすすめられており、これを応用できる可能性があると考えられる。羊膜由来幹細胞については、Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, FGF4, Telomeraseといった幹細胞マーカーの発現を維持している。細胞培養にてSphereを形成する細胞に関しては、SSEA-3SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81などの幹細胞マーカーの発現をみせることが確認されてい

る。この細胞は培養条件を変化させることで、神経系細胞、心筋系細胞、肝細胞系への分化能が指摘されている。特に神経系細胞に関しては、神経分化マーカーであるNestin, GAD (glutamic acid decarboxylase)の発現が培養中に増加し、また90%の培養細胞においてグリア細胞のマーカーであるGFAPや10%の細胞では神経膠細胞のマーカーであるCNPにて陽性を確認する事ができる。羊膜由来幹細胞は、グリア細胞以外に神経膠細胞への分化能も有していると考えられる。またフローサイトメトリーによる幹細胞抽出において、既存の幹細胞マーカーのほかにHoechst33342色素を使用し、SP (Side population)細胞を幹細胞の候補として使用することを考えている。SP細胞は、Hoechst33342で細胞内DNAを染色した際の染色性の低い細胞集団であり、細胞表面にABCトランスポーターのABCG2が発現し、色素を排出することによって形成される。SP細胞は、幅広く各臓器、また癌組織内に存在し、幹細胞としての性質を有している事が報告されている。Hoechst33342に、さらに幹細胞マーカーを組み合わせる事でより幹細胞としての性質の強い細胞を抽出する事が可能になると考えられる。羊膜由来幹細胞は、分娩後に比較的大量に入手でき、かつ胎児成分であるため、宿主反応も考えづらく有効な治療法となる可能性がある。すでに羊膜に関しては、眼科領域において難治性眼表面疾患に対する移植治療が臨床応用されている。新生児脳室周囲白質軟化症を含めた胎児期・周産期の脳障害は、胎児・新生児死亡や脳性麻痺や精神遅滞等の後遺症を来すことが多く、重大な課題である。さらに医療訴訟となることもあり、社会的影響も多大である。

幹細胞を用いた細胞治療が注目されているが、各種幹細胞は採取や臨床応用に関して

それぞれ固有の問題も持っている。卵膜由来幹細胞は医療廃棄物となる卵膜を使用するため、倫理的問題やドナーに体する浸襲はなく、さらにガン化の問題もなく、非常に有望な細胞と考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒト羊膜由来幹細胞のPVL治療への応用に関しての報告はない。胎児付属物由来の幹細胞を新生児治療に応用するという発想である。出生後短期間で発症し、病態が進行するPVLに対しては、早期の治療が必要となる。特に出生後数時間から1日以内に凝固壊死病変が形成され、4日以内にはミクログリアの活性化が惹起され脂肪顆粒細胞や軸索の腫大が認められる。反応性のアストロサイトは7日前後で出現し、新生血管の増殖は1-2週間で生じ、軟化巣が形成、融解、空洞形成が14日以降で認められ始める。したがって出生後すみやかに、かつ大量に入手できる羊膜細胞の治療への適用は、臨床治療上有用かと思われる。また羊膜由来幹細胞は、グリア細胞だけでなく、オリゴデンドロサイトのような神経膠細胞への分化能も指摘されている。既存の幹細胞マーカーに、Hoechs33342を加えることで、幹細胞としてのより強い性質を有した細胞を抽出することが可能と考えられる。羊膜由来SP細胞の神経細胞への分化能が確認でき、治療の有用性がマウスモデルで確認できれば、今後の早産児、低出生体重児のPVLによる神経学的予後改善に寄与する可能性があると予想される。

第一に、ヒト卵膜の採取、培養方法を確立し、効率よく卵膜由来幹細胞を得られる条件を検討する。

第二に、ラット新生仔脳障害モデルを用いて、卵膜由来幹細胞移植の効果を検討する。

## 3. 研究の方法

帝王切開時に清潔操作に留意し、ヒト羊膜をサンプルとして採取した。約20症例の羊膜を帝王切開後の症例より清潔な状態で入手した。ヒト羊膜はトリプシン処理を行い、羊膜細胞を採取する。DMEM培養液にEGF、10%FBSを添加したものを培養液として使用し、24-48時間初代培養を行う。培養後、細胞を採取し、蛍光標識抗体を使用し、フローサイトメトリーにて、セルソーティングを行った。蛍光標識抗体としてHoechst33342を主体に使用し、SP(side population)細胞を幹細胞の候補として使用している。SP細胞よりRNAを抽出し、cDNAに逆転写し、これをサンプルとしてマイクロアレイ解析を行う。幹細胞マーカーの有意な発現上昇が指摘されれば、リアルタイムPCRにて発現の上昇を確認する。さらに幹細胞マーカーであるSca1, CD29, c-kitなどの蛍光標識抗体を組み合わせ、幹細胞の性質のより強いSP細胞の抽出を試みる。そしてマイクロアレイ、リアルタイムPCRへと同様の解析を試みる。幹細胞に関与する遺伝子の有意な発現をSP細胞に確認する。

幼若ラットを用いて新生児低酸素性虚血性脳症モデルを作成した。これらの細胞を浮遊液の状態、Hamilton シリンジを使ってstereotacticに脳室内投与した。7日後にラットをホルマリンで還流固定し、脳を取り出し、脳障害の評価を行った。冠状断での大脳半球面積、大脳半球体積を計測し、解析を行った。次に、培養細胞をトリプシン処理せずに細胞シートのまま移植する検討を行った。脳室内投与は浸襲的過ぎることと技術的に困難であることから、代わりに低酸素性虚血を受けている大脳皮質の脳表に貼付けるように移植した。

## 4. 研究成果

現在のところ SP 細胞の抽出を試みている細胞分画は 0.02%程度とごく少ない細胞数である。

細胞移植の効果であるが、細胞を浮遊液の状態で移植した場合、有意な脳障害の改善は現在のところ認めていない。細胞シートのまま移植した場合、頭蓋骨に開けた小さな穴からの貼付けで技術的に難しいこともあるが、7日後に脳を取り出してみると細胞シートが脳表ではなく、常に頭蓋骨側に不着していた。このことから現在は、別な細胞投与経路を用いる方法の準備を行っている。また、羊膜由来幹細胞だけでなく、骨髄由来幹細胞を用いての実験も検討している。

#### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Intracranial Injection of Fetal Membranous Mesenchymal Stem Cells Following Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonatal Rats. Keiko Ueda, Kazuhiko Harada, Jun Yoshimatu, Shinji Kasturagi, Shin Ishikane, Noritoshi Nagaya, Tomoaki Ikeda  
6<sup>TH</sup> Hershey Conference on Developing Brain Injury, Paris France 2008

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○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

佐々木 禎仁 (SASAKI YOSHIHITO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・周産期・婦人科部・医師

研究者番号: 50396389

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: