

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16311

研究課題名(和文)先天性中枢神経障害に対する母体の脂肪組織由来幹細胞を用いた胎児細胞移植療法の検討

研究課題名(英文) ENGRAFTMENT POTENTIAL OF MATERNAL ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS FOR IN UTERO TRANSPLANTATION

研究代表者

川嶋 章弘 (Kawashima, Akihiro)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10783376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は母体由来の脂肪組織間葉系幹細胞に着目し、脳神経細胞の再生と機能改善を目的とした胎児治療法の開発に取り組んでいる。本研究において、マウスで脂肪組織由来間葉系幹細胞を胎児脳室内投与により、移植細胞が胎児の脳内に生着することを見出し、胎児に投与した幹細胞が神経細胞に分化することを明らかにしている。さらに母体の脂肪組織間葉系幹細胞を使った場合に同種の脂肪組織間葉系幹細胞に比較し移植早期に細胞傷害性T細胞の誘導が少なく炎症性サイトカインの発現を低下させ抗炎症性サイトカインの発現を上昇させる。母体の免疫反応を抑制し移植早期の生着率の向上に成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この成果はダウン症児の高次機能障害の改善を目的とする胎児治療において、母体の間葉系幹細胞を用いることでより移植後の免疫反応を特別な加療なく抑制させることから道を開く画期的な方法であると考えられる。本研究成果は、出生前診断により早期治療介入が可能となった染色体疾患や遺伝性疾患をもつ胎児に対して、胎児期より進行する中枢神経系疾患における胎児治療の可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：We hypothesised that maternal mesenchymal stem cells (MSCs) might be a better cell source of in utero transplantation for the fetal tissue than allograft MSCs. In the first part, the allograft ADSCs after in utero transplantation settled at day 28 after transplantation and also expressed TUBB3 and NeuN. In the second part of this study, we demonstrated that the maternal ADSCs induced less CD45+ cells and GFAP+ astrocytes around the transplanted cells than allogenic ADSCs. The maternal ADSCs expressed less TNF, IL-6 and TIM1 gene expression in the fetus brain than allogenic ADSCs. Transplanting ADSCs from the mother may improve the success of in utero allogenic transplantation of ADSCs for their immune tolerance to the fetus.

研究分野：周産期医学

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞 胎児治療 幹細胞治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダウン症はおよそ新生児 700 人あたり 1 人に生じ、21 番染色体のトリソミーが原因となり、精神遅滞を始めとしたさまざまな症状が認められる疾患である。ダウン症の脳では神経細胞の数と密度が減少し、アストロサイトの数が増加することが知られている。この変化は胎児期より見つかっており、胎児期より進行性に病状が進行している。この原因はトリソミーになっている遺伝子の発現が過剰になっているためと考えられている。

検査技術の発展により妊娠 8 週前後から母体血を用いた胎児の遺伝子診断が可能となってきた。胎児中枢神経系の発達する前の段階で、胎児治療を開始することでダウン症などの中枢神経発達障害に伴う脳機能障害を改善させ、出生後に生産的な社会生活を送ることが可能となる。既に薬剤投与や遺伝子操作で胎内治療が試みられている。しかし薬剤投与による治療では継続的な治療を要し、脳内の細胞に対する遺伝子操作はその後の発達に及ぼす影響が懸念されていた。

本研究課題ではこれらの問題点を解決するために成人の中枢神経障害において臨床応用が検討されている脂肪組織間葉系幹細胞を用いて、胎児治療を行うことに着想した。さらに母体と胎児間の免疫寛容から母体の細胞が投与細胞の胎児器官への生着に有利であるとされ、母体由来の脂肪組織間葉系幹細胞を用いた胎児治療に着目し研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、母体の脂肪組織間葉系幹細胞を用いた胎児治療により、胎児の進行性中枢神経疾患の症状の緩和するための治療法の開発への貢献である。その中で、本研究課題では基盤となる「脂肪組織間葉系幹細胞の脳内での長期生着および神経分化」および「母体由来の脂肪組織間葉系幹細胞による生着の改善」に焦点をあてた。

(1) 脂肪組織間葉系幹細胞を胎児脳室内に投与し生着した細胞の神経分化

本研究課題の予備実験としてマウス鼠蹊部より脂肪を採取し、脂肪組織間葉系幹細胞を抽出後、*in vitro*において間葉系細胞への多分化能を有する事を確認しており、神経分化誘導によりアストロサイト及びニューロンに分化することを明らかにしてきた。さらに全身で緑色蛍光タンパクを発現するマウスより採取した脂肪組織由来幹細胞を採取し胎生 14.5 日通常マウス胎仔の脳室内投与し、胎生 17.5 日に頭蓋内に投与細胞が生着していることを認めていた。この細胞は胎仔由来の細胞と移植された脂肪組織由来幹細胞とで架橋構造を形成しており、移植された脂肪組織由来幹細胞が胎仔の既存細胞と共に脳構造を形成する可能性を示していた。本研究課題では生着した細胞の神経分化と投与後の細胞の動態に付き明らかにすることを目的とした。

(2) 母獣より抽出した脂肪組織間葉系幹細胞が生着率を向上への寄与

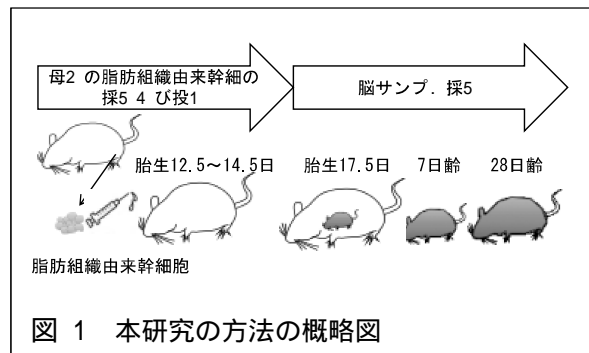
既に動物実験で母獣の T 細胞を抑制することで幹細胞移植の組織生着率が向上することが報告されている。母体の免疫によって排除されない細胞では胎児への子宮内幹細胞移植際の幹細胞の胎児における生着率が高いと考えられた。本研究課題では母獣より抽出した脂肪組織由来幹細胞が胎児に投与後の生着率および、免疫反応の動態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題の目的を達成するために以下の 2 つの実験を行った。

(1) 脂肪組織間葉系幹細胞を胎児脳室内に投与し生着した細胞の神経分化

C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)グリーンマウスの鼠径部より脂肪を摘出し、プラスチックプレートで培養し接着性をもつ細胞群を抽出した。マウス間葉系幹細胞のマーカである Sca-1 と PDGFR が共陽性である細胞をセルソーターで分離し、脂肪組織間葉系幹細胞とした。組織の接着性および組織分化能を亢進させるため液状化しているアテロコラーゲン中に採取された幹細胞を懸濁した。妊娠 12.5-14.5 日の妊娠マウスに対して吸入麻酔下に開腹し妊娠子宮の中の胎仔を直視下で確認した後に胎仔の大泉門より懸濁した幹細胞浮遊液を投与した。投与した細胞は 28 日齢時に脳を摘出し組織学的に移植した細胞を確認した。



妊娠 12.5-14.5 日の妊娠マウスに対して吸入麻酔下に開腹し妊娠子宮の中の胎仔を直視下で確認した後に胎仔の大泉門より懸濁した幹細胞浮遊液を投与した。投与した細胞は 28 日齢時に脳を摘出し組織学的に移植した細胞を確認した。

(2) 母獣より抽出した脂肪組織間葉系幹細胞が生着率を向上への寄与

C57BL/6 マウスの非妊娠時に脂肪組織由来幹細胞を採取した後に交配させ、脂肪組織間葉系幹細胞に ZsGreen1(緑色蛍光蛋白)遺伝子をレンチウイルス(pLV SIN-EF1 -IRES-ZsGreen1 Vector: Takara)を用いて導入した。緑色蛍光蛋白を発現する細胞を移植後に追跡するために使用する。妊娠マウスへの投与は胎生 12.5~14.5 日に行い、サンプルの胎仔脳の摘出を胎生 17.5 日、日齢 7 に行い非母体から抽出した脂肪組織間葉系幹細胞を対照に母体の脂肪組織由来幹細胞の生着および周囲に対する炎症の波及を組織学的に確認した。

4. 研究成果

(1) 本研究課題の主な成果

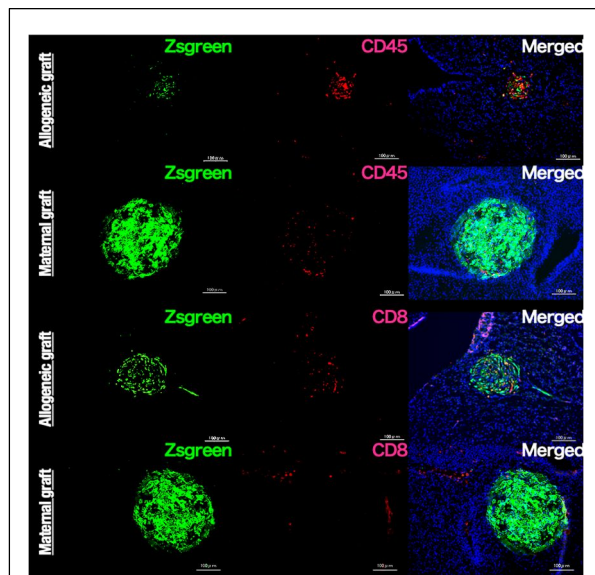
脂肪組織間葉系幹細胞を胎児脳室内に投与し生着した細胞の神経分化

PDGFR- (platelet-derived growth factor receptor-alpha) と Sca-1(stem cell antigen-1) の共陽性分画を用いることで、マウス脂肪由来間葉系幹細胞でも均一な間葉系幹細胞を得られることがわかりました。この共陽性分画を用いて神経分化誘導を行ったところ PDGFR- 陰性 Sca-1 陽性の細胞、PDGFR- 陽性 Sca-1 陰性の細胞と比較して効率的に神経様細胞を誘導され、細胞の未分化能もより長く維持された。

この分画の脂肪由来間葉系幹細胞をグリーンマウスより抽出し、抽出された細胞を野生型マウス胎児の脳室内に移植したところ、生後 1 ヶ月でも仔の脳内において多数の細胞が生着し一部の細胞が神経様の分化を呈していた。しかし生着率が低いこと、生着した細胞の周囲にレシピエント由来のアストロサイトの増生が認められたことから移植時の免疫応答を抑制する必要があると考えられた。

母獣より抽出した脂肪組織間葉系幹細胞が生着率を向上への寄与

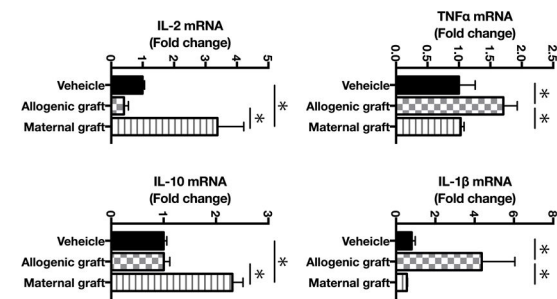
母獣の脂肪由来間葉系幹細胞に蛍光蛋白遺伝子を導入した細胞を移植した場合と、グリーンマウスより脂肪由来間葉系幹細胞を抽出し同系移植を行った場合を比較すると母獣の脂肪由来間葉系幹細胞の投与の場合には移植細胞への炎症性細胞の浸潤が少ないことを明らかにしました。しかし投与した脂肪由来間葉系幹細胞の一部が脂肪細胞の集塊を形成してしまったことも確認されたため、脂肪細胞への分化を抑制する必要性が求められた。



母親より抽出した細胞の投与群では炎症細胞の浸潤が少ない

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究で得られた成果は第72回日本産科婦人科学術集会で congress award を受賞し、国内の周産期分野における胎児に対する細胞治療の可能性を発信できた。また国際学術誌への投稿および国際学会で本研究成果を発信でき、今後母体の幹細胞を用いた胎児細胞治療の可能を示せた意義は大きい。



炎症性サイトカインの遺伝子発現が母親由来の細胞投与により抑制される

(3) 今後の展望

投与した細胞が生着した野生型マウスにおいて非投与群との間に明らかな運動性の異常などを認めないことを確認しているため、現在ダウン症モデルマウスでの機能改善を確認し、さらに掘り下げた実験を行っていく。胎児に対する幹細胞治療の臨床応用はその安全性と倫理的な問題から研究段階であるが、細胞リソースの特性や移植免疫応答を考えると母親から採取できる脂肪由来間葉系細胞を用いた胎児治療は応用が可能な幹細胞の一つとなると考え、さらに研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akihiro Kawashima |
| 2. 発表標題 Exploration of the use of adipose tissue-derived stem cells for in utero transplantation |
| 3. 学会等名 International society for stem cell research (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akihiro Kawashima |
| 2. 発表標題 THE ENGRAFTMENT POTENTIAL OF MATERNAL ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS, FOR FETAL TRANSPLANTATION |
| 3. 学会等名 日本産科婦人科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 川嶋章弘 |
| 2. 発表標題 MOUSE ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS COULD BE AN IDEAL SOURCE FOR IN UTERO THERAPEUTIC REPAIR OF FETAL BRAIN DYSFUNCTION |
| 3. 学会等名 ISSCR 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川嶋章弘 |
| 2. 発表標題 子宮内胎仔脳室内投与における脂肪組織由来幹細胞の中樞神経系への有効性 |
| 3. 学会等名 第39回分子生物学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|