

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17522

研究課題名(和文) 先天代謝異常症に対する羊膜上皮細胞治療の開発

研究課題名(英文) Cell Therapy Development for Congenital Metabolic Diseases Using Human Amniotic Epithelial Cells

研究代表者

高野 智圭 (TAKANO, Chika)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50845310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、胎盤から分離したヒト羊膜上皮細胞(human amniotic epithelial cells: hAEC)がin vitroで培養を始めると直ちにTGF- $\beta$ 依存性の上皮間葉転換(EMT)を起こすことを示した。また、網羅的トランスクリプトーム解析および細胞表面糖鎖解析等を用いて、TGF- $\beta$ 依存性EMTの阻害によりhAECの多能性が保持されることを初めて報告した。さらに多能性の維持は細胞の非腫瘍形成性に影響を与えず、hAECは臨床応用に適した安全性の高い細胞であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性代謝異常症とは、生まれながらに特定の酵素などが欠損し、生体内の物質代謝障害を来す疾患群である。時に根本的治療として行われる肝移植の侵襲は大きい。我々はこれに替わる新規治療として、ヒト羊膜上皮細胞を用いた細胞移植治療の開発を目指している。本研究で得られた、細胞の多能性制御に関わる分子機構の知見は、細胞調整プロトコルの最適化に繋がり、将来的には先天性代謝異常症の新規治療開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human amniotic epithelial cells (hAECs), which are a type of placental stem cell, express stem cell marker genes and are capable of differentiating into all three germ layers under appropriate culture conditions. hAECs are known to undergo TGF- $\beta$ -dependent epithelial-mesenchymal transition (EMT); however, the impact of EMT on the stemness or differentiation of hAECs has not yet been determined. Here, we first confirmed that hAECs undergo EMT immediately after starting primary culture. Comprehensive transcriptome analysis using RNA-seq revealed that inhibition of TGF- $\beta$ -dependent EMT maintained the expression of stemness-related genes, including NANOG and POU5F1, in hAECs. Moreover, the maintenance of stemness did not affect the nontumorigenic characteristics of hAECs. We showed for the first time that TGF- $\beta$ -dependent EMT negatively affected the stemness of hAECs, providing novel insight into cellular processes of placental stem cells.

研究分野：再生医療

キーワード：羊膜上皮細胞 多能性幹細胞 先天性代謝異常症 上皮間葉転換 TGF- $\beta$  経路

## 1. 研究開始当初の背景

先天代謝異常症とは、生まれながらに特定の酵素などが欠損し、生体内の物質代謝障害を来たす疾患群である。一部の疾患群では食事療法が標準治療として行われ、重症例では厳しい蛋白制限や脂質制限を要する。早期診断のもと適切な栄養管理が行われれば予後は良好であるが、患者の生活には大きな制限が生じる。また食事療法の効果は必ずしも十分ではなく、根本的治療として行われる肝移植の侵襲は大きい。代表者らはこれらに代わる新規治療の開発を目指し、胎盤を覆う羊膜から分離できる多能性幹細胞であるヒト羊膜上皮細胞 (**human amnion epithelial cells: hAEC**) を用いた細胞移植治療の可能性に着目してきた。

**hAEC** はヒト胎盤の羊膜から容易に、また大量に分離できる。胎生初期の幹細胞と同じ表面マーカーを発現し、三胚葉に分化することから、胎盤由来幹細胞の一つであると考えられている<sup>1)</sup>。複数の先行研究により、**hAEC** が *in vitro* および *in vivo* で成熟肝細胞に分化することが報告されている<sup>2)</sup>。さらに免疫原性が低く、遺伝子導入なしに脱分化できるため腫瘍形成のリスクが少ないことから、細胞移植を始めとする臨床応用に適した細胞であると考えられている。実際、現在までに複数の施設から先天代謝異常症であるメープルシロップ尿症、**Hurler** 症候群、体質性黄疸の原因となる **Crigler-Najjar** 症候群のモデル動物で、**hAEC** の肝臓内移植による治療効果が示されてきた<sup>3,4)</sup>。その作用機序は移植された **hAEC** が生体内で機能的肝細胞に分化し、先天性に欠失していた酵素を作り出すことによる病態改善と考えられている<sup>5)</sup>。

**hAEC** を細胞移植のソースとして用いることを考えた際、「多能性の制御」は生着効率や治療効果に影響する重要な因子である。**hAEC** は羊膜から分離された直後から多能性マーカー (**POU5F1**, **NANOG**) を発現し、その発現量は培養条件によって変化するが、その多能性や細胞分化をコントロールする分子機序は検討されていない。これを考える上で代表者らは、細胞の上皮間葉転換 (**epithelial mesenchymal transition: EMT**) がひとつの鍵を握ると考えた。**EMT** は発生や創傷治癒、癌転移など様々な過程に関与し、組織形成においては幹細胞が **EMT** を起こすことで様々な組織に分化するが、癌細胞は **EMT** を起こすことにより幹細胞様の機能を獲得する<sup>6)</sup>。多能性幹細胞においても様々な検討がなされているが、**iPS** 細胞の樹立には **TGF-β** 依存性 **EMT** は抑制的に働き、逆に間葉上皮転換が **iPS** 細胞の安定に関わるとする報告がある<sup>7)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究で明らかにしたい学術的問いは、羊膜という組織を形成していた **hAEC** が、単離され *in vitro* で培養を開始されるとどのように変化し、どのように多能性幹細胞としての特徴を獲得し、それを維持するのかがである。代表者は、予備実験と上記背景から、**hAEC** も他の幹細胞と同様に、多能性の制御に **TGF-β** 依存性 **EMT** が関与するという仮説を立てた。**TGF-β** の **Type I** レセプター (**ALK5**) 選択的阻害剤である **SB-431542** を用いて、**TGF-β** 依存性 **EMT** の抑制が **hAEC** の多能性に与える影響を検討した。将来的には **hAEC** の多能性増強や維持に関与する因子、細胞分化を制御する分子機構の解明を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### (1) **hAEC** における上皮間葉転換

当該施設における倫理委員会承認 (**No. 29-4-1, RK-220412-6**) のもと、対象となる妊婦から書面の同意を得て、胎盤を収集した。既報のプロトコルに準じて羊膜を酵素処理し<sup>8)</sup>、**hAEC** を分離した。細胞は **Stem cell banker** を用いて凍結保存し、随時検討に用いた。**hAEC** は **DMEM** 培地を基本とする専用培地で培養した。**SB-431542** については **Cell Counting Kit-8** を用いた細胞毒性試験および **EMT** 関連遺伝子の **mRNA** 発現をもとに、至適濃度を決定した。

様々な条件下で培養した **hAEC** から **Total RNA** を抽出し、**RT-qPCR** を用いて **EMT** に関連する **mRNA** 発現解析を行った。カバーガラス上で培養した **hAEC** を固定し、**E-cadherin** および **N-cadherin** に対する抗体を用いて免疫染色を行った。培養細胞から蛋白を抽出し、**Western Blot** 法により **Smad1**, **Smad2/3** の蛋白およびリン酸化蛋白発現解析を行った。

### (2) 網羅的トランスクリプトーム解析

培養した **hAEC** の **SB-431542** 添加群 (**SB-treated**) **n=3** および非添加群 (**Control**) **n=3** に対し、**NovaSeq 6000 (Illumina platform)** を用いた **RNA-seq** による網羅的トランスクリプトーム解析を施行した。**protein coding gene** の発現量解析を行い、発現変動解析および **Enrichment** 解析を追加した。発現変動解析で得られたいくつかの候補遺伝子については、**RT-**

qPCR を用いて培養開始前の細胞（ナীব hAEC）、SB-treated、Control の 3 群間で mRNA 発現を比較した。

### (3) hAEC における多能性と分化

上記のトランスクリプトーム解析で得られた発現量データを用いて、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行い、多能性の保持や細胞分化に関わる包括的な mRNA 発現解析を施行した。ヒト ES/iPS 細胞表面に存在する糖鎖に高い親和性を持つ rBC2LCN というレクチンを用いて、SB-treated と Control の細胞特性を評価した。rBC2LCN-FITC で標識された細胞をフローサイトメトリーで分析し、FlowJo ソフトウェアを用いて解析した。最後に、軟寒天コロニーアッセイを行い、hAEC の *in vitro* における造腫瘍性を検証した。統計分析には JMP ソフトウェアを用いた。2 群間比較には Wilcoxon 検定、多重比較の補正には Tukey-Kramer 検定を使用した。p 値 < 0.05 を統計的に有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) hAEC は細胞培養開始直後から TGF-β 依存性 EMT を起こす

書面で同意を得た妊婦から胎盤の提供を受け、hAEC を分離・保存した。

hAEC は胎盤が分離された後、*in vitro* で培養を開始された直後から EMT が起こることが判明した。SB-431542 を添加して培養することにより、上皮形態を保った均一な細胞集団を得ることが出来た。TGF-β 経路における SB-431542 の効果は Western blot 法を用いて検証し、Smad2/3 のリン酸化が有意に抑制されていることを確認した。

### (2) SB-treated 群の遺伝子発現様式はナীব hAEC と類似する

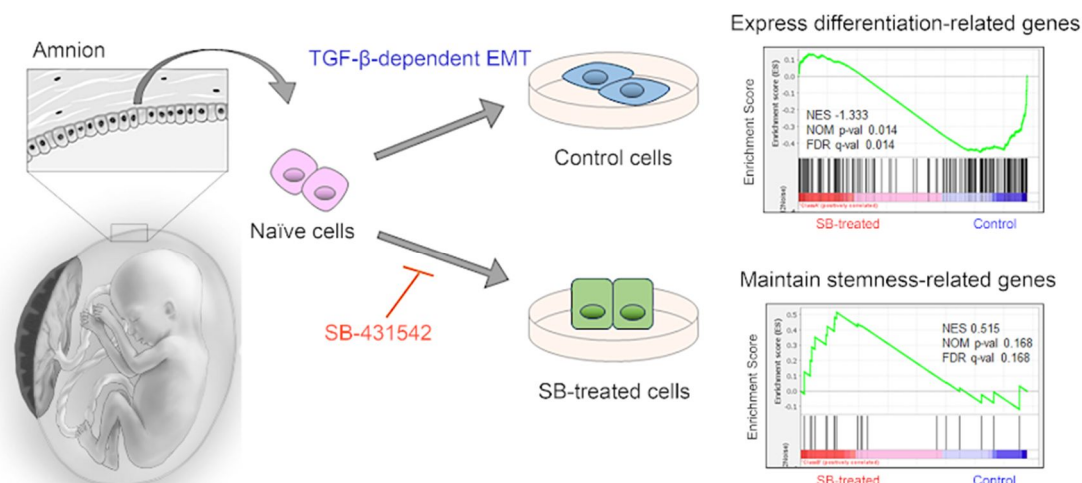
網羅的トランスクリプトーム解析により、Control 群と SB-treated 群間の発現変動遺伝子を見出すことが出来た。いくつかの遺伝子について、RT-qPCR 法で発現比較解析を行ったところ、SB-treated 群ではナীব hAEC と同程度の発現が保たれていることがわかった。

### (3) TGF-β 依存性 EMT の阻害により hAEC の多能性は維持される

GSEA 解析により TGF-β 依存性 EMT を起こした hAEC は三胚葉への分化を示唆する遺伝子が優位に発現する一方で、TGF-β 依存性 EMT を抑制した hAEC は多能性を示唆する遺伝子発現が優位であることを見出した。また、rBC2LCN-FITC で標識された細胞は Control 群より SB-treated 群に多く観察された。以上より、胎盤から分離直後の hAEC の初期培養において、TGF-β 依存性 EMT を抑制することにより hAEC の多能性が保たれることを示した。

hAEC は SB-treated および Control どちらにおいてもコロニー形成能を認めず、hAEC は細胞移植のソースとして用いる際に、安全性の高い細胞であることが確認できた。

これらの結果は関連学会および論文にて発表した ([Takano C, Horie M, Taiko I, Trinh QD, Kanemaru K, Komine-Aizawa S, Hayakawa S, Miki T. Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition Maintains Stemness in Human Amniotic Epithelial Cells. Stem Cell Rev Rep. 2022 Dec;18\(8\):3083-3091.](#))。



Graphical abstract. Stem Cell Rev Rep. 2022 Dec;18(8):3083-3091.

#### (4) 今後の展望

哺乳類における他の多能性幹細胞においても、EMT が起こるにつれて細胞の多能性が失われるという報告があり、上記はそれに一致する結果であった。しかしながら、TGF- $\beta$  経路が hAEC の多能性/分化に与える影響は直接的か否かさらなる解析が必要と考えられた。代表者はトランスクリプトーム解析の結果から、TGF- $\beta$  依存性 EMT を抑制した細胞群で **Traf2- and Nck-interacting kinase ( TNIK )** の mRNA 発現が有意に誘導されていることを発見した。TNIK は Wnt 経路の重要な促進因子であることから、hAEC における多能性/分化制御の一連のプロセスには Wnt 経路の介在がある可能性が示唆され、胎盤由来幹細胞の運命決定に関する次なる研究に繋がる知見を得た。

#### (5) hAEC を用いた新規治療の展望

*in vitro* における実験の他、本研究の対象となる先天性代謝異常症について臨床的な考察を行い、関連学会で発表した。また hAEC を臨床応用する際の展望について総説を執筆した。先天性代謝異常症であるメープルシロップ尿症を例に挙げ、hAEC を用いた細胞治療の可能性について論じた (**Takano C, Grubbs BH, Ishige M, Ogawa E, Morioka I, Hayakawa S, Miki T. Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. Stem Cells Transl Med, 2021. 10(6): 829-835** )。

#### < 引用文献 >

1. Miki, T., et al., Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 2005. 23(10): 1549-59.
2. Marongiu, F., et al., Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology*, 2011. 53(5): 1719-29.
3. Skvorak, K.J., et al., Placental stem cell correction of murine intermediate maple syrup urine disease. *Hepatology*, 2013. 57(3): 1017-23.
4. Rodriguez, N.S., et al., Liver-Directed Human Amniotic Epithelial Cell Transplantation Improves Systemic Disease Phenotype in Hurler Syndrome Mouse Model. *Stem Cells Transl Med*, 2017. 6(7): 1583-1594.
5. Strom, S.C., et al., Translation of amnion stem cells to the clinic. *Stem Cells Dev*, 2013. 22 Suppl 1: 96-102.
6. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009. 119(6): 1420-8.
7. Teshigawara, R., et al., OCT4 activity during conversion of human intermediately reprogrammed stem cells to iPSCs through mesenchymal-epithelial transition. *Development*, 2016. 143(1): 15-23.
8. Miki, T., et al., Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2010. Chapter 1: Unit 1E 3.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Chika Takano, Mika Ishige, Erika Ogawa, Nobuhiko Nagano, Tamaki Morohashi, Aya Okahashi, Kaori Kawakami, Atsushi Komatsu, Kei Kawana, Tatsuhiko Urakami, Ichiro Morioka	4. 巻 26
2. 論文標題 Nutrient management in the intrapartum period in maternal maple syrup urine disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2021.100711.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chika Takano, Brendan H Grubbs, Mika Ishige, Erika Ogawa, Ichiro Morioka, Satoshi Hayakawa, Toshio Miki	4. 巻 10(6)
2. 論文標題 Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 829-835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/sctm.20-0225.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Chika Takano, Erika Ogawa, Satoshi Hayakawa	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Insulin Resistance in Mitochondrial Diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom13010126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Isamu Taiko, Chika Takano, Masayuki Nomoto, Shingo Hayashida, Kazunori Kanemaru, Toshio Miki	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Selection of red fluorescent protein for genetic labeling of mitochondria and intercellular transfer of viable mitochondria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24297-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chika Takano, Masafumi Horie, Isamu Taiko, Quang Duy Trinh, Kazunori Kanemaru, Shihoko Komine-Aizawa, Satoshi Hayakawa, Toshio Miki	4. 巻 18(8)
2. 論文標題 Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition Maintains Stemness in Human Amniotic Epithelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 3083-3091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-022-10420-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計19件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Chika Takano, Masafumi Horie, Toshio Miki
2. 発表標題 Inhibition of epithelial mesenchymal transition maintains stemness in human amniotic epithelial cells
3. 学会等名 Joint IXA-CTRMS Virtual Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野智圭、堀江真史、早川 智、三木敏生
2. 発表標題 ヒト羊膜上皮細胞における上皮間葉転換と多能性に関する網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野智圭、三木敏生、早川 智
2. 発表標題 母体喫煙は羊膜上皮細胞の多能性を阻害する
3. 学会等名 第28回日本胎盤学会学術集会/第38回日本絨毛性疾患研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野智圭、小川えりか、石毛美夏、諸橋 環、今泉隆行、土方みどり、長野伸彦、岡橋 彩、川上香織、小松篤史、川名 敬、高木俊一、鈴木孝浩、桑名 司、木下浩作、浦上達彦、森岡一朗
2. 発表標題 帝王切開による出産と産褥期管理に成功したメープルシロップ尿症の一例
3. 学会等名 第124回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井千尋、石毛美夏、小川えりか、高野智圭、杉山洋平、鶴岡智子、村山 圭、細川淳一、沼倉周彦、淵上達夫、浦上達彦、森岡一朗
2. 発表標題 尿中オロト酸陰性で診断に苦慮したオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の男児
3. 学会等名 第124回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野智圭、小川えりか、石毛美夏、諸橋 環、長野伸彦、岡橋 彩、川上香織、小松篤史、川名 敬、浦上達彦、森岡一朗
2. 発表標題 帝王切開による出産と産褥期管理に成功したメープルシロップ尿症の一例
3. 学会等名 第48回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野智圭、小川えりか、岩間元子、豊島翔太、市野井那津子、石毛美夏、相澤志保子、岡山吉道、早川 智
2. 発表標題 先天性代謝異常症では食物アレルギー有病率が低い
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野智圭、小川えりか、市野井那津子、岩間元子、豊島翔太、岡山吉道、石毛美夏、浦上達彦、森岡一朗
2. 発表標題 脂肪酸代謝異常症におけるアレルギー疾患の有病率
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大海なつき、市野井那津子、殿内亮介、峯 佑介、高野智圭、小川えりか、石毛美夏、石毛信之、浦上達彦、森岡一朗
2. 発表標題 低血糖時の分枝鎖アミノ酸上昇を反復したシトリン欠損症幼児
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川えりか、石毛美夏、高野智圭、市野井那津子、濱崎孝史、笹井英雄、細川淳一、浦上達彦、森岡一朗
2. 発表標題 p.R53H変異を有する軽症高フェニルアラニン血症の管理についての検討
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野智圭、小川えりか、市野井那津子、石毛美夏、岩間元子、浦上達彦、森岡一朗
2. 発表標題 脂肪酸代謝異常症におけるアレルギー疾患の検討
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 高野智圭、小川えりか、市野井那津子、石毛信之、森岡一朗、石毛美夏
2. 発表標題 一過性メチルマロン酸血症を呈した 3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症の一例
3. 学会等名 第49回日本マススクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chika Takano, Toshio Miki
2. 発表標題 Expression of Traf2- and Nck-interacting kinase in EMT-inhibited human amniotic epithelial cells
3. 学会等名 The Transplantation Society 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chika Takano, Isamu Taiko, Remi Kuwabara, Ibrahim Fathi, Toshio Miki
2. 発表標題 Comparison of laboratory- and clinical-grade reagents in isolation and cultivation of human amniotic epithelial cells
3. 学会等名 The Transplantation Society 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野智圭、生田 稜、小川えりか、金丸和典、市野井那津子、早川 智、森岡一朗、石毛美夏
2. 発表標題 FBLX4変異による乳児ミトコンドリア病における5-アミノレブリン酸効果のin vitro解析
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡村尚子、藤城 緑、高野智圭、市野井那津子、小川えりか、森岡一朗、石毛美夏
2. 発表標題 2型糖尿病を合併した成人フェニルケトン尿症の栄養管理
3. 学会等名 第63回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chika Takano, Millei Kaga, Isamu Taiko, Yusuke Higuchi, Toshio Miki
2. 発表標題 Mechanism of stemness maintenance in human amniotic epithelial cells
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masayuki Nomoto, Isamu Taiko, Chika Takano, Kazunori Kanemaru, Toshio Miki
2. 発表標題 Direct differentiation of human amniotic epithelial cells to type II alveolar epithelial cells
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chika Takano, Ryo Ikuta, Erika Ogawa, Kazunori Kanemaru, Natsuko Ichinoi, Satoshi Hayakawa, Ichiro Morioka, Mika Ishige
2. 発表標題 In vitro effects of 5-aminolevulinic acid on infantile mitochondrial disease caused by FBXL4 mutation
3. 学会等名 44th Annual meeting of the Society for Inherited Metabolic Disorders (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 羊膜由来幹細胞の維持培地、維持培地用サプリメント及び維持培養方法	発明者 三木敏生、高野智圭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、J 3 1 7 6 7 A 1	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------