

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791716

研究課題名(和文) 羊膜由来幹細胞の移植による網膜再生

研究課題名(英文) Retinal regeneration using human amnion cell-derived neural progenitors.

研究代表者

北原 由紀(KITAHARA YUKI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30360176

研究成果の概要(和文)：

羊膜は胎児をつつんでいる膜で、妊婦の出産時には処分される膜である。帝王切開で得られた羊膜から多能性幹細胞を分離することが出来る。羊膜由来幹細胞は、網膜下に移植する事で網膜を構成する細胞に分化する能力があることが証明された。

研究成果の概要(英文)：

Human amnion cell-derived neural progenitors can be isolated and cultured from human amnion obtained during cesarean section under the informed consent. Human amnion cell-derived neural progenitors obtain long-term survival in the subretinal space and possess the potential of differentiating to retinal cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：再生医学、網膜再生、羊膜由来幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

網膜変性疾患は現在治療法がなく、失明原因の上位を占める。新しく神経幹細胞を移植

し、変性脱落する網膜の細胞に代わって、分化させ機能させることができれば、失われた視力を取り戻すことができる可能性がある。

現在、欧米では死産等で得られるヒト胎児の脳や網膜から神経幹細胞を分離し、網膜移植による網膜再生が試みられているが、羊膜由来神経幹細胞を用いた報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、出産により得られる羊膜を由来とする神経幹細胞を用い、網膜機能再生が可能であるかを評価する。

本研究では、宿主にマウスを用いるが、網膜下に移植された神経幹細胞は、宿主の免疫応答を抑制すれば移植局所で生着し、宿主網膜内に遊走し、網膜の構成細胞へと分化する可能性がある。これらの分化した細胞が、宿主のほかの網膜構成細胞とシナプスを形成することができれば、機能的にも網膜は再生される。特に変性網膜内で、神経幹細胞から分化した細胞が変性した細胞と置き換わることができれば、網膜変性症は治療できる。

現在、網膜再生研究の分野では、脳や網膜由来の神経幹細胞を網膜に移植し、それらが神経幹細胞として生着し、分化するかを主として、形態とマーカーで評価している研究が多いが、網膜機能の再生は未だ実現されていない。

本研究は、量的にも、倫理的にもより入手しやすい羊膜を由来とする神経幹細胞を用い、生着、分化するかを評価し、さらに、機能的にも網膜再生がなされるのかを目標とした研究である。したがって、ES 細胞や胎児細胞、患者自身の脳や眼内の神経幹細胞を用いる神経再生よりも、はるかに、臨床応用化しやすく、意義が大きいと考えられる。

## 3. 研究の方法

羊膜由来神経幹細胞は、羊膜細胞を培養し、

適切な条件の下で神経幹細胞への分化を誘導することで得る。ヒトの場合には文書によるインフォームドコンセントのもとで、帝王切開で得られた羊膜を用いる。

網膜下で羊膜由来神経幹細胞が生着し、分化するかを検討するため、マウスを宿主とし、ヒト羊膜由来神経幹細胞をドナーとして網膜下に移植する。ドナー細胞は PKH26 生体染色にてマーキングしておく。重症免疫不全 (SCID) マウスの網膜下に移植することで、網膜下という環境で羊膜由来神経幹細胞が生着できるかを検討する。網膜下移植後一定期間ごとに眼球を摘出し、神経幹細胞マーカー、神経線維マーカーなどにて染色し、ドナー細胞の生着期間と、それらが神経へ分化する能力を失わずにいるか、分化していくのかを検討する。また、BALB/c マウスの網膜下に移植することで、拒絶されるかを検討する。網膜下移植後一定期間ごとに眼球を摘出し、非特異的免疫反応をみるために好中球マーカーで切片を染色し、好中球の動態をみる。細胞性免疫をみるために T 細胞マーカー (CD4、CD8) で染色し、解析する。液性免疫をみるために宿主の血清を一定期間ごとに採取し、ドナー特異的免疫グロブリンを ELISA にて測定する。(陽性コントロールとして BALB/c マウスにヒト羊膜由来神経幹細胞を皮下注射し、同様の期間ごとに採血をして、ドナー特異的免疫グロブリンを ELISA にて測定する)。移植手技自体による変化を除外するために、BALB/c マウスに PBS を注入した眼球を作成し、同様の検討をする。ドナー細胞が拒絶された場合にはどの程度の免疫抑制で BALB/c の網膜下で SCID と同様にヒト羊膜由来神経幹細胞が生存し分化するのかを検討する。

羊膜由来神経幹細胞が、障害された網膜を機能的に回復させることができるのかを検討

するため、網膜変性モデルマウスにシクロスポリンで免疫を抑制し、ヒト羊膜由来神経幹細胞や、マウス羊膜由来神経幹細胞を網膜下に移植する。移植後一定期間ごとに網膜電図を記録する。網膜変性モデルマウスは網膜電図がフラットになる週齢のものを用いることで、神経が機能的に再生された場合には網膜電図により波形が記録できるようになる。網膜電図を記録した後は各々の眼球を摘出し、病理組織学的、免疫組織化学的に網膜が再生されているかを同時に評価する。

#### 4. 研究成果

羊膜由来神経幹細胞は、神経前駆細胞、SP細胞(幹細胞)の分離に成功している。

ヒト羊膜由来神経前駆細胞の移植においては、マウスへの異種移植を成功させるためには免疫抑制が必要であることがわかった。

ヒト由来 SP 細胞(幹細胞)においては、*in vitro* では炎症性サイトカインの暴露により、MHC クラス I、クラス II 共に発現することがわかったが、発現は可逆的であった。一方、*in vivo*での、SP 細胞の C57BL/6 マウス網膜下移植では、正常免疫で4週は生着し、移植細胞はMHC抗原を発現しなかった。このことから SP 細胞は異種網膜下移植においては免疫抑制を要しないことがわかった。これは、臨床応用において、患者への重大な負担となる免疫抑制剤投与を要しない可能性を示唆する重要な結果である。

C57BL/6 マウス網膜下では移植細胞は6カ月でその細胞数がかなり減少することがわかり、原因検索中である。しかしながら、網膜変性モデルマウス網膜下移植では、6カ月にわたり多数の細胞が生着し、視細胞マーカー、特に視力と明所視に関わる錐体細胞のマーカーであるオプシンを発現していたこと

がわかった。ヒトの網膜変性の再生医療にとって非常に有用な結果である。

網膜電図を用いた機能解析では、網膜変性モデルマウスにSP細胞を移植後、6か月で網膜機能の改善がみられた個体が確認され、移植により網膜機能を回復できる可能性を示唆する結果を得た。

量的にも倫理的にも入手しやすく、臨床応用しやすいヒト羊膜を由来とする神経幹細胞を用いて、免疫抑制せずに移植により網膜の機能的な再生ができる可能性を示唆するこれらの結果は、再生医学においてその意義は大きい。

#### 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)

北原由紀1、堀純子1、小林護2、谷口ヒロ子1、亀谷修平1、高橋浩1、桜川宣男2  
1 日本医科大学眼科学教室、  
2 北里大学医療衛生学部ニデック再生医学寄付講座 ヒト羊膜間葉細胞と間葉細胞由来 Side Population 細胞の網膜下移植における抗原性 第2回羊膜研究会 2009年5月23日 北里大学内(神奈川県)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

北原 由紀 (KITAHARA YUKI)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30360176

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：