

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03080

研究課題名（和文）胎児期からはじめる、自己羊水由来幹細胞を用いた多面的な脳性麻痺予防法の開発

研究課題名（英文）Development of a Multifaceted Approach to Prevent Cerebral Palsy Using Autologous Amniotic Fluid Stem Cells Starting from the Fetal Period

研究代表者

田中 守（Tanaka, Mamoru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：20207145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、hAFSCの炎症抑制効果と早産予防の有効性を検証した。LPS誘発性早産モデルでは、hAFSCの投与により早産率が有意に減少し、炎症性サイトカインも低下した。投与されたhAFSCは腹腔内でマクロファージと凝集体を形成し、マクロファージの極性が抗炎症型に変化した。さらに、pPROM患者から得られた羊水からもhAFSCを樹立し、コンタミネーションがないこと、通常のhAFSCと同様の性質を持つことを確認した。scRNA-seqを用いた細胞集団の単離試みでは、新たな単離法の開発には至らなかったが、hAFSCの細胞外小胞が抗炎症作用の中核を担っている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト羊水幹細胞は、羊水中から採取される間葉系幹細胞の一種であり、高い抗炎症作用を有していることが知られている。本研究は、ヒト羊水幹細胞が早産を予防する効果を初めて明らかにし、炎症性マクロファージを抗炎症性に変えることを示した。加えて、ヒト羊水幹細胞から単離された細胞外小胞にも抗炎症作用があることが明らかになった。これにより、hAFSCを用いた新しい周産期医療の可能性が示され、将来的には早産予防と関連する新生児の健康改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the anti-inflammatory effects and efficacy of human amniotic fluid stem cells (hAFSCs) in preventing preterm birth. In the LPS-induced preterm birth model, hAFSC administration significantly reduced the preterm birth rate and decreased inflammatory cytokines. Administered hAFSCs formed aggregates with macrophages in the peritoneal cavity, leading to a phenotypic switch of macrophages to an anti-inflammatory state. Additionally, hAFSCs were established from amniotic fluid obtained from pPROM patients, and no bacterial contamination was detected. Attempts to isolate specific cell populations using scRNA-seq did not lead to the development of new isolation methods, but it was suggested that extracellular vesicles from hAFSCs may play a central role in their anti-inflammatory effects.

研究分野：産婦人科

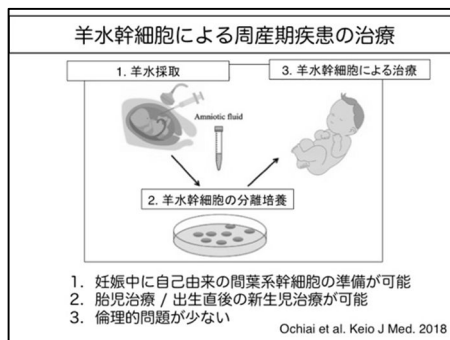
キーワード：ヒト羊水幹細胞 早産 胎児治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト羊水幹細胞 (Human Amniotic Fluid Stem Cells; hAFSC) は、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells; MSC) の一種であり、羊水細胞の約 1% に存在する幹細胞である。hAFSC は通常は廃棄される医療廃棄物であるため倫理的な問題を有さず、癌化のリスクが低いうえ、免疫学的な拒絶反応も起こさないことが報告されており、周産期における幹細胞治療の細胞源として期待されている。

これまで、脳梗塞や脊髄損傷など成人の神経疾患に対する幹細胞治療は臨床応用が進み、いくつかの製品が上市されているが、胎児・新生児の難治性神経疾患に対する幹細胞治療は未だ実現されていない。**周産期の脳障害や脊髄髄膜瘤などの疾患は、十分な治療効果を有する治療法が確立されておらず、新たな治療法の開発が喫緊の課題である。**



申請者らはこれまでに、低酸素虚血性脳症

(Hypoxic-Ischemic Encephalopathy; HIE) や脳室周囲白質軟化症 (Periventricular Leukomalacia; PVL)、脊髄髄膜瘤のモデル動物を作成し、hAFSC による治療効果を見出してきたが、機序に関する検討は十分ではなかった。

また、hAFSC は複数の細胞種を内包する Heterogeneity な細胞集団であり、**どの細胞集団が上記の疾患モデル動物における治療効果の根幹を担っているかは不明**であった。臨床応用に向け、治療機序の高い細胞を選択して培養し、製品化することは必須であり、多くの研究グループが hAFSC の細胞集団に関する検討を行っているが、申請時点では十分に明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、周産期の難治性神経疾患に対する新規治療法として、hAFSC による幹細胞治療をヒトに臨床応用するために、残された課題を検討することであった。下記 3 つの小課題を設定し、研究を行った。

- (1) 早産モデルマウスの作成と hAFSC による治療効果の検討
- (2) 早産期前期破水の患者から経腔的に流出した羊水からの hAFSC の樹立と無菌性試験
- (3) hAFSC の Heterogeneity と真に治療効果を有する細胞集団の単離方法の開発

### 3. 研究の方法

#### (1) 早産モデルマウスの作成と hAFSC による治療効果の検討

##### hAFSC の樹立

妊娠 15-16 週に羊水穿刺を受けた妊婦から収集した羊水を用い、既報に則り CD117 陽性細胞を磁気細胞分離キットで単離し、hAFSC を得た。得られた hAFSC は増殖培地で培養した。

##### 早産モデルマウスの作成と hAFSC の投与

妊娠 15 日の C57BL/6J マウスに 3% イソフルランで麻酔をかけ、26G 針を用いて子宮頸部に 20  $\mu$ g の LPS を注入した。LPS 注入 3 時間前に PBS (コントロール群) または 2x10<sup>6</sup> の hAFSC (治療群) を腹腔内に投与した。LPS 注入後に児が娩出されるまでの時間を 24 時間毎に記録した。

## 投与した hAFSC の追跡

hAFSC を蛍光トレーサーXenoLight DiR で標識し、腹腔内投与後 0、24、48 時間後に IVIS® Spectrum を用いて細胞の局在を観察した。腹腔内に hAFSC を含む細胞の凝集体が形成されたため、これを摘出して 4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成し、抗ヒトミトコンドリア抗体および抗マウスマクロファージ抗体で免疫染色し、その性質を調査した。

### (2) 早産期前期破水の患者から経腔的に流出した羊水からの hAFSC の樹立と細菌試験

#### 経腔的に流出した羊水の採取と hAFSC の樹立

研究の同意が得られた早産期前期破水 (pPROM) の患者より、診察時に腔より流出した羊水を採取した。遠心分離により得られた細胞を培養し、通常の羊水穿刺で得られた羊水細胞と同様に CD117 陽性細胞を単離して pPROM-hAFSC を得た。

#### pPROM-hAFSC の特性評価

pPROM-hAFSC が MSC の特性を満たすかを、表面抗原マーカー、分化能を評価して確認した。その後、通常の羊水穿刺で得られた hAFSC と同様の抗炎症作用、特に炎症型マクロファージの極性を変化させる作用について評価した。

#### 細菌試験

pPROM-hAFSC およびその培養上清を細菌培養検査に提出し、細菌の増殖がないことを確認した。

### (3) hAFSC の Heterogeneity と真に治療効果を有する細胞集団の単離方法の開発

#### シングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq)

hAFSC を sc-RNAseq の手法でクラスタリングし、内包する細胞集団を明らかにした。その中で、抗炎症作用を有していると推測される細胞集団を単離するための表面抗原マーカーの候補分子を複数選出し、フローサイトメトリー法で単離を試みた。

#### シングルセルピッキングシステム (SCP)

hAFSC は異なる形態の細胞を含んでいるため、SCP を使用して、直視下で紡錘形の細胞を単離して培養を試みた。

### (4) hAFSC 由来細胞外小胞の単離と性質の調査

#### 細胞外小胞の単離

hAFSC の培養上清から超遠心法で細胞外小胞を単離し、電子顕微鏡、ウェスタンブロットティングおよびナノ粒子トラッキングの手法で評価した。

#### 抗炎症作用の評価

hAFSC 由来細胞外小胞を炎症型マクロファージと共培養した。超高解像度共焦点顕微鏡とフローサイトメトリーで取り込みについて評価し、その抗炎症作用を調査した。

## 4. 研究成果

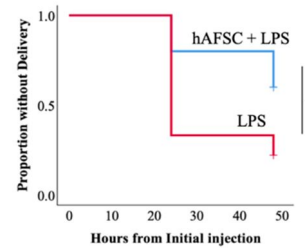
### (1) 早産モデルマウスの作成と hAFSC による治療効果の検討

#### hAFSC の樹立

既報に則り hAFSC を樹立し、骨、軟骨、脂肪といった間葉系細胞への分化能を有し、表面抗原マーカーで CD73, 90, 105 が陽性、CD14, 34, 45 が陰性であることを確認した。

## 早産モデルマウスの作成と hAFSC の投与

LPS の投与により、投与 48 時間後までにおよそ 78% の母体で早産に至ったが、hAFSC の投与により、**早産率はおよそ 40% まで有意に減少**した。腹腔内の細胞、胎盤、子宮頸部においても、一部の炎症性サイトカインが hAFSC 投与により有意に低下した。



## 投与した hAFSC の追跡

投与した hAFSC は腹腔内で凝集体を形成していた。免疫細胞染色の結果、この凝集体には、hAFSC のほかに、マクロファージが含まれていることが明らかになった。In vitro で炎症型マクロファージと hAFSC を共培養したところ、**炎症型マクロファージが抗炎症型マクロファージへ極性変化**している可能性が示唆された。

本研究は、hAFSC の炎症抑制効果を確認し、**早産の予防における有効性を示した初の報告**である。hAFSC の腹腔内投与により炎症誘発性の早産が抑制され、子宮頸部および胎盤の炎症が抑制された。特に、hAFSC が腹腔内でマクロファージと細胞塊を形成し、これにより**マクロファージの極性が炎症性から抗炎症性に変化**したことが示された。この研究は、hAFSC を用いた新しい治療法の可能性を示し、早産予防における臨床応用へ向けた重要な知見を明らかにした。

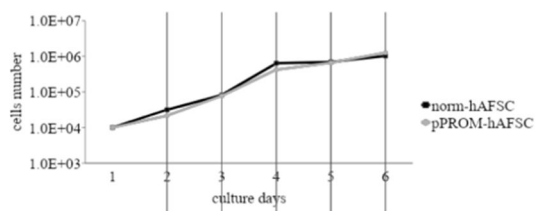
## (2) 早産期前期破水の患者から経腔的に流出した羊水からの hAFSC の樹立と細菌試験

### 経腔的に流出した羊水の採取と hAFSC の樹立

pPROM 患者の診察時、滅菌済み腔鏡診をかけたときに流出した羊水を採取し、遠心分離して羊水細胞を得た。多数の細胞断片を含んでいたため、遠心速度およびデカンテーションの調整により、細胞以外の成分を排除することができた。

### pPROM-hAFSC の特性評価

pPROM-hAFSC は通常の羊水穿刺で得られた hAFSC と同様に、MSC の性質を満たしていた。倍加時間も同程度で、増殖能も有意差を認めなかった。炎症型マクロファージとの共培養でも、通常の hAFSC と同様に抗炎症作用を有していることを確認した。



### 細菌試験

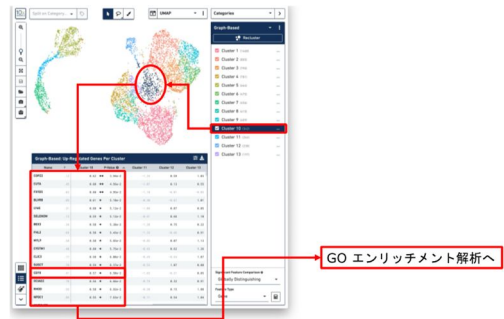
臨床で使用されている培養検査システムを用いて、細胞と培養上清の細菌検査を実施した。7 日間の培養で、細菌が発生しないことを確認した。

本研究は、**早産のリスクが極めて高い pPROM の患者から流出した羊水から、hAFSC が樹立可能で、細菌のコンタミネーションの可能性が低いことを示した**。妊娠初期に羊水穿刺をしていなくても、破水によって流出した羊水から hAFSC を得ることができれば、早産の合併症に対する細胞療法の細胞源として利用可能である。この**コンセプトの実現可能性を示した研究は他になく**、現在投稿準備中である。

## (3) hAFSC の Heterogeneity と真に治療効果を有する細胞集団の単離方法の開発

### シングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq)

scRNA-seq により、hAFSC の細胞集団を tSNE で可視化し、抗炎症作用を有しているといくつかの細胞集団の単離を試みた。炎症を抑制する効果が特に高い細胞集団に特異的に発現している表面抗原マーカーを候補分子として複数選出し、フローサイトメトリー法での単離を試みた。特定の表面抗原マーカーで単離することはできたが、他のセルラインでは当該の細胞集団が極めて少ないなど、**再現性に問題があり、本研究課題の研究期間内に新たな単離法を開発することはできなかった。**



#### シングルセルピッキングシステム (SCP)

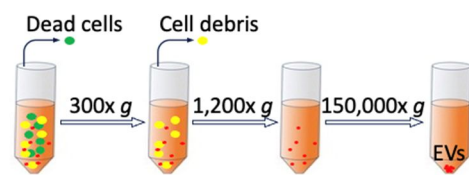
表面抗原での単離が困難であったため、形態学的に細胞の選出が可能な SCP による細胞集団の単離を試みた。しかし、SCP によるピッキングの際の細胞へのダメージが大きく、単離後の細胞の生存率が低いこと、SCP のシステムの一部が無菌ではないことから、**単離した細胞を培養するとコンタミネーションが発生**したことなどの解決できないトラブルが起きたため、本研究課題の研究期間内に SCP を用いた単離法の実現には至らなかった。

本研究においては、**当初予期していなかった事象が発生し、CD117 にかわる新たなスタンダードとなる単離法の開発には至らなかった。**しかし、scRNA-seq の結果、抗炎症作用を有している細胞集団から、細胞外小胞の分泌に関連している遺伝子の発現が有意に多いことが GO エンリッチメント解析により見出された。同時期に、海外の研究者とのディスカッションを通じて hAFSC の細胞外小胞が抗炎症作用の中核を担っているのではないかとこの着想を得た。そのため、hAFSC から**抗炎症作用の高い細胞集団を単離するのではなく、hAFSC から抗炎症作用の担い手である細胞外小胞を単離するほうが、より臨床応用へのハードルが低いと考え、下記の研究課題を追加した。**

#### (4) hAFSC 由来細胞外小胞の単離と性質の調査

##### 細胞外小胞の単離

hAFSC の培養上清を超遠心機にかけて細胞外小胞を遠心分離した。得られた細胞外小胞は、電子顕微鏡およびナノ粒子トラッキングにより、直径およそ 120nm であることが判明した。ウェスタンブロットティングでも、細胞外小胞のマーカーは陽性であり、細胞のコンタミネーションを示唆する所見は認められなかった。



##### 抗炎症作用の評価

蛍光色素で標識した hAFSC 由来細胞外小胞は、炎症型マクロファージに取り込まれた。その結果、**炎症型マクロファージの極性変化が促進され、抗炎症型マクロファージに特徴的な遺伝子の発現が有意に上昇した**(未発表データ)。

本研究においては、hAFSC 由来の細胞外小胞が、**抗炎症作用を有する**ことを見出した。また、この研究に引き続いておこなわれた実験で、**特定の表面抗原による中和処理で、この抗炎症作用が抑制されることが判明**している。現在、プロテオミクス解析をおこない、この細胞外小胞が炎症型マクロファージに与える影響について詳細な評価を実施している(未発表データ)。

## 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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ochiai Daigo, Abe Yushi, Fukutake Marie, Sato Yu, Ikenoue Satoru, Kasuga Yoshifumi, Masuda Hirotaka, Tanaka Mamoru	4. 巻 68
2. 論文標題 Cell sheets using human amniotic fluid stem cells reduce tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101472 ~ 101472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2020.101472	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 Abe Yushi, Ochiai Daigo, Sato Yu, Otani Toshimitsu, Fukutake Marie, Ikenoue Satoru, Kasuga Yoshifumi, Tanaka Mamoru	4. 巻 104
2. 論文標題 Amniotic fluid stem cells as a novel strategy for the treatment of fetal and neonatal neurological diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 247 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2021.01.009	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 Abe Yushi, Ochiai Daigo, Taguchi Masako, Kanzaki Seiji, Ikenoue Satoru, Kasuga Yoshifumi, Tanaka Mamoru	4. 巻 23
2. 論文標題 Human Amniotic Fluid Stem Cells Ameliorate Thioglycollate-Induced Peritonitis by Increasing Tregs in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6433 ~ 6433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23126433	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 Abe Yushi, Ochiai Daigo, Kanzaki Seiji, Sato Yu, Otani Toshimitsu, Ikenoue Satoru, Kasuga Yoshifumi, Tanaka Mamoru	4. 巻 478
2. 論文標題 Prophylactic administration of human amniotic fluid stem cells suppresses inflammation-induced preterm birth via macrophage polarization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 363 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-022-04512-2	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 Abe Yushi, Sato Yu, Tanaka Mamoru, Ochiai Daigo	4. 巻 38
2. 論文標題 Development of a new treatment for preterm birth complications using amniotic fluid stem cell therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 965 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-607	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 阿部 雄志, 落合 大吾, 升田 博隆, 佐藤 佑, 池ノ上 学, 春日 義史, 田中 守, 青木 大輔
2. 発表標題 ヒト羊水幹細胞の腹腔内投与は腹腔内凝集体による炎症制御を介して早産を抑制する
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	落合 大吾  (Ochiai Daigo)  (80348713)	北里大学・医学部・教授   (32607)	

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		
英国	University of Oxford		