

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 20日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791044

研究課題名（和文） “fetus as a patient”-胎児に対する幹細胞移植の治療戦略-

研究課題名（英文） Stem cell transplantation for fetal therapy

研究代表者

井原 規公（IHARA NORIMASA）

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：50425716

研究成果の概要（和文）：GFP マウスの骨髄から採取した単核球から幹細胞を回収して、胎齢 14.5 日目の BALB/c マウス胎仔の卵黄囊静脈内に投与した。生後 4 週間目にマウス末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いてドナー細胞の生着率について分析を行った結果、最大 20%に至るドナー細胞の生着が確認された。遺伝性疾患のモデルマウスで治療実験を行ったところ、表現型が正常の罹患マウスが確認され、胎児期から進行する脳神経症状や骨形成異常などに対する有効な治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We performed allogeneic in utero stem cell transplantation (IUT) at E14.5 from MHC-H2Kb+GFP+ C57BL/6TgN(act-EGFP) mouse donors into MHC-H2Kd+ BALB/c recipient fetuses. Donor mononuclear cells were injected intravenously into each fetus. At 4 weeks of age, peripheral blood hematopoietic chimerism was determined by flow cytometry, and we achieved about 20% of donor chimerism. In a hereditary disorder, donor cells can supply the missing enzyme continuously. Even low level of secretion of the enzyme reduces lysosomal storage. This indicates that IUT would be effective therapy for diseases especially in which brain damage and bone aplasia progress during early stage of development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・ 胎児・新生児医学

キーワード：胎児治療・幹細胞移植・免疫寛容・キメラリズム・先天性代謝異常症

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性血液疾患の治療として、生後に造血幹細胞移植による治療が行なわれているが、この造血幹細胞移植は移植前処置に伴う免疫抑制剤・放射線照射による合併症や移植後の移植片対宿主病（GVHD）などの副作

用が問題とされ安全性の高い治療法とはいえない。この副作用を最小限に抑えるためには HLA 適合ドナーを見つけることが必要とされるが、HLA 適合ドナーを用意することは実際には困難であることが多く、依然、小児の造血幹細胞移植は克服されるべき問題

が残されている。遺伝子導入治療についても現在のところ完全な安全性が担保されていない。遺伝性疾患に対する治療には限界があるため、こうした疾患の家族歴をもつ多くの夫婦は妊娠を断念あるいは妊娠しても妊娠継続を躊躇するケースが多く、夫婦に与える精神的負担も大きい。

(2) 胎児期は免疫系の発達が未熟であり、外界からの抗原に対して拒絶反応が起こらないことが知られている。免疫系発達の過程において、胎児がその抗原にさらされると免疫学的寛容（免疫トレランス）が獲得されるが、これは自然発生した多胎の動物において証明されており、また動物モデルにおいても胎児に移植された細胞に対する免疫トレランスが獲得されることが証明されている。これらから、胎児期に放射線、化学療法などの前処置を行わずに HLA が適合していないドナー細胞を移植しても免疫学的寛容が獲得されることが理論上可能であり、生後に行われる従来の骨髄移植に伴う危険性を少なくすることが可能であるだけでなく、HLA 適合に関わらず多くのドナー細胞が移植に利用することが可能となることが期待される。

(3) 現在、重症免疫不全症に対して子宮内造血幹細胞移植が臨床応用されているが、その他の遺伝性疾患に対する明らかな効果は現在のところ否定的である。これは移植細胞の生着数が十分ではないことが原因であり、その生着率の向上が認められれば移植細胞による治療効果が期待できる。また、胎児期にも病状が進行して致死的状态に至ることもある先天性代謝異常症・骨形成不全症・ α サラセミアなどの疾患においては、胎児期からの治療が理想的であり、早急な治療法の開発が期待されている。特に先天性代謝異常症においては、全身を巡る数多くのドナー由来の血液細胞から必要な酵素がわずかにでも分泌されることにより、治療に必要な十分量の酵素が確保されると考えられる。

このことから、造血幹細胞を用いた胎児移植は出生前診断が可能である遺伝性血液疾患のみならず、筋ジストロフィーなどのさまざまな遺伝性疾患に対する胎児治療として大変期待される。

(4) さらに、人工多能性幹細胞 (iPS) を含む遺伝子導入技術を用いた再生医療が期待されているが、遺伝性疾患のなかには胎児期に病状が進行するため、胎内で致死となったり機能障害をきたすものも多く、課題が残されている。これに対して胎児期の細胞治療においては、成人に比して少ない細胞数で十

分であり、あらかじめ投与する細胞を準備することができることが大きなメリットがある。

これまでの研究から、ドナー由来の造血幹細胞を胎児期に移植することによって生着させる手法が確立されている。この免疫寛容の獲得を利用すれば、同じドナー由来の細胞や組織の移植も生後に免疫抑制剤を使うことなく可能であり、極めて理想的な移植治療となり得る。

(5) 近年、造血幹細胞や間葉系幹細胞が種々の細胞（筋、骨、軟骨、脂肪など）に分化することが数多く報告され、さまざまな組織や臓器に対して幹細胞を利用する細胞療法・再生医療の可能性が議論されるようになった。すでに臨床応用されている造血幹細胞にとどまらず、筋や骨に分化する間葉系幹細胞の生着およびその分化・増殖によって筋ジストロフィーや骨形成不全症の治療につながり、間葉系幹細胞を用いた細胞治療の確立も求められている。

これが日常的な治療法の選択肢となるためには、治療に用いる細胞に関して再現性を保証するための基準がぜひとも必要である。また、細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を実現化するために必要な技術として、細胞の分離培養技術の確立および細胞品質管理の標準化技術がある。前者は特に造血幹細胞の研究で相当の実績を得てきている。このような状況の中で、臨床研究から医薬品へステップアップを図るためには後者のヒト細胞のバリデーション方法を確立することが重要となる。

2. 研究の目的

(1) 胎児期の移植免疫学および発生・分化の基礎的研究

胎児期では外界からの抗原に対して拒絶反応が起こらず、免疫トレランスが獲得されることが知られているが、近年、同種異系マウス間の移植実験において十分な生着率が得られないという報告がなされている。これまでの研究ではドナー細胞のキメリズムの成立とドナー細胞特異的な免疫トレランスの獲得については示されたが、その機序についての基礎的な研究は十分とはいえない。ドナー細胞の生着率が高くなる条件を見出し、移植治療に結びつく免疫トレランス獲得のメカニズムの解明を目指す。

(2) 胎児期の移植治療の開発

欧米では、遺伝性血液疾患と診断された罹患胎児に対して造血幹細胞の移植が行われ、1995年に初めてX連鎖SCIDにおいて行われた移植では有効な成績が得られている (N Engl J Med 335:1806-10, 1996)。ところが、

それ以外の疾患に関しては、動物モデルにおいても有効な治療結果を得るのに十分な高いレベルのキメリズムの維持は困難な結果であり、臨床に応用できる段階ではなかった。

今後はトランス獲得のメカニズムの基礎的研究とこれらの基礎研究をもとにして、治療効果が期待される高いレベルのキメリズムの獲得が可能な新しい胎児移植法の開発が課題とされる。

(3) 子宮内幹細胞移植の再生医療への応用

最近では、骨髄や脂肪組織中に筋、神経、骨、軟骨、脂肪などに分化する間葉系幹細胞が存在することが知られ、これらの細胞を胎児期の移植治療に応用することが可能であれば、胎児治療は遺伝性血液疾患だけでなく、先天性代謝性疾患、骨・軟骨系疾患、筋・神経疾患に対しても治療が可能な新しい治療法として期待される。日本ではこの分野に関する研究はほとんどなく、また外国における研究ではマウス、ラット、ヒツジ、サルなどを用いた研究が行われているが報告された論文は少数である。

先天性代謝異常症などの遺伝性疾患のなかには、胎児期に病状が進行して致死あるいは機能障害にいたり、生後におこなう遺伝子治療などでは手遅れとなる疾患も多い。細胞治療はあらかじめ準備することが可能であり、①胎児期に進行する病態の増悪を軽減する、②免疫寛容が成立しているため抗癌剤等の免疫抑制剤が不要である、③細胞数が少なくてもよい、④癌化しないことが確認されている細胞を使用することができる等の利点がある。特に造血幹細胞が生着した場合においては、同じドナー由来の細胞や臓器が生後に拒絶されないことは特筆すべき特徴である。

本研究では、ドナー造血幹細胞を胎児期の疾患動物に生着させて直接治療効果を確認、もしくは二次的なドナー由来の間葉系幹細胞の移植により、新しい治療法を確立することが目的である。胎児期に行われる再生医療に対しては、既に確立されている幹細胞移植を応用する意義は大きい。

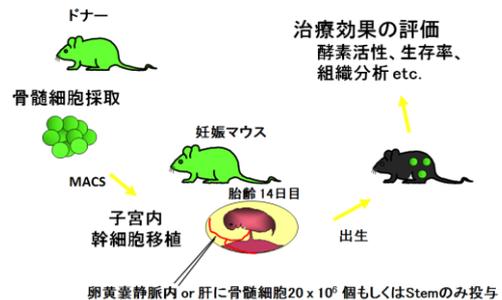
3. 研究の方法

(1) 胎児移植治療モデルの確立

マウスを用いた胎児幹細胞移植治療モデルにより、キメラマウスを作成する。このモデルは既に諸研究報告により確立されたものである。このキメラマウスに対し、侵襲の少ないプロトコルを用いた細胞移植によりドナーキメリズムの増幅が可能であることを証明する。またこのプロトコルでは、

通常の成体マウスでは移植治療の効果が得られないことも確かめ侵襲の少ないプロトコルであることを証明する。

実験方法



具体的には、GFP発現ドナーマウス由来の骨髄単核球を胎齢14日目のマウス胎仔の卵黄囊静脈内に、 20×10^6 細胞/胎仔となるように調製して投与後、移植細胞の胎仔への生着率を検討する。胎齢20日に分娩となった新生仔マウスを飼育して、生後4週間目となる時期にマウス末梢血を採取し、単核細胞を抽出したのちフローサイトメトリーを用いてドナー細胞の生着率について分析を行う。

さらに、キメラマウスに対してブスルファン投与下にドナーの骨髄を再移植して、その後4週目・8週目・24週目にドナー細胞の生着率をフローサイトメトリーで分析する。

(2) 治療効果が十分得られるレベルのキメリズムの獲得が可能な治療法の開発

ドナー細胞が生着したキメラマウスを用いて、その疾患マウス（先天性代謝異常症、筋ジストロフィー、骨形成不全症）に出現する症状の改善の有無と程度について検討を行なう。またドナー細胞生着率と症状改善の程度についての検討も同時に行う。ドナー細胞が生着しても臨床症状が改善されない場合、さらにドナー細胞の生着率を増加させるように、生後8週目のキメラマウスに骨髄造血幹細胞の2次移植を行う。その後、同様にドナー特異的な抗体を用いてドナー細胞の生着率を分析し、その疾患マウスの症状の改善の有無と程度について分析を行う。また、同じドナーマウスから得られた間葉系幹細胞を免疫寛容が成立している疾患マウスに投与して、症状の改善に関して検討する。

(3) ヒト間葉系幹細胞の規格化

得られたヒト幹細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析 (Affymetrix 社 GeneChip による解析) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行う。使用するモノクローナル抗体は、ヒト ES 細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、TRA1、

Oct-3/4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補マーカーも含む。

(4) 異種動物成分を排除したヒト間葉系幹細胞培養法・維持法の標準化（完全ヒト型培養システムの開発）

臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・脂肪などのヒト組織を間葉系幹細胞の供給源とする。既にラボ内にて、骨髄などから 30 種類以上のヒト間葉系幹細胞を得ている。その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみ、あるいは無血清培地を用いた培養法の開発を目指す。

3. 研究成果

(1) 胎児移植治療モデルの確立

卵黄嚢静脈投与による子宮内胎児移植によって、正常免疫能を持つキメラマウスを作成した。GFP 陽性ドナー細胞の生着率が 20.5% になるキメラマウスを作成することができたが、出生仔におけるキメラマウスの割合は 8.7%にとどまり、そのうち生着率が 5%を超えるものは 26.5%であった。プロトコールの改変により、キメラマウスが 38.5%（処置をしていない出生仔を含む）に至った。

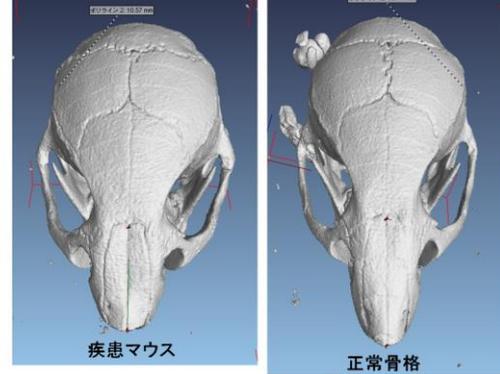
成熟マウスにおいては異種抗原をもつ細胞移植は生着しないことも確認している。

また、ドナー細胞の生着率を増加させるよう、生後 4 週目のキメラマウスに少量のプスルファンを併用した骨髓造血幹細胞の 2 次移植を行ったところ、ほとんど全ての血液細胞がドナー細胞に置換されたマウスも確認された。さらに、疾患マウスを用いて胎児幹細胞移植治療を行い、ドナー細胞の生着の確認とともにその治療効果を評価する方法について検討した。

(2) 治療効果が十分得られるレベルのキメリズムの獲得が可能な治療法の開発

ドナー細胞が生着した遺伝性疾患マウスを用いて、症状の改善の有無と程度について検討した。ドナー細胞が 1%程度生着していれば臨床症状が顕著に改善され、寿命、骨格、生殖能力に関して完全に表現型が治癒されている個体も確認された。組織学的にもドナー細胞が分化および生着していることが明らかであった。

3D CT画像による評価



骨格筋に分化する間葉系細胞を、筋ジストロフィーのモデルマウスの大腿筋へ投与したところ、筋線維に分化したことが既に報告されている。

同様の間葉系幹細胞（子宮内膜由来前駆細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞）を子宮内移植することによってキメラマウスの作成を試みたが、現在のところ生着が確認されていない。また、成獣における静脈内投与では、肺塞栓が原因と思われる死亡例も数個体認められた。

(3) ヒト間葉系幹細胞の規格化

得られたヒト幹細胞に対して Affimetrix 社 GeneChip による網羅的遺伝子発現解析、ならびに SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補であるモノクローナル抗体を用いて分子発現解析を行い、規格設定を行った。

(4) 異種動物成分を排除したヒト間葉系幹細胞培養法・維持法の標準化（完全ヒト型培養システムの開発）

臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・脂肪などのヒト組織から、無血清培地を用いて異種動物成分を排除し、間葉系幹細胞を誘導する培養法を確立した。

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）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 規公 (IHARA NORIMASA)

(独)国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：50425716