

Title	脳性麻痺に対する自己羊水細胞由来幹細胞治療の開発
Sub Title	Development of stem cell therapy derived from autologous amniotic fluid cells for cerebral palsy
Author	落合, 大吾(Ochiai, Daigo) 田中, 守(Tanaka, Mamoru)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>低酸素虚血性脳症(HIE)は、脳性麻痺の主要因である。今回は、新生仔HIEモデルマウスを用いて、ヒト羊水幹細胞(hAFS) 投与の治療効果を検討した。ヒト羊水中CD117陽性細胞をhAFSとして分離した。生後9日目(P9)にマウスの右総頸動脈を結紮し、8%酸素に30分間曝露させてHIEモデルを作成した。P19に治療群にはhAFSを、非治療群にはPBSを鼻腔内投与した。P30に運動機能試験を実施し、脳を組織標本として評価した。hAFS投与は、HIEモデルマウスの脳実質を回復し運動障害を軽減した。hAFS投与は、HIE慢性期の新規治療となる可能性が示唆された。</p> <p>Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) remains a major cause of cerebral palsy. However, the efficacy of human amniotic fluid stem cells (hAFS) for HIE, especially in the chronic phase, remains unclear. The aim of this study was to determine the effect of hAFS on the chronic phase of HIE. hAFS were isolated from AF cells as CD117+ cells. Hypoxia-Ischemia (HI) was induced in mice at postnatal day 9 (P9). Animals intranasally received hAFS or PBS at P19 and were harvested for histological analysis after functional tests at P30. hAFS improved sensorimotor deficits in HIE by brain restoration followed by migration to the lesion. These results suggest that hAFS administration could be a novel treatment for HIE, especially in the chronic phase.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2015～2017 課題番号：15K09724 研究分野：再生医療
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09724seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09724seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09724

研究課題名(和文) 脳性麻痺に対する自己羊水細胞由来幹細胞治療の開発

研究課題名(英文) Development of stem cell therapy derived from autologous amniotic fluid cells for cerebral palsy

研究代表者

落合 大吾 (OCHIAI, DAIGO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80348713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素虚血性脳症(HIE)は、脳性麻痺の主要因である。今回は、新生仔HIEモデルマウスを用いて、ヒト羊水幹細胞(hAFS)投与の治療効果を検討した。ヒト羊水中CD117陽性細胞をhAFSとして分離した。生後9日目(P9)にマウスの右総頸動脈を結紮し、8%酸素に30分間曝露させてHIEモデルを作成した。P19に治療群にはhAFSを、非治療群にはPBSを鼻腔内投与した。P30に運動機能試験を実施し、脳を組織標本として評価した。hAFS投与は、HIEモデルマウスの脳実質を回復し運動障害を軽減した。hAFS投与は、HIE慢性期の新規治療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) remains a major cause of cerebral palsy. However, the efficacy of human amniotic fluid stem cells (hAFS) for HIE, especially in the chronic phase, remains unclear. The aim of this study was to determine the effect of hAFS on the chronic phase of HIE.

hAFS were isolated from AF cells as CD117+ cells. Hypoxia-ischemia (HI) was induced in mice at postnatal day 9 (P9). Animals intranasally received hAFS or PBS at P19 and were harvested for histological analysis after functional tests at P30. hAFS improved sensorimotor deficits in HIE by brain restoration followed by migration to the lesion. These results suggest that hAFS administration could be a novel treatment for HIE, especially in the chronic phase.

研究分野：再生医療

キーワード：羊水 脳性麻痺 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳性麻痺は医療技術の進歩にもかかわらず減少しておらず、一旦脳障害が進行し脳性麻痺になると有効な治療法はない。

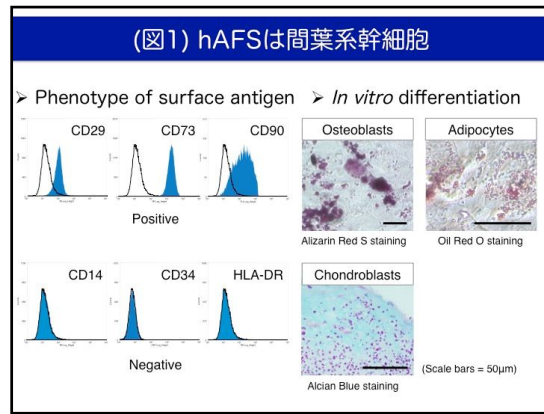
低酸素虚血性脳症 (hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE) は、脳血流遮断により脳神経細胞が低酸素に陥ることにより生じ、不可逆的な脳性麻痺へと進行する病態である。新生児 HIE は脳性麻痺の主要因であり、その治療法開発は周産期医療における最重要課題の一つである。HIE の急性期～亜急性期(傷害から 72 時間以内)に、低体温療法や臍帯血幹細胞投与が実施されているが、治療効果は限定的であり<sup>1)</sup>、HIE 慢性期(傷害から 72 時間以降)にも実施可能な治療法の検討が必要である。

## 2. 研究の目的

今回我々は、妊娠中から採取・培養を開始することが可能であり、新生児 HIE 慢性期においても十分な自家移植が可能な間葉系幹細胞の候補としてヒト羊水幹細胞(human Amniotic Fluid Stem Cells: hAFS)に注目し、hAFS が新生児 HIE に対する新規治療となりえるか検討することとした。

## 3. 研究の方法

(1)本学倫理委員会承認の下(承認番号:20140285)で、妊娠 15-17 週に当院で羊水検査を施行した患者羊水のうち約 5ml を研究用に使用した。そのヒト羊水細胞から CD117 陽性羊水細胞を、CD117 抗体単離法<sup>2)</sup>を用いて hAFS を分離・培養した。CD117 陽性羊水細胞は、間葉系マーカー陽性、単球・造血幹細胞・白血球マーカー陰性で、骨・軟骨・脂肪への分化能を持つことから、hAFS は間葉系幹細胞の定義を満すことが示された(図 1)。



(2)本研究では、成熟児脳障害を模倣した HIE モデルマウス<sup>3)</sup>を右総頸動脈結紮・低酸素(8%酸素に 30 分間)負荷により作成した。早産児脳傷害モデルマウス(Neonatal chronic hypoxia model: CH model)に関しても検討を行うことを考えモデル作成を試みたが、モデルの確立には至らなかった。

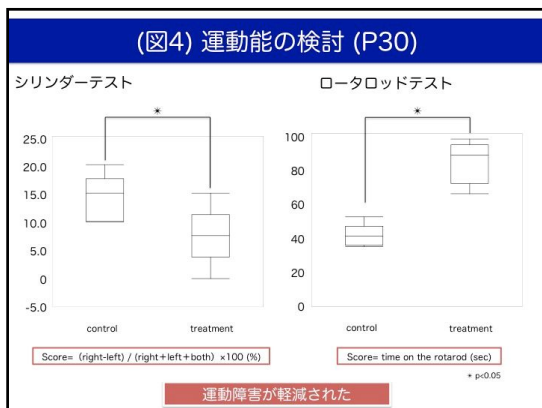
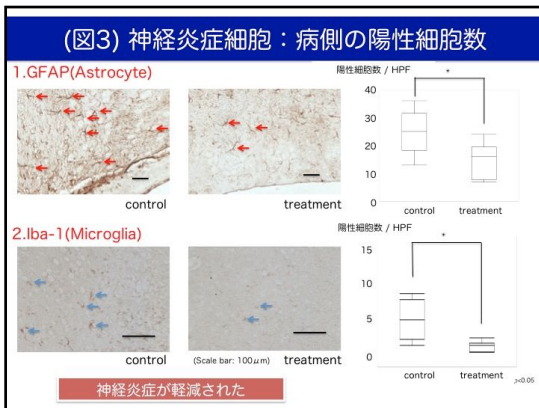
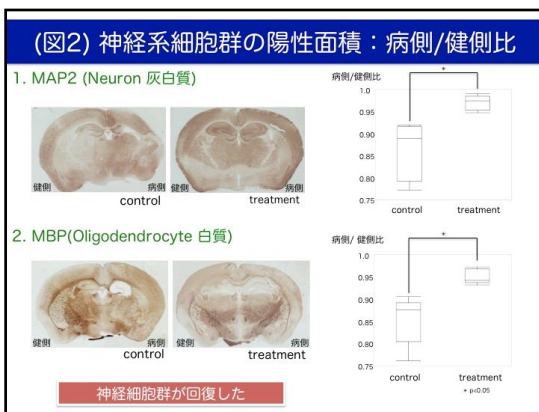
(3)HIE モデルマウスに対する治療効果は運動機能的評価と病理組織学的評価に分けて検討した。

運動機能評価に関しては、ロータロッドテストとシリンダーテストを行った。病理組織学的評価は主に免疫組織染色で検討する方針とし、Neuron, Oligodendrocyte, Astrocyte, Microglia のマーカー分子を用いた。生後 9 日目のマウスを用いて HIE モデルを作成し、生後 19 日目に治療群には hAFS( $5.0 \times 10^5$  個/匹)を投与し、非治療群には PBS を投与した。生後 30 日目にシリンダーテスト(筒の中にマウスを入れ、マウスが左右どちらの肢で筒をタッチするかをカウントする検査。運動機能の左右差の評価が可能である。今回の HIE モデルでは右総頸動脈を結紮し低酸素負荷を与えるため、患側は左となる score(%) が大きいほど相対的に左の運動障害が強いことを示している)及びロータロッドテスト(回転する筒の上にマウスが乗っていられる時間を計測する四肢の協調運動試験)を実施後に病理組織学的評価目的で脳を摘出し冠状断面標本とした。さらに、蛍光色素

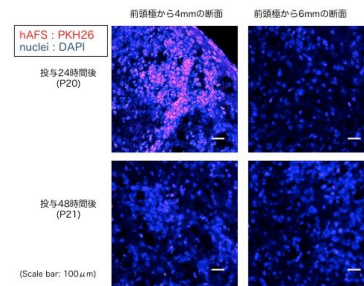
PKH26 で標識した hAFS ( $5.0 \times 10^5$  個/匹) を生後 19 日目に投与し、脳組織標本を用いて脳実質への生着を評価した。なお、幹細胞投与経路としては、静脈投与・脳室内投与・腹腔内投与・鼻腔投与等の報告があるが、投与における侵襲性の低さ及び中枢神経への選択的な投与という観点から、まず鼻腔内投与<sup>4)</sup> を選択した。

#### 4. 研究成果

今回の実験の結果、HIE慢性期(傷害から72時間以降)ではhAFSの鼻腔内投与により、



(図5) PKH-26標識hAFSの追跡



脳の灰白質及び白質が温存され(図2), 神経炎症が軽減され(図3), 運動障害も軽減される(図4)ことが示された。

また、鼻腔投与後のhAFSは脳実質に一過性に生着していることも示された(図5)。

これまでに骨髄や臍帯血等に由来するMSCは、動物モデル実験においてHIEに対する治療効果を持つことが報告されているが<sup>5)</sup>, hAFSのHIE慢性期(傷害から72時間以降)における投与効果に関しては報告がない。

また、新生児脳傷害急性期に対して、臍帯血幹細胞自家移植や低体温療法の臨床応用が開始されているが治療効果は限定的であり、HIE慢性期にも実施可能な追加治療開発が求められている。しかし、臍帯血は出生後でなければまとまった量の採取は困難であり出生直後に投与できる細胞数には限界がある。HIEの慢性期にも十分量の自家移植が可能な幹細胞は、出産前からの採取及び培養が可能なhAFS以外には考えにくい。hAFS 自家移植による治療が確立されれば、周産期医療における最大の課題の一つである新生児脳傷害の予後改善につながる可能性がある。

今回の研究で示唆された、hAFSのHIE慢性期に対する治療効果は極めて重要な知見と考えられる。

#### < 引用文献 >

1) Gabriel S et al. Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Frontiers in Neurology*. 2014

2) De Coppi et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nature Biotechnol. 2007

3) Rice et al. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat, Ann Neurol. 1981

4) Danielyan L et al. Intranasal delivery of cells to the brain. Eur J Cell Biol. 2009

5) Gonzales-Portillo GS et al. Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Frontiers in neurology. 2014

#### 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8件)

1) Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Otani T, Fukutake M, Tanaka M. Human amniotic fluid stem cells: Therapeutic potential for perinatal patients with intractable neurological disease. Keio J Med. 査読あり. 2018. [Epub ahead of print]

DOI: 10.2302/kjm.2017-0019-IR.

2) Ochiai D, Miyakoshi K, Koinuma G, Tanaka M. Prenatal sonographic images of left pulmonaryartery sling.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 査読あり. 2017;211:217-218.

DOI: 10.1016/j.ejogrb.2015.09.035.

3) Kasuga Y, Ochiai D, Tanaka M, Aoki D. Mid-trimester residual cervical length and the risk of preterm birth in pregnancies after abdominal radical trachelectomy: a retrospective analysis.

BJOG. 査読あり. 2017;124:1729-35.

DOI: 10.1111/1471-0528.14688.

4) Kasuga Y, Hata K, Tajima A, Ochiai D, Saisho Y, Matsumoto T, Arata N, Miyakoshi K, Tanaka M. Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women: A case-control

study.

Endocr J. 査読あり. 2017;64:463-475.

DOI: 10.1507/endocrj.EJ16-0431.

5) Ochiai D, Miyakoshi K, Akiba Y, Otani T, Tanaka M. Atypical HELLP syndrome secondary to uteroplacental insufficiency. Hypertension research in pregnancy. 査読あり. 2016;4:106-107.

DOI: 10.14390/jsshp.HRP2016-003

6) Kasuga Y, Nishio H, Miyakoshi K, Ochiai D, Kuji N, Aoki D, Tanaka M.

Pregnancy Outcomes After Abdominal Radical Trachelectomy for Early-Stage Cervical Cancer: A 13-Year Experience in a Single Tertiary-Care Center. Int J Gynecol Cancer. 査読あり.

2016;26:163-168.

DOI: 10.1097/IGC.0000000000000571.

7) Ito A, Saisho Y, Miyakoshi K, Fukutake M, Kasuga Y, Ochiai D, Tanaka M, Ito H. Time-dependent changes in insulin requirement for maternal glycemic control during antenatal corticosteroid therapy in women with gestational diabetes: a retrospective study.

Endocr J. 査読あり. 2016;63:101-104.

DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0482

8) Ochiai D, Miyakoshi K, Miwa T, Fukutake M, Kasuga Y, Matsumoto T, Tanaka M.

Prenatal diagnosis of thrombosed dural sinus malformation with periorbital hemangioma: a case report.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 査読あり. 2016;198:157-159.

DOI: 10.1016/j.ejogrb.2015.09.035.

[学会発表](計11件)

1) Otani T, Ochiai D, Abe Y, Sato Y, Fukutake M, Matsumoto T, Miyakoshi K,

Tanaka M. Human Amniotic Fluid Stem Cells: A novel treatment option for neonatal brain palsy. 65<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of Society for Reproductive Investigation. 2018. (国際学会)

2) Abe Y, Ochiai D, Masuda H, Otani T, Fukutake M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M. A novel strategy to treat fetal myelomeningocele using human amniotic fluid stem cells. 65<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of Society for Reproductive Investigation. 2018. (国際学会)

3) Sato Y, Ochiai D, Masuda H, Fukutake M, Abe Y, Otani T, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M. Human amniotic fluid stem cells have a unique potential to accelerate cutaneous wound healing with less fibrotic scarring like fetal wound healing. 65<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of Society for Reproductive Investigation. 2018. (国際学会)

4) 落合大吾, 阿部雄志, 大谷利光, 福武麻里絵, 佐藤佑, 秋葉洋平, 松本直, 升田博隆, 宮越敬, 田中守. ヒト羊水幹細胞の羊水腔内注入によるラット脊髄髄膜瘤の治療効果に関する検討. 第15回 日本胎児治療学会学術集会. 2017.

5) Fukutake M, Ochiai D, Masuda H, Sato Y, Akiba Y, Otani T, Kasuga Y, Ikenoue S, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M, Daisuke Aoki. Effects of human amniotic fluid stem cells on cutaneous wound healing in a mouse excisional model. 69<sup>th</sup> Annual Congress of Japan society of Obstetrics and Gynecology. 2017.

6) Ochiai D, Fukutake M, Masuda H, Fukutake M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M. The effect of human amniotic fluid stem cells on the cutaneous wound healing. 19<sup>th</sup> Congress of Federation of Asia and Oceania

Perinatal Societies. 2016. (国際学会)

7) 福武麻里絵, 落合大吾, 升田博隆, 大谷利光, 秋葉洋平, 池ノ上学, 春日義史, 松本直, 宮越敬, 田中守. ヒト羊水幹細胞がマウス皮膚創傷治癒に与える影響. 第14回 日本胎児治療学会学術集会. 2016.

8) 福武麻里絵, 落合大吾, 大谷利光, 秋葉洋平, 春日義史, 池ノ上学, 松本直, 宮越敬, 田中守. ヒト羊水幹細胞はマウス皮膚創傷治癒を促進する. 第52回 日本周産期・新生児医学会学術集会. 2016.

9) Fukutake M, Ochiai D, Akiba Y, Otani T, Kasuga Y, Ikenoue S, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M, Daisuke Aoki. Conditioned medium from human amniotic fluid stem cell ameliorates glutamate-induced apoptosis. 68<sup>th</sup> Annual Congress of Japan society of Obstetrics and Gynecology. 2016.

10) Fukutake M, Ochiai D, Masuda H, Otani T, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M. Conditioned medium from human amniotic fluid stem cells ameliorated glutamate-induced neuronal cell injury. 63<sup>rd</sup> Annual Scientific Meeting of Society for Reproductive Investigation. 2016. (国際学会)

11) 福武麻里絵, 落合大吾, 大谷利光, 秋葉洋平, 春日義史, 池ノ上学, 松本直, 宮越敬, 田中守. 胎児や新生児への自家移植を目指したヒト羊水幹細胞治療ツールの作成. 第13回 日本胎児治療学会学術集会. 2015.

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称: 羊水幹細胞を含む細胞シート及びその製造方法  
発明者: 田中守、福武麻里絵、落合大吾、升田博隆  
権利者: 学校法人慶應義塾  
種類: 特許  
番号: J12532A1  
出願年月日: 平成 27 年 11 月 20 日  
国内外の別: 国内

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 大吾 (OCHIAI, Daigo)  
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教  
研究者番号：80348713

(2) 研究分担者

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