慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	脳性麻痺に対するヒト羊水幹細胞治療の最適化に関する検討
Sub Title	Optimization of human amniotic fluid stem cell therapy for cerebral palsy
Author	落合, 大吾(Ochiai, Daigo)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	低酸素虚血性脳症と脳室周囲白質軟化症は，分娩時の脳虚血により脳神経細胞が低酸素に陥ることで発生する．これらは，脳性麻痺へと進行し脳神経細胞に不可逆的な障害をもたらす．我々は，これまでに，低酸素虚血性脳症マウスモデルの鼻腔内に羊水幹細胞を移植して，脳性麻痺への進行を予防する可能性を見出してきた． 今回，我々は，脳室周囲白質軟化症モデルラットを作製し，羊水幹細胞をマウスの腹腔内に投与し治療効果の検討を行った．その結果，投与した羊水幹細胞が腹腔内で凝集体を形成し，脳障害を抑制する可能性が示唆された． Neuronal hypoxic damages induced by cerebral ischemia during delivery evoke hypoxic ischemic encephalopathy and periventricular leukomalacia(PVL), which leads to cerebral palsy characterized by irreversible neuronal damages. In this study, we investigated the effect of intraperitoneal administration of human amniotic fluid stem cell (hAFSC) on rat model of PVL and found that hAFSC could reduce neuroinflammation and prevent the progression from PVL to cerebral palsy. We also found that hAFSCs aggregated in the peritoneal cavity and might enhance their effect.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2018～2019 課題番号：18K15730 研究分野：産婦人科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K15730seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１５７３０

研究課題名（和文）脳性麻痺に対するヒト羊水幹細胞治療の最適化に関する検討

研究課題名（英文）Optimization of human amniotic fluid stem cell therapy 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）・講師

研究者番号：８０３４８７１３

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）：低酸素虚血性脳症と脳室周囲白質軟化症は，分娩時の脳虚血により脳神経細胞が低酸素に陥ることで発生する．これらは，脳性麻痺へと進行し脳神経細胞に不可逆的な障害をもたらす．我々は，これまでに，低酸素虚血性脳症マウスモデルの鼻腔内に羊水幹細胞を移植して，脳性麻痺への進行を予防する可能性を見出してきた．
今回，我々は，脳室周囲白質軟化症モデルラットを作製し，羊水幹細胞をマウスの腹腔内に投与し治療効果の検討を行った．その結果，投与した羊水幹細胞が腹腔内で凝集体を形成し，脳障害を抑制する可能性が示唆された．

研究成果の学術的意義や社会的意義
脳性麻痺は現時点で有効な治療法の存在しない周産期難治性神経疾患である．ヒト羊水幹細胞は胎児から樹立可能な間葉系幹細胞の一種であり，抗炎症作用があることが知られている．我々はこれまでに，低酸素虚血性脳症モデルマウスに羊水幹細胞を経鼻投与することで一定の治療効果を見出してきた．今回，我々は類似のモデルである脳室周囲白質軟化症モデルラットに対して，ヒト羊水幹細胞を腹腔内投与することで，細胞が腹腔内で凝集体を形成し，これにより全身の炎症が抑制されて脳障害が予防される可能性を見出した．この知見は，脳性麻痺に対する革新的な治療法になる可能性があると自負しており，今後のさらなる発展が望まれる．

研究成果の概要（英文）：Neuronal hypoxic damages induced by cerebral ischemia during delivery evoke hypoxic ischemic encephalopathy and periventricular leukomalacia(PVL), which leads to cerebral palsy characterized by irreversible neuronal damages.
In this study, we investigated the effect of intraperitoneal administration of human amniotic fluid stem cell (hAFSC) on rat model of PVL and found that hAFSC could reduce neuroinflammation and prevent the progression from PVL to cerebral palsy. We also found that hAFSCs aggregated in the peritoneal cavity and might enhance their effect.

研究分野：産婦人科

キーワード：ヒト羊水幹細胞　間葉系幹細胞　脳性麻痺　脳室周囲白質軟化症　低酸素虚血性脳症　細胞凝集体

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

分娩時の低酸素状態や感染などの外因に起因する脳虚血や脳損傷により，脳神経細胞が障害を受けることにより不可逆的な脳性麻痺を発症することが知られている．本邦においては出生 1000 あたり 1-2 人の割合で発生しているにも関わらず，児の生命予後や神経学的予後を改善しうる根本的な治療法は存在しない．

現在，脳障害などの神経障害を伴う疾患に対して，新しい治療法として幹細胞治療が注目されている．これは主に人工多能性幹細胞（Induced pluripotent stem cells: iPSC）を利用し，その多分化能に注目し，失われた神経細胞を再生することを目的とするものである．既に，脳梗塞や脊髄損傷，筋萎縮性側索硬化症などでの研究が進んでおり，一部は臨床応用されている．しかし，出生直後の児に対して iPSC を使用することは腫瘍化や免疫学的拒絶反応の観点から，成人よりもハードルが高いのが現状である．

一方で，同じ幹細胞でも iPSC のような外的因子を導入して人工的に樹立したものではなく，自己由来の間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells: MSC）による幹細胞治療が注目されている．これは，MSC の多分化能ではなく，抗炎症作用に着目したもので，現在までに脂肪組織や骨髄由来の MSC による種々の疾患への治療法が研究されている．

我々は，妊娠中から樹立可能な唯一の幹細胞源としてヒト羊水幹細胞（Human amniotic fluid stem cells: hAFSC）に着目し，基礎的な研究を行ってきた．hAFSC は，MSC の一種であるが，腫瘍化しない，免疫学的寛容能が高く拒絶されない，羊水採取におけるリスクが一般的に許容されているなどの特徴を有しており，臨床応用へのハードルが低いと考えられている [1]．申請者らは，これまでに，hAFSC を既報 [2]に準拠し安定的に樹立する方法を確立し，それらが MSC の定義を満たすことを確認した．また，脳性麻痺の原因となる低酸素虚血性脳症（hypoxic-ischemic encephalopathy: HIE）モデルマウスに対し，hAFSC を鼻腔内投与したところ，細胞が一過性に脳に生着し脳実質断面の患側/健側比や前肢運動能，協調運動能が改善することを世界で初めて見出した [3]．

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ，今回我々はより治療効果の高い細胞の投与方法を見出すことを目的とした実験計画を立案した．前述の HIE モデルマウスに対する治療における「細胞の投与方法」と「細胞の投与前調整」に関する検討を行い，より治療効果の高い投与方法を確立したいと考えた．

細胞の投与方法は，投与量（細胞数），投与時期（タイミング），投与回数（単回もしくは複数回），投与経路（鼻腔内投与だけではなく，腹腔内投与や静脈内投与）などの複数の因子に関しての検討を計画した．

細胞の投与前調整は，低酸素条件下（3-5%酸素）で培養した細胞や神経幹細胞への分化誘導した細胞，細胞凝集体（スフェロイド）を形成した細胞などの治療効果の検討を計画した（図 1）．

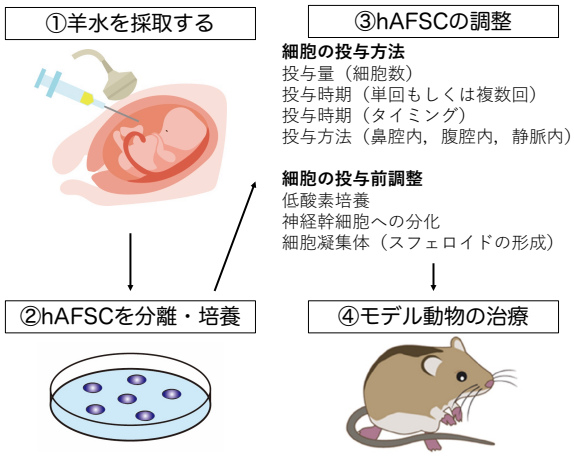

図 1 実験計画の概要

特に今回は，他の疾患モデル動物の既報において治療効果が高いとされていた神経幹細胞への分化誘導とスフェロイド化した細胞を投与することを中心に検討を行う方針とした．

研究計画の遂行中，正期産児の脳障害を反映していると考えられている HIE モデルマウスにおける検討は難しいと判断し，早産児の脳障害を反映していると考えられている脳室周囲白質軟化症（periventricular leukomalacia: PVL）モデルラットも使用し，上記検討を行った（詳細は 4.（2）にて記載した）．

3. 研究の方法

（1）hAFSC の樹立

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．初代培養を経たヒト羊水細胞から CD117 陽性羊水細胞を，抗体磁気ビーズを用いた単離法 [2] で単離した．この細胞は，フローサイトメトリー法（Flow Cytometry: FCM）による細胞表面抗原の検討において，間葉系マーカー（CD29，CD73，CD90）が陽性かつ血球系マーカー（CD14，CD34，HLA-DR）が陰性であり，誘導培地における継代培養において骨・軟骨・脂肪への分化を確認し，MSC の定義に合致していることを確認した．

(2)動物モデルの樹立
①HIE モデルマウス
申請者らが以前に行っていた研究(科研費基盤研究(C)15K09724)と同様の方法でモデルマウスを作成した. 具体的には, 生後 9 日目の C57BL/6J マウス(雄)に対し, 全身麻酔下で右総頚動脈を結紮し, その後 8%低酸素 30 分暴露により作成した [4].

②脳室周囲白質軟化症モデルラット
生後 3 日目の SD ラットに対し, LPS 0.25mg/kg を腹腔内投与して作成した. 腹腔内の炎症が全身に波及し, 脳室周囲白質軟化症を引き起こすモデルとして知られている.

(3)神経幹細胞への分化誘導
継代培養している hAFSC を誘導培地内でプラスチック培養皿に接着培養した. 神経系細胞への分化の確認は Tubulin beta III による免疫細胞染色で行った.

(4)スフェロイドの作成
非接着加工がされたマイクロウェルを多数有する 3 次元培養皿で hAFSC を培養し, スフェロイドを形成した.

4. 研究成果
(1)ニューロスフェアの作成
他の疾患の既報から高い治療効果が得られる可能性がある神経細胞への分化誘導を行ったところ, 一部の細胞で神経様細胞への分化を確認した. しかし, 分化誘導効率は十分とは言えなかったため, スフェロイドを作成した上で, 分化誘導を行い, ニューロスフェアを作成することを計画した. iPSC のニューロスフェアは, 脊髄損傷モデル動物に対する治療で有効性を示す報告を認めている [5].
1 つあたりのスフェロイドを形成する細胞数を調整し, 複数の大きさのスフェロイドを作成した. それぞれの大きさのスフェロイドに対して, 神経細胞への分化誘導培地を用いて非接着培養を行ったが, 分化誘導の最中に多数の細胞が膨化・死亡し, スフェロイドとしての形態が維持できない状態となった. 分化誘導において, 一部の細胞が死亡することは稀な事象ではないが, モデル動物に対する投与に必要な細胞量を得ることが難しいと判断し, 実験を中止し, 計画を変更した.

(2)動物モデルの変更
より多彩な投与時期や投与量, 投与方法を検討しようと考えた際に, 現在使用している HIE モデルマウスは個体の大きさが小さく, 実験手技の観点から難易度が高いと判断した. また, より早期の投与を実施することが困難であったため, より時間的猶予のあるモデルへ変更してから, 投与時期の検討を行うことを考案した.
そこで, 申請者らのグループで実験を遂行していた(科研費基盤研究(B)17H04236)脳室周囲白質軟化症モデルラットを使用し, 上記の検討を行うことを立案した. 脳室周囲白質軟化症モデルは早産児の脳障害を反映していると考えられているが, HIE モデルの病態とオーバーラップする部分が多い. その上で, hAFSC をより早期に, そして腹腔内に投与した場合の治療効果の検討を行った.
具体的には, 生後 3 日目の SD ラットに対し, hAFSC の懸濁液を $1x10^6$cells/kg 投与し, その 3 時間後に LPS を投与することで, 投与 48 時間後の生存率の改善を認めた. 以降は, 本モデルに対する hAFSC の治療効果ならびに投与方法の最適化を検討することとした.

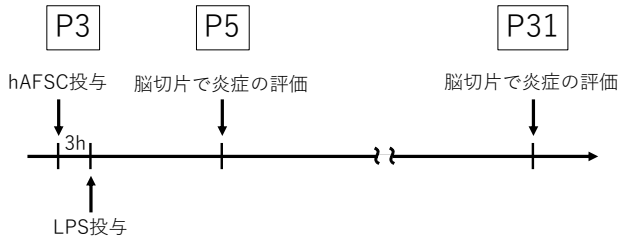

図 2 脳室周囲白質軟化症モデルの作成と評価

(3)検討結果

まず，LPS 投与後 48 時間の時点で，脳障害を反映していると考えられているグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）やミクログリア特異的カルシウム結合タンパク質（Iba-1）の陽性細胞数の減少を認めた（図 3）．

さらに，この治療効果は，4 週間経過しても持続していたことから，より早期の介入で不可逆的な脳障害を抑制している可能性が考えられた（図 4）．特にこれらは，海馬領域に顕著であり，海馬領域における神経炎症およびグリア瘢痕形成の抑制を介して脳性麻痺に起因する高次脳機能障害を改善できる可能性が示唆された．

また，腹腔内に投与した hAFSC が腹膜や肝皮膜の近傍で凝集体を形成していることが判明した．他の間葉系幹細胞を用いた既報では，この「腹腔内凝集体」から種々のサイトカインが分泌され，体内の炎症反応を抑制している可能性が示唆されている．

今後は，腹腔内の細胞凝集体をによる治療機序を明らかにすることを目標とした研究計画を推進する予定である．

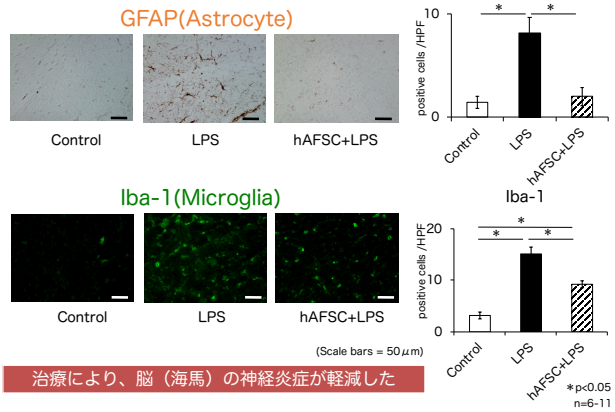

図 3 脳神経炎症（LPS 投与 48 時間後）

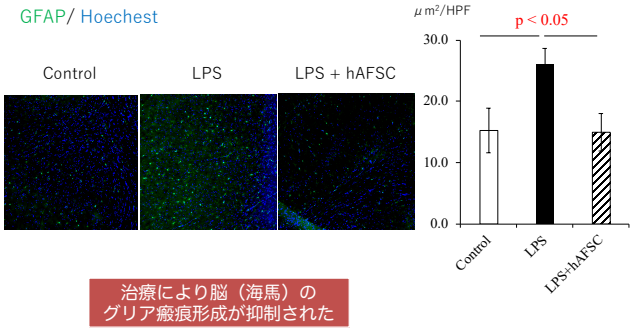

図 4 脳神経炎症（LPS 投与 4 週間後）

参考文献

[1] Zhang, S. et al. The heterogeneity of cell subtypes from a primary culture of human amniotic fluid. Cell Mol Biol Lett. 2010

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

[3] Otani T et al. The neurorestorative effect of human amniotic fluid stem cells on the chronic phase of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy in mice. Pediatr Res. 2019

[4] Rice et al. The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat, Ann Neurol.1981

[5] Nori S et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　6件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Fukutake M, Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Sato Y, Otani T, Sakai S, Aramaki-Hattori N, Shimoda M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Kanai Y, Kishi K, Tanaka M.	４．巻 32
２．論文標題 Human amniotic fluid stem cells have a unique potential to accelerate cutaneous wound healing with reduced fibrotic scarring like a fetus.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Hum Cell.	６．最初と最後の頁 51-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-018-0222-1. Epub 2018 Dec 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Ikenoue S, Miyakoshi K, Kasuga Y, Ochiai D, Matsumoto T, Tanaka M.	４．巻 2
２．論文標題 Impaired fetal growth in mothers with inadequate gestational weight gain: a retrospective study in Japanese uncomplicated pregnancy.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 J Matern Fetal Neonatal Med.	６．最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14767058.2018.1545835. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Kasuga Y, Miyakoshi K, Tajima A, Saisho Y, Ikenoue S, Ochiai D, Matsumoto T, Arata N, Hata K, Tanaka M.	４．巻 10
２．論文標題 Clinical and genetic characteristics of abnormal glucose tolerance in Japanese women in the first year after gestational diabetes mellitus.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 J Diabetes Investig.	６．最初と最後の頁 817-826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.12935. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Otani T, Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Fukutake M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M.	４．巻 85
２．論文標題 The neurorestorative effect of human amniotic fluid stem cells on the chronic phase of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in mice.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Pediatr Res.	６．最初と最後の頁 97-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41390-018-0131-8. Epub 2018 Aug 10.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Otani T, Fukutake M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M.	4．巻 67
2．論文標題 Human Amniotic Fluid Stem Cells: Therapeutic Potential for Perinatal Patients with Intractable Neurological Disease.	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Keio J Med	6．最初と最後の頁 57-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2302/kjm.2017-0019-IR. Epub 2018 Mar 6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Endo S, Saisho Y, Miyakoshi K, Ochiai D, Matsumoto T, Kawano Y, Mitsuishi M, Irie J, Tanaka M, Meguro S, Tanaka M, Itoh H.	4．巻 7
2．論文標題 Association of Maternal Factors with Perinatal Complications in Pregnancies Complicated with Diabetes: A Single-Center Retrospective Analysis.	5．発行年 2018年
3．雑誌名 J Clin Med	6．最初と最後の頁 ー
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm7010005.	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9件（うち招待講演　1件／うち国際学会　5件）

1．発表者名 Abe Y, Ochiai D, Masuda H, Sato Y, Otani T, Fukutake M, Tanaka M
2．発表標題 A POTENTIAL THERAPY FOR FETAL MYELOMENINGOCELE BY HUMAN AMNIOTIC FLUID STEM CELLS.
3．学会等名 International Society for Stem Cell Research 2018（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Otani T, Ochiai D, Masuda H, Fukutake M, Sato Y, Ikenoue S, Miyakoshi K, Tanaka M
2．発表標題 The therapeutic potential of human amniotic fluid stem cells on the chronic phase of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in mice
3．学会等名 8th Korea-Taiwan-Japan Symposium on Maternal-Fetal Medicine（国際学会）
4．発表年 2018年

１．発表者名
Otani T, Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Fukutake M, Sato Y, Ikenoue S, Miyakoshi K, Tanaka M

２．発表標題
THE THERAPEUTIC EFFECTS OF HUMAN AMNIOTIC FLUID STEM CELLS ON THE CHRONIC PHASE OF NEONATAL HYPOXIC-ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

３．学会等名
20th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies （FAOPS 2018）（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Sato Y, Ochiai D, Abe Y, OtaniT, Fukutake M, Ikenoue S, Masuda H, Miyakoshi K, Tanaka M

２．発表標題
A NOVEL STRATEGY TO TREAT FETAL MYELOMENINGOCELE USING HUMAN AMNIOTIC FLUID STEM CELLS

３．学会等名
20th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies （FAOPS 2018）（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Ochiai D, Tanaka M

２．発表標題
Pregnancy Outcomes After Abdominal Radical Trachelectomy for Early-Stage Cervical Cancer

３．学会等名
2018 Kangwon-Keio International symposium（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
大谷利光，落合大吾，阿部雄志，佐藤佑，升田博隆，福武麻里絵，宮越　敬，田中　守

２．発表標題
ヒト羊水幹細胞を用いた脊髄髄膜瘤に対する新規胎児治療法の開発

３．学会等名
第18回　日本再生医療学会

４．発表年
2018年

１．発表者名
阿部雄志，落合大吾，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，青木大輔

２．発表標題
ラット胎仔脊髄髄膜瘤モデルを使用したヒト羊水幹細胞の羊水腔内注入による胎児治療効果について

３．学会等名
第70回　日本産科婦人科学会

４．発表年
2018年

１．発表者名
大谷利光，落合大吾，阿部雄志，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，青木大輔

２．発表標題
新生仔低酸素虚血性脳症モデルマウスに対するヒト羊水幹細胞鼻腔内投与の治療効果に関する検討

３．学会等名
第70回　日本産科婦人科学会

４．発表年
2018年

１．発表者名
大谷利光，落合大吾，佐藤　佑，福武 麻里絵，松本　直，宮越　敬，田中　守

２．発表標題
新生仔低酸素虚血性脳症モデルマウスに対するヒト羊水幹細胞投与の治療効果に関する検討

３．学会等名
第54回　日本周産期新生児医学会

４．発表年
2018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