

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト羊膜上皮細胞培養上清の神経細胞死抑制作用

指導教官 新家 眞 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月 入学

医学博士課程

外科学専攻

内田彩子

羊膜は妊娠中、子宮内面全体を覆う最内層の膜であり、内側に羊水を満たしている。羊膜の基本的な機能は、羊水を介して胎児を保護することと考えられてきた。また、羊膜は生理活性物質の授与に関与していると予想されていた。1920年代に、羊膜が熱傷後の皮膚の創傷治癒に有効に使用できるとの臨床報告があった。さらに、1940年に脳硬膜下移植に使用されて以来、羊膜は移植片として、神経剥離術、腱癒着剥離術、末梢血管障害などに使用されてきた。

1982年、羊膜の免疫原性に関する研究で、ヒト羊膜組織やヒト羊膜上皮細胞(HAECs)にはHLA-A,-B,-C,-DR抗原が発現していないことが明らかになった。1985年、羊膜組織の移植が一部のライソゾーム病に有効であることが証明された。1992年、我が国で初めて羊膜組織移植術が施行され、ゴーシェ病の1女兒に有効であることを報告された。臨床的効果が一過性であったため、それ以降、組織の変わりに羊膜細胞を移植する研究が進められてきた。従来の研究では、HAECsがアセチルコリン及びカテコールアミンを合成・分泌する能力をもつ細胞であること、また、神経系及びグリア系細胞のマーカー遺伝子を発現するこ

とが報告されてきた。さらに、HAECs は免疫学的に脆弱であり、またドーパミンを合成・分泌することから、パーキンソンモデルラットに HAECs が移植され、臨床症状を部分的に改善することが報告されてきた。

一方で、羊膜の神経保護・神経再生作用については、文献的に羊膜上皮細胞を除去した羊膜組織に関する報告は見られるが、培養羊膜上皮細胞を用いた研究は行われていない。また、眼科領域では、1995 年以来、羊膜組織は瘢痕性角結膜疾患で前眼部の再建術に使用されているが、培養羊膜上皮細胞を用いた研究は行われていない。

本研究では、HAECs の神経栄養因子の合成・分泌能を検討し、HAECs の培養上清が、培養中枢神経細胞（ラット大脳皮質ニューロンとラット網膜神経節細胞）に神経細胞死抑制効果を有することを報告する。

羊膜細胞は神経栄養因子を合成・分泌する

まず初めに、羊膜細胞培養上清の作成方法について示す。インフォームドコンセントを施行後、帝王切開時に入手した胎盤から HAECs を分離し、10% FCS を含む RPMI 培地で 2-3 日間培養した。PBS で 3 回洗浄後、無血清培地（N2 添加 Neurobasal medium; N2-NB）で 2 日間培養し、培養上清（HAEC-CM）を回収した。次いで、HAEC-CM 中の神経栄養因子（nerve growth factor; NGF, brain-derived neurotrophic factor; BDNF, neurotrophin-3; NT-3）の濃度を酵素免疫法にて測定した。HAEC-CM 中に BDNF は 610 ± 242 pg/ml, NT-3 は 600 ± 125 pg/ml（平均±標準誤差）と測定され、NGF は測定限界値未満であった。また、羊膜組織凍結切片を作成し、抗神経栄養因子抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、羊膜上皮が抗 NGF 抗体及び抗 NT-3 抗体により特異的に染色された。さらに、HAECs 及び羊膜組織を用いて RT-PCR で神経栄養因子の mRNA 発現を検討した。その結果、HAECs 及び羊膜組織ともに BDNF, NT-3, NGF の当該バンドを検出した。これらの結果から、HAECs は神経栄養因子を合成・分泌する能力をもつ細胞であることが明らかとなった。

羊膜細胞培養上清の培養ラット大脳皮質ニューロンに対する神経細胞死抑制効果の検討

次に、HAEC-CM が、ラット大脳皮質ニューロンに対して神経細胞死抑制効果を有するか否かを *in vitro* で検討した。皮質ニューロンは胎生 18 日令のラット大脳皮質から採取した。N2-NB で 1 日培養後、N2-NB、HAEC-CM、種々の神経栄養因子を含む N2-NB に培地を交換した。さらに培養 2 日後に MAP2 で免疫染色を行い、生存率を検討した。培養 1 日目の MAP2 陽性細胞数を生存率 100% とした。生存率は N2-NB で培養した群で $10.7 \pm 3.8\%$ （平均±標準誤差）、HAEC-CM

で培養した群で $92.6 \pm 2.6\%$ と統計学的に有意差を認めた ($P < 0.0001$)。その他の因子の生存率は epidermal growth factor (EGF) 添加 N2-NB で $49.2 \pm 3.2\%$ 、activin A 添加 N2-NB で $48.6 \pm 13.1\%$ であり、N2-NB と比較し統計学的に有意に上昇した。しかし、HAEC-CM の神経細胞死抑制効果の方が統計学的に有意に高かった。その他、BDNF, NT-3, NGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF- I), ciliary neurotrophic factor (CNTF), interleukin-2 (IL-2) では神経細胞死抑制効果は認められなかった。また、HAECs が分泌すると報告されている神経伝達物質 dopamine、norepinephrine と BDNF, NT-3 を同時に添加した場合、神経細胞死抑制効果は認められなかった。次いで、HAEC-CM を高分子量分画 (> 30 kDa) と、低分子量分画 (< 30 kDa) に分け、同様に培地交換し、生存率を検討した。その結果、HAEC-CM の神経細胞死抑制効果はほぼ低分子量分画 (< 30 kDa) に存在した。HAEC-CM の神経細胞死抑制効果は既知の生理活性物質の相乗効果であることは否定できないが、HAEC-CM 中には新規の生理活性物質 (< 30 kDa) が含まれている可能性が示唆された。

次に、MAP2 陽性細胞の神経突起長を計測した結果、培養 1 日目で $43.3 \pm 7.4 \mu\text{m}/\text{cell}$ 、HAEC-CM に培地交換後 2 日目で $76.9 \pm 11.5 \mu\text{m}/\text{cell}$ と統計学的に有意に延長していた ($P < 0.0001$)。この結果は、HAEC-CM には神経細胞死抑制効果に加えて神経突起の成長促進効果があることを示唆している。

さらに、皮質ニューロンの TUNEL 染色を行った。N2-NB に培地交換した場合、多くの細胞が TUNEL 法により陽性に染色された。一方、HAEC-CM に培地交換した皮質ニューロンは TUNEL 染色陽性細胞が減少し、HAEC-CM はアポトーシス抑制効果を有することが示唆された。

羊膜細胞培養上清の培養ラット網膜神経節細胞に対する神経細胞死抑制効果の検討

次に、HAEC-CM が、ラット網膜神経節細胞 (RGCs) に対して神経細胞死抑制効果を有するか否かを *in vitro* で検討した。RGCs は生後 8 日のラット網膜から 2 段階イムノパンニング法を用いて単離精製をおこなった。無血清培地 B27 complete medium (B27, forskolin, glutamine, BDNF, CNTF 添加 Neurobasal medium) で 3 日培養後、以下に示す培養液に交換した。(1) 無血清培地 N2-NB/FG (N2, forskolin, glutamine 添加 Neurobasal medium)、(2) HAEC-CM/FG (forskolin, glutamine 添加 HAEC-CM)、(3) 種々の神経栄養因子を含む N2-NB/FG。さらに培養 2 日後に calcein 染色を行って RGCs の生存率を検討した。B27 complete medium で 5 日間培養した群を生存率 100% とした。その結果、生存率は N2-NB/FG で $8.1 \pm 3.1\%$ 、HAEC-CM/FG で $52.3 \pm 5.1\%$ と統計学的に有意差を認めた ($P < 0.0001$)。その他の生存率は、BDNF (40 ng/ml) 添加 N2-NB/FG で $13.5 \pm 6.5\%$ 、

CNTF (40 ng/ml) 添加 N2-NB/FG で $11.3 \pm 5.0\%$ 、NT-3 (40 ng/ml) 添加 N2-NB/FG で $7.5 \pm 4.5\%$ 、BDNF + CNTF (各々 40 ng/ml) 添加 N2-NB/FG で $10.3 \pm 4.9\%$ 、BDNF + NT-3 (各々 40 ng/ml) 添加 N2-NB/FG で $8.9 \pm 5.1\%$ 、BDNF + NT-3 (各々 0.6 ng/ml) 添加 N2-NB/FG で $6.1 \pm 4.0\%$ であった。これらの因子に神経細胞死抑制効果は認められなかった。次いで、HAEC-CM を高分子量分画 (> 30 kDa) と、低分子量分画 (< 30 kDa) に分け、forskolin, glutamine を添加後、同様に培地交換し、生存率を検討した。その結果、HAEC-CM/FG の神経細胞死抑制効果は主に低分子量分画 (< 30 kDa) に存在した。このことは、HAECs が BDNF, NT-3, CNTF 以外の何らかの生理活性物質 (< 30 kDa) を分泌していることを示唆する。

まとめ

本研究ではヒト羊膜上皮細胞が神経栄養因子を合成・分泌する能力をもつ細胞であることを明らかにした。また、羊膜細胞培養上清はラット皮質ニューロン及びラット網膜神経節細胞に対し、神経細胞死抑制効果を有すること示した。さらに、培養上清の神経細胞抑制効果は、いずれの培養神経細胞にても低分子量分画 (< 30 kDa) に存在することを示した。今後、培養上清中のどの因子が神経細胞死に抑制的に働くかを検討することにより、脳神経変性疾患や、緑内障を含む網膜神経節細胞変性疾患に対する新しい神経保護療法の発見につながる可能性がある。また、ヒト羊膜上皮細胞は免疫学的に脆弱であることから、網膜神経節細胞変性をきたす疾患を含めた中枢神経変性疾患の治療に、細胞療法として応用できる可能性がある。