

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5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790277

研究課題名（和文） 羊膜由来体性幹細胞分離方法の確立

研究課題名（英文） Establishment of isolation of amnion derived stem cells

研究代表者

小池 千加（KOIKE CHIKA）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：10523889

研究成果の概要（和文）：

羊膜上皮細胞（HAE）、間葉系細胞（HAM）と iPS 細胞、骨髄由来間葉系幹細胞の Stemness 遺伝子の発現を比較し、羊膜由来細胞ではこれらの発現が高く iPS 細胞に近いことが示された。HAE に対し低分子処理、あるいは Oct3/4 遺伝子導入を行うことにより、Stemness が上がることが示された。HAE の中の幹細胞は TRA1-60 抗体を用いて濃縮される事、HAM は大きさにより性質が異なる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The stemness gene expression of human amnion epithelial cells (HAE) and mesenchymal cells (HAM) was compared with that of iPS cells and bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSC), and was higher than BMMSC. It was suggested that HAE and HAM are closer to iPS cells than BMMSC. Drug treatment and Oct3/4 gene introduction into HAE cells made their stemness gene expression increased. Stem cells in HAE cells could be isolated according to TRA1-60 expression. HAM cells may have different differentiation potency according to their cell size.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現在、アルツハイマー病、脊髄損傷などの難治性疾患、血液疾患や糖尿病などの慢性疾患新規治療法開発とともに、変形性軟骨症などの患者の Quality of Life を向上させる治療法の開発が望まれるなか、再

生医療が新しい医療の形として期待される。再生医療には移植するための細胞、細胞の増殖や分化を制御する増殖因子やサイトカインなどの液性因子、細胞の増殖や分化に必要な微小環境を構成する細胞外マトリックスや人工物などの足場、の三要素が重要である。

再生医療の細胞源として主流の iPS 細胞等には癌化などの問題点があり、体性幹細胞を用いることが臨床応用への近道であり、拒絶を起こしにくく、他家移植に適している羊膜由来細胞から体性幹細胞を分離すれば、レディメイドの体性幹細胞を供給することができるのではないかと考えた。我々は、大学倫理委員会の承認の下、患者よりインフォームドコンセントを得て、胎盤より羊膜を剥離し、トリプシンとコラゲナーゼで段階的に消化させ、上皮細胞、次に間葉系細胞を分離、培養する方法を確立した。羊膜由来細胞についての研究は我々のほか Strom (米)ら、Parolini (伊)ら、Sakuragawa (日)らが行っているにすぎず、生物学のおよび分子生物学的知見はほとんど蓄積されていなかった。

2. 研究の目的

羊膜由来細胞の Stemness などの性質を解析し、体性幹細胞の分離を可能にするマーカーを同定すること、同定したマーカーを用いて羊膜由来体性幹細胞を分離すること、さらに、薬剤あるいは遺伝子導入により Stemness を高めること、これらの細胞の自己増殖能、分化能を検討し、体性幹細胞としての性質を解析することを目的とした。

2. 研究の方法

(1) 羊膜由来細胞の遺伝子発現解析

大学医倫理委員会の承認の下、患者よりインフォームドコンセントを得て羊膜を採取する。トリプシンとコラゲナーゼで段階的に消化させ、上皮細胞、次に間葉系細胞を分離した。10%牛胎児血清を含む DMEM を用いて培養する。培養 2 週間後に Torizol および Qiagen RNeasy Kit により total RNA を抽出する。得られた各 total RNA 1 μ g を用いて、TOYOBO ReverTraAce により cDNA を合成した。iPS 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより入手し、Knockout Serum Replacement、Non-essential amino acid を含む DMEM/F12HAM を用いてフィーダー細胞上で培養し、上記に習って RNA 抽出、cDNA 合成を行う。広島大学よりヒト腸骨由来間葉系幹細胞およびヒト繊維芽細胞由来の cDNA を入手した。これらを用いて、Real time PCR (Stratagene Mx300P) により Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc をはじめとする遺伝子発現を比較することにより各細胞の Stemness の度合いを比較した。

(2) フローサイトメトリーによる発現解析 幹細胞を多く含む細胞群を分離するた

めのマーカー候補を選別するために、羊膜由来上皮細胞、間葉系幹細胞を用いてフローサイトメトリーにより、CD3, CD7, CD10, CD13, CD44, CD24, CD29, CD49f, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD133, CD117, SSEA-4, TRA1-60 等の表面抗原マーカーの発現の解析を行った。

(3) 薬剤処理による誘導

羊膜由来上皮細胞を DNA メチル化阻害剤 5-Azacytidine やヒストン脱アセチル化阻害剤 Valproic Acid, Trichostatin A, Suberoylanilide Hydroxamic Acid、ALK5 inhibitor SB431542, MEK inhibitor PD0325901, thiazovivin などの薬剤処理を行った。その後の遺伝子の発現を、定量的 PCR およびフローサイトメトリーにより比較解析した。

(4) 遺伝子導入

Oct3/4 遺伝子を羊膜由来上皮細胞へ Nepagene Electroporation 装置を用いて導入した。その後の遺伝子の発現を定量的 PCR、フローサイトメトリーにて比較解析した。

(5) 羊膜上皮細胞のマーカーによる分離

羊膜上皮細胞を TRA1-60 抗体と MACS bead を用いて TRA1-60 陽性細胞を分離した。これを用いて定量的 PCR により Stemness 遺伝子の発現解析を行った

(6) 羊膜間葉系細胞の大きさによる分離

羊膜間葉系細胞を細胞の大きさにより分離し、得られた細胞を用いて肝細胞、心筋細胞などに分化誘導を行った。

3. 研究成果

羊膜由来上皮細胞、間葉系細胞の幹細胞マーカーを同定することを目的に、各種細胞表面マーカーを用いてフローサイトメトリー解析を行った。この結果、羊膜上皮細胞は CD45, CD133 and CD 271, 羊膜間葉系細胞は CD44, CD73, CD90 and CD105 を発現していることを明らかにした。また、免疫組織化学染色では、羊膜上皮細胞、間葉系細胞ともに、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc などの幹細胞マーカーを発現していた。さらに、定量的 PCR にて、これらの幹細胞マーカーの発現量を iPS 細胞、骨髄由来間葉系幹細胞と比較した。その結果、羊膜由来上皮細胞、間葉系細胞における Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 の発現量は骨髄由来間葉系幹細胞よりも高かった。特に、Klf4 の発現量は iPS 細胞と同等であつ

た。このことから、羊膜由来上皮細胞、間葉系細胞は骨髄由来間葉系幹細胞よりも iPS 細胞に近く、より幹細胞の性質をもつことが強く示唆された。

羊膜上皮細胞に対して低分子化合物 VPA, VIX, BayK, CHIR, RepSox で処理した場合には Klf4 の発現が上昇することが確認された。Oct3/4 遺伝子を電気穿孔法にて導入して強制発現させ、各種遺伝子の発現を定量的 PCR にて検討し、Rex-1, Sox2, Nanog の遺伝子の発現が上昇すること、また免疫蛍光染色にて検討し、SSEA3, SSEA4, TRA1-60 陽性細胞の比率が上昇することがわかった。

これらを組み合わせ、Oct4 遺伝子を導入後に VPA, CHIR, RepSox で処理した場合には Oct4 と Klf4 の遺伝子発現が上昇し、その Stemness が向上している事が示唆された。

また、羊膜由来上皮細胞に関しては、TRA1-60、TRA1-81 が有効なマーカーとなる可能性があることを見出した。これに基づき、TRA1-60 の発現する細胞を HAE の中から単離することを試みた。単離した細胞を用いて幹細胞マーカーの発現を定量的 RT-PCR にて解析した結果、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 のいずれも、分画前の HAE や TRA1-60 陰性細胞群と比較して TRA1-60 陽性細胞群では発現量が高かった。このことから、TRA1-60 陽性細胞群に羊膜由来上皮幹細胞が濃縮されていると考えられた。

一方、羊膜由来間葉系細胞に関しては、細胞の大きさにより細胞の性質が異なる可能性があることが考えられたため、フローサイトメトリーにより大きさに従って細胞を 3 つ (L; large, M; middle, S; small) に分画し、それらの細胞を用いて、幹細胞マーカーの発現を免疫染色にて検討した。その結果、L では Nestin, Musashi1, SSEA-1 の陽性率が高く、M では Oct3/4, Nestin, SSEA-4, TRA1-60 の陽性率が高く、S では Sox2, KLF4 の陽性率が高く、それぞれの細胞が幹細胞として事なる性質をもつ可能性が考えられた。また、in vitro にて各種細胞への分化能を検討した。肝細胞への分化誘導後免疫染色にて肝細胞マーカーの発現を解析した結果、L でアルブミンの発現が強く、L は肝細胞へ分化しやすい細胞であることが示唆された。一方、心筋への分化誘導後の RT-PCR 及び免疫染色による心筋細胞マーカーの発現解析の結果、S で GATA4 や Myosin light chain の発現が高かったことから S は心筋へ分化しやすい細胞であることが示唆された。以上より、羊膜由来上皮幹細胞は TRA1-60

の発現を指標として、間葉系幹細胞は大きさを指標として単離できる可能性が示された。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kaixuan Zhou, Chika Koike, Toshiko Yoshida, Motonori Okabe, Moustafa Fathy, Satoshi Kyo, Toru Kiyono, Shigeru Saito, and Toshio Nikaido .2013 :Establishment and Characterization of Immortalized Human Amniotic Epithelial Cells. Cellular Reprogramming, 15, 55-67 査読あり

2. Shingo Otaka., Saori Nagura, Chika Koike., Motonori Okabe, Toshiko Yoshida, Moustafa Fathy , Kentoku Yanagi, Misaki T., and Toshio Nikaido .2013. Selective isolation of Nanog positive human amniotic mesenchymal cells and differentiation into cardiomyocytes. Cellular Reprogramming, 15, 80-91 査読あり

3. Hiroaki Ttsuno, Toshiko Yoshida, Makiko Nogami, Chika Koike, Motonori Okabe, Zenkou Noto, Naoya Arai, Makoto Noguchi, Toshio Nikaido. 2012. Application of human amniotic mesenchymal cells as an allogenic transplantation cell source in bone regenerative therapy. Material Science and Engineering C, 32,2452-2458 査読あり

4. Makiko Nogami, Hiroaki Tsuno, Chika Koike, Motonori Okabe, Toshiko Yoshida, Shoji Seki, Yoshito Matsui, Tomoatsu Kimura, Toshio Nikaido.2012. Isolation and Characterization of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells and Their Chondrogenic Differentiation. Transplantation. 93 (12), 1221-1228. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1. 小池千加、吉田淑子、杉本潤、岡部素典、二階堂敏雄 羊膜由来幹細胞単離マーカーの探索 2013.3.21-23 横浜 第 12 回日本再生医療学会

2. 吉田淑子、岡部素典、小池千加、王芳、斎藤滋、二階堂敏雄 ヒト羊膜間葉系幹細胞が肝臓線維化におよぼす効果 2013.3.21-23 横浜 第 12 回日本再生医療学会

3. Chika Koike, Toshiko Yoshida, Motonori Okabe, Toshio Nikaido. REPROGRAMING OF HUMAN AMNIOTIC EPITHELIAL CELLS BY OCT4 OVEREXPRESSION

2012.6.13-16, Yokohama The 10th meeting of International Society for Stem Cell Research

4 . Chika Koike, Jing Fang, Toshiko Yoshida, Kaizuan Zho, Motonori Okabe, and Toshio Nikaido Establishment of insulin expressing amniotic cells and cell therapy for diabetes. 2011. 3. 1-2 東京 第 10 回日本再生医療学会

5. Toshio Nikaido, Yuji Takeda, Chika Koike, Toshiko Yoshida, Motonori Okabe : Reprogramming of human amniotic epithelial cells by Oct4 overexpression.

2011. 12. 13 - 16, 横浜. 第 34 回 日本分子生物学会年会

6. 竹田裕司、小池千加、吉田淑子、岡部素典、杉本潤、二階堂敏雄 Oct-4 過剰発現による不死化ヒト羊膜上皮細胞のりプログラミング 2011. 3. 1-2 東京 第 10 回日本再生医療学会

7. 周凱旋、小池千加、吉田淑子、岡部素典、京哲、清野透、二階堂敏雄 不死化羊膜上皮細胞の樹立と解析 2011. 3. 1-2 第 10 回日本再生医療学会

8. 野上真紀子、津野宏彰、Moustafa Fathy Omar、小池千加、岡部素典、吉田淑子、関庄二、松井好人、木村友厚、二階堂敏雄 羊膜間葉系幹細胞の単離・同定と軟骨分化に有効な成長因子の検討 2011.8.20-21 富山 第 29 回日本ヒト細胞学会

9. 小池千加、周凱旋、岡部素典、吉田淑子、二階堂敏雄 羊膜由来細胞のStemnessの度合いの解析 2011.8.20-21 富山 第 29 回日本ヒト細胞学会

10. Chika Koike, Kaixuan Zho, Moustafa Fathy, Motonori Okabe, Toshiko Yoshida, and Toshio NIKaido.他 Characterization of Amniotic Stem Cells 20100618 San Francisco, CA, U.S.A The 8th International Society for Stem Cell Research

〔図書〕(計 1 件)

小池千加 無敵のバイオテクニカルシリーズ「改訂第 3 版 遺伝子工学実験ノート」(田村隆明 編) 2010. 上p162, p168-173, 下 p126-137 羊土社

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：羊膜間葉系幹細胞の調製方法および単離された羊膜間葉系幹細胞集団

発明者：二階堂敏雄、吉田淑子、岡部素典、小池千加、野上真紀子、木村友厚、野口誠、津野宏彰、竹田裕治

権利者：富山大学

種類：IPC：A 6 1 K 3 5 / 5 0 C 1 2 N5/00

番号：特願 2011-257419

出願年月日：2011 年 11 月 25 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 千加 (KOIKE CHIKA)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号：10523889

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：