

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12554

研究課題名(和文) ヒト胎盤羊膜由来間葉系幹細胞のバイオバンクの創設

研究課題名(英文) Establishment of cell storage from amnion and other human placental tissue

研究代表者

大河内 信弘 (Ohkohchi, Nobuhiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：羊膜幹細胞はES細胞と近い性質を持ちまた肝細胞に分化する傾向をもつことが知られており、肝不全治療に向けた臨床応用が期待されている。我々は筑波大学附属病院で帝王切開から採集した胎盤由来体性幹細胞の単離と保存の安定化とバンキングを試み、さらに羊膜幹細胞の性質とその肝分化を目的とした新規3次元培養を詳細に検討した。結果として、54症例の細胞バンクを作成し、形成した肝オルガノイドの肝遺伝子発現が上昇した。より肝に近い性質を持ちうることを発見した。今後最適化条件を検討し、肝不全治療への貢献が可能な肝臓原基を作製と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The amnion stem cells from the placenta have been reported to have not only the pluripotent characteristics similar to ES cells, but also the liver differentiation tendency. We evaluated the characteristics of the amnion stem cells and created the placenta-derived somatic stem cell bank using the specimen of Tsukuba University Hospital. As a result, we succeeded in establishing the cell bank with 54 patients till now, and confirmed the new features of amnion stem cells, that the hepatic related gene expression increased when incubated on the special 3D system. In addition, adding other kinds of placenta-derived somatic stem cells resulted in the further manifestation of the features of hepatic organoids. In conclusion, the utilization of placenta somatic stem cells with their differentiation method optimized, have possibility of the clinical application toward hepatic diseases.

研究分野：消化器外科学

キーワード：再生医療 肝不全 幹細胞 羊膜幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において、肝炎ウイルス感染、アルコール、NASH などによる肝硬変・肝不全によって年間に2万人以上が死亡している。唯一の根治的治療法は肝移植であるが、諸外国と比較し本邦ではドナー数が非常に限定的であり再生医療による治療が強く求められている。ES細胞やiPS細胞を用いた再生医療は、倫理問題、造腫瘍性、拒絶反応などの問題があるため、我々は胎盤に由来する体性幹細胞に着目した。帝王切開時に廃棄される胎盤組織から採取される羊膜幹細胞は、ES細胞と近い性質を持ち、また自然に肝細胞に分化する傾向をもつことが知られている。一方でその性質には未だ不明な点が多く、また胎盤提供者の情報とリンクした形でのセルバンクが存在しないため、分化能・機能と安全性の問題が解決せず臨床応用は進んでいなかった。我々は筑波大学附属病院で採取した胎盤由来体性幹細胞の単離と保存の安定化とバンキングを試み、さらに羊膜幹細胞の性質とその肝分化を目的とした新規3次元培養を詳細に検討した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、羊膜に由来する幹細胞(Amion Stem Cells: ASC)を始めとする胎盤由来体性幹細胞の性質を明らかにし、移植治療を目指して肝オルガノイド(臓器原基)を作製することである。また今後の学際的研究発展を目的とした細胞バンクを確立することである。

### 3. 研究の方法

まず、筑波大学附属病院において予定帝王切開を行う患者にインフォームドコンセントを行った上で、本来廃棄される胎盤から4種類の体性幹細胞(羊膜幹細胞(ASC)、臍帯由来の間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSC)、血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell: EPC)、造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell: HSC))を単離・同定・保存する技術を確立した。

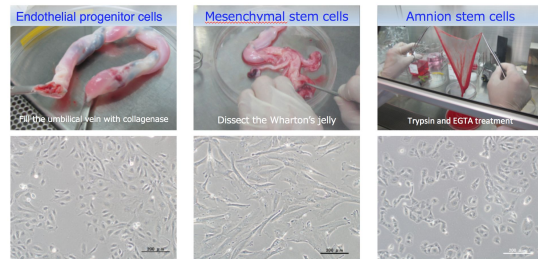
続いて、羊膜上皮細胞の特性解析を行った。FACSによる表面抗原解析、培養法の違いによる遺伝子発現を行った。また、通常の2次元培養と特殊な培養プレートを用いた3次元培養とで、遺伝子発現を比較した。さらに、3次元培養プレートで肝オルガノイドを作製し、肝がもつ代謝能の再現性を検討した。

### 4. 研究成果

#### 羊膜由来体性幹細胞バンクの確立

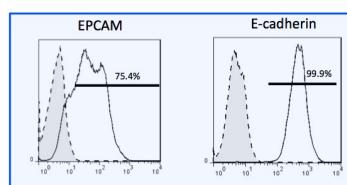
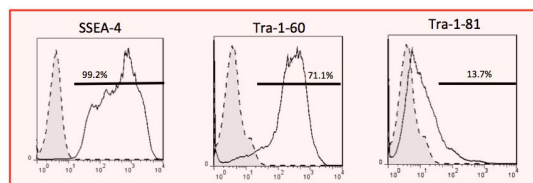
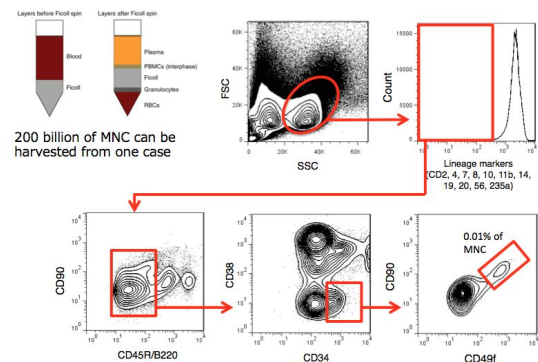
胎盤組織より4種類の体性幹細胞の採取を安定化させた。具体的には、胎盤表面の羊膜とトリプシン等で処理することでASCを、臍

帯静脈をコラゲナーゼ等で処理することでEPCを、臍帯中心部付近のWharton's jellyを細断することでMSCを採取した。HSCに関してはFicoll paqueを用いて単核球分画を遠心分離したのちに、セルソーターを用いてLin-CD45-CD38-CD34+CD90+CD49f+の分画をソーティングすることで、単核球分画の約0.01%を占めるHSCを単離した。これらの細胞は新規に導入した大型液体窒素タンクに保存し、患者情報(個人特定は不可能)と突き合わせることが可能な状態となっている。



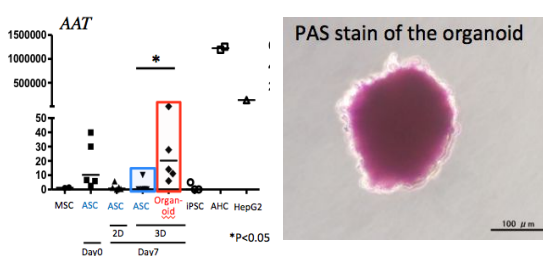
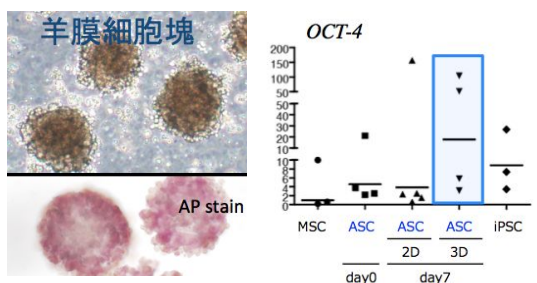
#### 羊膜幹細胞の特性解析

単離した羊膜上皮細胞の表面抗原をフローサイトメーターにて解析すると、SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, EPCAM, E-cadherinなどの未分化細胞に特徴的なマーカーが高発現しており、羊膜上皮細胞中には多分化能を保持する羊膜幹細胞が高い割合で存在することが示唆された。一方で、羊膜の未分化性は通常の平面培養では短時間で失われることが明らかとなった

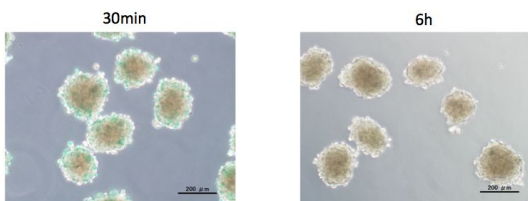


移植にむけた肝オルガノイドの創出  
 移植・生体内分化に向けてこの未分化性を維持した状態で肝オルガノイドを作製する方法を探索したところ、羊膜の未分化性は平面培養では減少し、細胞同士が球体(スフェロイド)を形作るような条件で培養すると、保持されることが確認された。そこで我々は(株)クラレ提供の三次元培養プレートを用いることで未分化性を維持しながら肝への分化方向をもつ羊膜細胞塊を作製することが可能となった。具体的にはこの細胞塊は AP 染色陽性であり、遺伝子発現を解析すると OCT-4 や NANOG など未分化性に関連する遺伝子と、アルブミンなど肝細胞分化に関連する遺伝子が平面培養と比較して上昇することが明らかとなった。

一方でこの細胞塊単独では肝機能を代替することは不十分であることが明らかとなり、羊膜細胞に由来する幹細胞数種類を特定の条件下で共培養することで、さらに肝臓に近い性質をもつことが明らかとなった。具体的には -1 アンチトリプシンなどの遺伝子が羊膜細胞塊に比較して上昇し、肝代謝能の重要な指標であるグリコーゲン貯蔵能や ICG 取り込み・排泄能などを獲得した。



ICG uptake and emission of the organoid



この肝臓器原基(オルガノイド)を動物の肝疾患モデルに移植し、治療効果を検討する実験を現在継続中である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

岩崎健一, 鄭允文, 大河内信弘 胎盤由来体性幹細胞を用いた肝オルガノイドの作製 第 25 回日本肝臓医生物学研究会 2016 年 9 月 17 日・ナスパーニュオータニ(新潟県南魚沼郡湯沢町)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
 ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大河内信弘 (OHKOUCHI, Nobuhiro)  
 筑波大学・医学医療系・教授  
 研究者番号: 40213673

### (2)研究分担者

中西 真人 (NAKANISHI, Mahito)  
 国立研究開発法人産業技術総合研究所・  
 幹細胞工学研究センター・研究員  
 研究者番号: 10172355

竹内 朋代 (TAKEUCHI, Tomoyo)  
 筑波大学・医学医療系・助教  
 研究者番号: 50450333

### (3)研究協力者

鄭允文 (ZHENG, Yun-Wen)  
 筑波大学・医学医療系・准教授  
 研究者番号: 80404995

岩崎健一 (IWASAKI, Kinichi)  
 筑波大学大学院・人間総合科学研究科・大学院生

佐古大輔 (SAKO, Daisuke)  
 東京理科大学・薬学部・大学生

清水義夫 (SHIMIZU, Yoshio)  
 筑波大学大学院・人間総合科学研究科・大学院生

R.サブリーナ ラミレス (R. Sabrina RAMIREZ)

筑波大学・グローバル教育院・ライフイノベーション学位プログラム・大学院生

葛剣云 (GE, Jianyun)  
筑波大学大学院・人間総合科学研究科・大学院生

劉莉萍 (LIU, Liping)  
筑波大学・医学医療系・外国人受託研究員

八木洋也 (YAGI, Hiroya)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：70625623

濱田洋実 (HAMADA, Hiromi)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：60261799

磯田博子 (ISODA, Hiroko)  
筑波大学・生命環境研究科・教授  
研究者番号：00375429