

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18790211  
 研究課題名（和文）ヒト胎児に由来する組織からの効率的な間葉系幹細胞の単離技術の開発  
 研究課題名（英文） Development of the efficient method to purify and obtain mesenchymal progenitors derived from human amniotic membrane.  
 研究代表者  
 須藤 和寛 (SUDO KAZUHIRO)  
 独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・協力研究員  
 研究者番号：10392002

## 研究成果の概要：

ヒト羊膜中に骨芽細胞、軟骨、脂肪細胞に分化可能な間葉系幹/前駆細胞が存在していることを明らかにし、さらにこれらの細胞は羊膜中において CD90 または CD166 陽性細胞であることが示唆された。しかし、分離、培養後数継代を経た細胞は分化能を有するか否かに関わらず全て CD90 および CD166 陽性であり、これらの細胞表面抗原の発現が *in vitro* での分化能を直接反映していないことが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：体性幹細胞、胎児付属組織、羊膜、間葉系幹細胞、分化能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系幹細胞は骨芽細胞や軟骨、脂肪細胞、腱、心筋などに分化する能力を有する細胞であり、これまで不可能と考えられていた組織（心筋や軟骨、歯茎など）の再生に有効に利用できること期待されていた。実際、臨床の現場において数年前から損傷軟骨の修復や心筋梗塞後の心筋の再生、インプラント前の処置などに用いられ始めていた。骨髄間葉系幹細胞が治療において非常に有用な細胞であることは疑いようのない事実であったが、使用に関しては問題も存在していた。例えば、重度の心筋梗塞など急性疾患や骨髄の採取が困難な場合には患者自

身の骨髄間葉系幹細胞を用いることは難しい。また、骨髄間葉系幹細胞には分裂可能回数に限界があり、患者の年齢に依存して低下していくことが示唆されていた。

(2) 実際に臨床の現場で利用され始めていたにも関わらず、間葉系幹細胞の性状に関する基礎研究はそれほど進んでいなかった。我々は間葉系幹細胞を適切に治療に使用したり、新たな利用方法を開発するためには、間葉系幹細胞の性状が明らかにされていることが非常に重要だと考えていたが、骨髄中においてどの細胞が間葉系幹細胞であるのかすら明らかにされていなかった。

(3) 治療に使用するにしても研究に使用するにしても、少量の骨髄細胞に由来する間葉系幹細胞を治療や研究に使用するためには、*in vitro* において必要な細胞数にまで細胞を増殖させなければならないが、間葉系幹細胞の分裂可能回数は有限であり、1人の骨髄に由来する細胞はそれほど多く回収できない。さらに少量とはいえ骨髄を採取することは、患者自身に大きな心理的、肉体的な負担を強いることになる。

再生医療に用いる材料として、患者本人に由来する間葉系幹細胞を使用することが、感染症や拒絶反応等のことを考慮すると最善であることは明らかであるが、上記のような問題を解決するために我々は骨髄に替わる新たな間葉系幹細胞の供給源を開拓する必要があると考えていた。

## 2. 研究の目的

羊膜は臍帯、胎盤と同様、出産に付随して必ず出現する胎児に由来する組織であるが、ほとんどの場合新生児誕生後に廃棄されてしまうものであり、使用に当たって提供者の同意が得やすいことから倫理的な問題をクリアすることが比較的容易である。また、産婦人科医の協力を得る事によって安定して組織を入手することが可能であり、定期的に大量の胎児由来細胞を取得するための材料として非常に有用であると考えられた。これまでに、胎盤や臍帯血など胎児に由来する組織から間葉系幹細胞が分離できるとする報告があることから、我々は胎盤と接する羊膜や臍帯血を循環させる臍帯中にも間葉系幹細胞が存在する可能性が高いと考え、羊膜中における間葉系幹細胞の存在の有無の確認およびその純化法、さらには効率良く取り出した間葉系幹細胞を増殖させる培養法を開発することにした。

## 3. 研究の方法

### (1) 羊膜における間葉系幹細胞の有無の検討

羊膜より付着している血液を出来る限り洗浄した後、組織をできるだけ細かく細断した。組織片をトリプシンEDTAおよびコラゲナーゼ中にて37°Cで60分間震盪しながらインキュベートした後、単細胞と組織片をそれぞれ別個に回収した。残った組織片は金属メッシュを用いてできるだけ細かく分離した。全ての細胞分画を10~20%ウシ胎児血清を含んだDMEMおよび $\alpha$ -MEM培地を用いて懸濁し、プラスチックディッシュに播種した。細胞播種24時間後に浮遊細胞を取り除き、その後2~3日毎に培地を交換しながら付着性細胞を増殖させた。細胞が増殖しサブコンフルエントに達した時点で細胞を回収し、新たなディッシュに $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>の濃度で再播種した。この操作を2回繰り返した後、増殖した細胞の骨、軟骨、脂肪細胞への分化能を検討す

ると同時に、FACSを用いてこれまでに間葉系幹細胞に発現していると報告されている細胞表面抗原の発現を調べた。上記3つの組織への分化能を持つ細胞が確認された場合、羊膜中に間葉系幹細胞が存在するものと判断した。

### ①骨芽細胞への分化能

増殖した細胞をコラーゲンタイプIでコートされたプラスチックディッシュに播種し、サブコンフルエントになるまで培養した。骨芽細胞誘導用培地を用いて3日毎に培地交換を行いながら分化誘導を行った。分化誘導開始後21日目および28日目に細胞を固定し、アルカリホスファターゼ活性の測定およびアリザリンレッド染色、オステオカルシンの発現を検討することによって骨芽細胞への分化能の有無を測定した。

### ②軟骨細胞への分化能

増殖した細胞 $2.5 \times 10^5$ 個を0.5mlの軟骨分化誘導培地に懸濁し、15mlコニカルチューブに移した後150xgで5分間遠心し、ペレットを作製した。コニカルチューブのキャップを一回転半ほど開けた状態でインキュベーター内に静置し、24時間後に培地を交換した。その後、ペレットがチューブ底に付着しないように3日毎の培地交換の度に軽く懸濁しながら21~28日間培養し、細胞塊を取り出し固定した。パラフィンによって封埋した後、切片を作製し、トルイジンブルーによる多糖類の染色およびコラーゲンタイプII抗体を用いた免疫染色によって軟骨への分化能を測定した。

### ③脂肪細胞への分化能

増殖した細胞をプラスチックディッシュに播種し、サブコンフルエントになるまで培養した。脂肪細胞分化誘導用培地に交換し、3日間培養した。その後、脂肪細胞維持培地に交換し2日間培養した。この操作を数回繰り返して、分化誘導開始から28日間培養した後細胞を固定した。オイルレッドOを用いた染色およびPPAR- $\gamma$ の発現によって、脂肪細胞への分化能を測定した。

### (2) 羊膜中における間葉系幹細胞の表現型の決定

酵素処理によって回収したヒト羊膜細胞を用いて、これまでに間葉系幹細胞のマーカーであると報告されているCD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166、STRO-1、NGFRの発現について検討を行った。また、羊膜より得た細胞をCD90およびCD166に対する抗体で染色しMACS磁気ビーズを用いて陽性細胞、陰性細胞を別個に分離した後、分化誘導を行い間葉系幹細胞が含まれる分画を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) 羊膜における間葉系幹細胞の有無の検討

現在までに、30人を超える新生児に由来する羊膜より分離した細胞をそれぞれプラスチックディッシュに播種し、数回継代の後に線維芽細胞様の細胞を分離することができた。それらの細胞を骨芽細胞、軟骨、脂肪細胞へ分化誘導を行い、アリザリンレッド染色、トルイジンブルー染色およびオイルレッドO染色を行った結果、全ての羊膜に由来する細胞において、アリザリンレッドによって染色されるカルシウムの沈着が認められたことから、骨芽細胞への分化能を有する細胞が存在することが確かめられた（図1）。

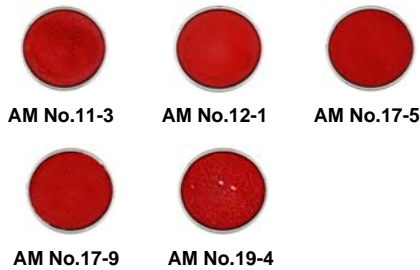


図1 骨芽細胞への分化能（一部抜粋）  
また、軟骨へ分化誘導した細胞のペレット中には強く異染性を示すような部分は認められなかったが、広範な部位に渡って弱く異染性を示す部分が観察された。しかし、これらの細胞からオイルレッドOによって染色されるような油滴を細胞内に持つ成熟脂肪細胞への分化は観察できなかった。

上記の染色法による分化能の判定の結果を確定するために、骨芽細胞の特異的マーカーであるオステオカルシンのタンパク産生、軟骨細胞の特異的マーカーである2型コラーゲンの遺伝子の発現および脂肪細胞の特異的マーカーであるaP2およびLipoprotein Lipase (LPL)の遺伝子の発現をRT-PCR法によって確認した。その結果、アリザリンレッドによって染色された細胞全てにおいて、オステオカルシンの産生が有意に上昇していた（図2）。軟骨特異的マーカーである2型コラーゲンは、一部の細胞においてのみ発現が認められた（図3）。また、脂肪細胞の分化マーカーであるaP2およびLPLは成熟脂肪細胞が観察されなかった細胞の一部に発現が認められた。（図4、5）

以上の結果から、ヒト羊膜中には骨芽細胞、軟骨細胞に分化することのできる細胞が存在することが確認できた。しかし、脂肪細胞への分化能に関しては、成熟脂肪細胞が観察できなかったことからその有無を決定するに至らなかった。これまで、用いていた分化誘導条件は、脂肪細胞分化培地および脂肪細胞維持培地を交互に使用するものであるが、この条件下では脂肪細胞特異的な遺伝子の発現は確認できるが、形態的に明らかな脂肪細胞の分化を観察することは出来なかった。脂肪細胞特異的な遺伝子の発現が確認できていることから、脂肪細胞への分化誘導は進んでいるものの脂肪細胞の成熟過

程に問題があるものと考えた。そこで、これまでの分化誘導条件を変更し、脂肪細胞分化培地のみによって分化誘導を行ったところ、非常に少数ではあるが細胞質に油滴をもつ特徴的な脂肪細胞を確認することができた。また、脂肪細胞への分化誘導期間を延長することによって、脂肪細胞の数が増加することも明らかとなった。このことヒト羊膜中には間葉系幹細胞および前駆細胞が存在することを明らかにできた。

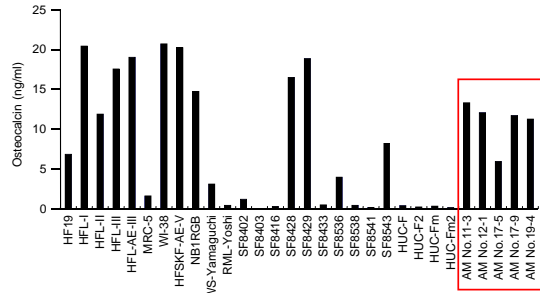


図2 オステオカルシンの産生量

(2) 羊膜中における間葉系幹細胞の表現型の

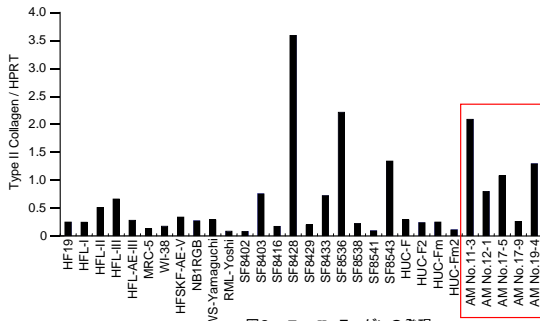


図3 TypeIIコラーゲンの発現

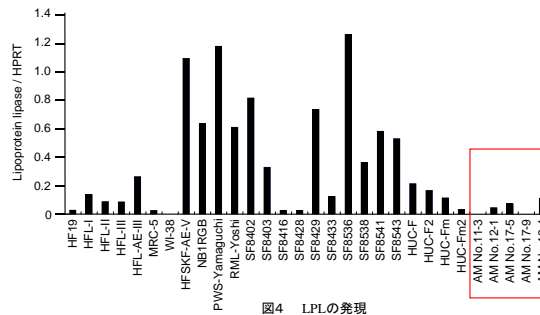


図4 LPLの発現

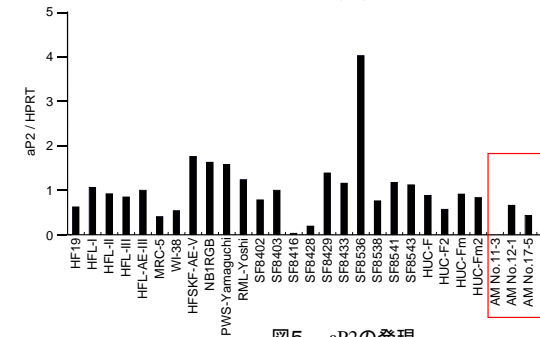


図5 aP2の発現

決定  
ヒト羊膜より回収した細胞を CD90、CD166 およびNGFR に対する抗体で染色し、CD90 陽性細胞、CD166 陽性細胞、NGFR 陽性細胞をそれぞれ MACS

を用いて分離し、播種直後より骨への分化誘導を行った結果、それぞれの細胞集団において骨細胞への分化が確認された。このことから、ヒト羊膜中の間葉系幹/前駆細胞は CD90、CD166、NGFR 陽性分画に存在し、これらのマーカーを組み合わせることにより、ヒト羊膜中の間葉系幹/前駆細胞を効率良く純化できる可能性が示唆された。次に CD90 および CD166 を組み合わせる事によって、さらに間葉系幹/前駆細胞を純化することが可能かどうかを検討した。ヒト羊膜中の CD90 陽性細胞および CD166 陽性細胞の割合は検体によって大きく異なり、それぞれ  $19.3 \pm 7.1\%$ 、 $13.3 \pm 5.3\%$ であったが、これら2つのマーカーを共に発現している細胞は存在しないことが明らかになった(図6)。このことから、ヒト羊膜中に存在する間葉系幹/前駆細胞の純化においてこれらのマーカーを組み合わせる使用しても、それぞれのマーカーを単独で使用する以上の効果は得られないことが明らかになった。

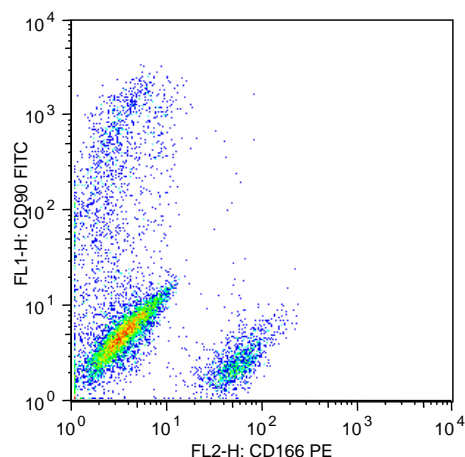


図6 羊膜におけるCD90およびCD166の発現

一方、*in vitro* で培養・増殖させた分化能を持つヒト羊膜由来細胞はほぼ全て CD90 および CD166 を共に発現していることから、培養によってヒト羊膜中には存在しない表現型を持つ細胞が出現してくることが示唆された。*in vitro* において培養した間葉系幹/前駆細胞の発現するマーカーを解析することによって得られた結果を元に、生体内における間葉系幹/前駆細胞を純化するためのマーカーを探索することはそれほど有効ではない可能性が考えられ、間葉系幹/前駆細胞をヒト羊膜より純化するためには分化能を反映するマーカーの探索を行う必要があることが示唆された。

## 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 1 件)

Kazuhiro Sudo (7 名中 1 番目), Mesenchymal Progenitors Able to Differentiate into

Osteogenic, Chondrogenic, and/or Adipogenic Cells *in vitro* are present in Most Primary Fibroblast-like Cell Populations. *Stem Cells*. 25:1610-7: 2007、査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 須藤和寛、ヒト線維芽細胞の分化能の検討、日本組織培養学会第 79 回大会、2006 年 5 月 26 日、東京
- (2) 須藤和寛、ヒト線維芽細胞の分化能に基づく分類、日本再生医療学会総会、2007 年 3 月 13 日、横浜
- (3) 須藤和寛、ヒト線維芽細胞の分化能の検討-2、日本組織培養学会第 80 回大会、2007 年 5 月 15 日、大阪
- (4) 須藤和寛、ヒト羊膜由来間葉系前駆細胞の造血支持能の検討、日本組織培養学会第 81 回大会、2008 年 5 月 20 日、つくば、茨城
- (5) Kazuhiro Sudo, Mesenchymal Progenitors Able to Differentiate into Osteogenic, Chondrogenic, and/or Adipogenic Cells *in vitro* are present in Most Primary Fibroblast-like Cell Populations. The 2008 World congress on *in vitro* biology. June 17, 2008. Tuscon, Arizona, USA. Invited speaker.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須藤 和寛 ( SUDO KAZUHIRO )

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・協力研究員

研究者番号：10392002