

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462669

研究課題名(和文) 羊膜と間葉系幹細胞の関連性とその効果と保存

研究課題名(英文) The relationship between the amniotic and mesenchymal stem cell, the its effect and preservation

研究代表者

島崎 潤 (Shimazaki, Jun)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40170930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞には再生誘導作用、抗炎症作用、血管新生抑制作用など様々な効果や作用があることが知られている。一方、羊膜にも抗炎症作用や創傷治癒促進効果があると同時に間葉系幹細胞の存在が報告されている。そこで、羊膜に存在する間葉系幹細胞が羊膜の持つ効果にどのように関与しているか明らかにするため、羊膜から分離培養した間葉系細胞を解析し、上皮創傷治癒モデルへの影響を比較検討した。羊膜から分離・培養した間葉系細胞は未分化マーカーを発現し、分化誘導により、骨芽細胞や神経細胞で観察される像を確認した。創傷治癒モデルにおいて、羊膜由来間葉系細胞と共培養した培養上清により、創傷治癒が促進される傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：Amniotic membrane (AM) has the ability of anti-inflammatory effect, wound healing promoting effect, etc. For about 10 years, mesenchymal stem cells (MSCs) have been reported to exist in AM. Mesenchymal stem cells (MSCs) reside in various tissues (bone marrow, skin, adipose, etc.), and have the ability of multi-differentiation. MSCs also have the ability of tissue regeneration effects, such as the improvement of cardiac function, revascularization, and intestinal tissue repair, etc. Therefore, MSCs are important for tissue homeostasis and wound healing. To estimate whether human amniotic membrane mesenchymal cells (hAMMCs) were involved in the effect of AM. We examined effect of hAMMCs on human limbal epithelial sheets. After the induction of differentiation, isolated hAMMCs showed similar characteristics of osteoblasts and neural cells. Isolated AMMCs maintained limbal epithelial phenotype and immature state, and promoted wound healing in limbal epithelial sheets.

研究分野：眼科学

キーワード：羊膜 間葉系幹細胞 保存

## 1. 研究開始当初の背景

羊膜は外胚葉由来の上皮と中胚葉由来の間葉系細胞からなる胚膜の一つである。妊娠中の母体内において、この羊膜は胎児を包み込む最も胎児側の膜である。羊膜には抗炎症作用や創傷治癒促進効果などが知られているだけでなく、コラーゲンを豊富に含んだ血管のない免疫寛容組織であり、角膜、皮膚、血管、気管、鼓膜など様々な臓器の代替基質として臨床応用されるなど、再生医療の分野でも注目されている。

各組織には細胞を供給する細胞源となる幹細胞が存在し、恒常性を維持するために必須である。近年、皮膚、脂肪、歯髄など様々な組織で間葉系幹細胞が存在し ( J.G. Toma, Nat Cell Biol, 2001; S. Gronthos, J Cell Physiol, 2001; S. Gronthos, Proc Natl Acad Sci USA, 2000 )、骨や軟骨、脂肪など複数に分化する能力 (多分化能) を持っていることが明らかになってきた。羊膜においても、間葉系幹細胞の存在が報告され、この羊膜由来の間葉系幹細胞を移植すると、心筋細胞や肝細胞へ分化するなど、臓器の機能を回復させる効果があることが報告されている ( L. Fujimoto, Cell Transplant, 2009; U. Manuelpillai, Cell Transplant, 2010 )。

当施設では以前からスティーブンス・ジョンソン症候群など角膜上皮幹細胞の枯渇した症例の眼表面を再建させるため、我々は羊膜を基質としたドナー由来の角膜上皮幹細胞の移植を行ってきた (K.Tsubota, N Engl J Med, 1999) 。また、より安定した上皮化をはかるため、我々は角膜上皮幹細胞を羊膜上に培養した培養上皮シートの移植も行ってきた (J.Shimazaki, Ophthalmology, 2002)。一方で、我々は羊膜の基礎的な研究についても行っている。例えば、羊膜上に角膜上皮や結膜上皮を培養すると免疫調節に関与

する MHC class I の一つである HLA-G の発現が上昇すること (K.Higa, Cornea, 2006)、重篤な炎症をともなった眼表面疾患にこの羊膜を物理的なカバーとして用いると、炎症細胞が羊膜にトラップされ抗炎症効果をもたらすこと (S.Shimmura, Cornea, 2001)、さらに、その効果は羊膜に豊富に存在するヒアルロン酸と炎症細胞で発現する CD44 を介して接着しトラップされていることなどについて報告した (K.Higa, Cornea, 2005)。一方で我々は角膜上皮、口腔粘膜上皮、羊膜上皮、尿管上皮など様々な組織から幹細胞の分離を行った経験を持ち、最近では口腔粘膜上皮下組織から、間葉系幹細胞の分離も行っている。この口腔粘膜上皮下組織由来の細胞には造血組織由来の間葉系幹細胞に類似した細胞が存在し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へ分化誘導可能であることが解ってきた (図参照 : S Matsumura, Oral Disease accept, 2013)。また、この口腔粘膜上皮下組織由来の細胞には間葉系幹細胞でも胚葉を超えた多分化能を示す上で重要な神経堤由来の細胞も含まれていることも分かってきた。さらに、培養上皮シートを作成する際に、フィーダー細胞と共培養を行うが、骨髄由来間葉系幹細胞を代わりにフィーダーとして使うことによっても上皮シートを作成出来ることが解っている (M. Omoto, IOVS, 2009)。同様に、我々は口腔粘膜上皮下組織由来の細胞をフィーダーとして用いても、上皮シートの作成に成功している (歯科学報, 2013)。このように、良好な上皮シートを作成または再生させるためには、角膜の上皮と実質細胞のように、フィーダーなど間葉系の細胞とのインターアクションが重要である。以上のことから、羊膜中の間葉系幹細胞が上皮の創傷治癒効果を発揮している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では羊膜の優れた特性、特に創傷治癒促進効果のメカニズムを解明するため、羊膜由来の間葉系幹細胞を採取し、羊膜と比較しながら角結膜上皮の創傷治癒促進効果を観察する。

## 3. 研究の方法

### 1) 羊膜の採取

ヒト羊膜採取には、当院産婦人科に来院し、帝王切開が必要と判断された妊婦の中で、当院倫理委員会の規定に基づき同意を得たものを使用する。帝王切開時に新生児と共に取り出された胎盤とその周辺組織から羊膜-絨毛膜組織を胎盤から切り離して羊膜を採取する。

### 2) 羊膜から間葉系幹細胞の分離と培養

酵素処理により上皮と上皮組織に分離する。上皮組織より細胞を抽出し、増殖培地より増殖させる。間葉系幹細胞はストレス条件下において耐性で、濃縮することで効率良く分離出来ることが報告されている(Kuroda, PNAS, 2010)。我々も増殖させた細胞から、より高率な多分化能を持った間葉系幹細胞の分離を行う。

### 3) 間葉系幹細胞の解析

増殖したそれぞれの細胞は間葉系幹細胞であるか確認するため、フローサイトメーターを用いて間葉系幹細胞マーカーとして CD44, CD90, CD105, CD106, CD73, CD146, STRO-1 の発現を解析する。さらに、多分化能を調べるため、それぞれの分化培地を用いて骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞ならびに神経細胞への分化誘導を行う。

分化誘導後、それぞれ、アルカリフォスファターゼ(骨芽細胞)、アリザリンレッド(骨芽細胞)、Oil Red O 染色(脂肪

細胞)、Safranin O 染色(軟骨細胞)、 $\beta$ III-tubulin, Neurofilament Medium (NFM)の免疫染色(神経細胞)を行い評価する。遺伝子発現についてもそれぞれのマーカーで RT-PCR を用いて評価する。

### 4) 角結膜上皮細胞培養への羊膜と間葉系幹細胞の影響

角膜ならびに結膜上皮細胞を角膜移植に使用済みの輪部組織から酵素処理により採取し、培養する。培養する際に羊膜もしくは間葉系幹細胞と共培養する。共培養はトランズウェルを使用し、直接接しない状態で、液性因子のみの影響を観察する。評価として、上皮細胞の未分化維持能を比較するため、p63, K15 などの発現を免疫染色ならびに RT-PCR にて確認する。また、分化度を評価するため、ケラチン 12 などの発現を同様に観察する。また、増殖能を観察するため、コロニー形成能の比較についても検討する。

### 5) 角膜上皮シート作成への羊膜と間葉系幹細胞の影響

創傷治癒促進効果を観察するため、トランズウェルインサート上に角結膜上皮シートを作成し、インサート下に羊膜もしくは間葉系幹細胞を共培養して創傷を *in vitro* で作成する。創傷は上皮を一定の面積で剥離を行って、再上皮化するスピードを比較する。

#### 4. 研究成果

羊膜から分離・培養した羊膜由来間葉系細胞 (hAMMCs) はフローサイトメトリーにより間葉系幹細胞でも観察される CD29、CD44、CD73、CD90 が検出された (図 1)。また、神経堤由来細胞で重要な CD49d ならびに CD56 が検出された (図 2)。一方、造血系で発現する CD14、CD34、CD45 ならびに血管内皮で発現する CD31 は検出されなかった (図 3)。

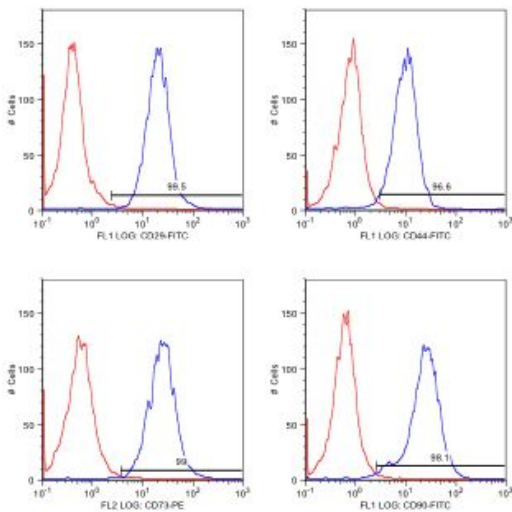


図 1) hAMMCs の間葉系幹細胞マーカーのフローサイトメトリー。赤：アイソタイプコントロール。青：陽性細胞。左上：CD29、右上：CD44、左下：CD73、右下：CD90。

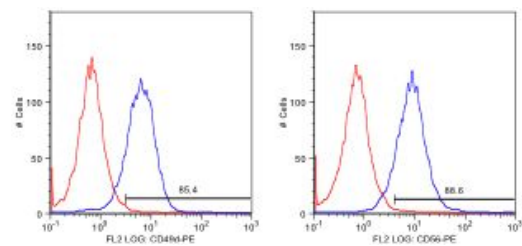


図 2) hAMMCs の神経堤因子のフローサイトメトリー。赤：アイソタイプコントロール。青：陽性細胞。左：CD49d、右：CD56。

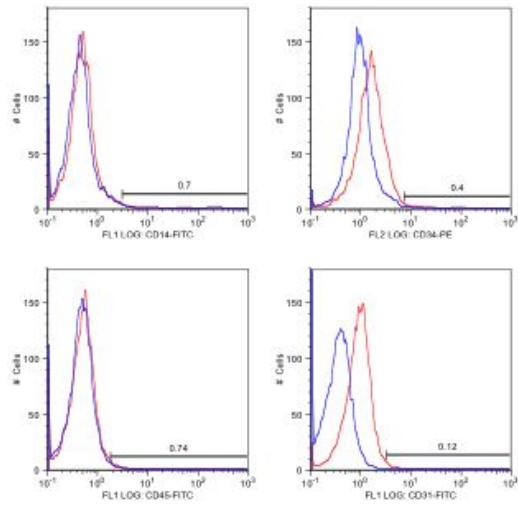


図 3) hAMMCs の造血系ならびに血管内皮マーカーのフローサイトメトリー。赤：アイソタイプコントロール。青：陽性細胞。左上：CD14、右上：CD34、左下：CD45、右下：CD31。

hAMMCs は分化誘導により、骨芽細胞で観察される ALP 並びに ARS 陽性像を示し、RT-PCR において、ALP ならびに OPN の発現を確認することができた (図 4)。

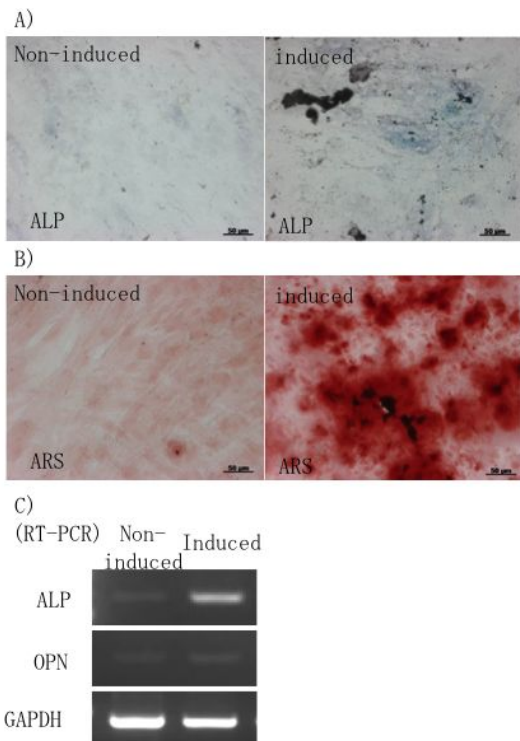


図 4) hAMMCs の骨芽細胞への文化誘導。A) アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色。B) アリザリンレッド S 染色。C) RT-PCR。OPN：オステオポンチン。Non-induced：分化誘導前。Induced：分化誘導後。

hAMMCs の神経細胞への分化誘導において、 $\beta$ III-tubulin ならびに NFM の陽性像を示し、RT-PCR においては、MBP ならびに NFM の発現を確認した (図 5)。

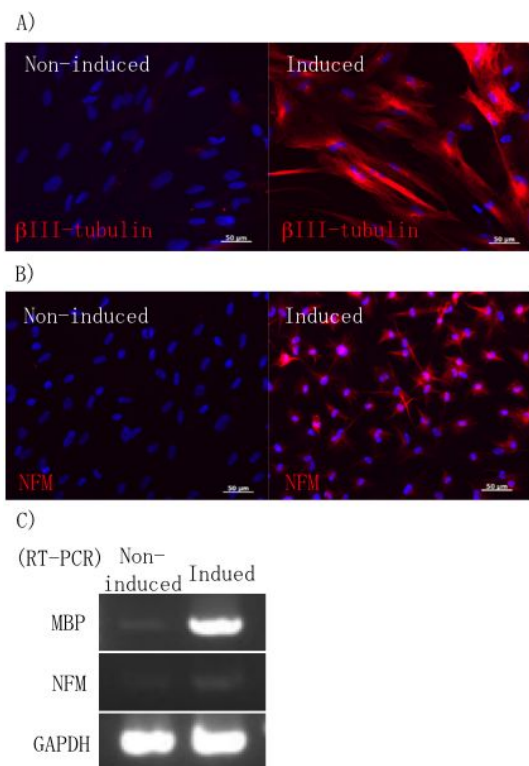


図 5) hAMMCs の神経細胞への文化誘導。  
A)  $\beta$ III-tubulin の免疫染色。 B) Neurofilament Medium (NFM)の免疫染色。 C) RT-PCR。 MBP : Myelin basic protein。 Non-induced : 分化誘導前。 Induced : 分化誘導後。

脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導においてはそれぞれに特徴的な像をあまり観察することができなかった。

AMMCs の培養上清で培養した角膜輪部上皮シートは AM と同様に DF- に比べて角膜上皮の幹細胞が存在する角膜輪部のフェノタイプを示す K15 ならびに p63 の発現を維持していた (図 6)。

AMMCs の培養上清で培養した角膜輪部上皮シートは AM と同様に DF- に比べて高いコロニー形成能 (CFE) を示した ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ , 図 7)。

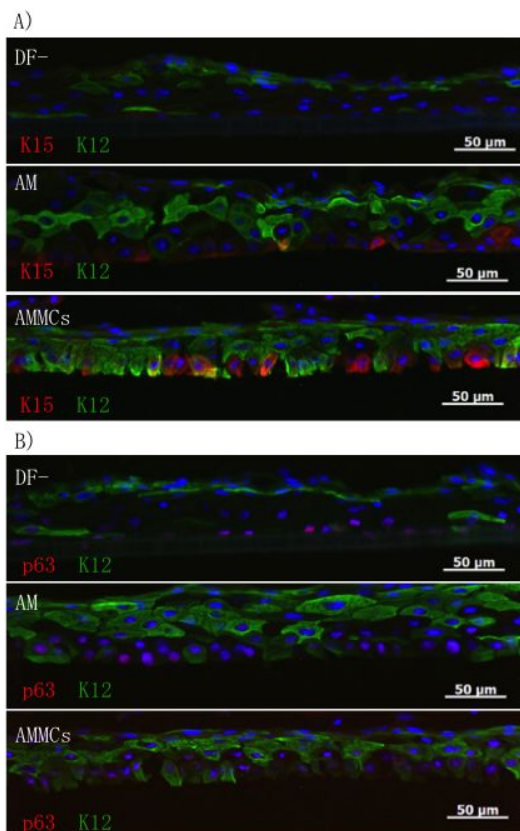


図 6) 角膜輪部上皮シートの免疫染色。 A) ケラチン (K)15, K12 の二重染色。 B) p63、K12 の二重染色。 DF- : DMEM/F12 のみの培地で培養した上皮シート。 AM : 羊膜を培養した培地で培養した上皮シート。 hAMMCs : 羊膜由来間葉系細胞を培養した培地で培養した上皮シート。

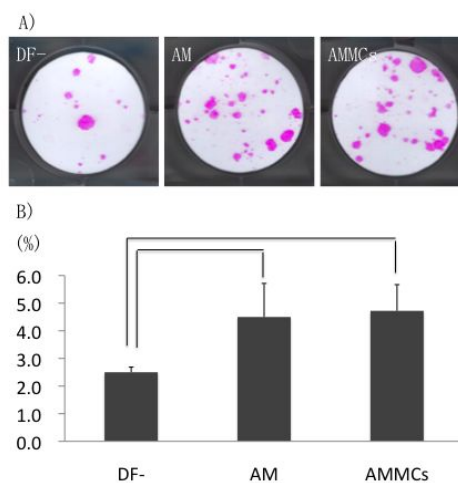


図 7) 角膜輪部上皮シートのコロニー形成能 (CFE) の比較。 A) ローダイミン B によるコロニーの染色。 B) そのコロニー形成率 ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ )。 DF- : DMEM/F12 のみの培地で

培養した上皮シート。AM：羊膜を培養した培地で培養した上皮シート。hAMMCs：羊膜由来間葉系細胞を培養した培地で培養した上皮シート。

創傷治癒モデルにおいて、hAMMCsの上清により、創傷治癒がAMと同様に促進される傾向を示した ( $P<0.05$ ,  $n=6$ )。

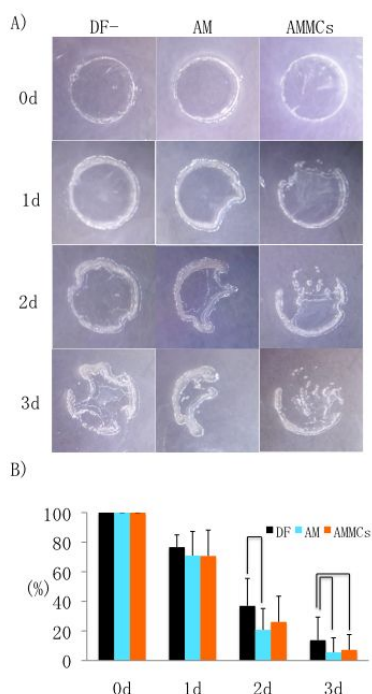


図8) 角膜輪部上皮シート創傷治癒モデルにおける上皮創傷治癒過程の比較。A) 上皮欠損部位の経時的変化。B) その欠損部位の割合 ( $P<0.05$ ,  $n=6$ )。DF-：DMEM/F12 のみの培地で培養した上皮シート。AM：羊膜を培養した培地で培養した上皮シート。hAMMCs：羊膜由来間葉系細胞を培養した培地で培養した上皮シート。

以上のことから、羊膜に存在する間葉系細胞は比較的未分化な多分化能を持っている可能性が考えられた。またこの細胞は羊膜の持つ角膜上皮未分化性の維持と創傷治癒促進効果に関与している可能性が考えられた。

## 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)

[学会発表](計 3件)

比嘉一成. 羊膜由来間葉系細胞の角膜上皮への影響. 長崎大学病院羊膜バンク設立記念シンポジウム 羊膜がもたらす再生医療の新展開. 2017年12月17日長崎大学医学部ポンペ会館(長崎県、長崎市)

比嘉一成、樋口順子、鈴木輝政、佐竹良之、山口剛史、島崎潤. 羊膜由来間葉系細胞の角膜輪部上皮シートへの影響.

角膜カンファランス2017. 2017年2月16日～2017年2月18日アクロス福岡(福岡県・福岡市)

比嘉一成、樋口順子、鈴木輝政、佐竹良之、山口剛史、島崎潤. 羊膜から分離・培養した間葉系細胞の解析と角膜上皮創傷治癒モデルへの影響. 第16回日本再生医療学会. 2017年3月7日～2017年3月9日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島崎潤 (SHIMAZAKI Jun)  
東京歯科大学 歯学部・教授  
研究者番号：40170930

### (2) 連携研究者

比嘉一成 (HIGA Kazunari)  
東京歯科大学 歯学部・助教  
研究者番号：6039782

### (3) 研究協力者

兼子智 (KANEKO Satoshi)  
東京歯科大学 歯学部・講師