

胎児付属物由来幹細胞による造血幹細胞維持能の
比較解析
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系小児科学専攻

西川 英里

修了年 2014 年

指導教員 高橋 昌里

【背景】臍帯血は造血幹細胞移植における有用な細胞源として利用されている。しかし、他の移植細胞源である骨髄や末梢血と比較し、生着不全の合併が多いことが問題となる。生着不全の原因としては、移植前処置に伴う骨髄ストローマ細胞の障害や、移植細胞数の量不足などが考えられる。

生着は骨髄のニッチを形成するストローマ細胞に造血幹細胞が接着することで達成され、骨髄破壊的前処置の後、造血幹細胞とともにストローマ細胞を移植することで生着の促進が期待できる。実際、骨髄中でストローマ細胞として機能している骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stromal cell :MSC)と臍帯血の同時移植により、生着不全を回避したとの報告がある。

一方、胎盤や臍帯など、分娩時に破棄される胎児付属物には、造血幹細胞のニッチとして機能する細胞が含まれるとの報告がある。一方でその局在や、単離・培養増殖後の造血支持能についてはほとんど解明されていない。こうした胎児付属物由来細胞は、採取に侵襲がなく臍帯血と同一ドナーからの調整も可能であるため、臍帯血生着不全予防を目的とした細胞治療の新たな細胞源として期待できる。

【目的】臍帯、胎盤から単離、調整できる 3 種類の幹細胞について、造血幹細胞ニッチ細胞としてのマーカーの発現や、臍帯血造血幹細胞の維持能を解析し、造血幹細胞ニッチの機能を有する細胞の同定を試みた。

【方法】

1. 胎児付属物由来細胞の採取、調整

当院にて同意の得られた予定帝王切開患者から、分娩後に臍帯と胎盤を採取した。得られた組織の凍結切片を作成し、生体の骨髄微小環境において、造血幹細胞の維持やホーミングに重要な役割を果たす **Stroma -derived -factor-1 (SDF-1)** と、上皮細胞のマーカーである **cytokeratin19 (CK19)** を用い、臍帯、胎盤の免疫組織化学染色を行った。**SDF-1** の発現をもとに、造血幹細胞維持能に差があると予想される 3 種類の組織（胎盤羊膜上皮、胎盤羊膜間質、臍帯 Wharton's-jelly）を選択し、細胞を単離した。胎盤羊膜上皮由来幹細胞(AM-Epi)と胎盤羊膜間質由来幹細胞(AM-Mes)は既報に従い酵素処理で分離した。Wharton's-jelly 由来細胞(WJ-MSC)は既報に従い explant 法にて分離した。

2. 免疫組織染色による検討

調整した細胞を用い、骨髄の造血幹細胞ニッチを構成するストローマ細胞が発現する **SDF-1** や **Nestin** および、幹細胞マーカーである **SSEA3**、**SSEA4**

の発現解析を、免疫細胞染色にて行った。サイトスピンおよび継代 0 代から 3 代までの培養細胞を用い、各種マーカーの発現パターンと、培養、継代による性質の変化を解析した。

3. フローサイトメーター

AM-Epi、AM-Mes、WJ-MSC の表面マーカーの発現パターンを、フローサイトメーターを用いて解析した。評価は、MSC の minimal-criteria に挙げられている CD90、CD105、CD73、CD45、CD34、CD11b、CD19、HLA-DR の 8 項目について行った。

4. 臍帯血 CD34 陽性細胞との共培養実験

3 種類の胎児付属物由来細胞と臍帯血中の CD34 陽性細胞と共培養を行い、造血幹細胞維持能を *in-vitro* で評価した。陽性コントロールとして、放射線照射した C3H/HeN マウス骨髄から樹立されたストローマ細胞株 HESS-5 細胞を用い、陰性コントロールとして、ヒト fibroblast を用いた。共培養後の臍帯血細胞を回収し、CD34 陽性 CD45 陰性細胞分画をフローサイトメーターで解析した。

5. 共培養後の臍帯血 CD34 陽性細胞の造血能

3 種類の胎児付属物由来幹細胞と共培養を行った臍帯血 CD34 陽性細胞を CFU-GM アッセイを行い、14 日培養後のコロニー数をカウントした。

【結果】

1. 胎児付属物および胎児付属物由来細胞の免疫組織・細胞学的検討

臍帯、胎盤の免疫組織化学染色を行った結果、ニッチ構成細胞のマーカーである SDF-1 は臍帯羊膜、臍帯 WJ、胎盤羊膜、胎盤絨毛に陽性細胞が検出された。特に CK19 陽性の臍帯、胎盤羊膜上皮で高発現であった。

AM-Epi、AM-Mes、WJ-MSC をそれぞれ単離し、サイトスピンおよび継代 0~3 代までの培養細胞で細胞免疫染色を行った結果、単離直後の細胞は AM-Epi、WJ-MSC で SDF-1 陽性であり、ニッチ構成細胞のマーカー Nestin、幹細胞マーカー SSEA4 は AM-Epi、AM-Mes、WJ-MSC 全てで発現が認められた。しかし、継代培養により増殖させた細胞では、こうしたマーカーの発現は減弱し、細胞の形質に大きな差異が見られなくなった。

2. 胎児付属物由来幹細胞の表面マーカープロファイル

フローサイトメーターによる解析の結果、AM-Epi、AM-Mes、WJ-MSC は

いずれも MSC マーカーである CD90、CD105、CD73 陽性、血球細胞マーカーである CD45、CD34、CD11b、CD19、HLA-DR 陰性という MSC の minimal-criteria に一致した。AM-Epi、AM-Mes、WJ-MSC はいずれも MSC に類似した形質を持つことが明らかになった。

3. 臍帯血 CD34 陽性細胞との共培養実験

3 種類の胎児付属物由来幹細胞を臍帯血 CD34 陽性細胞と共培養し、臍帯血細胞の細胞数を計測した結果、AM-Epi は 5.8 倍、AM-Mes は 7.6 倍、WJ-MSC は 6.5 倍の増加を認めた。HESS-5 細胞では 4.6 倍の増加を認めた。一方、フィーダー細胞を用いずに臍帯血 CD34 陽性細胞のみを培養した場合、細胞増加はほとんど起こらなかった。5 日間共培養後の、CD34 陽性 CD45 陰性細胞の割合は、AM-Epi 37.8%、AM-Mes 38.8%、WJ-MSC 27.3%、HESS-5 60.0%、Fibroblast 27.4%であった。AM-Epi と AM-Mes の CD34 陽性 CD45 陰性細胞の割合は、HESS-5 には及ばないものの、Fibroblast に比べて高値であった。

4. 共培養後の臍帯血 CD34 陽性細胞の造血能

共培養後の臍帯血細胞による CFU-GM アッセイでは、コロニー数は陽性コントロールの HESS-5 は 271.3 ± 39.2 で、陰性コントロールの fibroblast が 147.8 ± 19.0 、フィーダー細胞のない陰性コントロールは 121.3 ± 6.5 であった。これに対し、AM-Epi は 255.5 ± 21.6 、AM-Mes は 246.3 ± 28.5 、WJ-MSC は 118.3 ± 11.8 であった。AM-Epi および、AM-Mes は、WJ-MSC、陰性コントロールと比べ CFU-GM 数が有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。

【考察】

1. 胎児付属物由来細胞の免疫組織・細胞学的検討

造血ニッチマーカーである SDF-1 を指標にヒト臍帯、胎盤の免疫組織学的検討を行った結果、臍帯羊膜、臍帯 WJ、胎盤羊膜、胎盤絨毛に陽性細胞が検出された。胎盤組織では、SDF-1 は CK19 陽性の羊膜上皮で高発現しており、CK19 陰性の羊膜間質ではほとんど発現を認めなかった。上皮胎生期における起源は、羊膜上皮細胞が embryonic ectoderm、羊膜間質細胞が embryonic mesoderm とその由来が異なるため、これらの細胞は元々、SDF-1 の発現に差異がある可能性がある。一方、生体内造血ニッチマーカーである nestin や幹細胞マーカーである SSEA4 は、胎盤羊膜より単離した上皮細胞、間質細胞、臍帯 WJ より単離した細胞ともに発現が認められた。胎児付属物に由来する細胞に種々の幹細胞マーカーが発現していると

いう所見は、既報に一致する。

今回、胎盤羊膜上皮、間質、臍帯 WJ より細胞を培養増殖させ、すでに単離増幅法が確立している 3 種類の幹細胞(AM-Epi, AM-Mes, WJ-MSc)を調製し、形質解析を行った。その結果、3 種類の細胞共に、継代培養で SDF-1, nestin, SSEA4 の発現は減弱することが明らかになった。継代培養による幹細胞マーカーの減弱や多分化能の減弱は、既報に一致する。培養、継代を重ねた胎児付属物由来幹細胞は、多能性や造血幹細胞維持能が低下している可能性が示唆された。

2. 胎児付属物由来幹細胞の表面マーカープロファイル

今回、同一ドナー胎児付属物から得られた 3 種類の胎児付属物由来幹細胞 (AM-Epi, AM-Mes, WJ-MSc) は、MSc の minimal criteria に一致する細胞表面マーカープロファイルを示した。この結果は、既報と一致する。AM-Epi は元々上皮細胞由来の細胞であるが、継代培養の過程で上皮系マーカーは消失し、間葉系のマーカーを発現するようになることが明らかになった。AM-Epi 調製時に認められる間葉系細胞への形質転換現象は、遺伝子レベルでも同様の変化が起こっていることが報告されており、培養中に何らかの刺激により上皮間葉転換(epithelial –mesenchymal - transition, EMT)が起こっていると考えられている。造血支持能を有する胎児付属物由来細胞株の特徴として、MSc マーカーを発現し、骨や脂肪への分化能を示すことが報告されている。またマウス骨髄においても、造血幹細胞ニッチとして機能する細胞は、MSc の形質や機能を有していることが明らかにされている。今回調製した胎児付属物由来幹細胞についても多分化能などを検討し、MSc 機能と造血幹細胞維持能との関連を明らかにする必要がある。

3. 胎児付属物由来幹細胞の造血幹細胞維持能

今回、造血幹細胞維持能を比較検討した結果、共培養による臍帯血 CD34 陽性細胞の増殖能は、AM-Epi, AM-Mes, WJ-MSc 共に HESS5 と同様の高い増殖能を示した。またフローサイトメーターや CFU-GM アッセイによる造血幹細胞の維持能は、WJ-MSc に比べ AM-Epi, AM-Mes で高いことが明らかになった。これまでに同一ドナー由来の複数の種類の胎児付属物由来幹細胞との共培養で、造血幹細胞の維持能を比較検討した報告はなく、WJ-MSc に比べ AM-Epi, AM-Mes が高い造血幹細胞維持能を持つことを明らかにしたことは、本研究の新規性であると考えられる。今後、共培養により得られた細胞が造血能を保持しているか証明するために、共培養後の臍帯血細胞を免疫不全マウスに移植する実験を行い、生着率や造血回復のスピ

ード改善があるか検討する必要がある。

最近、造血幹細胞移植時に臍帯由来 MSC を同時移植する臨床研究が行われ、MSC の同時移植が安全に行えること、また同時移植すると造血幹細胞の生着率が促進され、早期に造血回復が得られることが報告されている。今後、本研究にて比較検討した AM-Epi, AM-Mes, WJ-MSC についても、免疫不全マウスにヒト造血幹細胞とともに同時移植することにより、造血幹細胞の生着率向上や造血回復の促進が得られるか検討することが望まれる。

【まとめ】

ヒト胎児付属物（臍帯、胎盤）に含まれる造血幹細胞維持能を有する細胞の同定と機能解析を行った。SDF-1 を高発現する幹細胞は CK19 陽性の羊膜上皮に多く局在することが明らかになった。また胎盤羊膜上皮、胎盤羊膜間質から培養、増幅させた AM-Epi、AM-Mes は、胎盤 WJ より調製した WJ-MSC に比べ、高い造血幹細胞維持能を示した。AM-Epi、AM-Mes などの胎児付属物由来幹細胞は、造血幹細胞移植時の生着率向上を目的とした細胞治療の細胞源として臨床応用が期待できると考えられた。