

ヒト羊膜幹細胞の存在部位の検討

Distribution of amniotic stem cell in human term amnion membrane

2020

富山大学大学院 医学薬学教育部（博士課程）

生命・臨床医学専攻 危機管理医学講座

31361006 小池 伸享

目次

要約	1
はじめに	2
材料と方法	6
1. 倫理的配慮	
2. 羊膜の採取	
2.1 伸展標本の作製（ホールマウント切片）	
2.2 凍結標本（凍結切片）の作製	
2.3 パラフィン包埋標本の作製	
3. 電子顕微鏡組織の作成	
4. 免疫組織化学的染色	
4.1 免疫染色	
4.2 ALP (Alkaline phosphatase) 活性	
5. 組織における幹細胞転写因子に関する mRNA の発現解析	
5.1 リアルタイム PCR 法	
6. 統計学的分析	
結果	10
1. 羊膜の区分と構造	
1.1 羊膜の区分	
1.2 羊膜の部位の違いによる HAE 層（ヒト羊膜上皮細胞層）の構造の違い	
1.3 羊膜の部位の違いによる結合組織構造の違い	
2. 電子顕微鏡による観察	
3. 羊膜の上皮層における幹細胞マーカーおよび分化マーカーの発現	
3.1 HAE (羊膜上皮細胞) の ALP 活性および Tra-1-60 の発現	
3.2 HAE (羊膜上皮細胞) の Tra-1-60 と幹細胞マーカーとの共発現	
3.3 HAE (羊膜上皮細胞) における分化マーカーの発現	
4. 羊膜の結合組織における幹細胞マーカーの発現	
4.1 HAM (羊膜間葉細胞) の分布	
4.2 HAM (羊膜膜間葉細胞) における幹細胞マーカーの発現	
5. 幹細胞関連転写因子に対する mRNA の発現	
6. HAE 幹細胞（ヒト羊膜上皮系幹細胞）と HAM 幹細胞（ヒト羊膜間葉系幹細胞）	

の分布

6.1 HAE 幹細胞の分布

6.2 HAM 幹細胞の分布

考察 24

結語 28

利益相反 28

謝辞 28

参考文献 29

要約

古くから被覆材として利用されてきたヒト羊膜は、ヒト羊膜上皮細胞 (Human amniotic epithelial cell: HAE) およびヒト羊膜間葉細胞 (Human amniotic mesenchymal cell: HAM) により構成され、その中には、それぞれヒト羊膜上皮系幹細胞 (Human amniotic epithelial stem cell: HAE 幹細胞) およびヒト羊膜間葉系幹細胞 (Human amniotic mesenchymal stem cell: HAM 幹細胞) が存在する。羊膜は胎盤のある絨毛膜有毛部 (胎盤付着部) および胎盤のない絨毛膜無毛部で構成される。本研究では前者をさらに臍帯付着部 (Area A) およびその周辺である臍帯周囲部 (Area B) の2つの部位にわけ、後者 (絨毛膜無毛部) を辺縁部 (Area C) とし、これら3つの領域に存在する HAE 幹細胞および HAM 幹細胞を幹細胞マーカーや転写因子の発現にて同定し、その分布について検討した。

結果: Area A には単層円柱状で、vimentin に強陽性を示す HAE が散在した。Area B および Area C には立方及び扁平状でほとんどの細胞が vimentin 陽性を示す HAE が存在した。Area A および Area C には、HAE の中に幹細胞関連転写因子 Oct3/4 の発現、および未成熟細胞や幹細胞で強い活性を示す ALP (アルカリフォスファターゼ活性) の活性を示す HAE 幹細胞が存在した。また、幹細胞マーカーである Tra-1-60 にのみ陽性を示す HAE 幹細胞だけでなく、Tra-1-60、Tra-1-81 かつ SSEA3 に陽性である HAE 幹細胞が Area A および Area B に存在した。Area A、B には上皮細胞の中間系フィラメントである CK5 (サイトケラチン 5) および CK18 (サイトケラチン 18) の両方に同時に染まる HAE が存在したが、Area C にはどちらか一方にのみ染まる HAE が存在した。

結合組織には、緻密層 (compact zone) と網状層 (sponge zone) の境界に 10-15 個集合して存在する CD73, SSEA4 陽性の HAM 幹細胞群と、網状層内で Sox2 陽性の HAM 幹細胞群が存在した。フローサイトメトリーでの幹細胞解析に使われる手技の一つである side population (SP) 解析に重要な薬剤排出トランスポータータンパク ABCG2 の責任分子である BCRP (Brest Cancer Resistance Protein) を発現する HAM 幹細胞が Area A に多く存在した。iPS 細胞に発現する幹細胞関連転写因子 Klf4, OctA, Oct3/4, c-Myc, Sox2 の発現を示す HAM 幹細胞は Area C に多く存在した。しかし、これらに対する mRNA の発現には領域による有意差はなかった。

HAE 幹細胞, および HAM 幹細胞は、羊膜全体に均等に分布するのではなく、偏在して存在した。また、HAE 幹細胞, および HAM 幹細胞はすべて同じ幹細胞マーカーを発現するのではなく、幹細胞により発現するマーカーに違いがあることから、幹細胞にはサブクラスがあることが示唆された。これらの意義については今後研究する必要があるが、再生医療材料源とし、幹細胞を採集する上で幹細胞の分布を知ることが、特定の細胞を効率よく採取するためには有効な情報である。

はじめに

骨髄に存在する造血幹細胞は、細胞治療の材料として重度の血液疾患患者の治療に用いられている[1, 2]。再生医療の分野では、幹細胞は骨髄だけでなく、脂肪、神経、皮膚、消化管、臍帯、胎盤関連組織など、人体のあらゆる組織に体性幹細胞(SSC)として存在することが報告されている[3]。体性幹細胞は、肝硬変、脳梗塞、表皮水疱症などの難治性疾患の新たな治療材料としての研究がすすめられている[4, 5]。しかし、体性幹細胞の使用には倫理的な問題に加え、採取時にドナーの苦痛が伴うことや、治療に必要な細胞を十分に確保できないなどの問題がある[6]

羊膜は、受精後 7 から 8 日の間に内部細胞塊(inner cell mass:内部細胞塊、embryonic stem cell:ES 細胞の由来)の胚盤葉上層(epiblast side)内に羊膜腔として出現する組織であり、発生学的に ES 細胞とたいへん近い位置に存在する事から幹細胞を多く含有していると考えられている。また、羊膜などの胎盤周囲組織は出産後廃棄される組織であることから倫理的な問題はほとんどない。これらの特性に加え、羊膜には抗炎症効果があることや、羊膜の面積が分娩時 $1876 \pm 307 \text{ cm}^2$ にも及び多くの細胞を一人のドナーから供給することが可能であること[7]などから、羊膜から単離した羊膜由来細胞を再生医療において新たな細胞医療材料源として利用する事が有望視されている[8, 9, 10]。

我々は、すでに羊膜から HAE(ヒト羊膜上皮細胞)および HAM(ヒト羊膜間葉細胞)を採取する方法を樹立し、疾患モデルにおいてその有効性を報告している[11]。

羊膜は豊富な膠原線維に加え、サイトカインを含んでいることから、細胞の成長や移動を誘導するスカフォールドとして組織工学分野で利用されてきた[12, 13]。スカフォールドとして開発するには、ドナー間(年齢、民族、ドナーの健康状態、妊娠年齢、胎児の性別など)[14]だけでなく、一人のドナーにおいても部位による羊膜の構造の違いや、分泌するサイトカインや成長因子などが異なる可能性について考える必要がある[15, 16]。

羊膜は本来、妊娠と出産の要として機能する大変重要な器官である[17, 18]。構造的には単層上皮組織と結合組織からなる $100 \sim 200 \mu\text{m}$ の厚さの膜状の器官であるが、胎盤や臍帯と連続した組織であることから臍帯部、胎盤部、絨毛膜無毛部の 3 つの領域に分けられており[19]、これまで産科的な観点から多くの報告がなされてきた。陣痛の有無が、インターロイキン- 1β (IL- 1β) のメッセンジャーRNA(mRNA)の分布の違いと相関していること[20]や、出産時に羊膜全体のプロスタグランジン(PG)や炎症性サイトカインが増加することが破水と関連することが示された[21]。また、羊膜は胎盤の表面を覆う部位(胎盤部)だけでなく、無毛部が子宮口領域にも到達し、サイトカインや生理活性物質の分泌が部位により異なることが報告され、分泌するサイトカインの種類により、胎盤ゾーン、中間ゾーン、先端ゾーン(子宮口側)に分類された[22]。特に、先端ゾーンは他の 2 カ所と異なり、MMP-9

(Matrix metalloproteinase 9) [23] の活性が高く、TIMP 3 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 3) [24] が極めて少ないという特徴がある。胎盤ゾーンでは、EGF (Epidermal Growth Factor) [25] の活性は低く、TGF- β (Transforming growth factor β) [26] の活性が高いが、中間ゾーンでは、EGF の活性が高く、TGF- β の活性が低い。このように、羊膜は部位によりサイトカインなどの生理活性物質の分泌が異なる [22]。

一方で、羊膜に、PG [21]、MMP-9 [23]、TIMP-3 [24]、EGF [25]、TGF- β [26] などの各種サイトカインや生理活性物質が存在することは、創傷被覆材として大きな利点である [27, 28]。これまで分泌されるサイトカインなどについて報告はされているものの、羊膜を構成する細胞と幹細胞の存在部位との関係についてはほとんど関心が持たれなかった。2015 年 Banerjee ら [29] が、細胞の分化には多くのエネルギーを必要とすることから、多分化能を有する幹細胞のミトコンドリアのタイプと機能との関係から抗酸化作用を強く持つ細胞が胎盤部に多いと報告したにすぎない。

本研究では、形態的特徴や幹細胞マーカーの発現により幹細胞を同定し、羊膜の領域の違いによる幹細胞の分布を検討する。

HAE 幹細胞については、幹細胞マーカーとして最も広く利用されている ALP (Alkaline phosphatase) 活性 [30] 及び 2 系統の異なった細胞表面マーカー 4 つを利用した。一系統は SSEA3、SSEA4 (Stage specific embryonic antigen 3, 4) などをマークする糖鎖マーカーである。SSEA3 はシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質 (ganglioside) の内部構造であり、SSEA4 は末端部として認識されている [31]。SSEA3 (R-3GI α NAc α 1-3Gal α 1-4R) と SSEA4 (NeuAC α 2-3v-3GalNAc α 1-33Gal α 1-4R) のエピトープは初期のマウスやヒトの胚の構成に重要で、インテグリンの活性を強める [32]。もう一つの系は、Tra-1-60 [33] と Tra-1-81 [34] で、ヒトの EC や ES 細胞の細胞表面マーカーであり、ケラチンサルファートプロテオグリカンである。どちらのエピトープも幹細胞活性において重要な働きをするが、それぞれ、異なったステージで発現するためその発現率は異なる。Tra-1-60 陽性の HAE は、分離濃縮する事により幹細胞活性が高くなったことから [35]、Tra-1-60 陽性細胞を主として幹細胞を同定し、さらにその他の幹細胞表面マーカーとの共発現などから幹細胞の分布を検討した。

HAM 幹細胞については、iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) の作成に関与する幹細胞転写因子 (Oct 3/4 [36], Sox2 [37, 38], OctA [39, 40], Nanog [41], Klf4 [42], c-Myc [43]) 及び フローサイトメトリーでの幹細胞解析に使われる手技の一つである side population (SP) 解析に重要な薬剤排出トランスポータータンパク ABCG2 の責任分子である BCRP (Brest Cancer Resistance Protein) [44] を幹細胞マーカーとして使用した (Table 1)。

Table 1-1 幹細胞表面マーカーおよび転写因子

	略号・名称	概要	論文
幹細胞表面マーカー	ALP Alkaline phosphatase	マウス/ヒトの胚性幹細胞(ES細胞)および胚性生殖細胞(EG細胞)で広く用いられる幹細胞マーカー	Stefkova K et al., 2015 ³⁰
	Tra-1-60	幹細胞マーカー CD34 関連シアロムシンファミリーのメンバーであるポドカリキシンとして同定されたケラタン硫酸化糖タンパク質の炭水化物エピトープを特異的に認識する。	Badcock G et al., 1999 ³³
	Tra-1-81	幹細胞マーカー CD34 関連シアロムシンファミリーのメンバーであるポドカリキシンとして同定されたケラタン硫酸化糖タンパク質の炭水化物エピトープを特異的に認識する。 機能不明。	Qui D et al., 2008 ³⁴
	SSEA3 Stage specific embryonic antigen 3	幹細胞マーカー・糖鎖抗原マーカー スフィンゴ糖脂質の一種で, Muse 細胞を始め、ヒト EC 細胞、ES 細胞、iPS 細胞、などの細胞表面に局在しており、多能性/胚性マーカーとして用いられている	Kannagi R et al., 1983 ³¹
	SSEA4 Stage specific embryonic antigen 4	糖鎖抗原マーカー スフィンゴ糖脂質 多能性ヒト胚性幹細胞マーカー。間葉系幹細胞の分離に利用される。	Kannagi Ret al., 1983 ³¹
幹細胞関連転写因子	Oct3/4 Octomer-binding transcription factor 3/4	POU(Pit-Oct-Unc)ドメインを持つ転写因子群である POU ファミリー。 生殖細胞や内細胞塊など多能性を保持した細胞系譜で特異的に発現する。	Niwa H et al., 2000 ³⁶
	Oct A Octomer-binding transcription factor A	POU(Pit-Oct-Unc)ドメインを持つ転写因子群である POU ファミリーのホメオドメイン転写因子。 未分化胚性幹細胞の自己複製に密接に関与している。	Seiler et al., K 2011 ³⁸ Rodda D J et al., 2005 ³⁹ Nichols J et al., 1998 ⁴⁰
	Klf4 Kruppel-like factor	Oct3/4 および Sox2 と協調した転写活性化を行う。下流遺伝子を制御し、Nanog と共働する。	Seiler et al., K 2011 ²⁸ Aksoy I 2014 ⁴²
	Nanog Tir Na Nog	ES 細胞特異的に発現するホメオボックス転写因子遺伝子として同定された。Oct3/4, Sox2 とともに共通の下流遺伝子を制御する。しかし、多能性の転写ネットワークには必要ではない。多能性を安定化させる因子	Mitui K et al., 2003 ⁴¹
	c-Myc c-myelocytomatosis	転写因子をコードする遺伝子ファミリー。調節遺伝子であり、がん原遺伝子のファミリー。c-Myc により多くの遺伝子発現が上昇し、園一部は細胞増殖に関与しているため、癌形成に関与する。	Takahashi k et al., 2007 ⁴³
	Sox-2 SRY-box containing gene 2	内細胞塊、生殖細胞や神経幹細胞などに発現する。Sox2 は多能性維持に必須である。	Avilion A et al., 2003 ³⁷ Seiler e K et al., 2011 ³⁸ Rodda D J et al., 2005 ³⁹
	BCRP Brest Cancer Resistance Protein	薬剤排出トランスポータータンパク ポルフィリン系薬剤の細胞外排出 side population(SP)解析	Qingcheng M et al., 2008 ³⁶

Table 1-2 サイトカイン及び生理活性物質 など

CD 分類	CD73	間葉系幹細胞マーカー 5'-ヌクレオチダーゼの酵素活性を有する。	Dominici M et al., 2006 ⁴⁷
中間系 フィラメント	CK5 Cytokeratin5	上皮細胞の中間径フィラメント 高分子ケラチン、Type II ケラチン 塩基性から中性	Quinlan RA et al., 1985 ⁴⁵
	CK18 Cytokeratin18	上皮細胞の中間径フィラメント 低分子ケラチン、Type I ケラチン 酸性	Bartek J et al., 1991 ⁴⁶
	vimentin	間葉系の中間系フィラメント ビメンチンがケラチンの発現を調整する	Dmello C et al., 2017 ⁵⁹
サイトカイン	IL-1 β Interleukin-1 β	主に血液中の単球によって産生されるサイトカインファミリー。炎症性サイトカイン	Han et al. 2008 ²⁰
	PG prostaglandin	アラキドン酸から性合成される化合物。平滑筋収縮、子宮収縮作用、血小板凝集作用など	ohnson RF et al., 2002 ²¹
	EGF Epidermal Growth Factor	上皮細胞の増殖、移動	Hudson LG et al., 1998 ²⁵
	TGF-β Transforming Growth Factor- β	TGF- β ファミリーに属するサイトカイン。コラーゲン産生増加、細胞外基質の分解抑制	Ogawa K et al., 2004 ²⁶
生理活性物質	MMP-9 Matrix metalloprotease	細胞外マトリックスを分解する酵素。基底膜のIV型コラーゲン、ゼラチンの分解酵素	Litwiniuk M et al., 2011 ²³
	TIMP-3 Tissue inhibitors of metalloproteinases	MMP 抑制、創傷面におけるタンパク質分解活性を調整する	Moore RM et al., 2006 ²⁴
	MAPK Mitogen activated protein kinase	セレン/スレオニンキナーゼ 細胞外のシグナルを核内に伝える分子 4つの経路が存在する。 1. 古典的 MAPK:ERK1/ERK2 サブファミリー 2. ストレス活性化キナーゼ :JNK1/JNK2/JNK3 のサブファミリー 3. p38 α ・p38 β ・p38 γ ・p38 δ サブファミリー 4. ERK5 サブファミリー	Richardeon LS et al., 2020 ⁵²

HAE 幹細胞および HAM 幹細胞の分布を明確にし、羊膜からそれぞれの特性を生かした羊膜幹細胞を効率よく採取するための基礎とすることを目的とする。

材料と方法

1. 倫理的配慮

ヒトおよび動物サンプルの使用を含むすべての実験手順は、富山大学倫理審査委員会の審査(審査番号:44)を経て承認されたプロトコールに基づき、ヘルシンキ宣言のガイドラインを遵守して実施した。

2. 羊膜の採取

羊膜は富山大学および高岡市民病院でインフォームド・コンセントを得た上で、日本角膜学会の 2014 年の羊膜取り扱いガイドラインに準拠し、周産期の予定帝王切開のドナー(38 週、18 例)から採取されたものであり、感染、早産などの問題はなかった。

採集直後に絨毛膜有毛部と絨毛膜無毛部を区別し、さらに前者を 2 つに区別した(臍帯付着部 (Area A)) と臍帯周囲部 (Area B) である)。後者の絨毛膜無毛部を辺縁部 (Area C) とし、以上 3 カ所について検討した。Area A は胎盤が付着した部位の中で臍帯の起始を中心として半径 5cm の領域、Area B は、胎盤が付着した部位の中で Area A を除いた部位、Area C は辺縁部(胎盤非付着部)である。凍結標本、伸展標本(ホルマウント標本)、パラフィン包埋標本および電子顕微鏡用試料を作成し、組織学的、免疫組織学的、免疫組織化学的に検討した。

2.1 伸展標本の作製(ホルマウント切片)

PBS (Phosphate-buffered saline) 溶液内で洗浄した後、1.5cm x 4.0 cm に細切し、スライド上に上皮側と結合組織側を区別し、針にて伸展した。使用時まで、-30℃の冷蔵庫に保管した。

2.2 凍結標本(凍結切片)の作製

絨毛膜から機械的に剥離した羊膜を細切し、羊膜の断面が観察されるように、プラスチック包埋皿(ティシュー・テック クリオモルド 3 号、Sakura Finetek Japan Co, Ltd、Tokyo, Japan)に入れ、組織全体を覆うように凍結包埋剤(STEM, SECTION-LAB Co.Ltd.、広島、日本)で包埋した。アセトンドライアイスで冷却したヘキサン溶液(ナカライテスク、京都、日本)中に凍結包埋剤入りの包埋皿を浸漬させて急速凍結した。凍結した組織片は使用するまで-80℃の冷凍庫内で保管した。

2.3 パラフィン包埋標本の作製

羊膜は4%パラフォルムアルデヒド PBS 溶液内で浸漬固定した後、パラフィンワックスに浸漬するために、エタノール系列で脱水し、Hemo-De(ファルマ、東京、日本)で透徹を行った。サンプルをパラフィンモールドに包埋し、厚さ $4\mu\text{m}$ の切片に滑走式ミクロトーム IVS-410(大和、埼玉、日本)にて薄切してガラススライド上に載せて、ヘマトキシリン - エオジン(サクラファインテックジャパン、東京、日本)染色を行った。

3. 電子顕微鏡用試料の作成

細切した羊膜を 1/2 karnovsky 固定液 (0.1M リン酸緩衝液) にて2時間浸漬固定し、2%四酸化オスミウム (0.2M リン酸緩衝液) 固定液で一時間後固定した。10%ショ糖添加蒸留水で洗浄後、3%ウラン水溶液にてブロック染色を実施し型の如くエタノール系列にて脱水した。プロピレンオキサイド (Propylene oxide, ナカライテスク、京都、日本) にて透徹後、Quetol 812(日新 EM 株式会社、東京、日本)にて包埋した。

$1\mu\text{m}$ の厚切り切片で部位を確認した後、ダイヤモンドナイフ (DiATOME, 日新 EM、東京、日本) で 80nm に薄切し、3%ウラン水溶液とクエン酸鉛溶液で電子染色を実施し、透過型電子顕微鏡 (JEM-2100, 日本電子、東京、日本) にて観察した。

4. 免疫組織化学的染色

4.1 免疫染色

伸展標本、凍結標本、パラフィン包埋標本に対し免疫染色をおこなった。凍結した組織片はクリオスタット (Leica CM3050S、Leica Microsystems K.K、東京、日本) を用いて、厚さ $10\mu\text{m}$ に薄切した。

本研究では、幹細胞マーカーとして、anti-Sox2, anti-Oct3, anti-Klf4(H-180), anti-c-Myc(9E10), anti-SSEA3, anti-SSEA4(13-70), anti-BCRP/ABCG, anti-Nanog, anti-Tra-1-60, anti-Tra-1-81, anti を、分化マーカーとして anti-CK5, anti-CK18, vimentin を、二次抗体として、Rabbit F(ab')₂ IgG FITC conjugate 594, Rabbit F(ab')₂ IgG FITC conjugate 488 anti-CD73、ビオチン標識抗マウス IgG+IgA+IgM 抗体, ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体, ビオチン化抗ヤギ IgG 抗体および Strept-avidin conjugated FITC、Strept-avidin conjugated HRP を使用した。抗体等の詳細については Table 2 に示す。発色試薬は DAB キット (Nichirei biosciences Inc、Tokyo、Japan)、核染色は Hoechst 33342(和光、大阪、日本)およびヘマトキシリン 3G(サクラファインテックジャパン、東京、日本)を用いた。

染色した組織は Leica DMRBE 顕微鏡 (Leica、Wetzlar、Germany) にて鏡検し、DP73 system (Olympus、Tokyo、Japan) を用いて画像解析を行った。

Table 2 免疫染色に使用する抗体

	抗体名		希釈	会社
幹細胞関連抗体	Anti-Sox2	Mouse IgG2A	1/50	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-365823
	Anti-Oct3/4	Rabbit IgG	1/100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-9081
	Anti-Oct3/4 (10): Oct A	Rabbit IgG	1/100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-5279
	Anti-Klf4(H-180)	Mouse IgG1	1/100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2069
	Anti-c-Myc (9E10)	Mouse IgG	1/100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-40
	Anti-CD73 (7G2)	Mouse IgG2a	1/100	Abcam Cat# ab54217
	Anti-SSEA3	Rat IgM	1/100	Abcam Cat# ab109868
	Anti-SSEA4 (13-70)	Mouse Ig G3	1/200	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-21704
	Anti-BCRP/ABCG	Mouse IgG	1/100	Abcam Cat# ab-3380
	Anti-Nanog (N-17)	Goat IgG	1/200	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-30331
	Anti-Tra-1-60	Mouse IgM	1/100	Millipore MAB
	Anti-Tra-1-81	Mouse IgM	1/200	Millipore MAB 4381
分化抗体	Anti-CK5	Rabbit IgG	1/500	Purified Cat# PRB-160P
	Anti-CK18 Clone DC10	Mouse IgG	1/50	Dako Cat# M7010
	Anti-Vimentin Clone V9	Mouse IgG1 MO725	1/200	Abcam Cat# ab-8069
二次抗体	Rabbit F(ab') ₂ IgG FITC conjugate 594		1/400	Beckman coulter
	Rabbit F(ab') ₂ IgG FITC conjugate 488		1/400	Beckman coulter
	Biotin 化抗 Mouse IgG+IgA+IgM 抗体			Nichirei biosciences Inc. Tokyo Japan
	Biotin 化抗ウサギ IgG 抗体			Nichirei biosciences Inc. Tokyo Japan
	Biotin 化抗ヤギ IgG 抗体			Nichirei biosciences Inc. Tokyo Japan
標識	Strept-avidin conjugated FITC			Nichirei biosciences Inc. Tokyo Japan
	Strept-avidin conjugated HRP			Nichirei biosciences Inc. Tokyo Japan

4.2 ALP(Alkaline phosphatase)活性

伸展標本及び凍結標本の ALP 活性を ALP 基質キット (Fast Red; Naphthol AS Phosphate/Fast Red violet LB) (MOSS, INC., Maryland, USA) を用いて検討した。

5. 組織における幹細胞転写因子に関する mRNA の発現解析

5.1 リアルタイム PCR 法

ドナー(3 例)から得た凍結保存羊膜を使用した。PBS にて洗浄した羊膜から、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用い以下の方法で RNA を抽出した。

ビーズ型ホモジナイザー(マルチビーズショッカーMB455GU(S)、安井機器、大阪、日本)を用い組織を粉砕し、QIAzol® Lysis Reagentで破砕したサンプル溶液を 1.5ml のエッペンドルフチューブに移し、核タンパク質コンプレックスの解離を促進させる為に、室温で 5 分間放置した。その後、gDNA Eliminator Solution、クロロホルムにて、total RNA を採取した。サンプル溶液を全て RNeasy Mini Spin Column に通し超微量分光光度計 (NanoDrop™2000、Thermo Fisher Scientific、MA,US) により濃度測定した。

Total RNA は Deoxyribonuclease(RT Grade)for Heat Stop (ニッポン・ジーン、東京、日本)を用いて、DNase 処理を実施したのちに、ReverTra® Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡、大阪、日本)を用いて、cDNA を合成し、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix(アジレント・テクノロジー、東京、日本)を用いて、Real Time -PCR (RT-PCR) を実施した。本研究で使用したプライマーの配列とアニーリング温度を Table 3 に示す。

遺伝子発現量は、各領域での mRNA 量を $\Delta \Delta Ct$ 法で相対定量し、胎盤付着部 (Area A + Area B) と辺縁部 (Area C) の比を求めた。以下、この比を Relative Expression と記載した。

Table 3 PCR primer sequences の表

Gene name	Forward	Reverse	Annealing Temp (°C)
Total Oct3/4	GCAATTTGCCAAGCTCCTGAA	AAGCTAAGCTGCAGAGCCTCAAAG	60
Nanog	CCTCAGCTACAAACAGGTGAAGAC	GCATCCCTGGTGGTAGGAA	60
C-Myc	CGGGCATTCTGAAGCTGA	GGATGGATGAAACCCAGACACATAG	60
Klf4	AAGAGTTCCCATCTCAAGGCACA	GGGCGAATTTCCATCCACAG	60
β 2M	CGGGCATTCTGAAGCTGA	GGATGGATGAAACCCAGACACATAG	60

6. 統計学的分析

すべてのデータは R version 3.6.3 (R Core Team, 2020) [48] を用いて分析し、平均値±標準誤差で示した。各データの比較は、いずれも Games-Howell 法による多重比較を行い、有意水準を 5%未満とした。

結果

1. 羊膜の区分と構造

1.1 羊膜の区分

羊膜を胎盤のある絨毛膜有毛部（胎盤付着部）のうち、臍帯の起始を中心として半径 5cm の領域を Area A（臍帯付着部）、胎盤付着部で Area A を除いた部位を Area B（臍帯周囲部）とした。さらに胎盤のない絨毛膜無毛部（胎盤非付着部）を Area C（辺縁部）として区分し、以上 3 つの領域（Fig. 1）について羊膜の構造について検討した（Fig. 1）。

1.2 羊膜の部位の違いによる HAE 層（ヒト羊膜上皮細胞層）の構造の違い

羊膜の HAE 層の形態は部位によって異なっていた。Area A は単層円柱から立方上皮で、Area B は単層の立方上皮、Area C は単層の扁平上皮であった（Fig. 1 b）。

1.3 羊膜の部位の違いによる結合組織構造の違い

結合組織は、緻密層（compact layer）および 網状層（spongy layer）で構成されていた。緻密層は膠原線維が密で細胞成分は存在しなかった。Area A および B 領域は、緻密層が存在したが Area C には、緻密層が存在しなかった。網状層はいずれの部位にも存在した。HAM は、緻密層と網状層の境界および網状層内に散在性に存在し、いずれの部位でも線維芽細胞様の紡錘状の形態で、光学顕微鏡的には形態的な違いは見られなかった（Fig. 1 b）。

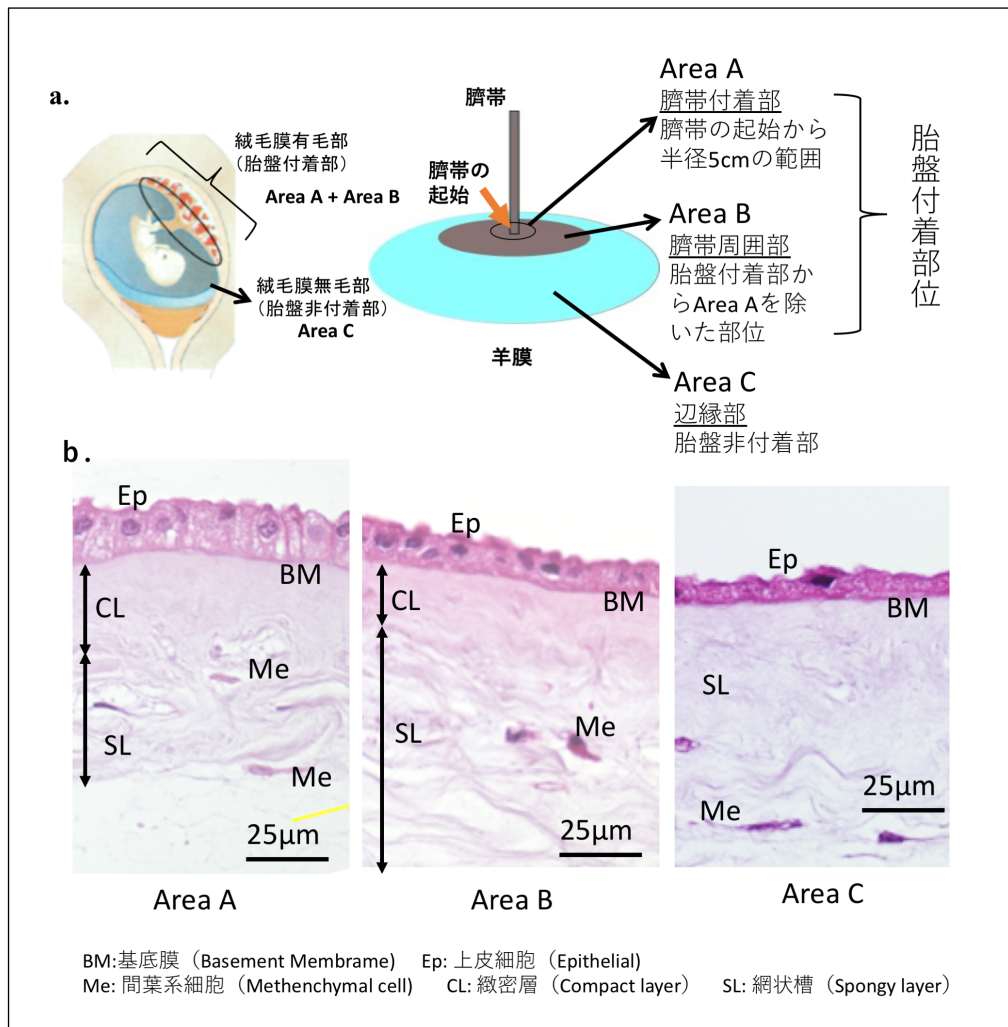


Figure 1 羊膜の構造

a. 羊膜の区分

羊膜を絨毛膜有毛部のうち、臍帯付着部をArea A (○で囲った部位、臍帯の起始を中心に半径 5cm の領域)、Area A 以外の胎盤付着部を臍帯周囲部としてArea B、絨毛膜無毛部 (辺縁部) をArea Cとする。

b. 部位による HAE 層 (ヒト羊膜上皮細胞層) の構造の違い (光学顕微鏡、パラフィン包埋標本)

Area A の HAE 層 (上皮組織: Ep) は単層円柱上皮で、結合組織内には散在性に HAM (羊膜間葉系細胞: 間葉系細胞: Me) が存在する。Area B の HAE 層は単層の立方上皮で、結合組織は膠原線維の密な緻密層 (CL) が発達し、疎性結合組織である網状層 (SL) との区別が明確である。これらの結合組織には多くの HAM (間葉系細胞: Me) が観察される。

Area C の HAE 層は単層扁平上皮で、結合組織に緻密層は見られない。

2. 電子顕微鏡による観察

電子顕微鏡による観察では、いずれの部位の HAE も基底陥入および隣接する細胞間の指状陥入が顕著であった。特に Area C では、隣接する細胞の間に形成される指状陥入が解離し、互いに細胞突起を伸ばし、細胞突起同士がデスモゾームで連絡し、細胞と細胞の間に大きな空胞が存在していた (Fig. 2 a-4, a-5)。基底陥入した細胞膜に沿って基底膜構造が観察された (Fig. 2 a-2)。HAE は管腔側に微絨毛をもち、細胞質内に滑面小胞体、ミトコンドリアなどの細胞小器官が観察された。Area B では細胞質内に中等度の電子密度を持つ脂肪滴を含んでいた。細胞間に見られる細胞接着装置はデスモゾーム (desmosome) (Fig. 2 a-7) で閉鎖帯 (tight junction) は観察されなかった。

HAM は光学顕微鏡では紡錘状の細胞として一様に観察されたが、豊富なコラーゲン線維内に散在性に存在する HAM は単独ではなく、細胞質の電子密度の高い細胞と細胞質の電子密度の低い細胞が 2 個密着して存在した。細胞質の電子密度の低い細胞ではミトコンドリア、ライソゾームなどの細胞小器官が観察された (Fig. 2 b)。

a. HAE

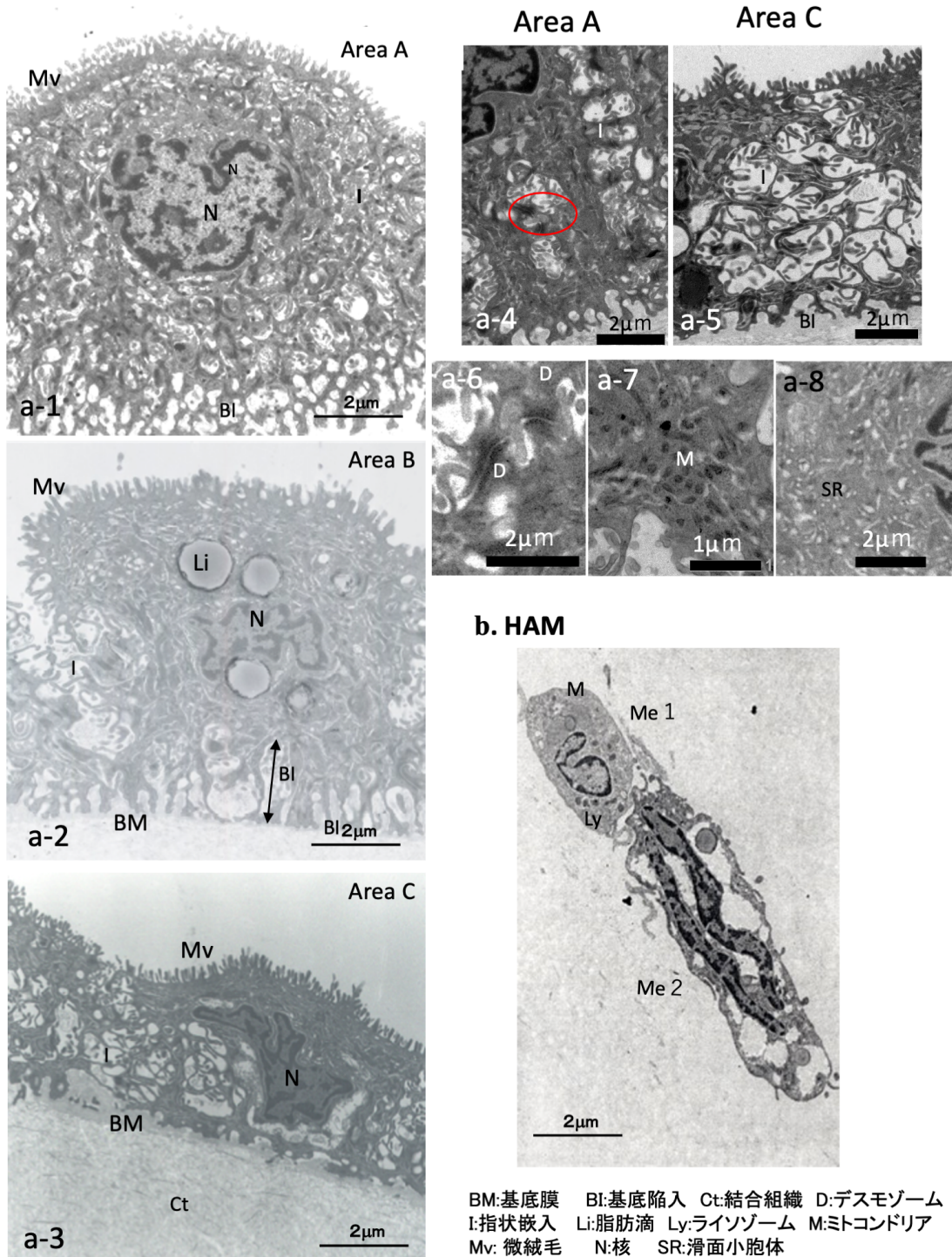


Figure 2 電子顕微鏡による各部位の細胞の構造の比較 Quetol 812 包埋、3%ウラン水溶液とクエン酸鉛溶液による 2 重染色

- a. HAE(ヒト羊膜上皮細胞 : human amniotic epithelium cell) の電子顕微鏡像
- a-1: Area A の HAE。不規則な形の核を中心とした細胞質豊富な立方状の細胞。基底陥入 (BI) および隣接する細胞間との指状陥入 (I) が顕著。管腔側に微絨毛 (Mv) が観察される。
 - a-2: Area B の HAE。細胞質内に中等度の電子密度を持つ脂肪滴 (Li) が観察される。基底面では陥入面に並行して基底膜 (BM) が発達している。
 - a-3: Area C の HAE。他の領域の HAE 細胞よりも丈が低く、扁平な細胞。羊膜腔側には微絨毛 (Mv)、基底側には基底陥入が観察される。基底陥入は Area B より浅く、隣接する細胞との間では指状陥入 (I) が解離し、長くのびた細胞突起で連絡している。基底面では結合組織との間に基底膜 (BM) が観察される。
 - a-4: Area A の基底陥入 (BI) と指状陥入 (I)。
 - a-5: Area C の基底陥入 (BI) と指状陥入 (I)。細胞の間が大きく開き、複雑な突起で連絡している。
 - a-6: Area A a-4 の○の拡大図。細胞間にデスモゾーム (D) が観察される。
 - a-7: Area-A の基底側にミトコンドリア (M) が発達している。
 - a-8: Area-B の核周辺では滑面小胞体 (SR) が発達している。

b. 緻密層 (CL) と 網状層 (SL) の境界に存在する HAM (ヒト羊膜間葉系細胞 : human amniotic mesenchymal cell) の電子顕微鏡像

Area B の結合組織内の CL と SL の境界には明るい細胞質をもち、細胞小器官が発達した明調な細胞 (Me1) と細胞質の電子密度が高く、細胞小器官の発達が不明瞭な暗調細胞 (Me2) が密着して存在する。

3. 羊膜の上皮層における幹細胞マーカーおよび分化マーカーの発現

HAE における細胞表面マーカーおよび幹細胞関連因子の発現について検討した。

3.1 HAE (羊膜上皮細胞) の ALP 活性および Tra-1-60 の発現

未成熟細胞や幹細胞で強い活性を示すことから幹細胞マーカーとして最も広く利用されている ALP 活性、および 幹細胞マーカーである Tra-1-60 について領域の違いによる発現の違いを検討したところ、いずれの部位においても散在性に Tra-1-60 陽性細胞が観察された。倍率 x100 で、50 μ m 四方にある細胞数 (Hoechst33342 で核を染色し測定) を元として、Tra-1-60 陽性細胞の存在する割合を百分率で計測したところ、Area A 12.0 \pm 3.60%, Area B 1.84 \pm 0.25%, Area C 4.23 \pm 2.53% の割合で存在した。Gomes-Howell 法では領域間に有意差はみられなかったが Area A に Tra-1-60 陽性細胞が多く存在する傾向が観察された (Fig. 3)。

凍結標本で ALP 活性と幹細胞関連転写因子ある Oct3/4 の発現を Area A、Area B で調べたところ、ALP 活性を示す細胞に Oct3/4 陽性が観察された (Fig. 3 c)。しかし、vimentin 陽性の HAE、HAM には ALP 活性は観察されなかった (Fig. 3 d)。

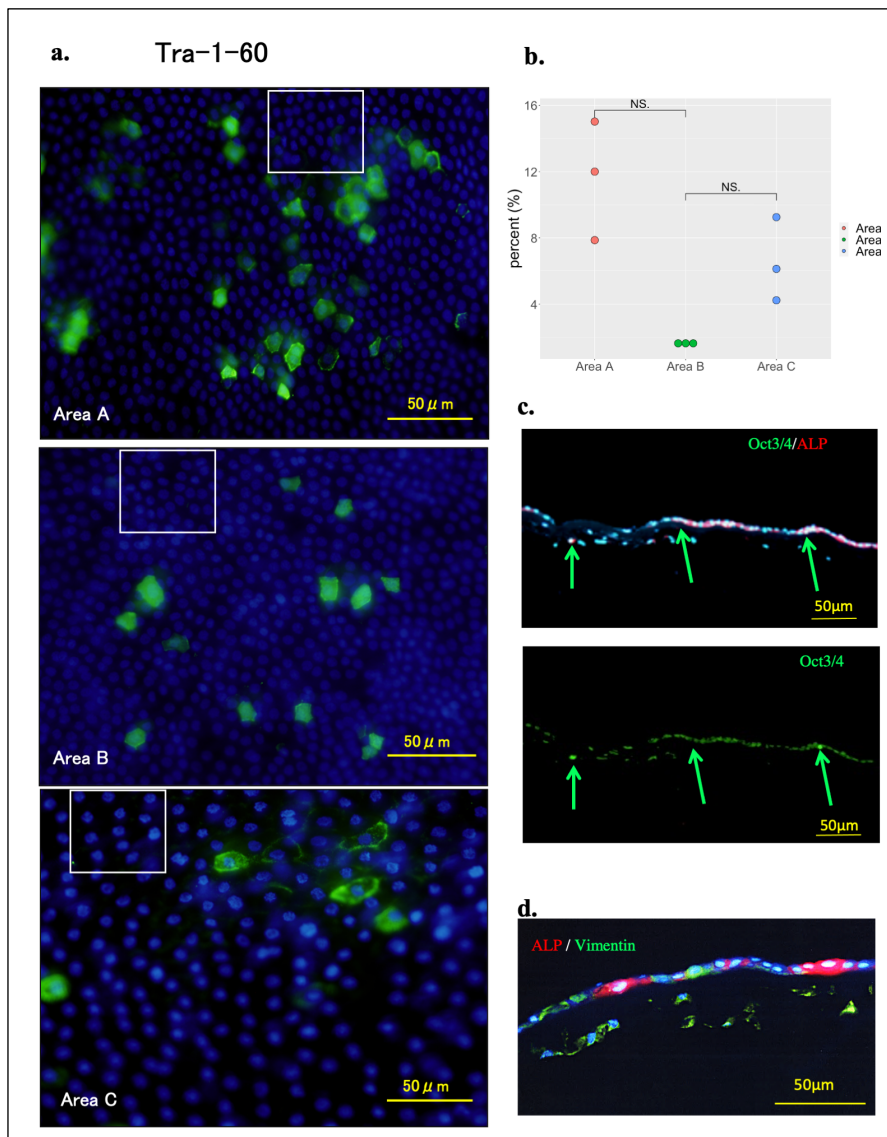


Figure 3

ALP 活性と Tra-1-60 の発現

a. 伸展標本

Tra-1-60 陽性細胞は全ての領域に存在する。

b. a の口の領域に存在する細胞数を元として各領域に存在する Tra-1-60 陽性細胞数を百分率で計測する。

NS:Non Significance

c. ALP 活性、OCT3/4 に対する免疫組織像 (Area B) 凍結標本

Oct3/4 陽性 (緑) で ALP 活性を示す (赤) 細胞が Area B に多数存在する。

d. ALP 活性、vimentin に対する免疫組織像 (Area B) 凍結標本

vimentin 陽性細胞は ALP 活性を示さない。

Oct3/4:緑、ALP:赤、vimentin:緑

3.2 HAE (羊膜上皮細胞) の Tra-1-60 と幹細胞マーカーとの共発現

伸展標本の HAE について、TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA4、SSEA3 の発現を調べた。Area A と Area B では、TRA-1-60 に陽性の細胞のほとんどが TRA-1-81 を発現していたが、Area C では Tra-1-81 のみに陽性の細胞 (赤い矢印) が存在した。

Tra-1-60 と SSEA4 との共発現について観察すると、Area A では、Tra-1-60 と SSEA4 の共陽性 (2 重矢印) の細胞は 1 視野あたり、11 から 12 個であった。Area B では SSEA4 のみ陽性の細胞 (赤矢印) が多く、SSEA4 と Tra-1-60 とに染まる細胞 (共陽性細胞) は 1 視野あたり 4 から 5 個であり、Area C では SSEA4 あるいは Tra-1-60 による単染色の細胞のみが観察された。

Tra-1-60 と SSEA3 の染色では、Area C において SSEA3 のみに陽性の細胞および Tra-1-60 のみ陽性の細胞が存在した。SSEA3 と Tra-1-60 の共陽性細胞は Area A および Area C に観察されたが、1 視野あたり 1 個の頻度であった (Fig. 4)。

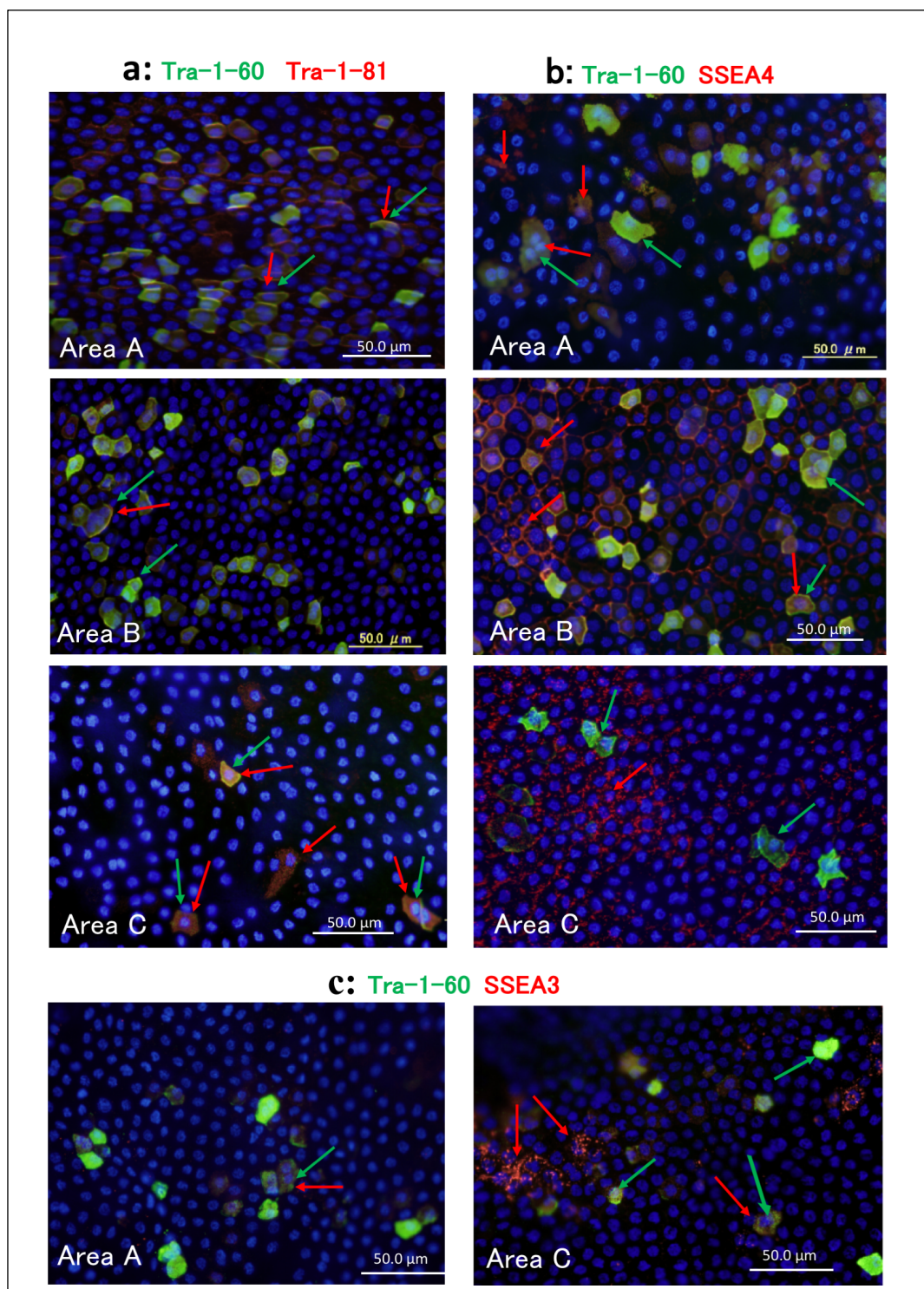


Figure 4 Tra-1-60 と幹細胞マーカーの共発現の検討

伸展標本、免疫染色

a. Tra-1-81 との染色性

Tra-1-60 陽性細胞はすべて Tra-1-81 陽性細胞である。

b. SSEA4 との染色性

Area A では Tra-1-60 陽性の細胞はほとんど SSEA4 陽性で、わずかに SSEA4 のみ陽性（赤→）の細胞が混在する。

Area B では Tra-1-60 のみ陽性（緑→）、SSEA4 のみ陽性（赤→）および TRA-1-60/SSEA4 陽性細胞（緑→、赤→）が存在する。Area C では Tra-1-60 のみ陽性細胞（緑→）、SSEA4 のみ陽性細胞（赤→）が観察される。

c. SSEA3 との染色性

Area A では Tra-1-60/SSEA3 陽性細胞（緑→、赤→）が存在する。

Area C では Tra-1-60 のみ陽性細胞（緑→）あるいは SSEA3 のみ陽性細胞（赤→）が存在する。

3.3 HAE(羊膜上皮細胞)における分化マーカーの発現

Area B では CK5(サイトケラチン 5) [45] と CK18(サイトケラチン 18) [46] の両方に陽性を示す細胞が存在していたが、Area C では CK5 のみ、あるいは CK18 のみに陽性を示す細胞が多く観察された。間葉系細胞マーカーである vimentin 陽性の細胞は、Area A と B に点在していたが、Area C ではほぼ全ての細胞が vimentin 陽性であった (Fig. 5)。

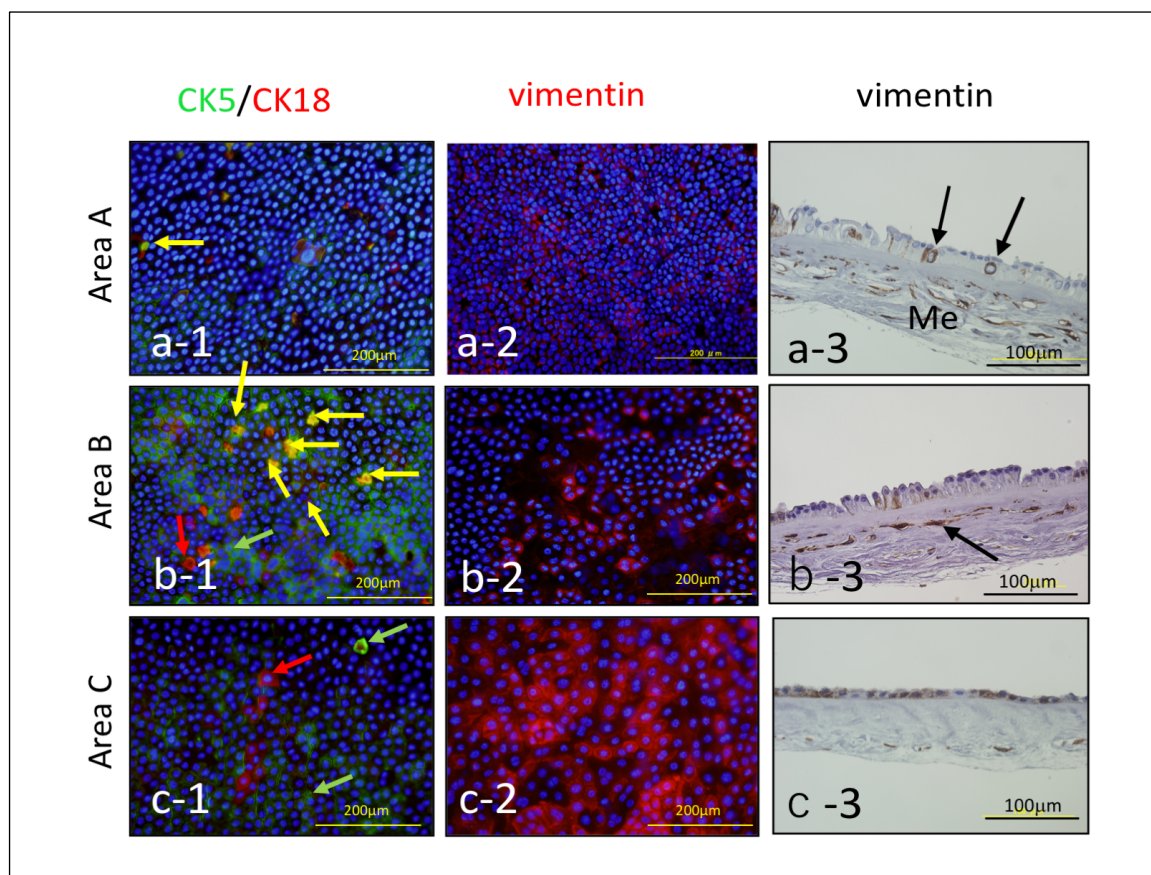


Figure 5 HAE における分化マーカーの発現

a-1: 伸展標本、蛍光染色。

a-2: 伸展標本、蛍光染色

a-3: パラフィン包埋標本、vimentin 染色、DAB 反応、HAM（間葉系細胞, Me）だけでなく、細胞質全体に vimentin 陽性を示す細胞が HAE に散在性に存在する（→）。

b-1: 伸展標本、蛍光染色。CK5（緑）、CK18（赤）および CK5/CK18（黄色）陽性細胞が混在する。

b-2: 伸展標本、蛍光染色。Vimentin 陽性細胞（赤）が散在性に存在する。

b-3: パラフィン包埋標本、vimentin 染色、DAB 反応。CL と SL の境界（→）および SL に vimentin 陽性細胞が観察される。

c-1: 伸展標本、蛍光染色。CK5（緑）あるいは CK18（赤）の陽性細胞が観察される。

c-2: 伸展標本、蛍光染色。vimentin 陽性（赤）が観察される。

c-3: パラフィン包埋標本、vimentin 染色、DAB 反応。HAE はすべて vimentin 陽性である。

4. 羊膜の結合組織における幹細胞マーカーの発現

4.1 HAM(羊膜間葉細胞) の分布

羊膜の結合組織は、緻密なコラーゲン線維が密接に存在する緻密層と、コラーゲン線維の分布が粗でスポンジ状を呈する網状層で構成されている。

Fig6 a の点線方向に深さを変えて観察したところ、HAM は緻密層と網状層の境界に、10～15 個集合して存在する SSEA4 陽性の HAM 幹細胞群 (Fig.6 b-3, B-4) と、網状層内で Sox2 陽性を示し弥漫性に存在する HAM 細胞群 (Fig.6 b-5, b-6) が観察された。羊膜には幹細胞の分布領域と発現する幹細胞マーカーが異なる 2 つのタイプの HAM 幹細胞群が存在した (Fig.6)。

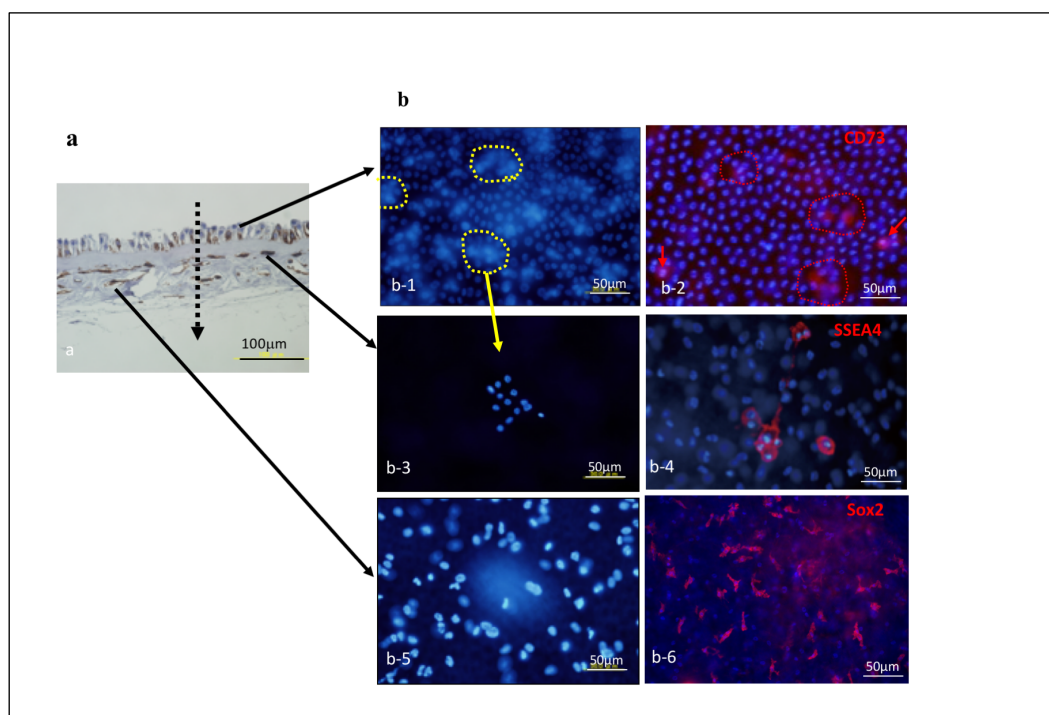


Figure 6 HAM の分布

6-1:HAM の分布と幹細胞マーカーの発現

a:パラフィン包埋標本。vimentin に対する免疫組織化学染色。

HAM は Area A と Area B では緻密層 (CL) と網状層 (SL) の境界で観察される。

Area に関係なく、網状層 (CL) では多数の HAM が観察される。

b:伸展標本。Tra-1-60、SSEA4、CD73、SOX 2 による蛍光免疫染色。Hoechst 核染色。

b-1:HAE 層の下に細胞が集合して存在している像が観察される。

b-2:HAE (→) および HAE 層の下 (サークル) に CD73 陽性細胞が観察される。

b-3:b-1 のサークルの拡大。緻密層と網状層の間に細胞が集まって存在する。

b-4:緻密層と網状層の間に存在する細胞は SSEA4 陽性であった。

b-5:網状層には多数の細胞が存在する。

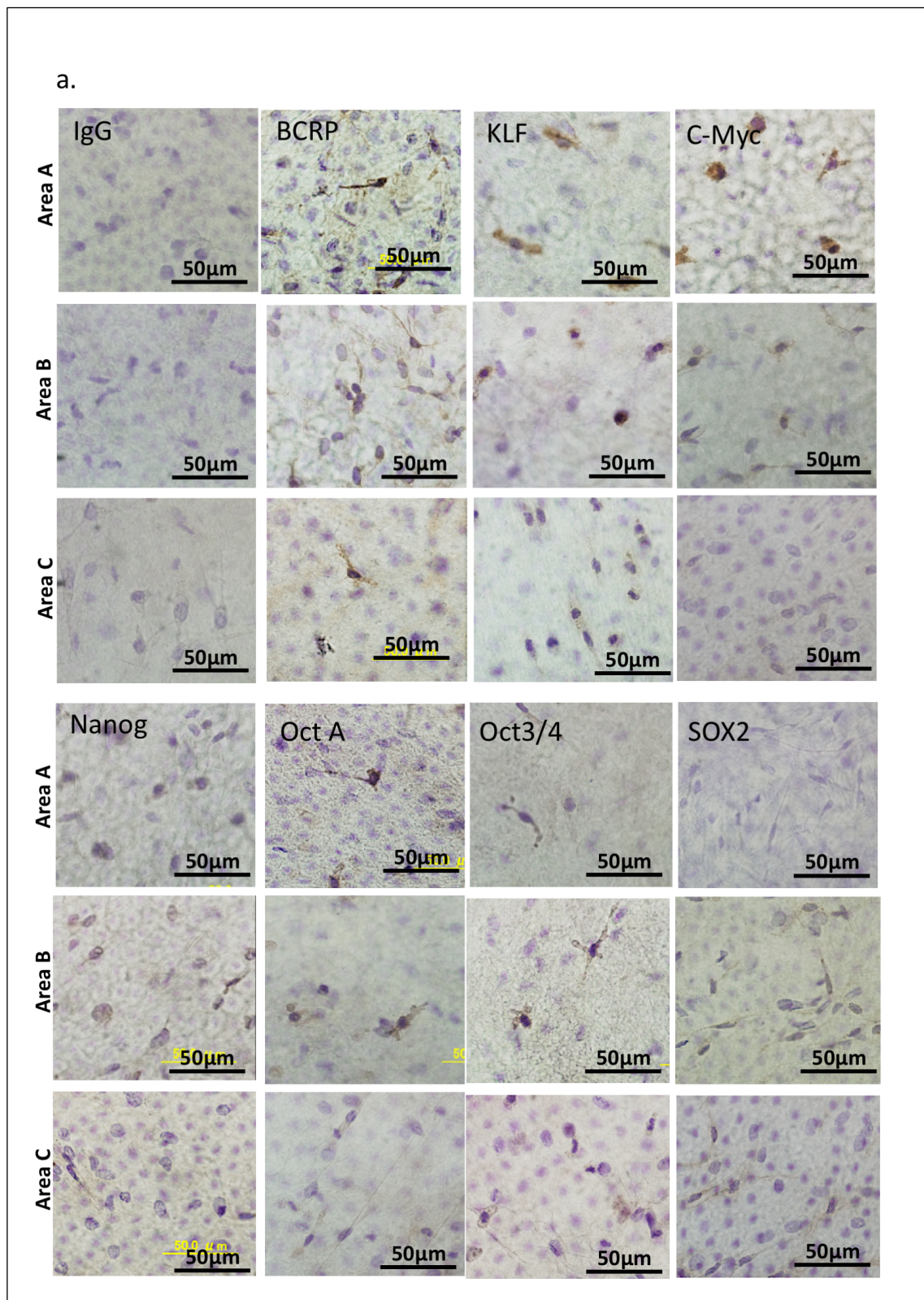
b-6:網状層には Sox2 陽性の細胞が瀰漫性に存在する。

4.2 HAM(羊膜膜間葉細胞) における幹細胞マーカーの発現

HAM の免疫組織像

伸展標本の結合組織側で、BCRP および幹細胞関連転写因子 (Klf4, c-Myc, Nanog, OctA, Oct3/4, Sox2) に対する免疫組織化学を行い、画像を観察した。

フローサイトメトリーでの幹細胞解析に使われる手技の一つである side population(SP) 解析に重要な薬剤排出トランスポータータンパク ABCG2 の責任分子である BCRP (Brest Cancer Resistance Protein) を発現する HAM 幹細胞が Area A に多く存在した。iPS 細胞に発現する幹細胞関連転写因子 Klf4, c-Myc, OctA, Oct3/4, Sox2 の発現を示す HAM 幹細胞は Area C に多く存在した (Fig. 7 a)。これらの細胞の発現率を細胞免疫染色のネガティブコントロール (プライマリー抗体と同様の抗体: IgG による染色) での細胞数を元として、陽性細胞数を百分率で計測した。その結果、BCRP 以外は、Area C の方に陽性細胞が多いという傾向が見られた (Fig. 7 b)。



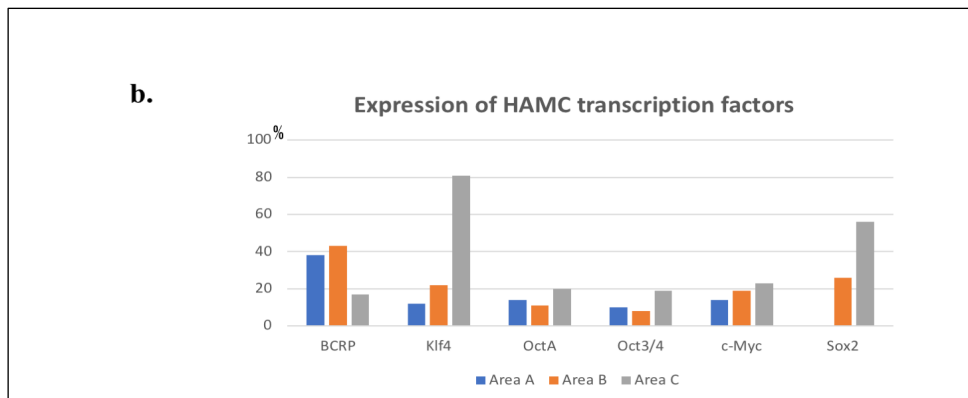


Figure 7 : HAM における幹細胞関連転写因子の発現

a. 網状層の免疫染色像 伸展標本。免疫組織化学。DAB 反応。

b. 幹細胞関連転写因子に対する陽性細胞の発現率

陽性細胞の発現率を 抗体に陽性を示す細胞数/抗体に対するネガティブコントロールにおける細胞数 x100 で表記する。

BCRP は Area A および Area B で陽性細胞の発現率が高いが、Klf4, c-Myc, OctA, Oct3/4, Sox2 は Area C での発現が高い傾向が見られる。

5. 幹細胞関連転写因子に対する mRNA の発現

羊膜を胎盤付着部の羊膜と胎盤非付着部（辺縁部）の羊膜に分けて、幹細胞関連転写因子 c-Myc, Klf4, Nanog, Oct3/4 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。c-Myc 以外、Area C の方が多いように見えるが、各群内 (n=3) のばらつきが大きく有意差は見られなかった (Fig. 8)。

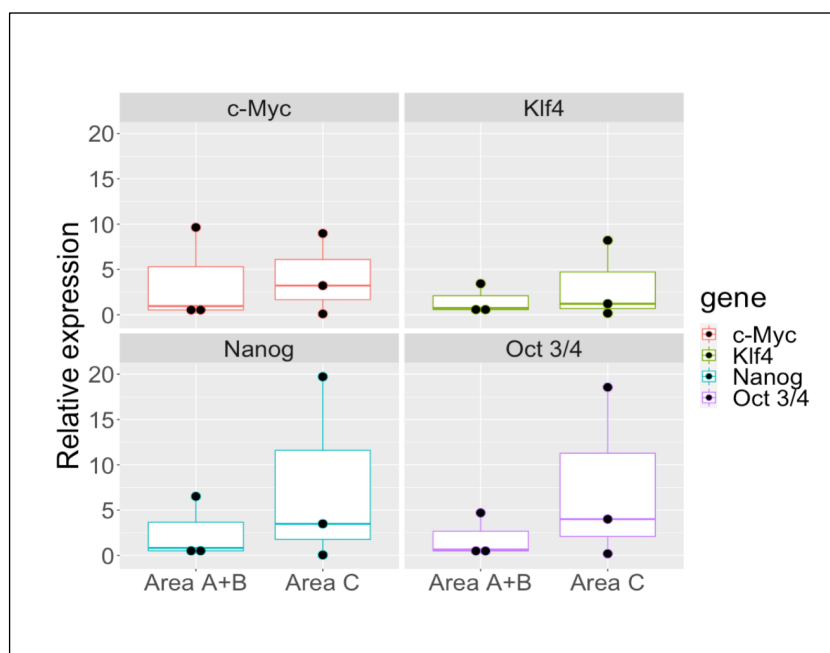


Figure 8 :

羊膜由来細胞における幹細胞関連転写因子の mRNA の発現

胎盤付着部 (Area A + Area B) および胎盤非付着部 (Area C) における幹細胞関連転写因子 c-Myc, KLF4, Nanog, Oct3/4 の mRNA の発現 (n=3) 群内のばらつきが大きく有意差はみられない。

6. HAE 幹細胞（ヒト羊膜上皮系幹細胞）と HAM 幹細胞（ヒト羊膜間葉系幹細胞）の分布
羊膜は HAE と HAM で構成されていることから、それぞれに存在する HAE 幹細胞および HAM 幹細胞の分布と発現する幹細胞マーカーについて図にまとめた。

6.1 HAE 幹細胞の分布

Area A では、Tra-1-60/Tra-1-81, Tra-1-60/SSEA4, Tra-1-60/SSEA3 など異なった幹細胞マーカーを二重あるいはそれ以上に多重に発現する HAE 幹細胞が存在した。Area B では、Tra-1-60 陽性の発現率は低いが、Tra-1-60/Tra-1-81 や Tra-1-60/SSEA4 などに共陽性を示す細胞が存在した。Area C には、Tra-1-60/Tra-1-81 の共陽性細胞は存在するが、Tra-1-60 のみ、Tra-1-81 のみ、SSEA4 のみ、SSEA3 のみなど、単一の幹細胞マーカーを発現する細胞が主として存在した (Fig. 9 a)。

6.2 HAM 幹細胞の分布

薬剤排出トランスポータータンパク ABCG2 の責任分子である BCRP は、Area A および Area B に多く発現するが、幹細胞関連転写因子である Klf4, c-Myc, OctA, Oct3/4, Sox2 に陽性の細胞は Area C に多く存在する傾向があった。

SSEA4 陽性、CD73 陽性を発現する HAM 幹細胞群は、緻密層と網状層の境界に固まって存在し、Sox2 陽性の HAM 幹細胞は網状層に分散して存在した (Fig. 9 b)。

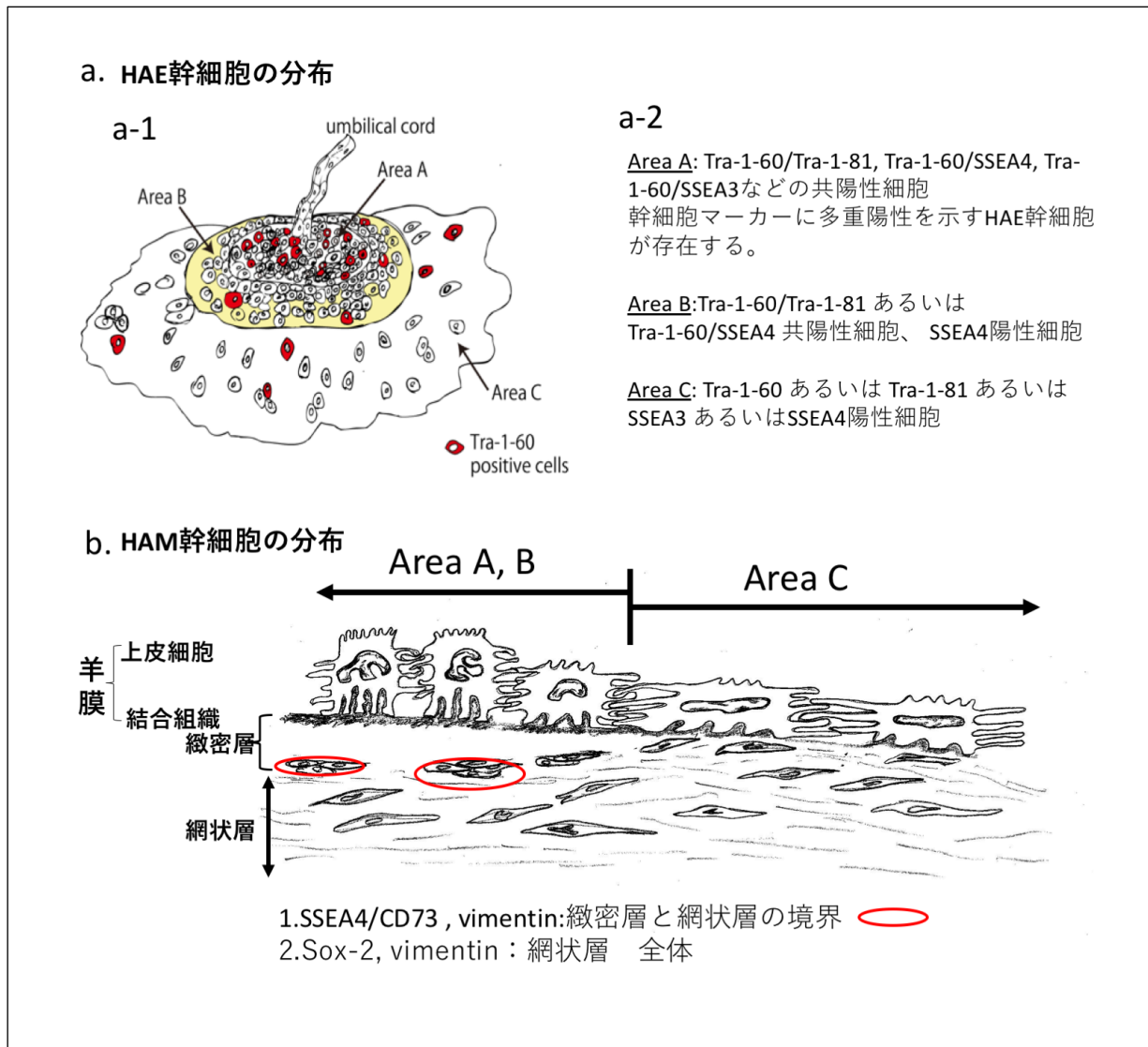


Figure 9

a. HAE 幹細胞の分布

a-1:Tra-1-60 陽細胞の分布

Tra-1-60 陽性細胞は、Area A で多く観察される。

a-2:幹細胞マーカー(Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA4, SSEA3)の発現と HAE 幹細胞の分布

Area A には幹細胞マーカーを多重に発現する HAE 幹細胞が多く、Area B では、二重に発現する HAE 幹細胞が観察される。Area C では単一の幹細胞マーカーを発現する HAE 幹細胞が観察される。

b. HAM 幹細胞の分布

SSEA4 陽性、CD73 陽性を発現する HAM 幹細胞は、羊膜結合組織の緻密層と網状層の境界に、固まって存在するのが観察される。

Sox2 陽性の HAM 幹細胞は網状層に散在して観察される。

考察

HAE は羊膜芽細胞 (amnioblasts) から形成する事から、羊膜には幹細胞が残存している可能性が高いと考えられてきた。羊膜に存在する HAE 幹細胞は、妊娠週数が若い方が周産期の HAE よりも幹細胞を多い [49] だけでなく、周産期の HAE においても成人の組織内に存在する体性幹細胞の含有率が 0.1~0.01% 程度であるのとは対比的に、羊膜内には幹細胞が 10% もの高率で存在する事が報告された [50, 51]。Miki ら [8] によると、妊娠の経過とともに、HAE 内の幹細胞が減少するように見えるが、胎児の発育に伴い、羊膜が空間的に広がっていくために相対的に幹細胞が減少したように見えるだけであり、幹細胞の実数は減少していないという。羊膜に存在する幹細胞は、胎児の発生に直接関係する器官形成を担うために成長因子や基質のシグナルにより組織化されている他の体性幹細胞とは根本的に異なることがその理由の一つと考えられているが、羊膜に幹細胞が高率に残存する理由や、羊膜幹細胞がどこに分布しているかははっきりしていない。

本研究では羊膜を構成する HAE および HAM に存在する HAE 幹細胞および HAM 幹細胞を数種類の幹細胞マーカーの発現により同定しその分布を観察した。

臍帯および臍帯付着部を臍帯部、その他の胎盤付着部を胎盤付着部とし、胎盤非付着部を無毛部とした Benirschke ら [19] の分類を元として、羊膜を 3 つの領域に区分した。本研究では臍帯をのぞき、胎盤付着部の中で、臍帯の起始を中心に径 5 cm の領域を Area A (臍帯付着部)、Area A 以外の胎盤付着部を臍帯周辺部として Area B、胎盤非付着部を辺縁部として Area C とした。

3 つの領域では HAE の形態が異なっていた。Area A にある HAE は単層円柱上皮であり、B から C に向かうにつれ、HAE の丈は低くなる傾向を示した。各領域の単位あたりの HAE の細胞数を測定すると Area C が最も少なく、1 個あたりの細胞面積が広い傾向にあった。胎盤付着部である Area A および Area B では結合組織内にコラーゲン線維が密に走行する緻密層が発達し、物理的な進展による胎盤構造への障害を防御するために羊膜の伸展を制限していると考えられた。電子顕微鏡像の観察でも Area A と Area C の HAE を比較すると、Area C の基底陥入の深さが浅く、細胞の側面に存在する指状嵌入は離解し、細胞突起のみで隣接細胞と連絡しているため、細胞間に大きな空胞が存在する像が観察された。今回、電子顕微鏡像による画像解析は実施しなかったが、今後 Area ごとの基底陥入の深さ、指状嵌入の離解に伴う空胞の大きさについて測定し、生体内で HAE が進展していることを検証する。最近、In vitro による、羊膜の進展が細胞への侵襲をもたらすかどうかという実験で、羊膜上皮が羊膜の 20% 二軸方向に伸長するにも関わらず、細胞老化に関係する P-p38MAPK ($P = 0.02$) は活性化したが、細胞老化または MMP-9 の活性は誘導しないことがわかった [52]。

この結果は、HAE の伸展による胎児の成長に伴う容積の拡大が幹細胞への侵襲をもたらさないことを示唆した。

幹細胞の分布を明らかにするために、2 種類の異なる幹細胞マーカーを用いた。1 つ目は、SSEA3 と SSEA4 という糖鎖マーカーである。SSEA3 はシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質（ガングリオシド）と呼ばれる内部構造であり、SSEA4 は末端部分である[32]。SSEA3 と SSEA4 のエピトープは、マウスやヒトの胚発生の初期段階やインテグリン活性の増強に重要な役割を果たすことが知られている[31]。2 番目の幹細胞マーカーは TRA-1-60 と TRA-1-81 である。これらはケラタン硫酸プロテオグリカンで、ヒト EC（内臓癌）や ES 細胞の表面マーカーとして用いられている[33]。糖鎖が細胞分化の決め手となることはわかっていたが、多能性幹細胞の表面にある糖鎖の生物学的機能については不明な点が多かった。近年、多能性状態を維持するために 4 種類の糖鎖構造、グリコサミノグリカン、N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖、細胞内糖鎖が関与する事がわかった。これらの糖鎖は多能性に関与する転写因子のネットワークの上流にあるシグナルを調整するか、分化へと導くシグナルを阻害していることが明らかとなった。すなわち細胞外から幹細胞へのシグナル伝達のために糖鎖が重要であるということである[53]。本研究の結果では、Tra-1-60 はすべての領域で発現し、Tra-1-60 と Tra-1-81 はエピトープが異なる分子と連携しているとの報告[54]があるにも関わらず、Tra-1-60 陽性細胞はほとんどすべて Tra-1-81 陽性だった。Tra-1-81、SSEA4、SSEA3 などとの共発現の頻度や、SSEA3 や SSEA4 の単独発現は Area A、Area B、Area C で異なっていた。このことは、領域により表現型 (type) の異なった幹細胞が存在する事を示唆した。Malgorzata ら[22]は羊膜では、分泌されるサイトカイン (TGF- β や bFGF) や、生理活性物質 (MMP-9、TIMP-3) が、領域により異なることを報告した。幹細胞の表面に存在する糖鎖がシグナル伝達に関与していることを考えると、幹細胞の分布が偏在していることや存在する幹細胞が発現する幹細胞マーカーが異なるのは、必要なサイトカインや生理活性物質の分泌を制御するためと考えられる。詳細についてさらなる検討が必要である。

HAE の細胞表面マーカーに関する我々の先行研究におけるフローサイトメーターによる結果では、Tra-1-60 陽性細胞は HAE で $7.8\% \pm 3.3$ 、SSEA3 は $0.6\% \pm 0.5\%$ 、SSEA4 は HAE が $61\% \pm 19\%$ 、[34]で、これらの結果は、本研究の免疫染色のデーターと一致した。細胞膜成分であるスフィンゴ糖脂質である SSEA4 が、エピブラス由来細胞全般に発現するのに対し、ケラチンサルファートプロテオグリカンである Tra-1-60 を発現する細胞の割合が SSEA4 に比べ低いのは、分化ステージの違いであることが考えられる。今回使用した幹細胞マーカーは一般に使用されるマーカーであり、表面マーカーの有意性は理解されているものの、これらの標識マーカーだけでは、幹細胞の多様性を分類することが難しい。異なった

幹細胞マーカーを発現する細胞の性質を解明するためにも細胞表面マーカー以外のいくつかの方法を組み合わせ、それぞれの幹細胞を分離する必要がある[55]、今後の課題である。

HAE には胚の幹細胞維持に必要な転写因子であり幹細胞のマーカー遺伝子である、Oct4[32]、Sox2[31, 32]]などが発現していた。ES 細胞や iPS 細胞をはじめとする多くの幹細胞のマーカーとして利用されている[30]ALP 活性により、Area B では ALP 活性、Oct3/4 陽性の 2 重陽性細胞が存在した。一方で ALP 活性陽性細胞は vimentin に共染色しなかったことから、ALP 活性は幹細胞活性を持つ細胞においてのみ見られることは明らかで、Area B には ALP 活性陽性で Oct3/4 陽性の HAE 幹細胞が存在する事が示唆された。

一方で、HAE には上皮系の中間系フィラメント (CK5、CK18) と間葉系の中間系フィラメント vimentin の両方が存在した。Area A では、CK5/CK18 の発現も、ビメンチンの発現も弱かったのに、Area B では ビメンチン陽性の細胞が増加し、CK5/CK18 の共陽性細胞や CK5、CK18 に単独で染まる細胞が存在し、Area C では、すべての細胞がビメンチン陽性で CK5 あるいは CK18 陽性細胞のみが存在した。この現象を見ると、Area A から Area C に向かって、次第にビメンチンが増加しているように見える。ビメンチンは間葉特異的なⅢ型中間型フィラメントタンパク質である。ビメンチンは細胞の形を保持し、ストレスに対し体性を示す事が知られているが、同時に細胞の分化を妨げ、脱分化を保持することが報告されている[56, 57, 58]。また、上皮内にビメンチンが発現することにより、上皮特異的なケラチンのサイクログラミングが起こり、上皮間葉転換を起こすとの報告もある[59, 60]。Area C の HAE ではすべてビメンチン陽性であることを考えると、Area C の HAE は間葉系細胞の特性[61]を持っているために、細胞間の接着や基質との結合が弱まり、Area C での容積の拡張を容易にし、結果的に羊膜腔を拡大する事に関与しているとも考えられる。羊膜の HAE にビメンチンが陽性であることの意義については、上皮間葉転換をも含めさらに検討する必要がある。

これまで、羊膜は、受精後 8 日目のエピブラストから発生してくると考えられていたが、近年、胚の培養実験から、形態の異なる 2 つの OCT-4 発現細胞群やヒトの胚に存在する多分化性幹細胞から羊膜が発生してくること[62]が示され、羊膜の HAE の起源の多様性が示唆された。

HAM では Area A および Area B の胎盤付着部の結合組織では緻密層が発達していた。この領域では HAM は、二か所にわかれて分布した。緻密層と網状層との境界に存在する HAM は、すべて SSEA4 陽性を示した。一方、網状層には散在性に分布する HAM は Sox2 陽性であった。網状層における HAM について領域別に幹細胞に関係する転写因子の発現を見たところ、BCRP 以外はすべて (Klf4, C-Myc, OctA, Oct3/4, Sox2) Area C の方に陽性細胞が多いという結果であった。これらの幹細胞関連転写因子の mRNA の発現は、HAE と HAM の組

織としての単離を行わずに実施したため、明確な結果を得ることができなかった。BCRP は、非常に低頻度で存在する組織幹細胞活性を持つ細胞群である SP 細胞 (side population cell) に存在する ABC トランスポーターの一つである。BCRP が胎盤の合胞体栄養細胞に存在する事は報告されている[63]が、羊膜の胎盤部に存在する HAM においても BCRP 陽性細胞が存在する事は報告されていない。BCRP は、低酸素状態での細胞の生存率を高め[64]、ATP を利用して基質薬物を細胞内から細胞外へくみだすように働くタンパクである。羊膜は胎盤の表面で絨毛膜板と接着していることを考えると、羊水が羊膜を経て絨毛膜を通り、母体組織液へ移行し、子宮毛細血管へ入ることで3時間ごとに変わる羊水の羊膜循環にも関与する可能性が示唆される[65]。

以上のように HAM には結合組織内における分布領域が事なる細胞群と、網状層に散在性存在する HAM 幹細胞が存在し、後者は、さらに Area A/Area B と Area C では性質の異なる幹細胞群が存在する事がわかった。我々は、既に羊膜由来の HAM 幹細胞にサブクラスが存在することを認め、FACS を利用し、大きさにより単離する方法を確立し特許を取得している (特許番号:6243738)。今回の研究から、羊膜からそのまま幹細胞を採取するのではなく、予め採取する羊膜の領域を限定することにより、幹細胞マーカーの発現が異なる細胞を選択的に採取することが可能となる。

microarray の研究[66]で胎児の胎位によって 839 の遺伝子の発現が羊膜の部位により異なることが示された。羊膜は構造的には、上皮を形成する HAE と結合組織に存在する HAM で構成される膜状の組織である。しかし、羊膜の部位の違いによって、サイトカインや生理活性物質の分泌に違いがあるだけでなく [22]、MAPK (mitogen activated protein kinase) や TGF- β のようなシグナリングパスウェイにも違いが認められており [47]、羊膜は単に妊娠や出産における分子生物学的な研究だけでなく、炎症などの分子生物学的な研究にも有意義な組織であると考えられる。

本研究では、数種類の幹細胞のマーカーを利用し、羊膜の領域における HAE や HAM の幹細胞マーカーの発現の違いによる HAE 幹細胞や HAM 幹細胞の分布について討論した。その結果、羊膜における HAE 幹細胞は Area A に多く存在すること、異なったマーカーを発現する HAE が存在する事、Area A や Area B に存在する HAM 幹細胞は他の領域に存在する幹細胞とは異なった転写因子の発現傾向を示したことなどから、HAE 幹細胞および HAM 幹細胞が羊膜に均一に分布するわけではなく、幹細胞マーカーの発現が異なった幹細胞の分布 (サブクラス) に違いがある可能性が示唆された。羊膜に幹細胞が多く存在する理由や HAE 幹細胞および HAM 幹細胞のサブクラスの分布についてはさらに検討する必要があるが、羊膜に存在する HAE 幹細胞や HAM 幹細胞マーカーの発現やこれらの細胞の分布の違いを知ること

により、必要な部位から、必要な細胞を採取し、再生医療材料源として羊膜の有効性を生かした活用が期待できる。

結語

羊膜は領域の違いにより、形態や発現する幹細胞マーカーの異なる HAE 幹細胞及び HAM 幹細胞が存在することを示した。羊膜に存在する HAE 幹細胞や HAM 幹細胞が発現するマーカーや分布の違いを知ることにより、必要な部位から、必要な細胞を採取し、再生医療材料源として羊膜の有効性を生かした活用が期待できる。

利益相反

本研究に関して開示すべき利益相反は無い。

謝辞

本研究の機会を与え、7 年間に渡るご指導およびご支援を下さいました危機管理医学講座の奥寺敬教授、並びに臨床生体材料応用講座の吉田淑子教授、荒井建一助教、再生医学教室の岡部素典助教、相古千加助教、および専門的な技術指導で実験を支えて頂きました古市恵津子さんに深く感謝いたします。

参考文献

1. Trigg M E (2004) Hematopoietic stem cells. *Pediatrics* 113:1051–1057.
2. Cavazzana M, Ribeil J A, Lagresle-Peyrou C, and Andre-Schmutz I (2017) Gene therapy with hematopoietic stem cells: the diseased bone marrow's point of view. *Stem Cells Dev.* 26:71–76.
3. De Miguel M P, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual C Y, Aller M A, Arias J, and Arnalich-Montiel F (2012) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advanced and applications. *Curr. Mol. Med.* 12: 574–591.
4. Fisch S C, Gimeno M L, Phan J D, Simerman A A, Dumesic D A, Perone M J, and Chazenbalk G D (2017) Pluripotent nontumorigenic multilineage differentiating stress enduring cells (Muse cells): a seven year retrospective. *Stem. Cell Res. Ther.* 8: 227.
5. Tamai K and Uitto J (2016) Stem cell therapy for epidermolysis Bullosa-Does it work? *J. Invest. Dermatol.* 136: 2119–2121.
6. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, and Drela K (2019) Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Int* 2019: 9628536.
7. Miki T, Marongiu F, Ellis E, Dorko K, Mitamura K, Ranade A, Gramignoli R, Davila J, and Strom S (2009) Production of hepatocyte-like cells from human amnion. *Methods Mol. Biol.* 481: 155–168.
8. Miki T, Mitamura K, Ross M, Stolz D, Strom S (2007) Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reproduct Immunol.* 75: 91-96.
9. Miki T, Strom S (2006) Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2(2): 133-142.
10. Parolini O, Alviano. F, Bagnara G, Bilic G, Bühring H, Evangelista M, Hennerbichler, S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz C, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi T, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom S (2008) Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 26(2): 300-311.
11. Toda A, Okabe M, Yoshida T, and Nikaido T (2007) The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol. Sci.* 105: 215–228.
12. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM (2008) Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 15: 88–99.

13. Riau A, Beuerman RW, Lim LS, Mehta J (2010) Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*.31: 216–25.
14. Lopez-Valladares MJ, Rodriguez-Ares MT, Tourin R, Gude F, Silva MT, Couceiro J (2010) Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*. 88: e211–6.
15. Gicquel JJ, Dua HS, Brodie A, Mohammed I, Suleman H, Lazutina E, James DK, Hopkinson A (2009) Epidermal growth factor variations in amniotic membrane used for ex vivo tissue constructs. *Tissue Eng Part A*. 15: 1919–1927.
16. Hopkinson A, McIntosh RS, Tighe PJ, James DK, Dua HS (2006) Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF-beta content. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.47: 4316–22.
17. Arikat S, Novince RW, Mercer BM, Kumar D, Fox JM, Mansour JM, Moore JJ (2006) Separation of amnion from choriodecidua is an integral event to the rupture of normal term fetal membranes and constitutes a significant component of the work required. *Am J Obstet Gynecol*. 194: 211-217.
18. Oyen ML, Calvin SE, Landers DV (2006) Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant ?. *Am J Obstet Gynecol*.195: 510-515.
19. Benirschke K, Kaufmann P (2000) Anatomy and pathology of the placental membranes. In: *Pathology of the Human Placenta*, 4th ed. New York: Springer.281-334.
20. Han Y, Romero R, Kim JS, Tarca AL, Kim SK, Draghici S, Kusanovic JP, Gotsch F, Mittal P, Hassan S, Kim CJ (2008) Region-Specific Gene Expression Profiling: Novel Evidence for Biological Heterogeneity of the Human Amnion. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*. 79: 954–961.
21. Johnson RF, Mitchell CM, Giles WB, Walters WA, Zakar T (2002) The in vivo control of prostaglandin H synthase-2 messenger ribonucleic acid expression in the human amnion at parturition. *J Clin Endocrinol Metab*. 87: 2816–2823.
22. Malgorzata L and Tomasz G (2014) Amniotic membrane: New concepts for an old dressing. *Wound rep Reg* 22: 451-456.
23. Litwiniuk M, Bikowska B, Nideria -Bieinska J, Jozwiak J, Kamnski A, Skopinski P et al. (2011) High molecular weight hyaluronan and stroma-embedded factors of radiation-sterilized amniotic membrane stimulate proliferation of HaCat cell line in vitro. *Centr Eur J Immunol*. 36: 205-11. MMP-9

24. Moore RM, Mansour JM, Rediline RW, mercer BM, Moore JJ (2006) The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta* 27:1037-51. TIMP-3
25. Hudson LG, McCawley LJ (1998) Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microsc Res Tech.* 43: 444-55. EGF
26. Ogawa k, Chen F, Kuang C, Chen Y (2004) Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor-kB site. *Biochem J.* 381:413-22. TGF- β
27. Oba J, Okabe M, Yoshida T, Soko C, Fathy M, Amano K, Kobashi D, Wakasugi M, and Okudera H (2020) Hyperdry human amniotic membrane application as a wound dressing for a full thickness skin excision after a third-degree burn injury. *Burns Trauma* 8: tkaa014.
28. Hopkinson A, McIntosh R S, Tighe P J, James D K, and Dua H S (2006) Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF- β content. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 47: 4316–4322.
29. Banerjee A, Weidinger A, Hofer M, Steinborn R, Lindenmair A, Hennerbichler-Lugscheider S, Eibl J, Redl H, Kozlov AV, Wolbank S (2015) Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane. *Placenta* 36:1329-1332.
30. Stefkova K, Prochazkova J and Pachernik J (2015) Alkaline Phosphatase in stem cells. *Stem Cells International* 628368:11
31. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S, Andrews PW, Knowles BB, Solter D (1983) Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 12: 2355-2361.
32. Hakomori S, (2004) Carbohydrate-to-carbohydrate interaction through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj. J.* 21: 125-137.
33. Badcock G, Pigott C, Goepel, J, Andrews PW (1999) The human embryonal carcinoma marker antigen TRA 1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan. *Cancer Res.* 59: 4715–4719.
34. Qui D, Xiang J, Li Zhaoxia, Krishnamoorthy A, Chen L, Wang R (2008) Profiling Tra-1-81 antigen distribution on a human embryonic stem cell. *369(2):735-40.*
35. Koike C, Zhou K, Takeda Y, Fathy M, Okabe M, Yoshida T, Nakamura Y, Kato Y, Nikaido T (2014) Characterization of Amniotic Stem Cells Cellular Reprogramming. *16(4): 298-300.*
36. Niwa H, Miyazaki J, and Smith A G (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or selfrenewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24: 372–376.

37. Avilion A A, Nicolis S K, Pevny L H, Perez L, Vivian N, and Lovell-Badge R (2003)
Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 functions. *Genes Dev.* 17: 126–140.
38. Seiler K, Soroush Noghabi M, Karjalainen K, Hummel M, Melchers F, Tsuneto M. (2011)
Induced pluripotent stem cells expressing elevated levels of sox2, oct4, and klf-4 are severely reduced in their differentiation from mesodermal to hematopoietic progenitor cells. *Stem Cell Dev.* 20(7): 1131-42.
39. Rodda D J, Chew J L, Lim L H, Loh Y H, Wang B, Ng H H, and Robson P (2005)
Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and Sox2. *J. Biol. Chem.* 280: 24731–24737.
40. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, and Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379–391.
41. Mitui K, Tokuzwa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama m, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 113(5): 631-642.
42. Aksoy I, Giudice V, Delahaye E, Wianny F, Aubry M, Mure M, Chen J, Jauch R, Bogu GK, Nolden T, Himmelbauer H, Xavier Doss M, Sachinidis A, Schulz H, Hummel O, Martinelli P, Hübner N, Stanton LW, Real FX, Bourillot PY, Savatier P (2014) Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat Commun.* 28(5): 3719
43. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007)
Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5): 861-72
44. Qingcheng M (2008) BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm. Res.* 25: 1244–1255.
45. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, Achtstatter T, Moll R, Jorcano JL, Magin TM, Franke WW (1985) Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci.* 455: 282-306.
46. Bartek J, Vojtesek B, Staskova Z, Bartkova J, Kerekes Z, Rejthar A, Kovarik J (1991) A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: Characterization and value in diagnostic histopathology. *J Pathol.* 164(3) :215-24.
47. Dominici M, Bkanc K Le, Muller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent

- mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317.
48. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>
 49. Izumi M, Pazin BJ, Minervini CF, Gerlach J, Ross MA, Stolz DB, Turner ME, Thompson RL, Miki T. (2009) Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion *J Reproduct Immunol.* 81:39-43.
 50. Carson BM (1999) *Human Embryology & Developmental Biology*. Mosby, Inc., St. Louis, MO, pp.59-63.
 51. Centurione L, Passaretta F, Centurione MA, Munari S, Vertua E, Silini A, Liberati M, Parolini O, Di Pietro R. (2018) Mapping of the human placenta: Experimental evidence of amniotic epithelial cell heterogeneity. *Cell Transplant.* 27(1):12-22.
 52. Richardeon LS, Randnaa E, Urrabaz-Garza R, Lavu N, Menon R (2020) Stretch Scratch, and Stress: Suppressors and Supporters of Senescence in human Fetal Membranes Placenta 15(99): 27-34.
 53. Hsu YC and Fuchs E (2012) A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(2):103-14.
 54. Andrews PW, Banting G, Damjanov I, Arnaud D, Avner P (1984) Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* 3(4): 347-61.
 55. Trusler O, Huang Z, Goodwin J, Laslett AL (2018) Cell surface markers for the identification and study of human naïve pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 26: 36-43.
 56. Li B, Zheng Y-W, Sano Y, Taniguchi H (2011) Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation. *PloS One.* 6(2): e17092.
 57. Lian N, Wang W, Li L, Elefteriou F, Yang X (2009) Vimentin inhibits ATF4-mediated osteocalcin transcription and osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 284(44): 30518-25.
 58. Capetanaki Y, Smith S, Heath JP (1989) Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J Cell Biol.* 109 (4 Pt 1):1653-64.
 59. Dmello C, Sawant S, Alam H, Gangadaran P, Mogre S, Tiwari R, D'Souza Z, Narrkar M, Thorat R, Patil K, Chaukar D, Kane S, Vaidya M (2017) Vimentin modulates K5/K14 expression to regulate differentiation in carcinoma derived cells. *PLoS One* 12(2): e0172559.
 60. Eriksson JE, Dechat T, Gri B, Helfand B, Mendez M, Pallari H-M, Goldman RD (2009) Introducing intermediate filaments from discovery to disease. *J Clin Invest* 119(7): 1763-71.

61. Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM (2014) The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 50(1):1-6.
62. Deglincerti A, Croft GF, Pietila LN, Zernicka-Goetz M, Siggia ED, Brivanlou AH (2016) Self-organization of the in vitro attached human embryo. *Nature* 533: 251-254.
63. Qingcheng Ma (2008) BCRP/ABCG2 in the Placenta: Expression, Function and Regulation. *Pharmaceutical Research.* 25(6): 1244-55.
64. Chen DR, Lu DY, Lin HY, Yeh WL (2014) Mesenchymal stem cell- induced doxorubicin resistance in triple negative breast cancer. *Biomed Res Int.* 532161.
65. Brace RA, Cheung CY (2014) Regulation of amniotic fluid volume: evolving concepts. *Adv Exp Med Biol.* 814: 49-68.
66. Lopez-Valladares MJ, Rodriguez-Ares MT, Tourin R, Gude F, Silva MT, Couceiro J (2010) Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol.* 88(6): 211–6.