

氏 名 小池 伸享
こいけ のぶゆき

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 381 号

学位授与年月日 令和 3 年 12 月 22 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 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

学位論文題目 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)

論文審査委員

(主査)	教 授	野口 京
(副査)	教 授	井村 讓二
(副査)	教 授	一條 裕之
(副査)	特命教授	佐武 利彦
(指導教員)	准 教 授	若杉 雅浩

論 文 要 旨

論 文 題 目

ヒト羊膜幹細胞の存在部位の検討

富山大学大学院 医学薬学教育部
生命・臨床医学専攻
危機管理医学講座

氏 名 小池 伸享

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

〔目的〕

再生医療の領域では、骨髄をはじめとする体性幹細胞 (Somatic Stem Cell: SSC) が、これまで治療が不可能とされていた難治性疾患の治療に利用されはじめている。しかし、SSC の利用には倫理的な問題に加え、採取時にドナーの苦痛を伴うことや、治療に必要な細胞を十分に確保することができないなどの問題がある。古くから被覆材として利用されてきた羊膜から単離される細胞は、SSC の問題を払拭するうえに、移植時に拒絶を起し難いという性質を持つこと、成人の組織内に存在する SSC の含有率が 0.1~0.01% 程度であるのに、羊膜内には幹細胞が 10% もの高率で存在することから細胞医療材料として有望視されている。

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。

羊膜を 3 つの領域に分別し、各領域に存在する HAE 幹細胞および HAM 幹細胞を幹細胞マーカーにて同定し、その分布について検討することを目的とする。

〔材料と方法並びに成績〕

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。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、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。

羊膜を胎盤のある絨毛膜有毛部と胎盤のない絨毛膜無毛部に区別し、さらに前者を臍帯付着部の Area A と臍帯周囲部の Area B とした。後者の絨毛膜無毛部を Area C (辺縁部) とした。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 (ホールマウント標本)、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、組織化学的、免疫組織学的に検討した。

1. HAE 幹細胞の分布

HAE は単層円柱状 (Area A) から単層扁平状 (Area B) で、基底陥入および指状嵌入が発達した細胞である。

幹細胞マーカーである Tra-1-60 にのみ陽性を示す HAE 幹細胞は全ての領域に存在した。Area A、Area B には Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA3、SSEA4 に 2 重に染色される HAE 幹細胞や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を示す ALP (アルカリフォスファターゼ) 活性を示す HAE 幹細胞が存在した。Area C には Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA3、SSEA4 などの幹細胞マーカーに単独で染色される HAE 幹細胞が存在した。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、ほとんどの細胞が vimentin 陽性を示した。

2. HAM 幹細胞の分布

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 BCRP (Brest Cancer Resistance Protein) を発現する HAM 幹細胞が Area A に多く存在した。

幹細胞関連転写因子 Klf4, Oct A, Oct3/4, c-Myc, Sox2 を発現する HAM 幹細胞は Area C に多く存在した。

3. 幹細胞転写因子に關与する mRNA の発現

胎盤附着部 (Area A+ Area B) と辺縁部について幹細胞関連転写因子 Klf4, Oct A, Oct3/4, c-Myc に関する mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて比較したが有意差は認められなかった。

[総括]

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。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。幹細胞の分布が発現するマーカーにより異なることの意義については今後研究する必要があるが、分泌されるサイトカインや生理活性物質との関連が考えられる。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は、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。

様式 8

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	小池 伸享
論文審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 特 命 教 授	氏 名 野 口 京 井 村 穰 二 一 條 裕 之 佐 武 利 彦	
指 導 教 員	准 教 授	若杉 雅浩	
(論文題目)	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)		(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
〔背景と目的〕			
<p>再生医療の領域では、骨髄をはじめとする体性幹細胞 (Somatic Stem Cell: SSC) が、これまで治療が不可能とされていた難治性疾患の治療に利用されはじめています。しかし、SSC の利用には倫理的な問題に加え、採取時にドナーの苦痛を伴うことや、治療に必要な細胞を十分に確保することができないなどの問題がある。古くから被覆材として利用されてきた羊膜から単離される細胞は、SSC の問題を払拭するうえで、移植時に拒絶を起し難いという性質を持つこと、成人の組織内に存在する SSC の含有率が 0.1~0.01%程度であるのに、羊膜内には幹細胞が 10%もの高率で存在することから細胞医療材料として有望視されている。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。この研究では、羊膜を 3つの領域に分別し、各領域に存在する HAE 幹細胞および HAM 幹細胞を幹細胞マーカーにて同定し、その分布について検討した。</p>			
〔材料〕			
<p>羊膜は、富山大学倫理審査委員会の審査(審査番号 44)にて承認されたプロトコールにて、富山大学および高岡市民病院にて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。</p>			
〔方法と結果〕			
<p>羊膜を胎盤のある絨毛膜有毛部と胎盤のない絨毛膜無毛部に区別して、前者を臍帯付着部の Area Aと臍帯周囲部のArea Bとした。後者の絨毛膜無毛部をArea C (辺縁部) とした。</p>			

〔方法と結果の続き〕

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と電子顕微鏡用試料を作成し、組織学的、組織化学的、免疫組織化学的に検討した。

1. ヒト羊膜上皮系幹細胞(HAE 幹細胞)の分布

HAE は単層円柱状 (Area A) から単層扁平状 (Area B) で、基底陥入および指状嵌入が発達した細胞である。幹細胞マーカーである Tra-1-60 にのみ陽性を示す HAE 幹細胞は全ての領域に存在した。Area A、Area B には Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA3、SSEA4 に 2 重に染色される HAE 幹細胞や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を示す ALP (アルカリフォスファターゼ) 活性を示す HAE 幹細胞が存在した。Area C には Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA3、SSEA4 などの幹細胞マーカーに単独で染色される HAE 幹細胞が存在した。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、ほとんどの細胞が vimentin 陽性を示した。

2. ヒト羊膜間葉系幹細胞(HAM 幹細胞)の分布

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 BCRP (Brest Cancer Resistance Protein) を発現する HAM 幹細胞が Area A に多く存在した。幹細胞関連転写因子 Klf4, Oct A, Oct3/4, c-Myc, Sox2 を発現する HAM 幹細胞は Area C に多く存在した。

3. 幹細胞転写因子に関与する mRNA の発現

胎盤付着部 (Area A+ Area B) と辺縁部について幹細胞関連転写因子 Klf4, Oct A, Oct3/4, c-Myc に関する mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて比較したが有意差は認められなかった。

〔総括〕

ヒト羊膜上皮系幹細胞およびヒト羊膜間葉系幹細胞が羊膜全体に均等に分布するのではなく偏在して存在していることを初めて明らかにした点で新規性がある。ヒト羊膜上皮系幹細胞およびヒト羊膜間葉系幹細胞は、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。幹細胞の分布が発現するマーカーにより異なることの意義については、今後さらなる検討が必要である。羊膜から幹細胞を採集する上で、幹細胞の分布を知ることは、特定の幹細胞を効率よく採取するために有用な情報であり、将来的に羊膜を再生医療材料としてより有効に利用できる可能性があり、臨床的発展性が期待される。

以上より本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。