

## 25-1 マウス心筋幹細胞系の分離と樹立 (ES細胞から胚様体を経由して)

石渡産婦人科病院<sup>1</sup>, 聖マリアンナ医大<sup>2</sup>, 日本大学生物資源動物細胞<sup>3</sup>, 慈恵医大解剖第二<sup>4</sup>  
玉川朝治<sup>1</sup>, 石渡 勇<sup>1</sup>, 時枝由布子<sup>1</sup>, 石渡千恵子<sup>1</sup>, 岡根夏美<sup>1</sup>, 木口一成<sup>2</sup>, 佐藤嘉兵<sup>3</sup>, 石川 博<sup>4</sup>

【目的】心筋幹細胞株は骨髄間葉細胞や血球幹細胞から樹立されている。胚性幹細胞 (ES細胞) からの樹立は困難である。そこで, ES細胞から心筋幹細胞の樹立法を検討した。【方法】Leukemia inhibitory factor (LIF) 1ng/ml 含有培地で未分化な状態で維持されている ddY 系マウス EES-3細胞を実験に供した。LIF を除去し Embryotrophic factors (ETFs) 添加培養液 (10%FBS 含有  $\alpha$ MEM) で静置培養する方法と同培地を用いて hanging drop culture し種々の器官原基を形成させる方法を用いた。同培地で約2日間 hanging drop culture し, 胚葉体 embryoid body (EB) を形成させ, さらに, 培養液中で浮遊培養すると一部の EB には心拍動が確認できた。心拍動の部分ピンセットで摘出し, 21 gage 注射針を用いて細胞を分散させ静置培養した。培養液は10ng/ml LIF, ETFs, 10%FBS 含有  $\alpha$ MEM である。継代培養は0.25%trypsin を用い1:2 split で行った。【成績】細胞系は安定した増殖を示し分離後3ヶ月の間に12回の継代に成功した。培養細胞は小型円形, 類円形, 多角形で接触阻止が見られる。継代することなく confluent の状態で10%FBS 含有  $\alpha$ MEM で長期培養 (約3週間以上) すると一部に拍動する細胞が観察される。【結論】胚様体から心臓原基を誘導し, 心筋幹細胞系を樹立した。今後, 分子レベルで心筋であることの同定と, 心筋梗塞モデルマウスにおける細胞移植による再生医療を試みたい。

## 25-2 ヒト子宮内膜における stem-like cells の同定と分離

慶應大<sup>1</sup>, 慶應大生理学<sup>2</sup>  
升田博隆<sup>1</sup>, 丸山哲夫<sup>1</sup>, 松崎有未<sup>2</sup>, 長島 隆<sup>1</sup>, 内田 浩<sup>1</sup>, 岡野栄之<sup>2</sup>, 吉村泰典<sup>1</sup>, 野澤志朗<sup>1</sup>

【目的】再生と破壊の月経サイクルを長期間にわたり反復するヒト子宮内膜は, その極めて高い再生能力から幹細胞の存在が強く示唆されるが, 未だ同定と分離には至っていない。近年いくつかの臓器において DNA 染色剤 Hoechst33342によっても染色されない細胞集団 Side Population (SP) が存在することが報告され, その高い臓器特異的幹細胞活性が見いだされている。本研究ではこの SP 分離法を用いてヒト子宮内膜における幹細胞集団の同定と分離を試みた。【方法】患者の同意を得て摘出した良性子宮内膜より間質細胞と腺細胞を酵素処理および濃度勾配法を用いて分離した後, Hoechst 染色し FACS cell sorter を用いて SP 細胞を分離した。SP 細胞に対しては, 幹細胞マーカーの一つである CD34と白血球共通抗原 CD45に対する抗体を用いて FACS 解析を施行すると同時に, cytokeratin あるいは vimentin 等の蛍光免疫染色により SP 細胞の characterization を行った。【成績】間質細胞・腺上皮細胞ともに月経周期を通して常に SP 細胞 (全生細胞の0.1~12%) が存在し, 内膜基底層の占める割合が高い増殖期に SP 出現率が有意に高かった。SP 分画は CD34/CD45の発現パターンで (1) +/+ (2) +/- (3) -/-の3つの分画に分かれ, 間質 SP では約 (1) 80% (2) 5% (3) 15%であり腺 SP では約 (1) 10% (2) 40% (3) 50%であった。Cytokeratin/vimentin の陽性率は間質 SP で0.1%以下/100%であり腺 SP では約10%/100%であった。【結論】本研究を通じて, ヒト子宮内膜から安定的な SP 細胞を分離する方法を世界で初めて確立した。月経周期における SP 細胞出現率の変化および表面マーカーの発現パターンより, ヒト子宮内膜 SP 細胞が幹細胞的性格を持つことが強く示唆された。

## 25-3 子宮内膜幹細胞同定の試み

九州大生医研  
加藤聖子, 須賀 新, 一戸晶元, 山吉麻子, 上木原哲也, 有馬隆博, 和氣徳夫

【目的】月経毎に周期的に再生される子宮内膜には幹細胞の存在が示唆される。組織幹細胞の同定には Hoechst33342の取り込みの低い分画の細胞 (side population cells, 以下 SP 細胞) を分離する方法が用いられる。この方法を用いて子宮内膜 SP 細胞を分離しその生物学的特性を解析した。【方法】1) 同意を得た患者の摘出子宮より正常子宮内膜を採取し, 上皮と間質細胞に分離後 Hoechst33342で染色した。FACS で SP 細胞を分離し, サイトカインを含む培養液で collagen dish, feeder cell や matrigel 上に培養した。2) 長期培養 SP 細胞の CD9,E-cadherin, CD13,Vimentin の発現を Western blot 法や免疫染色で解析し正常子宮内膜の発現と比較した。【成績】1) 解析した20例中7例に, 上皮のみ2例, 間質のみ2例, 両方3例に SP 細胞が存在した。全細胞数に対する割合は0.01-0.3%であった。2) SP 細胞は SCF, IL-6,TPO 存在下で増殖した。collagen dish 上より feeder cell 上の方が増殖する確率は高かった。SP 細胞を直接 matrigel に撒いても増殖しなかった。3) collagen dish 上で長期培養した SP 細胞は, 形態学的に間質細胞に類似し, 正常子宮内膜間質で発現している CD13,Vimentin が陽性, 正常子宮内膜上皮で発現している CD9,E-cadherin が陰性であった。feeder cell 上で長期培養した SP 細胞はコロニー上に増殖し, その細胞集団を collagen dish 上に撒き直すと腺管構造を呈し, CD9,E-cadherin 陽性であった。【結論】1) 子宮内膜には SP 細胞が存在する。2) SP 細胞を長期培養すると子宮内膜上皮あるいは間質類似の特性を示したため, SP 細胞が子宮内膜の幹細胞或いは前駆細胞である可能性が高いことが示唆された。