P3-274 心筋再生療法におけるアログラフト可能な羊膜間葉系細胞

慶應大

辻 紘子, 浅田弘法, 青木大輔, 吉村泰典

【目的】羊膜は多分化能を有し再生医療への応用が期待されると同時に、免疫寛容能を有すると考えられている。本研究ではヒト羊膜由来間葉系細胞 (human amniotic mesenchymal cells; hAMCs) が免疫学的寛容を維持したまま心筋へ分化し、アログラフト可能な細胞源であることを明らかにすることを目的とする。【方法】hAMCs を樹立し EGFP にて標識後、胎仔マウス心筋細胞との共培養し、心筋細胞への分化を拍動の観察や免疫細胞化学的染色、RT-PCR にて解析した。Wistar rat 心臓に hAMCs を移植し、2 から 4 週間後に HLA-G, FOXP3 陽性 Regulatory T-cell (T-reg) を免疫組織化学的に観察することにより、免疫寛容の獲得機序を検証した。【成績】hAMCs は心筋誘導により自己拍動を開始し、免疫細胞化学的に心臓特異的な Troponin-I の横紋構造が観察され、RT-PCR にて心筋特異的遺伝子の発現が見られた。hAMCs は Wistar rat 心筋内で移植後 2 週間以上生着し、心筋細胞の形態を維持していた。HLA-G は移植前に Western blot にて発現が観察されたが、移植後は必ずしも全ての移植例で観察されなかった。生着した hAMCs の周囲には T-reg の発現が認められた。【結論】hAMCs は心筋分化能を持ち、異種移植でも長期間生着していた。免疫学的寛容の成立には主要組織適合性抗原の欠如・HLA-G の発現・T-reg の誘導の関与が示唆された。hAMCs は拒絶のないアログラフトとして心筋再生医療で有用な細胞源となりうると考えられた。

P3-275 羊膜から樹立した細胞株 (HAM) の神経細胞への分化誘導の検討

石渡産婦人科病院

玉川朝治, 時枝由布子, 佐藤智子, 岡根夏美, 石渡 巖, 石渡千恵子, 石渡 勇

【目的】羊膜細胞には幹細胞が含まれるとの報告があり、また本学会において HAM 細胞の骨芽細胞への分化誘導に報告をした。今回我々は外胚葉由来である神経細胞への分化誘導を試みた。【方法】インフォームドコンセント施行後、胎盤より羊膜を採取し、PBS で 3 回洗浄、ハサミで細切し、0.25% trypsin-EDTA で 45 分間酵素処理を行い、その後 1.0mg/ml collagenase, 0.1% (W/V) dispase, 0.1% (W/V) papain 含有の α MEM 培養液で 60 分間酵素処理を行った。フィルトレーションし、10 ng/ml (hEGF + hLIF), 10% FBS 含有 α MEM で培養した。樹立した細胞株を HAM と名付けた。神経細胞への分化・誘導は、コンフルエントになった後に、分化誘導培養液 I として、2mM glutamin, 10ng/ml EGF, 10ng/ml FGF-2, 1xN2 supplement, 10% FBS 含有 α MEM で 48 時間培養後、PBS で洗浄し、分化誘導培養液 II として、2mM glutamin, 1xN2 supplement, 200 μ M BHA, 1mM dbcAMP, 0.5mM IBMX, 1 μ M all-trans retinoic acid, 10% FBS 含有 α MEM で 96 時間培養した。神経細胞への分化誘導の有無を調べるために、RT-PCR により 11 個の神経細胞特異的マーカーの mRNA の発現を調べ、タンパク質の発現を調べるため、NSE, Tuj1, MAP2, GFAP, MBP の免疫染色を行った。【成績】分化誘導を行った HAM 細胞は、樹上突起や神経細胞体様構造が見られ、神経細胞様細胞へと形態変化が見られた。RT-PCR の結果、分化誘導後に神経細胞特異的な多くの mRNA の発現を確認した。また同様に分化誘導後は免疫染色の結果すべては陽性であった。【結論】HAM 細胞の神経細胞への分化誘導に成功した。細胞移植療法としての羊膜の再生医療への応用が期待される。

P3-276 羊膜より樹立した細胞株 (HAM) の肝細胞様細胞への分化誘導の検討

石渡産婦人科病院

石渡 勇, 玉川朝治, 時枝由布子, 佐藤智子, 岡根夏美, 石渡 巖, 石渡千恵子

【目的】本学会において、骨芽細胞への分化誘導の成功を報告した。HAM 細胞の三胚葉への分化誘導の試みの 1 つとして、今回は内胚葉である肝細胞への分化・誘導を試みた。【方法】インフォームドコンセント施行後、胎盤より羊膜を採取し、PBS で 3 回洗浄、ハサミで細切し、0.25% trypsin-EDTA で 45 分間酵素処理を行った。その後遠心し、1.0mg/ml collagenase $\cdot$ 1% (W/V) dispase $\cdot$ 1% (W/V) papain 含有 α MEM 培養液で 60 分間酵素処理を行った。フィルトレーションし、洗浄後 10ng/ml (rhEGF + rhLIF), 10% FBS 含有 α MEM で培養した。樹立した細胞株を HAM と名付けた。肝細胞への分化・誘導は、HAM 細胞を collagen type I coating した 60mm シャーレにコンフルエントになった後に 20ng/ml HGF $\cdot$ 10ng/ml FGF-2 $\cdot$ 10ng/ml oncostatin M $\cdot$ 100nM dexamethasone, 10units/ml heparin sodium salt, 10% FBS 含有 α MEM 培養液で 3 週間培養した。RT-PCR により、17 個の肝細胞特異的マーカーを用い、mRNA の発現を調べた。またタンパク質の発現を調べるために、 α -FP, albumin と CK18 の免疫染色を行った。また細胞内のグリコーゲンの貯蔵を調べるために、PAS 染色を行った。【成績】RT-PCR の結果、分化誘導後に多くに肝細胞特異的マーカーの発現を確認した。しかし発現が確認できなかったものも見られた。免疫染色の結果、分化誘導後は α -FP, albumin, CK18 は陽性であり、また PSA 染色も分化誘導を行った方は、強陽性であった。【結論】HAM の肝細胞様細胞への分化誘導に成功した。よって HAM は未分化な肝細胞様細胞含まれることが示唆された。再生医療の細胞ソースとして、有効である可能性が示唆された。