

単一マーカーによるヒト子宮内膜間葉系 幹細胞分離法の確立

A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 升田 博隆

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University

Hiroataka Masuda

派遣期間 2009年8月8日～2012年4月23日

August 8, 2009 – April 23, 2012

研究機関 The Ritchie Centre, Monash Institute of Medical Research

研究指導者 Associate Prof. Caroline Gargett

(英文要約)

Coexpression of PDGFR β and CD146 has been used to isolate endometrial mesenchymal stem-like cells (eMSCs). This study aims to evaluate a single marker for purifying eMSCs. We screened 12 novel markers by flow cytometry and immunohistochemistry to identify perivascular markers. Sorted subpopulations were examined for colony forming unit (CFU), self-renewal and differentiation assays for mesenchymal stem cell (MSC) function. We also transplanted sorted eMSCs into NSG mice. Magnetic bead selection was compared with flow cytometry sorting using CFU assay. W5C5 was particularly effective in selecting eMSCs. W5C5⁺ cells comprise $4.2 \pm 0.6\%$ (n=34) of endometrial stromal cells and reside predominantly in a perivascular location. The clonogenicity of W5C5⁺ cells is significantly greater than W5C5⁻ cells. W5C5⁺ cells differentiated into adipocytes, osteocytes, chondrocytes, myocytes and endothelial cells. W5C5⁺ cells produce endometrial stromal-like tissue in vivo. In terms of clonogenicity, magnetic bead selected W5C5⁺ cells gave rise to significantly higher CFU numbers compared to flow-sorted W5C5⁺ cells. This study identified W5C5 as a single marker capable of purifying eMSCs. W5C5 enriches eMSCs to high purity and provides a simple protocol for their prospective isolation using magnetic bead selection. W5C5 selection may provide an alternate, readily available autologous source of MSC for future cell-based therapies.

【目的】ヒト子宮内膜は、初経から閉経までの約35年に月経周期として400回にもおよぶ増殖・分化・剥脱を繰り返す極めて再生能力の高い組織である。そのため、組織幹細胞(子宮内膜幹細胞)が存在すると考えられている(Gargett and Masuda. Mol Hum Reprod. 2010)。子宮内膜は生命維持器官ではないために注目度は低いものの、種の保存という点では必要不可欠な器官である。一方で、生命維持器官でなく再生能力が高いという性質より、貴重な細胞供給源となり得る。また、子宮内膜から幹細胞が分離されることで幹細胞バンク化も可能であると考えられる。さらに、その幹細胞の培養まで可能になった場合、生検といった日常外来診察でも可能な低侵襲の医療行為にて、少量の幹細胞を分離し増幅できる事となり、臨床応用の可能性がいっそう広がると考えられる。実際の臨床応用としては、現在の生殖医療において妊娠率向上の律速段階となっている子宮内膜の着床能の問題に対して、内膜改造のための内膜幹細胞移植などの今までにない治療が生殖医療のブレイクスルーになることが期待される。その上、子宮内膜幹細胞では可塑性も証明されていることから、他臓器の再生医療へ応用できる可能性も高く、女性に限っては自家移植も可能となる。

現在、我々が報告してきたSP細胞(Masuda et al. PLoS One. 2010)やコロニー形成細胞(Chan et al. Biol Reprod. 2004)などいくつかの幹細胞集団が存在するが、その中でもヒト子宮内膜に存在すると考えられている間葉系幹細胞(MSC)は、内膜毛細血管周囲に存在するCD146⁺PDGFR β ⁺細胞として単離されることが報告されており(Schwab et al. Hum Reprod. 2007)、最も信頼度が高くコンセンサスが得られている。そこで我々は、ヒト子宮内膜MSCの臨床応用を目指し、単一マーカーによる内膜MSCの効率的なプロスペクティブ分離法の開発を目的とした。

【方法】同意を得て採取したヒト子宮内膜検体を用いてすべての実験を行った。骨髓MSCの分離マーカーとして作成された12種類の新規抗体に対して、子宮内膜における血管周囲細胞に対する特異的反応を指標とした免疫組織化学染色(IHC)と、分散子宮内膜間質細胞を用いてフローサイトメトリー(FCM)による選別が可能かどうか、という2種類のスクリーニングを行った。候補マーカー陽性細胞に対しては、FCMによる発現型解析を既存の間葉系幹細胞マーカーを中心に施行した。FCMにて分離した候補マーカー陽性内膜間質細胞のMSC特性は、コロニー形成能(CFU)および中胚葉組織への分化能を指標に評価した。また、そのマーカー陽性細胞を重度免疫不全マウス(NSGマウス)の腎被膜下に移植し、再構築された組織をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびIHCによって評価した。さらに、臨床応用を見据えた最適な分離方法を確立するため、FCMを用いた分離

法と磁気ビーズ (MACS) を用いた分離で得られた内膜細胞に対してCFUを中心とした比較検討を行った。

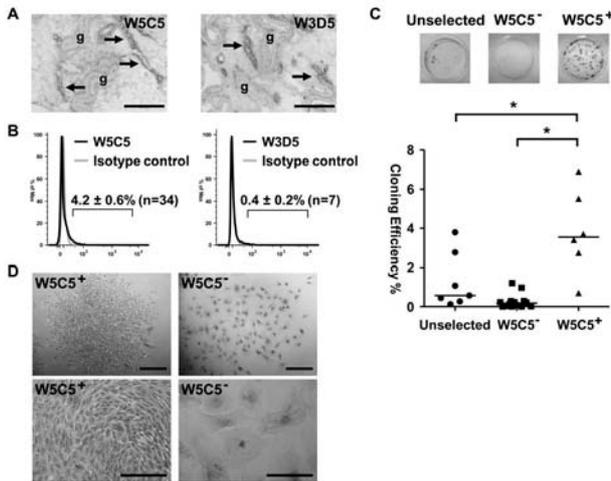


Fig.1 Localization and clonogenicity of human endometrial W5C5⁺ cells.

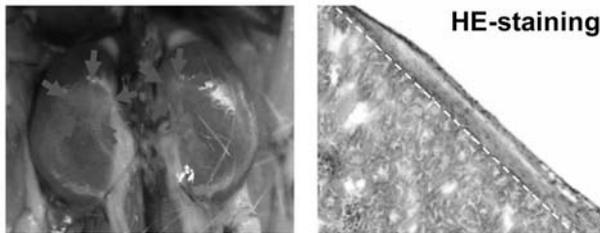


Fig.2 Human endometrial W5C5⁺ cells reconstitute stromal tissue in vivo.

や血管内皮細胞への分化能も有していた。ほとんどのW5C5⁺細胞は、CD146・PDGFRβともに発現しており、CD24・CD44・CD71・CD90・CD105といった間葉系幹細胞マーカーも

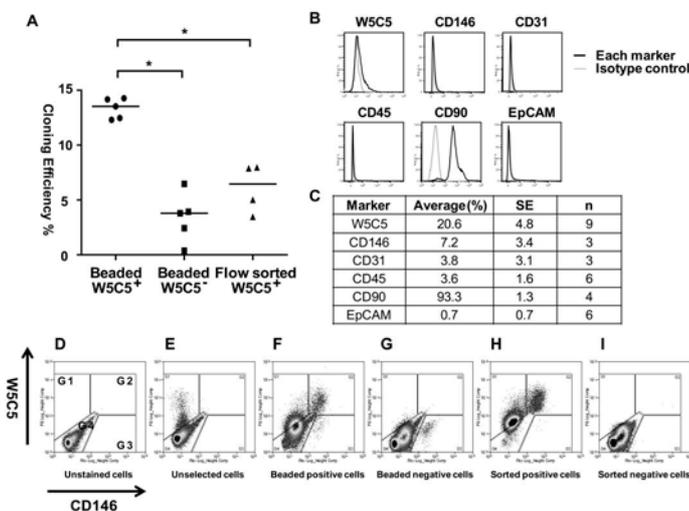


Fig.3 Magnetic bead vs flow cytometry sorting of human endometrial W5C5⁺ cells.

【結果】新規12マーカーのうちW5C5とW3D5の2マーカーで、基底層と機能層ともに血管周囲細胞が陽性となった。二つのマーカーのうち、W3D5は子宮内膜細胞の分散過程にて抗原性が消失した。一方、W5C5の抗原性は分散細胞でも保持され、内膜間質細胞中4.1 ± 0.6% (n=31) が陽性であり、CFUはW5C5⁺細胞の方がW5C5⁻細胞や非選別細胞より優位に高かった (Fig. 1)。W5C5⁺細胞はCD146⁺PDGFRβ⁺細胞と同等のCFUをもち、脂肪・骨・軟骨に加え平滑筋

を発現していた。NSGマウスの腎被膜下へのW5C5⁺細胞移植した実験では、再構築された組織はHE染色では内膜間質様であり (Fig. 2)、IHCにてvimentin陽性の間質細胞であった。また、FCMに

より分離されたW5C5⁺細胞はMACSで得られたW5C5⁺細胞に比べてW5C5の純度は高いと考えられていたが、MACSによる分取細胞にはFCMで分離されていないW5C5弱陽性細胞も含まれている可能性が高く、分離後の両細胞集団の生存率やCFUの比較ではMACSによる分取細胞の方が有意に高かった (Fig. 3)。

【結論】 W5C5は子宮内膜MSCのプロスペクティブな分離の際に単一マーカーとして有用であった。W5C5とMACSを用いたヒト子宮内膜MSCの新しい効率的な分離法を開発した。FCMや複数マーカーによる分離法に比べ簡便性や経済性の点で本法は優れており、内膜MSCを用いた細胞治療等の臨床応用に際して有用な基盤技術になり得ると考えられた。

上記業績は既に科学雑誌Cell Transplantationにacceptされon line掲載されている。

Masuda H, Anwar SS, Bühring HJ, Rao JR, Gargett CE.

A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells.

Cell Transplant. 2012 Mar 27. [Epub ahead of print]