

氏名	かくいかずよ 角井和代
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第 1900 号
学位授与の日付	平成 18 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Experimental Transplantation Study for Possible Transformation of Bone Marrow Cells in the Mouse Placenta (マウス胎盤中で骨髄細胞が形質変化(トランスフォーメーション)する可能性を検討するための実験的細胞移植の研究)
論文調査委員	(主査) 教授 中畑龍俊 教授 前川平 教授 芹川忠夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

妊娠が成立すると、絨毛細胞や血管内皮細胞が急速に分化・増殖して母体血から胎児血への酸素やエネルギーの供給系である胎盤が形成される。しかしながら、このような胎盤形成過程における分化誘導機序の全貌は必ずしも明らかになっていない。一方、ある種の骨髄由来細胞は多分化能を有し、肝や脳に移植すると移植部位の細胞と同じ性格の細胞に分化誘導されることが知られている。本研究は green fluorescent protein gene transgenic (GFP Tg) マウスから調整した骨髄由来細胞を、形成期の野生型マウス胎盤に移植しその分化誘導機序を *in vivo* で検討する動物モデルを作成することを目的とした。

施設内動物実験委員会の了承の下、非妊娠の GFP Tg マウスより骨髄細胞を採取し、Ficoll 法により単核球分画を調整し実験に供した。妊娠 9.5 日の野生型マウスを麻酔下に開腹し、子宮の胎盤側に、先端を鈍的に加工した 31 ゲージインジェクションカニューレを用いて、約 3  $\mu$ l の細胞浮遊液(細胞数 3-4  $\times$  10<sup>5</sup> 個)を、約 3 mm の深さで注入した後に閉腹した。さらに、妊娠 14.5 日から 18.5 日にかけてこの妊娠マウスを再開腹し、子宮切開分娩によりマウス胎盤を採取した。手術後の母獣の生存率は 88.9% であった。胎仔の生存率は、細胞浮遊液を注入した群で 50.0%、培養液のみ注入した群は 66.7% であった。再開腹して採取した胎盤から 100~200 枚の連続切片を作成し共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP Tg 骨髄由来細胞数を算定したところ、注入した GFP Tg 骨髄由来細胞数の 0.154% に相当する細胞の残存を検出した。残存した GFP Tg 骨髄由来細胞の大半は spongiotrophoblast 層あるいは labyrinth 層に局在し、一部は decidua あるいは amnion 周辺に局在した。また、組織学的に検討した全ての胎盤において炎症細胞浸潤像を認めなかった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡により GFP Tg 骨髄由来細胞を同定した後に、同一のスライドを HE 染色に供したところ、spongiotrophoblast 層および labyrinth 層いずれにおいても、残存した GFP Tg 骨髄由来細胞は絨毛構造の内部に局在を認めた。この絨毛構造に残存する GFP Tg 骨髄由来細胞において、絨毛細胞のマーカーとして cytokeratin, p57<sup>kip2</sup>, prolactin, 造血幹細胞あるいは血管内皮細胞のマーカーとして CD34 の染色を行った。cytokeratin, CD34, p57<sup>kip2</sup> は 0.0062%, 4.5%, 2.1% に陽性であったが、検討した全ての細胞において prolactin は陰性であった。一方、胎盤に注入する直前の GFP Tg 骨髄由来細胞を検討したところ、CD34 は 0.46% の細胞に陽性であったが、cytokeratin, p57<sup>kip2</sup>, prolactin は全て陰性であった。すなわち、胎盤に残存した GFP Tg 骨髄由来細胞の一部は cytokeratin, CD34, p57<sup>kip2</sup> 発現に変化を来したことが明らかとなった。

以上より、形成過程にあるマウス胎盤に GFP Tg 骨髄由来細胞を移植し、絨毛構造に残存した一部の GFP 陽性細胞において、分化抗原の発現における変化を検出することが可能である動物モデルを作成した。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はマウス胎盤に green fluorescent protein gene transgenic (GFP Tg) マウスの骨髄由来細胞を移植しその分化抗原発現の変化を *in vivo* で検討する動物モデルを作成することを目的とした。

GFP Tg マウス由来骨髄細胞の単核球分画を、妊娠 9.5 日の野生型マウス子宮の胎盤側に注入した後に閉腹した。さらに、

妊娠14.5~18.5日に胎盤を採取し連続切片を作成した。GFP Tg 骨髄由来細胞は絨毛構造の内部に局在して残存した。

この GFP Tg 骨髄由来細胞において、絨毛細胞マーカー cytokeratin, p57<sup>kip2</sup>, prolactin, 血管内皮細胞のマーカー CD34 の染色を行った。cytokeratin, p57<sup>kip2</sup>, CD34 は0.0062%, 2.1%, 4.5%に陽性であったが, prolactin は全て陰性であった。一方, 注入直前の GFP Tg 骨髄由来細胞では CD34 は0.46%に陽性であったが, cytokeratin, p57<sup>kip2</sup>, prolactin は全て陰性であった。すなわち, 胎盤に残存した GFP Tg 骨髄由来細胞の一部は cytokeratin, p57<sup>kip2</sup>, CD34 発現に変化を来したことが明らかとなった。

以上の研究は, 胎盤形成機序解析のための新たな動物モデルを開発し, 周産期医療の進歩に寄与するところが多い。

従って, 本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 本学位授与申請者は, 平成18年4月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。