

氏 名	森田 奈津子
(ふ り が な)	(もりた なつこ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 90 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 6 年 1 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Intravenous injection of iPS cell-derived endothelial progenitor cells prevents miscarriage by releasing pro-angiogenic factors in a mouse model of recurrent spontaneous abortion (流産モデルマウスへの iPS 細胞由来血管内皮前駆細胞の静脈投与は、血管新生促進因子を産生し、流産を予防する)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 廣瀬 善信 教授 瀧谷 公隆

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

自然流産とは、妊娠における最も一般的な合併症の 1 つであるが、約半数は原因不明であり、それらに対する治療法は確立されていないのが現状である。妊娠において胎盤形成は胎児発育に必要不可欠で、妊娠初期の胎盤での血管形成不全は流産の危険因子となる。血管形成には、主に胎生期に見られる新規の脈管形成と、既存の血管における血管新生の 2 つのプロセスが存在し、血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell : EPC) は、両者に関与する未熟な内皮細胞である。申請者の研究グループは、以前にマウス胚性幹細胞由来 EPC を用いて流産モデルマウスで流産率が改善することを報告したが、倫理面での問題も大きかったため、本研究では、ヒト人工多能性幹細胞由来 EPC (human induced pluripotent stem cell derived endothelial progenitor cell : hiPS-EPC) による流産率改善

効果とそのメカニズムについて検討した。

《方法》

1. hiPS 細胞からの EPC の分化誘導および細胞特性解析

hiPS 細胞よりプロトコルに従って EPC への分化誘導を行った。分化 2 日目、5 日目、8 日目の細胞から RNA を抽出し、RT-qPCR において多能性マーカー (Oct-4・Nanog)、EPC 関連マーカー (CD31・CD34・KDR) の発現レベルを hiPS 細胞と比較評価した。またフローサイトメトリーで CD31・CD34 に加え、血球系マーカーである CD45 を用いて各陽性細胞の割合を評価した。さらに分化させた細胞の機能評価として血管形成能を評価した。

2. 流産モデルマウスにおける流産率

CBA/J 雌マウスを DBA/2 雄と交配させ、妊娠 6.5–7.5 日目に hiPS-EPC (5×10^5 個/PBS 200 μ l)、または PBS (200 μ l) を尾静脈投与した。妊娠 13.5–14.5 日目に安楽死させ、胎仔と胎盤を摘出して流産率を評価した。

3. GFP-EPC 投与後のマウス胚の変化と GFP-EPC の局在同定

hiPS-EPC による流産率改善のメカニズムについて検討するため、まず GFP (Green fluorescent protein) 標識 iPS 細胞を EPC (GFP-EPC) に分化させ、妊娠 7.5 日目の妊娠マウスに GFP-EPC (5×10^5 個/PBS 200 μ l) または PBS (200 μ l) を尾静脈投与した。投与 3 時間後 (妊娠 7.5 日目 + 3 時間)・72 時間後 (妊娠 10.5 日目) にマウスを安楽死させて子宮を摘出し、マウス胚の評価を行った。次に GFP-EPC の局在を確認するために、組織透明化技術および免疫染色法 (GFP・CD31・DAPI) を用いて、GFP-EPC または PBS 投与 3 時間後 (妊娠 7.5 日目 + 3 時間)・72 時間後 (妊娠 10.5 日目) の子宮における血管の 3 次元構築を観察した。

4. hiPS-EPC 投与後のマウス胎盤における血管新生促進因子発現

EPC の血管新生促進因子産生作用に着目し、hiPS-EPC も同様の作用を持って胎盤形成に関与すると仮定した。hiPS-EPC から RNA を抽出して、RT-qPCR で胎盤形成に重要な血管新生促進因子であるヒト VEGF、PlGF の発現レベルを hiPS 細胞と比較評価した。さら

に hiPS-EPC 投与後のマウス胎盤における血管新生促進因子の発現を評価した。マウスの胎盤形成初期は妊娠 9.5 日目から 10.5 日目とされていることから、hiPS-EPC (5×10^5 個/PBS 200 μ l) または PBS (200 μ l) を投与した妊娠 10.5 日目のマウスを安楽死させ、採取した胎盤から RNA を抽出し、RT-qPCR でマウス VEGF、PlGF の発現レベルを hiPS-EPC 群および PBS 群とで比較評価した。

《結果》

1. 多能性マーカー (Oct-4・Nanog) の発現は分化 2 日目以降、有意に低下した。また EPC 関連マーカー (CD31・CD34・KDR) の発現は分化 5 日目以降、有意に増加した。分化 5 日目の細胞を用いたフローサイトメトリーでは、CD31・CD34 陽性細胞は 7.4% であった。CD45 陽性細胞は 0.7% であった。さらに分化 5 日目の細胞は、血管形成能を有していた。
2. 流産モデルマウスにおける流産率は hiPS-EPC 群 (n=7) で 13.6%、PBS 群 (n=6) で 27.1% と hiPS-EPC 群で有意な低下を認めた ($P=0.042$)。
3. GFP-EPC または PBS 投与 3 時間後では、胚の大きさと、胚数において両群に差は見られなかった。投与 72 時間後 (妊娠 10.5 日目) では PBS 群では一部の胚が小さく、出血を伴っており、このような異常胚は GFP-EPC 群で有意に少なかった ($P=0.026$)。また 3 次元血管構築の観察において、GFP-EPC 群では投与 3 時間後に CD31 が染色された胚に隣接する子宮血管系で、GFP 染色細胞が検出されたが、PBS 群では検出されなかった。さらに GFP-EPC 投与 72 時間後 (妊娠 10.5 日目) および投与 168 時間後 (妊娠 14.5 日目) でも同様に観察したが、GFP 染色細胞は検出されなかった。
4. hiPS-EPC では hiPS 細胞と比較してヒト VEGF、PlGF が有意に増加していた。また妊娠 10.5 日目の胎盤においても hiPS-EPC 群で、PBS 群と比較してマウス VEGF、PlGF の発現が有意に増加していた。

《考察》

hiPS 細胞より分化誘導した細胞は、分化 2 日目には多能性状態から脱した細胞であり、分化 5 日目には血管形成能を有する血管内皮前駆細胞 (hiPS-EPC) に分化していると考えられた。流産モデルマウスに対する hiPS-EPC の尾静脈投与では、血管新生促進因子を産生する hiPS-EPC がマウス胚に隣接する子宮血管系に一時的に局在し、胎盤における血管新生促進因子発現を改善することで胎盤形成に関与し、流産率を改善させる可能性が高い。また妊娠 7.5 日目の GFP-EPC 群と PBS 群のマウス胚において胚の大きさ、数に有意差はなく、妊娠 10.5 日目には GFP-EPC 群で有意に異常胚が減少したことから、hiPS-EPC による効果は投与直後ではなく、胎盤形成初期において発揮され、以降の胎盤成熟および胎児発育の環境改善に関与すると考えられる。

《結論》

hiPS-EPC の尾静脈投与によって、流産モデルマウスの胎盤における VEGF、PlGF の発現が増加し、流産率が減少した。hiPS-EPC は流産に対して、血管新生プロセスの促進を介して有効である可能性があり、流産を繰り返す妊婦に対する治療法の一つになりうると思う。

論文審査結果の要旨

自然流産とは、実臨床でも遭遇する機会が非常に多い妊娠合併症の 1 つであるが、約半数の症例で原因不明と言われており、その病態解明および治療法の確立の重要性は非常に高い。妊娠において胎盤形成は必要不可欠であり、妊娠初期の胎盤での血管形成が不十分であることは流産の危険因子となりうる。血管形成に関与する未熟な内皮細胞は血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell : EPC) と呼ばれ、申請者の研究グループは、以前にマウス胚性幹細胞由来 EPC を用いて流産モデルマウスで流産率が改善することを報告した。しかし、胚性幹細胞の使用は倫理面での問題も大きかったため、本研究では、ヒト人工多能性幹細胞由来 EPC (human induced pluripotent stem cell derived endothelial progenitor cell : hiPS-EPC) が流産モデルマウスにおける流産率を改善できるかどうかを検討することを目的とした。

まず hiPS 細胞から EPC への分化誘導を行い、細胞の特性を解析した。分化 2 日目には細胞の多能性マーカーの発現が有意に低下した。分化 5 日目には、EPC 関連マーカーの発現が増加し、血管形成能を有していたことから、hiPS-EPC への分化を確認した。この hiPS-EPC を流産モデルマウスに尾静脈内投与すると、流産率は有意に減少した ($P=0.042$)。次に流産率改善のメカニズムを解明するために、GFP (Green fluorescent protein) 標識 iPS 細胞を EPC (GFP-EPC) に分化させ、尾静脈投与した。組織透明化技術および免疫染色法を用いて妊娠マウスの子宮における血管の 3 次元構築を観察したところ、胚に隣接する子宮血管系に GFP-EPC が局在していることを確認した。さらに hiPS-EPC では血管新生促進因子である VEGF、PlGF の発現が hiPS と比較して有意に増加しており、hiPS-EPC を投与した妊娠 10.5 日目のマウスの胎盤でもマウス VEGF、PlGF の発現増加が見られた。これらの結果より、流産モデルマウスに対する hiPS-EPC の尾静脈投与では、血管新生促進因子を産生する hiPS-EPC がマウス胚に隣接する子宮血管系に一時的に局在し、胎盤における血管新生促進因子発現を亢進することで胎盤形成に関与し、流産を減少させる可能性が高いと考えられる。本研究はヒト人工多能性幹細胞を産科領域に用いた新規性の高いものであり、その知見は未確立である流産に対する治療の可能性を示すことが

期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Bulletin of Osaka Medical and Pharmaceutical University Vol.69 No.1 (2023)