

氏 名	神 吉 一 良
(ふ り が な)	(かんき かずよし)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 29 年 6 月 28 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	Bone marrow-derived endothelial progenitor cells reduce recurrent miscarriage in gestation (骨髄由来血管内皮前駆細胞移植治療による反復流 産予防効果の検討)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 前 村 憲 太 朗 教授 今 川 彰 久

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

流産は妊娠において最も頻度の高い合併症のうちの一つであり、高齢妊娠の増加とともに流産も年々増加傾向にある。臨床的には妊娠の約 15%で流産を認め、再発流産は約 1%認める。流産の原因は遺伝子異常が最も多く、血栓素因などが続いているが少なくとも約 25%は詳細不明であると報告されている。その主な病態は、胎盤発生時期の脈管形成と抗血管新生因子とのバランス異常と言われている。

骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) は循環血液中に存在し、虚血性疾患の治療に効果があるだけでなく、月経周期や子宮内膜の脈管形成にも関与していると報告されている。EPC は、内皮細胞に分化し直接血管を形成すると同時に、SDF-1、IGF-2、VEGF、PlGF などの走化因子を産生放出することによって血管形成に必要な

既存の内皮細胞の増殖・遊走を促進し、間接的にも血管を形成する。そこで、EPC を移植することによって妊娠初期における胎盤の血管形成を促進し、流産を防止するという仮説を立てた。本研究では、EPC の移植治療により胎盤血管新生を起こし、流産の頻度が減少するかどうかを反復流産マウスモデルを用いて検証するとともに、分子生物学的及び組織学的な解析によって、その機序の解明を試みた。

《材料および方法》

DBA2 マウス（生後 8-14 週齢）の雄と CBA/J マウス（生後 10-14 週齢）の雌を交配すると高頻度で流産（以後流産群：MisCar）が生じる。一方、BALB/c マウス（生後 8-14 週齢）の雄と、CBA/J マウス（生後 10-14 週齢）の雌を交配するとほとんどが正常妊娠（以後正常妊娠群：N-Gest）であり、明らかな流産は認めなかった。腔栓確認を妊娠 0 日目とし、妊娠 7 日目と 14 日目に CBA/J マウスの骨髓より分離培養した EPC をアセチル LDL-DiI でラベルして、MisCar 群に 5×10^5 個/匹を尾静脈投与した。次に、妊娠 18 日目に解剖を行い流産率を算出し、以下の項目に関して検討した。

1. N-Gest 群と MisCar 群それぞれから妊娠 18 日目に胎盤を採取し、SDF-1、IGF2、PlGF、sFlt1、VEGF の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法によって解析した。
2. 非妊娠マウス(以後 Normal : non-pregnant mouse)と N-Gest 群(妊娠 18 日目)と MisCar 群(妊娠 18 日目)から末梢血を採取し、CD34 陽性細胞を EPC と定義し、循環 EPC の割合をフローサイトメトリーによって解析した。
3. 培養 EPC に sFlt1 を添加しない群(以後 : sFlt1(-)群)とした群(以後 : sFlt1(+)群)における細胞遊走能をトランスウエルによるケモタキシスアッセイ法で、増殖能を MTT アッセイ法で比較検討した。
4. sFlt1(-)群と sFlt1(+)群における VEGF、eNOS、SDF-1 遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法によって、CD31 と eNOS の蛋白発現を蛍光免疫染色法によって解析した。
5. N-Gest 群と MisCar 群、それぞれに DiI でラベルした培養 EPC を妊娠 7 日目と 14 日目に尾静脈投与し、妊娠 18 日目に採取した胎盤を蛍光免疫染色することにより EPC

の胎盤への集積を定量分析し、比較検討した。

6. N-Gest 群と MisCar 群と MisCar に EPC を投与した群（以後：MisCar EPC(+)群）の胎盤組織標本を FITC-isolectin B4 を用いて蛍光免疫染色し、平均血管周囲長と平均血管内腔面積を計測し、胎盤での血管形成を比較検討した。

《結果》

1. 胎盤中の IGF2、sFlt1、VEGF の遺伝子発現は MisCar 群で有意に増加していた。SDF-1、PlGF の遺伝子発現は、N-Gest 群と MisCar 群で、ほぼ同程度であった。
2. 末梢血中の EPC 数は、Normal 群と N-Gest 群と MisCar 群、どの群においても有意差は認めなかった。
3. sFlt1(-)群に比し、sFlt1(+)群では培養 EPC の遊走能と増殖能が有意に低下していた。
4. sFlt1(-)群に比し、sFlt1(+)群で VEGF の遺伝子発現は、ほとんど変化がなかったのに対して、eNOS、SDF-1 の遺伝子発現は有意に低下していた。

EPC における CD31 の蛋白発現は、sFlt1 処理で明らかな変化を認めなかったことに對して、eNOS の蛋白発現は、その遺伝子発現と同じく sFlt1(+)群で有意に減少していた。これらの結果は、sFlt1 処理により EPC の内皮分化状態には影響を与えないものの eNOS の産生を阻害することで EPC の内皮機能を低下させることが示唆された。

5. EPC の胎盤への集積は、N-Gest 群に比べて MisCar 群で有意に増加していた。
6. 胎盤での平均血管周囲長と平均血管内腔面積は、N-Gest 群に比べて MisCar 群で有意に減少しており、MisCar EPC(+)群では、ほぼ N-Gest 群と同程度まで回復していた。

《結論》

本研究では、N-Gest 群の流産率が 5%であったのに対して MisCar 群では 20%以上であったが、EPC を移植することで MisCar 群の流産率を有意に減らすことができた。培養 EPC を尾静脈投与した胎盤の評価で、N-Gest 群と比較して MisCar 群で EPC の取り込みを多く認めた。また、胎盤での血管形成評価では、N-Gest 群に比較して MisCar 群で血管

のサイズが有意に小さかったが、EPC 移植により N-Gest 群と同程度にまで正常化される傾向が認められた。これらの所見は、流産に対して EPC を静脈内投与することによって胎盤の血管形成を正常化し、流産率を低下させることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

流産は妊娠において最も頻度の高い合併症のうちの一つであり、胎盤発生時期の血管形成と抗血管新生因子とのバランスが妊娠継続には不可欠である。骨髄由来の血管内皮前駆細胞（EPC）は、虚血性疾患に対して治療効果があるだけでなく、月経周期や子宮内膜の血管形成にも関与していると報告されている。本研究では、EPC の移植治療により胎盤血管新生を起こし、流産の頻度が減少するかどうかを反復流産マウスモデルを用いて検証するとともに、分子生物学的及び組織学的な解析によって、その機序の解明を試みたものである。

申請者は、まず反復流産マウスモデルを用いて流産率の検討と胎盤での SDF-1、IGF2、PlGF、sFlt1、VEGF の遺伝子発現を調べた。その結果、反復流産マウスモデルでの流産率は 26.2%であり、IGF2、sFlt1、VEGF 遺伝子が高発現していた。sFlt1 は反復流産および妊娠高血圧腎症において重要な因子の一つであり、VEGF を中和する物質として注目されている。妊娠初期に EPC を移植することにより胎盤での血管形成を促進し、流産を防止するという仮説を立て検証を行った。

本研究では、蛍光色素ラベルした EPC 移植によって MisCar 群の胎盤での EPC の集積増加と、EPC 移植による MisCar 群の血管の正常化が明らかになった。また、EPC を高濃度 sFlt1 処理することで遊走能と増殖能が減少したことが示され、移植後の EPC が胎盤で不活化される可能性が考えられた。EPC での eNOS 発現の減少は、NO の産生減少を引き起こし、脈管形成異常や流産を引き起こす可能性を示した。反復流産マウスモデルの胎盤で sFlt1 と VEGF が増加しているのは、sFlt1 の増加で VEGF 機能が阻害されることにより、反応性に VEGF 産生の増加することが原因と推測した。

本研究は、MisCar 群の流産率を外的な EPC 移植が有意に減少させることを明らかにしているが、EPC が sFlt1 による細胞機能抑制前に胎盤血管形成のプロモーターとして作用する可能性を示唆しており、臨床的に重要な知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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)

Cell transplantation 25(12): 2187-2197, 2016