

氏名	大門 篤史
(ふりがな)	(だいもん あつし)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1162号
学位審査年月日	令和3年1月29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	Intravenously Injected Pluripotent Stem Cell-Derived Cells Form Fetomaternal Vasculature and Prevent Miscarriage in Mouse (多能性幹細胞由来血管内皮様細胞 (PSC-EPs) の静脈内投与は、妊娠マウスの母仔間の血管形成を促し、流産を予防する)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 近藤 洋一 教授 小野 富三人

学位論文内容の要旨

《目的》

流産は、最も一般的な妊娠合併症で、約1%の女性が繰り返す(反復流産)と言われており、その予防は臨床的に重要な課題である。我々の研究グループは、骨髄由来血管内皮前駆細胞を自然発生の流産モデルマウス(♀: CBA/J × ♂: DBA/2)に移植し流産率が低下することを報告した。しかし、骨髄から細胞移植に必要な細胞数の採取が困難であり、本研究では多能性幹細胞(Pluripotent Stem Cell: PSC)から血管内皮細胞の性質を持つPSC由来血管内皮様細胞(PSC with endothelial potential: PSC-EPs)を流産モデルマウスに投与し、流産率の改善効果とそのメカニズムについて検討した。

《方法および結果》

1、CBA/J マウス受精卵から ES 細胞の分離培養

免疫拒絶反応が起こらないようにするため、母体と同系統の ES 細胞が必要であった。CBA/J マウスから樹立した報告がないため、CBA/J マウス同士を掛け合わせた受精卵から 5 個の ES 細胞株を樹立した。

2、樹立したマウス ES 細胞の解析

2-1) 核型解析検査

核型解析検査で 2 個の細胞株で正常核型 (40, XX) を確認した。

2-2) 未分化関連遺伝子の発現確認

ES 細胞から RNA を抽出し、RT-qPCR を行った。未分化関連遺伝子 (Nanog、Pou5f1、Zfp42) は、コントロールとなる以前に樹立した ES 細胞より高発現であった。

2-3) 胚様体形成による三胚葉への分化確認

ES 細胞から胚様体形成し、RNA を抽出後、RT-PCR で外胚葉 (Nestin)、中胚葉 (T)、内胚葉 (Gata6) の発現を確認し、in vitro で三胚葉への分化能力を確認した。

2-4) キメラマウスの作製

ES 細胞を注入した受精胚を偽妊娠 ICR マウスの子宮に移植し、産仔を得た。産仔の毛色を確認し、樹立した ES 細胞の寄与率 90%以上のキメラマウスが 1 匹、10%未満のキメラマウスが 5 匹生まれ、in vivo での分化能力を確認した。

3、ES 細胞から分化誘導した PSC-EPs の血管内皮細胞としてのフェノタイプの評価

3-1) 未分化関連遺伝子と血管内皮細胞関連遺伝子の発現確認

既知の分化プロトコルに変更を加え、ES 細胞を PSC-EPs へ分化誘導した。分化 1 日目から連日で RNA を抽出し、RT-qPCR を行った。未分化関連遺伝子 (Nanog、Zfp42、Pou5f1) の発現は分化 1 日目から低下した。血管内皮前駆細胞で誘導される遺伝子である血管内皮マーカー (Tal1、Egr4) は、分化 2~4 日目に発現が増加した。

3-2) 血管内皮細胞としての性質の評価

分化 4 日目の細胞で免疫染色を行い、CD34・CD31・VE-Cadherin が陽性であった。フローサイトメトリーで、CD31 陽性細胞は $12.75 \pm 1.2\%$ であった。4 日目の分化細胞が

Ac-LDL を取り込むことと、マトリゲル上でチューブ様形成をすることを確認できたため、PCS-EPs とした。

4、PSC-EPs による流産率の改善効果とそのメカニズムの検討

4-1) 胎盤血流への影響

胎盤に到達する血液量を調べるために、妊娠 7.5 日目に妊娠 CBA/J マウスに PSC-EPs (5×10^5 個/PBS 150 μ l) または PBS (150 μ l) を尾静脈投与した。妊娠 10.5 日目に蛍光標識デキストランを尾静脈投与後、安楽死させ胎盤を摘出した。PBS 群では、31%の胎盤でデキストラン流入の減少による蛍光強度の低下が見られたが、PSC-EPs 群では、10%以下に減少しており、胎盤への血液供給量が増加したことが示唆された。

4-2) 流産率・血管新生因子の検討

妊娠 14.5 日目に安楽死させ、検討した。流産率は、PBS 群 $27.3 \pm 4.17\%$ 、PSC-EPs 群 $7.8 \pm 2.86\%$ と PSC-EPs 群で有意な流産率の低下 ($p < 0.01$) を認めた。流産率は、胎盤の低灌流を示す胎盤の割合に近似していた。胎盤の RT-qPCR で血管新生因子 (sFlt-1、Vegfa、Plgf、Flk1) を、ELISA 法で血漿中の sFlt-1 濃度を測定したが、PBS 群と PSC-EPs 群で有意な変化は見られなかった。

4-3) 胎仔母胎血管の評価

GFP (green fluorescent protein) を導入したマウス ES 細胞を作製し、PCS-EPs に分化させ使用した。妊娠 14.5 日目に安楽死させ、妊娠子宮を摘出した。組織透明化技術を用いて妊娠子宮の透明化を行い、血管マーカー (CD31) で染色後、共焦点顕微鏡で 3 次元再構築を行った。PSC-EPs 群で、PBS 群と比較しらせん状形態の血管数と血管の直径が有意に増加し (血管数: 32 ± 5.3 , 19 ± 1.7 ($p < 0.05$))、血管の直径 (μ m) : 33.7 ± 15.6 , 21.0 ± 10.9 ($p < 0.01$))、血管は全長に渡って GFP が認められた血管と、GFP(+) の領域と GFP(-) の領域がモザイクになった血管があった。

《考 察》

1、上記結果より、今回樹立したマウス ES 細胞は高品質であると考えられる。

- 2、上記結果より、ES 細胞から分化開始 1 日目に多能性状態から脱出し始めており、分化 4 日目で血管内皮系に分化していた。また、分化 4 日目の細胞の大部分が血管内皮細胞の性質を持っていることを示しており、PSC-EPs として妥当であると考えられる。
- 3、GFP を導入した PSC-EPs 投与の実験で、らせん状の形態をした血管数と血管の直径が有意に増加していたことから、着床後に見られる血管リモデリングが促進されたことが示唆され、さらに、血管が GFP 陽性であったことから、投与した PSC-EPs がらせん状血管に直接取り込まれたものと考えられる。

《結 論》

我々が使用した流産モデルマウスに PSC-EPs を投与すると、胎盤への血液供給量の増加と血管リモデリングの促進が見られ、流産率を低下させた。骨髄から採取した EPC を治療に用いる方法では、治療に必要な細胞数を確保することが困難であるが、PSC-EPs を用いれば、必要な細胞数を準備するのは容易であり、本研究は将来的な流産治療への前進に繋がるものと考えられる。

論文審査結果の要旨

流産は、最も一般的な妊娠合併症で、約 1%の女性が繰り返す（反復流産）と言われており、その予防は臨床的に重要な課題である。申請者らの研究グループは、マウス骨髄由来血管内皮前駆細胞を自然発生の流産モデルマウス（♀: CBA/J × ♂: DBA/2）に移植し、流産率が改善することをすでに報告している。しかし、骨髄から細胞移植に必要な細胞数を採取するのは困難なため、臨床応用が難しい。本研究は、移植に必要な細胞数の確保が容易であるマウス多能性幹細胞（PSC）を用いて、血管内皮細胞の性質を持つ PSC 由来細胞（PSC-EPs）を同モデルマウスに投与し、治療効果を検討したものである。

申請者らはまず、免疫拒絶反応が起こらないように、CBA/J マウスの ES 細胞の樹立を行い、ES 細胞であることの証明をした。樹立した ES 細胞を用いて PSC-EPs への分化プロトコルを検討し、血管内皮細胞の性質を持つ PSC-ECs を誘導した。同モデルマウスの胎盤を調べると、低灌流を示す胎盤の割合が高く、これが流産率に近似することを見出し、さらには、妊娠 CBA/J マウスに PSC-EPs を投与することで流産率の低下と同時に低灌流を示す胎盤の割合が減少することも確認した。組織透明化技術を用いて妊娠子宮を透明化し、3次元再構築を行った。GFP でラベルした PSC-EPs 投与群でらせん状の血管数の増加と血管の直径の拡張が認められた。また、この血管は GFP 陽性であり、投与した PSC-EPs に由来することが判明した。RT-qPCR 法と ELISA 法で複数の血管新生因子の発現を確認したが、これら因子の有意な変化は見られなかった。

以上の結果より、ES 細胞由来の PSC-EPs の投与が、胎盤における血管新生に関わる因子の発現に影響を与えずに、胎盤形成と胚発生を維持するために必要な血液量を供給する胎仔母胎血管系を確立し、流産率を低下させたことを示唆しており、将来的な流産治療への前進に繋がる研究成果であると考えられる。

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)

doi: 10.1177/0963689720970456.