

令和元年6月28日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11119

研究課題名(和文) 子宮胎盤形成不全症の新たな治療～骨髄由来内皮前駆細胞の血管形成と新規抗凝固薬～

研究課題名(英文) The New therapy of placental insufficiency ~ Endothelial progenitor cells for angiogenesis and new anticoagulant therapy

研究代表者

神吉 一良 (Kanki, Kazuyoshi)

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30770911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：反復流産マウスの胎盤は、移植された血管内皮前駆細胞(EPC)を多く取り込むことで血管形成を正常化し、流産率を有意に減らすことが示唆された。また反復流産モデルマウスからES細胞を樹立し、ES細胞由来EPC様細胞へ分化誘導させることに成功した。またES細胞由来EPC様細胞を反復流産モデルマウスへ投与することで流産率を有意に改善することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

流産を繰り返し生児獲得が困難な患者自身より、培養した血管内皮前駆細胞を妊娠初期に自家移植すれば、再生医療による流産予防の新たな治療として期待ができる。今回の研究成果は、流産患者や子宮胎盤形成不全症の新たな治療の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Endothelial progenitor cells (EPC) were transplanted into abortion / hypertensive disorder of pregnancy model mice. The results showed that systemic EPC transfusion significantly reduced the rate of miscarriage, and EPCs were frequently observed in the miscarriage placenta. ES-like cells could be established from abortion / hypertensive disorder of pregnancy model mice. From the ES-like cells and human iPS cells, conditions for inducing differentiation into vascular endothelial progenitor cells could be established. A large amount of vascular endothelial progenitor cells could be generated.

研究分野：産婦人科

キーワード：不育症 ES細胞 胎盤形成不全症 血管内皮前駆細胞 妊娠高血圧腎症モデルマウス 流産モデルマウス iPS細胞 子宮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。一方、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。こういった背景から我々は、EPC をマウスに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、流産を防止するのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

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。またマウス ES 細胞から EPC-like cell を分化誘導し、EPC としての特性解析を行った後に、反復流産マウスへ投与することで流産率を非投与群と比較・検討した。

3. 研究の方法

- (1)反復流産マウスモデル (MisCar 群) と正常妊娠マウスにおいて、胎盤での SDF-1、IGF2、PlGF、sFlt1、VEGF の遺伝子発現と、末梢血中の EPC 数を検討した。
- (2)EPC を高濃度 sFlt1 処理することで胎盤での EPC の遊走能と増殖能について検討した。
- (3)蛍光色素ラベルした EPC 移植によって MisCar 群の胎盤での集積を検討した。
- (4)反復流産モデルマウスから ES 細胞を樹立し、樹立した ES 細胞を解析する。
- (5)反復流産モデルマウスの ES 細胞から EPC 様細胞を分化させる。
- (6)分化させた EPC 様細胞を妊娠した反復流産モデルマウスへ投与し、流産率を検討する。

4. 研究成果

- (1) 反復流産マウスモデル (MisCar 群) における流産率は 26.2%であり、胎盤での SDF-1、IGF2、PlGF、sFlt1、VEGF の遺伝子発現は、正常妊娠群 (N-Gest 群) の胎盤と比較して IGF2、sFlt1、VEGF 遺伝子が高発現していた。
- (2)末梢血中の EPC 数は、非妊娠群 (Normal 群) と N-Gest 群と MisCar 群、どの群においても有意差を認めなかった。
- (3) 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。さらに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。

(4) 妊娠反復流産マウスより受精卵を採取し、胚盤胞期に体を構成する全種類の細胞に分化する能力を備えた内部細胞塊を培養し、ES細胞を樹立した。そのES細胞を転写因子であるOct-4、Nanog、REX-1の発現を確認した。

(5) ES細胞からEPC様細胞に分化させた後にフローサイトメトリーで表面抗原マーカーを確認した。

(6) 分化させたEPC様細胞を妊娠した反復流産モデルマウスへ投与し、流産率が低下したことを確認した。

以上の結果から反復流産マウスの胎盤は、移植されたEPCを多く取り込むことで血管形成を正常化し、流産率を有意に減らすことが示唆された。また反復流産モデルマウスからES細胞を樹立し、ES細胞由来EPC様細胞へ分化誘導させることに成功した。またES細胞由来EPC様細胞を反復流産モデルマウスへ投与することで流産率を有意に改善することを確認した。ヒトにおいてもマウスと同じくEPCが存在するため、流産を繰り返し生児獲得が困難な患者自身より、培養したEPCを妊娠初期に自家移植すれば、再生医療による流産予防の新たな治療として期待ができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kanki K, Ii M, Terai Y, Ohmichi M, Asahi M.

Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Reduce Recurrent Miscarriage in Gestation. *Cell Transplant*. 2016 Dec 13;25(12):2187-2197.

doi: 10.3727/096368916X692753. Epub 2016 Aug 5. PubMed PMID: 27513361. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

大阪医科大学 産婦人科、大阪医科大学 薬理学

大門 篤史、友田 紀一郎、佐野 匠、藤田 太輔、寺井 義人、朝日 通雄、大道 正英

ES細胞由来血管内皮前駆細胞様細胞を用いた反復流産・妊娠高血圧腎症モデルマウスに対する流産率の検討

第39回日本妊娠高血圧学会 2018年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：林 正美

ローマ字氏名：HAYASHI, masami

所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00551748

研究分担者氏名：大道 正英
ローマ字氏名：OHMICHI,masahide
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：10283764

研究分担者氏名：林 篤史
ローマ字氏名：HAYASHI,atsushi
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：非常勤医師
研究者番号（8桁）：80411338

研究分担者氏名：寺井 義人
ローマ字氏名：TERAI,Yoshi to
所属研究機関名：神戸大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：90278531

研究分担者氏名：藤田 太輔
ローマ字氏名：FUJITA,daisuke
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：90411371

研究分担者氏名：鈴木 裕介
ローマ字氏名：SUZUKI,yusuke
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：非常勤医師
研究者番号（8桁）：90770925

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。