

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20791174

研究課題名（和文） 胎盤由来細胞を用いた血管内皮細胞培養システムの確立

研究課題名（英文） Establishment of vascular endothelial cell culture system using human placental cells

研究代表者

牧野 初音（MAKINO HATSUNE）

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号：90392498

研究成果の概要（和文）：

冠動脈疾患、虚血、肺高血圧、脳血管疾患、小児重症心不全症といった様々な疾患の予防と細胞治療に適した細胞の単離・培養・臨床応用へ向けたシステムの開発を目標として本研究を行った。その結果、胎盤に付属する羊膜に由来する細胞から拍動する心筋細胞を作り出すことに成功した。さらに、羊膜および胎盤の一部に由来する細胞、胎盤の血管に由来する細胞を用いて骨格筋を再生させることにも成功した。

研究成果の概要（英文）：

This study was performed to isolate novel cells useful for prevention of various cardiovascular diseases and to develop clinical application of these cells. I demonstrated that cells derived from human amniotic mesoderm, chorionic plate, and villous chorion efficiently transdifferentiated into myotubes, and I demonstrated that human amniotic membrane-derived MSC had a high ability to transdifferentiate into cardiomyocytes. Moreover, I revealed that human placental artery-derived endothelial cells efficiently transdifferentiated into myoblasts/myocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医療、発生・分化、発現制御

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担う。臨床においては、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に骨髄移植と同時に骨髄間質細胞の移植が行われ、細胞治療の供給源としての利用は心不全・心筋梗塞の新しい治療法として細胞を用いた再生治療が注目されている。現時点では、骨格筋芽細胞、骨髄細胞、内皮前駆細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。また、安全面や倫理面の問題から細胞移植の臨床応用は分野が非常に限られていた。

2. 研究の目的

“細胞を獲得するために健常部の損傷や疼痛を伴うことがない”、“同一種類の細胞が大量に調整できる”、“患者の性別を問わない”、以上の項目を満たす細胞を得ることを目標に研究を進める中、近年、胎盤には多分化能を有する幹細胞が含まれることや胎盤由来間葉系幹細胞の樹立が報告されたことから、新規の細胞供給源の1つとして胎盤が候補として浮上した。

したがって、本研究では①ヒト胎盤由来細胞の血管新生能および多分化能の検討、臨床応用へ向けた培養方法の確立と②ヒト胎盤由来細胞のヒトへの移植法の臨床的実現化、以上の2項目を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒト胎盤由来細胞の規格化

娩出後のヒト胎児付属物(図1、図2)より胎盤由来細胞を分離・培養を行う。得られたヒト胎盤由来細胞に対して、網羅的発現遺伝子プロファイリング解析(Affimatrix社 GeneChipによる解析)ならびに抗体を用いた免疫染色、および表面抗原解析を行う。使用する抗体には、血管内皮細胞マーカー、動脈血管内皮細胞マーカーを含む。血管新生関連分子については既知分子について発現様式を整理する。



図1 ヒト胎児付属物

娩出後の胎盤。直径 15~20cm、厚さ 2~3cm、重さ 500~600g、形 円盤状。

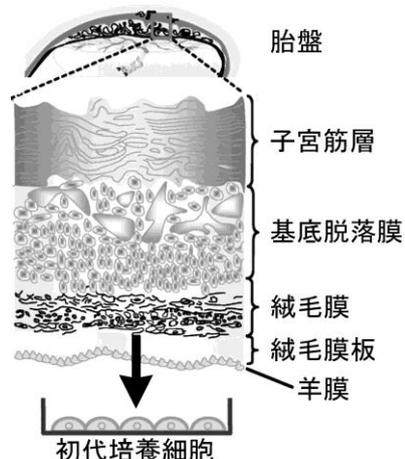


図2 ヒト胎盤の模式図

(2)異種動物成分を排除した培養法・維持法の標準化(完全ヒト型培養システムの開発)

ヒト胎盤より作成したヒト胎盤由来細胞を間葉系幹細胞の供給源とする。研究協力者の梅澤は des4、H3-2 および UBET-15 等 10 種類以上をヒト間葉系細胞として得ている。研究機関内に新たなヒト胎盤由来細胞の分離・培養を行う。その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発を目指す。

(3)ヒト胎盤由来細胞を用いた治療基盤の確立

ヒト胎盤由来細胞の血管、神経、骨、軟骨、脂肪を初めとする多分化能検定、および独自システムの開発ならびに情報収集を行う。ヒト胎盤由来細胞の多分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と血管新生能の評価、および免疫不全動物(NOD/SCID/IL-2 γ ^{-/-})への移植による生着、血管新生、機能発揮に関する検討を開始する。樹立したヒト胎盤由来細胞に蛍光遺伝子を導入することで、移植したヒト胎盤由来細胞の生体内での挙動を把握する。

(4)ヒト胎盤由来細胞の多分化能検定システムの構築

培養系ならびに動物個体による解析を継続し、細胞・組織形態解析、機能分子解析ならびに細胞外マトリックス形成能解析等を行い、適切な分化制御法の確立、個体への投与ルートと移植細胞数等の検討を行う。さらに、ヒトに対する臨床応用を目指すために、イヌ、ブタ、ウシといった大動物において、具体的なドナー細胞の移植法を検討する。

4. 研究成果

(1)ヒト胎盤由来細胞の規格化

新規に得られた胎盤を利用してヒト胎盤由来細胞を樹立した(図3)。それらヒト胎盤由来細胞に対して網羅的発現遺伝子プロファイリング解析(Affimetrix社 GeneChipによる解析)ならびに抗体を用いた免疫染色、および表面抗原解析を行った。使用する抗体には、血管内皮細胞マーカーとして知られている CD31、CD54、CD144、CD106、VEGF-R2(Flk-1)、Flt-1、動脈血管内皮細胞マーカー(CXCR4、CD44)、造血幹細胞マーカー(CD34)等の各種細胞特異的マーカーを用いた(図4)。最終的には発現遺伝子解析結果と表面抗原解析結果を統合しヒト胎盤由来細胞の規格化を図ると同時に、継代や分化に従って変動する傾向を示す遺伝子と細胞表面抗原を明らかにした。

また、研究期間に得られた発現遺伝子解析結果と表面抗原解析結果を統合し再解析することにより、個人に左右されないヒト胎盤由来細胞の規格化を図った。

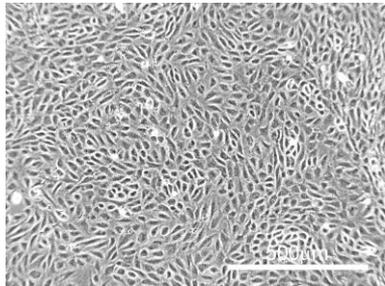


図3 ヒト胎盤由来細胞

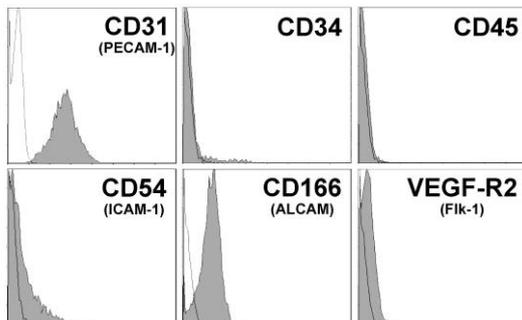


図4 ヒト胎盤由来細胞の表面抗原解析

ヒト胎盤由来細胞は血管内皮細胞マーカー(CD31、CD54、VEGF-R2)陽性、血管内皮先駆細胞マーカー(CD34)陽性、中胚葉性血管芽細胞マーカー(CD166)陽性、血球マーカー(CD45)陰性を示した。

(2) 異種動物成分を排除した培養法・維持法の標準化(完全ヒト型培養システムの開発)

ヒト胎盤由来細胞を細胞株樹立直後の状態に保つための維持培養に必須の要素(培養

液、添加因子、培養基材)について検討を行った。研究期間中に7検体についてヒト胎盤由来細胞の分離・培養を行った。ヒト間葉系幹細胞の完全ヒト型培養システムを完成させるために、ヒト胎盤由来細胞ならびに液性因子からなる閉鎖系培養ユニットの開発にも着手し始めた。

(3) ヒト胎盤由来細胞を用いた治療基盤の確立

ヒト胎盤由来細胞の多分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と血管新生能の評価、および重度免疫不全動物(NOD/SCID/IL-2R γ ノックアウトマウス)への移植による生着、血管新生、機能発揮、組織構築能に関する検討を行った。

また、羊膜(Tsuji, Makino et al., Circ Res., 2010)(図2)に由来する細胞から拍動する心筋細胞をつくりだすことに成功した。さらに、羊膜および胎盤の一部(Kawamichi, Makino et al., J Cell Physiol., 2010)(図2)、胎盤の血管(Cui, Makino et al., Hum Mol Genet., 2011)に由来する細胞を用いて骨格筋を再生させることにも成功した。また、胎盤の血管に由来する細胞が従来の血管内皮細胞の特性を示し、*in vivo*において活発に血管新生を行うことが確認できた。以上の結果は胎盤・羊膜に由来する細胞が心不全・心筋梗塞の細胞治療のソースとして非常に有用であることを示すと同時に、胎盤には成人組織を再生する能力をもつ幹細胞や前駆細胞が存在する可能性を強く示唆するものであった。

また、GFP陽性ブタの胎児付属物(胎盤、羊膜、臍帯)に由来する細胞の樹立にも成功したことから(図5)、ヒト胎盤由来細胞やヒト羊膜細胞のヒトへ臨床応用の実現の時期はそれほど遠いものではないと考えられる(図6)。

胎盤や羊膜を細胞治療の細胞ソースとして利用することは、従来医療廃棄物として扱われてきた胎盤や羊膜を有効活用することにもつながり、自己の細胞を用いたより安全で侵襲性が極めて低い新しい再生医療の実現化につながると確信している。

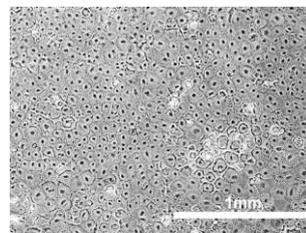


図5 ブタ胎盤由来細胞

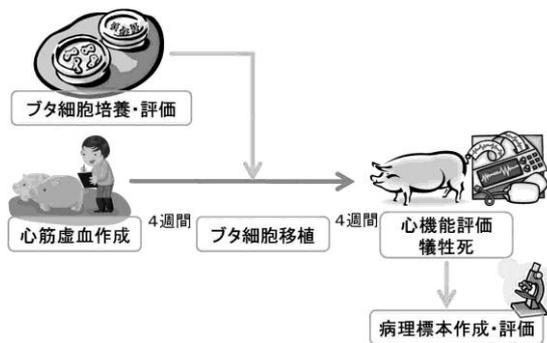


図6 心筋虚血モデルでのブタ細胞移植

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

①Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A. Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 20(2):235-44. 2011.

②Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. PLoS One. 5(9):e13017. 2010.

③ Umezawa A, Makino H. [Isolation and Culture of Human Mesenchymal Stem Cells]. Organ Biology. 17(1): 67-75. 2010.

④Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. Circ Res. 106(10):1613-23. 2010.

⑤Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. J Cell

Physiol. 223(3):695-702. 2010.

⑥Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T.

Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. Genes Cells.;14(12):1395-404. 2009.

⑦Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. PLoS One. 3(11):e3709. 2008

⑧Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. PLoS One. 3(6):e2407. 2008

⑨梅澤明弘、牧野初音、細胞ソースの確立、日本臨床(特集:再生医学と医療—幹細胞の基礎研究と臨床の進歩)、Vol. 66、5巻、2008、pp865-872

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 初音 (MAKINO HATSUNE)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号: 90392498

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: