

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18206

研究課題名（和文）妊娠高血圧腎症・不育症に対する新たな治療～ヒトiPS細胞を用いて～

研究課題名（英文）Intravenous Injection of iPS Cell-Derived Endothelial Progenitor Cells Prevents Miscarriage by Releasing Pro-Angiogenic Factors in a Mouse Model of Recurrent Spontaneous Abortion

研究代表者

大門 篤史（Daimon, Atsushi）

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：20846894

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：hiPS細胞より分化誘導した細胞は、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。流産モデルマウスへの尾静脈投与では、細胞が胚付近の血管内に一時的に局在し、血管新生促進因子を産生することによってマウス胎盤におけるVEGF・PIGF発現の改善に関与し、血管新生を促し流産率を改善させる可能性が高い。また妊娠7.5日目のマウス胚の大きさ、数に有意差はなく、妊娠10.5日目にはPBS群で有意に異常胚が増加したことから、hiPS-EPCによる効果は投与直後ではなく、胎盤形成初期にかけて発揮され、以降の胎盤成熟および胎児発育に関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hiPS-EPCの静脈投与によって、流産モデルマウスの胎盤におけるVEGF・PIGFの発現が増加し、流産率が減少した。これらの結果は、静脈内投与により妊娠胚に到達したhiPS-EPCが、血管新生促進因子を産生することで、マウス胎盤における血管新生促進因子発現も改善し、流産を減少させる可能性を示唆するものであり、流産に対する治療法の確立に期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether human induced pluripotent stem cell-derived EPCs (hiPS-EPCs) could improve abortion rates in a mouse model of recurrent spontaneous miscarriage. Intravenous transplantation of hiPS-EPCs significantly reduced abortion rates. To elucidate the mechanism by which miscarriages were ameliorated, we investigated whether the cells were preserved in the embryos. We differentiated GFP-labeled iPSCs into EPCs (GFP-EPCs), and intravenously injected them into the model mouse. Whole-mount immunostaining analysis showed the presence of injected cells expressing GFP in the uterine vasculature adjacent to the embryos from mice injected with GFP-EPCs. Furthermore, the gene expression of fluid factors such as VEGF and PIGF was increased in the placentas of mice implanted with hiPS-EPCs. These data indicate that hiPS-EPC transplantation therapy may reduce miscarriage via transplanted cells that remain in the uterine vasculature and secrete pro-angiogenic factors.

研究分野：周産期

キーワード：流産モデルマウス iPS細胞 血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者は、血管内皮細胞を含むマウス多能性幹細胞由来細胞群 (マウス PSC-EPs) を自然発生
の不育症・妊娠高血圧腎症 (preeclampsia, PE) モデルマウスに移植すると、胎仔母胎血管が増加
し、流産率が低下することを明らかにした。このモデルマウスに血管内皮細胞を含むヒト iPS 細
胞由来細胞群 (ヒト PSC-EPs) を移植しても流産率が低下する傾向をつかんだ。本研究では、今
後の臨床応用へ向け、この不育症・PE モデルマウスに対するヒト PSC-EPs の治療効果を確定さ
せ、さらにヒト PSC-EPs 投与の安全性、そして、その作用機序を解析する。これらの解析から、
ヒト不育症・PE の有効な治療法確立の一步とする。

2. 研究の目的

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、胎盤形成は胎児発育に必要不可欠であり、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、
既存の血管において血管新生促進因子によって促される血管新生の 2 つのプロセスが存在する。
両者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、これまでも多くの血管再生療法に関する研究で使用されてきた。我々の研究グループは、
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、胚性幹細胞の使用は倫理面での問題があった。本研究では、今後のさらなる臨床応用を見
据え、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。

3. 研究の方法

(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 雄マウスと交配させ、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生体内での 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、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・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、胚の評価を行った。さらに 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
いて子宮における血管形成の 3 次元構築を行った。

(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。まず hiPS-EPC から RNA を抽出し、胎盤形成において重要な血管新生促進因子である VEGF・PlGF の発現レベルを RT-qPCR を用いて hiPS 細胞と比較評価した。さらに hiPS-EPC が胎盤形成にどのように関与し、流産率を改善させるかを検討するために hiPS-EPC または PBS 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 の発現レベルを評価した。

4. 研究成果

(1) hiPS 細胞からの EPC の分化誘導および細胞特性解析

多能性マーカー (Oct-4・Nanog) は分化 2 日目より有意に低下した。また EPC 関連マーカー (CD31・CD34・KDR) は分化 5 日目より有意に増加した。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

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 投与後のマウス胚の変化と生体内での GFP-EPC の局在同定

GFP-EPC または PBS 投与 3 時間後では、すべての胚はほぼ同じ大きさで、両群の胚数に差は見られなかった。投与 72 時間後 (妊娠 10.5 日目) では GFP-EPC 群で PBS 群と比較して胚が大きかったが、PBS 群では一部の胚が小さく、出血を伴っていた。このような異常胚は GFP-EPC 群で有意に少なかった ($P=0.026$)。また組織透明化技術および免疫染色法を用いて行った 3 次元血管構築および観察において、GFP-EPC 群では投与 3 時間後に CD31 染色で可視化された、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、子宮、胚、胎盤のいずれにおいても GFP 染色細胞は検出されなかった。

(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

hiPS-EPC では hiPS 細胞と比較して 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 群でマウス由来 VEGF・PlGF の発現が有意に増加していた。

以上の結果より、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、細胞が胚付近の血管内に一時的に局在し、血管新生促進因子を産生することによってマウス胎盤における VEGF・PlGF 発現の改善に関与し、血管新生が促されることで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 PBS 群で有意に異常胚が増加したことから、hiPS-EPC による効果は投与直後ではなく、胎盤形成初期にかけて発揮され、以降の胎盤成熟および胎児発育に関与すると考えられる。

我々は、hiPS-EPC の静脈投与によって、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 は原因不明の流産に対する治療として、期待できると考えた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1 . 著者名 Natsuko MORITA, Hirofumi MORIHARA, Kazumasa MORIWAKI, Atsushi DAIMON, Michio ASAHI, and Masahide OHMICHII	4 . 巻 69
2 . 論文標題 Intravenous Injection of iPS Cell-Derived Endothelial Progenitor Cells Prevents Miscarriage by Releasing Pro-Angiogenic Factors in a Mouse Model of Recurrent Spontaneous Abortion	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Bulletin of Osaka Medical and Pharmaceutical University	6 . 最初と最後の頁 21-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------