

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670720

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来の血管構成細胞を用いたらせん動脈リモデリング機序の解明

研究課題名(英文) Exploration of mechanisms involved in spiral artery remodeling using human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells

研究代表者

近藤 英治 (Kondoh, Eiji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10544950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞とヒト不死化絨毛外絨毛細胞を接触条件下で24時間培養し、それぞれの細胞をフローサイトメーターで分別・回収した。ヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞の単独培養では生細胞が79.7%であったのに対し、共培養中のヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞の生細胞は49.7%と減少傾向にあった。また、ヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞の単独培養ではCD144陽性細胞が69.8%であったのに対し、共培養中のヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞のうちCD144陽性細胞は37.0%と減少傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：Direct-contact co-culture of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells adhered to immortalized extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells decreased cell viability of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells (79.7% versus 49.7%) as well as populations of CD144 positive cells.

研究分野：医歯薬学・産婦人科学

キーワード：ヒトiPS細胞 血管内皮細胞 不死化EVT 妊娠高血圧症候群 母体子宮らせん動脈リモデリング不全

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (PIH) の発症機序として推定されている有力な説は、妊娠初期の胎盤形成期に絨毛外栄養膜細胞 (EVT) が母体子宮らせん動脈内腔に沿って侵入することにより血管内皮細胞/壁細胞が消失し EVT が血管構成細胞に取って代わるというリモデリングが十分におこらず、胎盤への血流減少に起因する病的胎盤から放出される様々な因子が血管内皮や臓器を障害するというものである。本研究では、連携研究者の研究室が開発した iPS 細胞由来の血管構成細胞 (内皮細胞/壁細胞) (Taura et al.2009) に着目し、内皮細胞/壁細胞と EVT の相互作用に焦点をあて、子宮らせん動脈リモデリングの機序を解明するという着想に至った。

子宮らせん動脈のリモデリングの研究は、従来、内皮細胞として主に臍帯から回収した静脈内皮細胞 (HUVEC) が用いられてきた。しかし、HUVEC は成熟した血管内皮細胞であり妊娠初期の絨毛に栄養や酸素を供給するために新生する血管の代替材料としては不適と考えられる。胎盤形成の種差ゆえに、リモデリング機構を動物モデルで検討することは意義が乏しく、また正常妊娠における初期の脱落膜内の血管内皮細胞を採取することは手技的にも倫理的にも困難であり、子宮らせん動脈のリモデリングを解明するための実験材料を入手できないというのが現状であった。

周産期領域では iPS 細胞由来の血管構成細胞を用いた報告は皆無であり、本研究で用いる手法はラセン動脈リモデリングの機序を解明する新しいモデルとなる可能性がある。本研究で得られる知見は、未だ有効な治療法のない重篤な妊娠合併症である PIH の予防や治療法の開発に繋がることが期待され、周産期予後の改善や周産期医学の向上に寄与するところが大きいと考える。

2. 研究の目的

妊娠高血圧症候群 (PIH) は病的胎盤が引き起こす重篤な妊娠合併症である。しかし、PIH 発症の根源と推定されている妊娠初期の絨毛外栄養膜細胞 (EVT) による母体子宮らせん動脈の置換 (リモデリング) 不全については、妊娠初期に脱落膜内の血管の細胞を採取することが困難なこともあり、その機序はほとんど明らかになっていない。

本研究では、連携研究者が開発したヒト iPS 細胞由来の血管細胞 (内皮細胞/壁細胞) を用い、内皮細胞/壁細胞と EVT の相互作用に焦点を当て、両者が接触することにより生じる 1) 遺伝子発現・細胞内シグナリング伝達の変化を検討し、それらの 2) 機能および 3) 制御機構を解明することにより、子宮らせん動脈リモデリングの機序を明らか

にし、PIH の予防や治療法の開発を目指す。

EVT が自己の生着・増殖に有利な環境を得るために子宮らせん動脈をリモデリングしていく過程において、母体側では子宮脱落膜内に母体血管の新生が生じ、一方で EVT がその新たに生じた母体血管の内皮細胞を置換していくという協調した双方向の働きがあると考えられる。本研究ではヒト iPS 細胞から分化誘導させた血管内皮細胞を用いることで、絨毛細胞と血管内皮細胞の両者の相互作用を解明することができるようになる。本研究ではヒト iPS 細胞から分化誘導させた血管壁細胞も使用する。新生血管は VEGF による血管内皮の遊走に引き続き、血管壁細胞が遊走し内皮細胞を裏打ちすることで安定する。血管壁細胞を伴わない血管内皮細胞はアポトーシスを起こすことが知られており、血管新生において血管壁細胞は重要な役割を果たしている。EVT が子宮らせん動脈をリモデリングする際には EVT が母体血管の内皮細胞のみならず壁細胞も置換することが知られており、本研究では EVT と壁細胞の相互作用についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞と不死化 EVT の共培養における遺伝子発現変化

接触/非接触条件での共培養、不死化 EVT 単独、ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞単独の 4 条件で培養した細胞における遺伝子発現を比較する。

不死化 EVT は広く研究で使用されている HTR/SVneo を Charles Graham 教授 (Queen 's University) より提供を受け、既に実験に使用している。

不死化 EVT には事前に GFP が遺伝子導入されており、接触条件下の共培養ではヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞を CD144 抗体を用いて蛍光染色後、フローサイトメーターを用いそれぞれの蛍光で標識した細胞を分別・回収する。回収した細胞から mRNA を抽出し、リモデリングに重要と考えられている MMPs やアポトーシス関連遺伝子、血管内皮細胞マーカー、壁細胞マーカーの発現変化を検討する。また、4 条件で培養した細胞の遺伝子発現を網羅的に解析するため、DNA マイクロアレイ解析を行う。

(2) ヒト iPS 細胞由来の血管壁細胞と不死化 EVT の共培養における遺伝子発現変化

ヒト iPS 細胞由来の血管壁細胞についても (1) と同様の実験を行う。

(3) 血管内皮細胞/壁細胞と不死化 EVT の相互作用により生じる細胞内シグナル伝達の変化 (1) に記載した 4 条件にて培養

した細胞検体の遺伝発現データを single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA)を用い、それぞれの検体ごとに 9707 個の pathway(Molecular Signature Database 3.1 より入手)をスコア化する。それぞれの培養条件において有意にスコアが増減する pathway を抽出する。

(4) 血管内皮細胞/壁細胞と不死化 EVT との相互作用により生じる細胞の動きや形態変化

ヒト iPS 由来血管内皮細胞と不死化 EVT を接触共培養した場合のそれぞれの細胞の動きや形態変化を、インキュベーターと蛍光顕微鏡が一体化したタイムラプスイメージングシステムを用い観察する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞と不死化 EVT の共培養における遺伝子発現変化

ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞と不死化 EVT を接触条件下で 24 時間培養し、それぞれの細胞をフローサイトメーターで分別・回収した。ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞の単独培養では生細胞が 79.7%であったのに対し、共培養中のヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞の生細胞は 49.7%と減少傾向にあった。

また、ヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞の単独培養では CD144 陽性細胞が 69.8%であったのに対し、共培養中のヒト iPS 細胞由来の血管内皮細胞のうち CD144 陽性細胞は 37.0%と減少傾向にあった(図 1, 2, 3)。

図 1 iPS 細胞由来の血管内皮細胞の単独培養

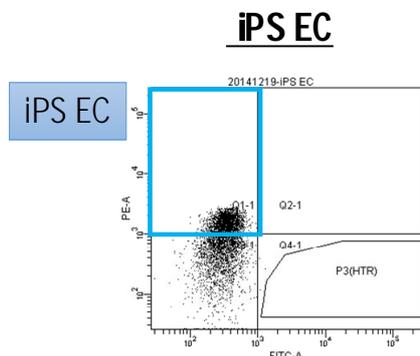


図 2 iPS 細胞由来の血管内皮細胞と絨毛細胞の共培養

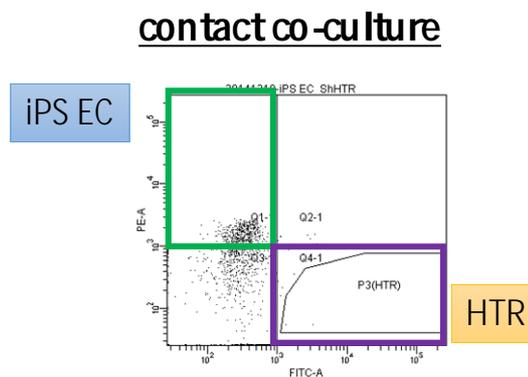
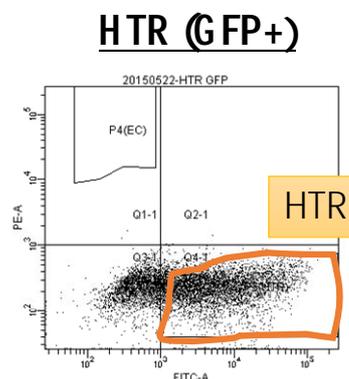


図 3 絨毛細胞の単独培養



ヒト iPS 由来の血管内皮細胞は、培養開始前に CD144 が陽性であった細胞のみを分離して使用している。単独培養条件でも 24 時間後には CD144 陽性率が減少しており、時間経過とともに血管内皮としての性質が消失していく可能性が考えられた。さらに、不死化 EVT との共培養では単独培養より生細胞率、CD144 陽性率ともに減少しており、不死化 EVT との接触により血管内皮としての性質が減じていく可能性が考えられた。なお、同実験は 2 回行い同様の傾向が示されている。今後実験を重ね検討していきたいと考えている。

共培養後に分別・回収した細胞からは mRNA 抽出を試みたが、抽出量が少なく関連遺伝子の解析やマイクロアレイ解析にまでは至っていない。共培養後に効率よく mRNA を抽出する方法につき検討中である。

(2) ヒト iPS 細胞由来の血管壁細胞と不死化 EVT の共培養における遺伝子発現変化

血管内皮細胞の実験成果を確認後着手する予定である。

(3) 血管内皮細胞/壁細胞と不死化 EVT の相互作用により生じる細胞内シグナル伝達の変化

共培養後の細胞より十分な mRNA を抽出することができ、DNA マイクロアレイ解析を行ってから ssGSEA を行う予定である。

(4) 血管内皮細胞/壁細胞と不死化 EVT との相互作用により生じる細胞の動きや形態変化

共培養下の iPS 由来血管内皮細胞と不死化 EVT の識別方法につき現在検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 英治 (KONDOH, Eiji)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10544950

(2) 研究分担者

最上 晴太 (MOGAMI, Haruta)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40378766

(3) 研究分担者

小西 郁生 (KONISHI, Ikuo)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90192062

(4) 連携研究者

曽根 正勝 (SONE, Masakatsu)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40437207