

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19664

研究課題名(和文) ヒト羊膜上皮の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying amniotic epithelium homeostasis

研究代表者

浅井 哲 (ASAI, Satoshi)

東海大学・医学部・客員講師

研究者番号：70383867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト羊膜上皮の恒常性は様々な側面から維持されている。今後の研究進展の基盤となる以下の結果を得た。母児免疫に関わるHLA-G mRNAに羊膜部位別の発現レベルの相違を認め、羊膜ではHLA-Gよりも著明にHLA-CのmRNA発現レベルが高い、羊膜ではER-、ともに有意なmRNA発現が見られない。PGRは発現していないが、PGRMC1はmRNAレベルで高発現している、単離羊膜上皮細胞で発現していたAQP3、AQP1、SPARCとTHBS1は、MK添加により発現調節されない、RNA-seq解析では羊膜の特徴(低増殖性、無血管、ECM構造維持)に合致した遺伝子発現パターンが判明した。

研究成果の概要(英文)：We performed experiments using several approaches in search for mechanisms involved in the homeostasis of amnion, particularly amniotic epithelium. Obtained data is as follows: 1) HLA-G, believed to be involved in feto-maternal immunotolerance, shows region-dependent differential expression levels in amnion; 2) HLA-C mRNA is much higher than HLA-G mRNA, suggestive of a more important role for HLA-C; 3) mRNAs encoding ER, ER, PGR are not expressed in amnion, however, PGRMC1 mRNA level is high; 4) AQP1, AQP3, SPARC and THBS1 are not regulated by addition of MK in isolated amnion epithelial cells; and 5) RNA-seq on such cells reveals a gene expression profile compatible with some of the known characteristics of amnion.

研究分野：周産期医学

キーワード：羊膜

1. 研究開始当初の背景

羊膜は胎児を形成する胚盤葉上層に由来する羊膜上皮と胚外中胚葉の一部から構成され、胎児と羊水を内包して胎児の発育に必要な子宮内環境の恒常性を維持している。近年、再生医療の分野では、倫理的制約のない細胞やスカッフールド（足場）の供給源として羊膜が着目されており、細胞を除去した羊膜上で各種上皮細胞や体性幹細胞、胚性幹細胞が効率的に分化・増殖することが示され、またヒト羊膜上皮には肝、膵、心筋、軟骨など様々な組織への分化能を持つ多能性幹細胞が含まれることが明らかとなってきた。ヒト羊膜上皮細胞には、*in vitro* で上皮化促進など創傷治癒を促す性質も知られている。一方でヒト羊膜上皮細胞は *in vivo* では増殖能が極めて厳密にコントロールされ、創傷治癒能力は低いことが示されている。例えば、妊娠後期の胎盤非被覆羊膜では Ki67 などの細胞増殖マーカーがほとんど観察されず、また胎児鏡を受けた妊婦の羊膜では、分娩時にほとんど欠損孔は塞がっていないことが観察されている (Gratacos E, et al. Placenta, 2006)。このような細胞増殖や創傷治癒に対する *in vitro* と *in vivo* での相違の原因は不明であり十分に検討されていない。 *In vitro* と異なり *in vivo* では羊水中の液性因子が直接的あるいは間接的に作用して羊膜上皮の細胞増殖や創傷治癒を抑制している可能性も考えられる。

これまで羊膜は均一な組織であると考えられてきたが、近年の知見では、羊膜は部位によりトランスクリプトームが相当に異なるとされる (Han YM, et al, BOR 2008)。しかしこれは羊膜全体についての解析であり、上皮単独での部位別トランスクリプトーム解析はなされていない。また胎盤臍帯刺入部に近い部位ほど羊膜上皮中に幹細胞を含む割合が高く、辺縁では幹細胞はあまり見られないとされる (二階堂敏雄、第 22 回日本胎盤学会教育講演、2014)。胎盤非被覆羊膜での細胞増殖像が少なく創傷治癒能が低い背景には、羊膜の部位による細胞増殖能・修復能の相違も関連しているかもしれないが未検討である。

細胞の増殖や分化は周囲の微小環境に左右されるが、これには細胞外マトリックス (ECM) の果たす役割も大きい。我々はこれまで ECM 蛋白のうち、組織の修復・リモデリングや細胞遊走・分化・増殖の制御に多様な役割を果たす蛋白、マトリックス細胞蛋白に着目し、羊膜において検討を進めてきた。そのうちのひとつである SPARC については、子宮頸部に近い羊膜上皮細胞に局在することが報告されており (McParland, et al, MHR 2001) また我々の検討では、羊水中にも高濃度に存在する。いくつかの細胞において、SPARC が autocrine/paracrine に細胞増殖抑制や種々の成長因子の活性調節に関与すること、同ノックアウトマウスでは創傷治癒率

が上がるということが知られており、SPARC は羊膜上皮細胞の増殖制御機構や修復機転への関与の可能性がある。

羊膜は様々な形で妊娠維持に関与する。羊膜上皮細胞においては、プロスタグランジン (PG) F2 や E2 の産生に関与する COX2 の発現増強は妊娠末期まで認められず、妊娠中は長期にわたって COX2 発現が抑制されている。PGF2 や E2 は分娩惹起物質であることから、これも羊膜の妊娠維持作用の一つと言える。研究代表者が所属する研究室では、胎児特異的な発現を示す成長分化因子 Midkine (MK) が妊娠中期羊水に高濃度、後期には低濃度存在し、*in vitro* で MK (羊水中濃度に相当) を培養羊膜上皮細胞に添加すると PGE2 産生と COX2 の発現が濃度依存性に抑制されることを示した (日産婦学会, 2012)。しかしこのメカニズムは不明であり、また *in vivo* に近い系で MK の PGE2 産生・COX2 発現抑制作用が見られるかは未検討である。また胎児肺では MK mRNA 発現が妊娠中期では後期の 3 倍あり、MK 免疫組織染色でも同様の結果が得られたことから、胎児肺が羊水 MK 産生源の可能性があるとしてさらに追求しているところである。

以上のように妊娠維持に直結するヒト羊膜、特に羊膜上皮の恒常性を維持する仕組みについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では妊娠維持に直結するヒト羊膜上皮の恒常性を維持する仕組みを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

上皮細胞を含む羊膜の恒常性は様々な側面から維持されているものと考えられる。そこで本研究では多方面からこれにアプローチした。

臨床研究審査委員会の承認と妊婦よりインフォームドコンセントを得て、帝王切開時にヒト卵膜および胎盤を得た。卵膜より羊膜を剥離し、部位別に分別し実験に供したほか、従来の酵素処理による方法、あるいは羊膜上皮特異的蛋白である EpCAM を用いた FACS による方法で羊膜上皮細胞分離を行い、単離した羊膜上皮細胞の初代培養、あるいは継代を行った。細胞の purity は EpCAM 染色陽性あるいはサイトケラチン陽性、ビメンチン陰性であることから確認した (purity > 90%)。一部の実験については、羊膜上皮初代培養細胞に human recombinant MK (1-100ng/mL) を添加し、羊水中生理的濃度の MK に対する影響を検討した。

卵膜や胎盤、単離した羊膜上皮細胞などにおける遺伝子発現や遺伝子産物局在の検討は RT-PCR、Taqman リアルタイム RT-PCR、免疫染色により行い、網羅的発現解析については次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 妊娠維持に関わる既知重要因子の発現プロフィール

妊娠維持に関連した既知の遺伝子で、母体にとって semi-allograft である胎児由来の羊膜や栄養膜細胞が排除されない免疫寛容の機序に関与すると考えられる胎児側因子の HLA-G については、辺縁羊膜では HLA-G mRNA の発現が胎盤被覆羊膜に比べ 9 倍高発現していた。胎盤被覆羊膜における HLA-G mRNA 発現レベルは低く母体組織である脱落膜と同等であった。一方、免疫組織染色では羊膜ではどの部位でも HLA-G 蛋白発現は認められなかったが、絨毛膜無毛部の栄養膜細胞では強く発現していた。胎盤では HLA-G 蛋白発現は合胞体および細胞性栄養膜細胞では認められず絨毛外栄養膜細胞と考えられる細胞群でのみ強発現していた。以上の結果から、卵膜や胎盤の部位による HLA-G 発現の違いは、母体細胞とより近接した関係にあることと関連している可能性があるものと考えられた。近年、母体にとって免疫寛容の機序に HLA-G よりも HLA-C の関与がより大きいとする見解が専門家の間で見られている。今回検討したところ、26-38 週羊膜の HLA-C の mRNA 発現レベルは HLA-G の 50-100 倍であることが確認され、上記見解が羊膜にあてはまる可能性が示唆された。

妊娠維持・分娩発来に関与するステロイドホルモンの関連では、卵膜を含む妊娠組織は非常に高いエストロゲン環境に晒されているが、特異的受容体の ER は卵膜において発現していない。一方、ER は発現がみられる脱落膜に比べ、羊膜では ER mRNA はほとんど発現していないことが明らかとなった。またプロゲステロン受容体(PGR)は免疫組織染色では脱落膜以外の羊膜、絨毛膜、胎盤絨毛のいずれにも発現が認められなかった。mRNA レベルでは、26 週と 38 週の比較で、脱落膜では羊膜に比べて 6-200 倍の PGR mRNA 発現が認められた。一方、プロゲステロンの膜性受容体の一つである PGRMC1 については、羊膜では脱落膜に比べ 3-10 倍の高発現が認められ、羊膜におけるプロゲステロンの作用発現が同受容体を介する可能性が示唆された。また FACS により単離した羊膜上皮細胞と非上皮細胞の検討では、プロゲステロンの局所での産生に関与する HSD17B2 は、羊膜上皮細胞では発現していないが、非上皮細胞では高発現していることが判明した。

(2) アクアポリン(aquaporin, AQP)ファミリーの発現と MK による発現調節の可能性についての検討

胎児をとりまく羊水量の恒常性の維持に関与すると推定されるアクアポリン(aquaporin, AQP)ファミリーの発現について検討した。羊膜ではアクアポリンのうち AQP1, 3, 8, 9, 11 が発現することが知られているが、我々の単離羊膜上皮細胞を用いた解析では、mRNA レベルとしては AQP3 が最も

高発現しており、次いで AQP1 が発現していた。しかし AQP8, 11 の発現レベルは低く、AQP9 は発現していなかった。また羊水中に多く存在する成長分化因子 MK の羊膜上皮細胞における AQP 発現に対する影響を *in vitro* で検討したが、有意な変化は認められなかった。

(3) マトリックス細胞蛋白の発現と MK による発現調節の可能性についての検討

これまでに羊膜全体のマトリックス細胞蛋白の mRNA 発現レベルについては SPARC と THBS1 で高発現レベル、THBS2 では低発現レベルであり、妊娠の進行につれて SPARC 発現低下傾向、THBS1 は増加傾向を認めている。これらの羊膜上皮細胞における発現レベルに対する MK 影響を *in vitro* で(2)と同様に検討したが、有意な変化は認められなかった。

(4) 単離羊膜上皮細胞における網羅的発現プロファイル

正期産選択的帝切妊婦より得られた単離羊膜上皮細胞の網羅的 RNA 発現解析(RNA-seq)においては、サイトカインや成長因子など液性因子の中ではインスリン様成長因子 2 (IGF2)が最も高い mRNA レベルを呈しており、RNA-seq で検出された RNA の上位 10 位までに含まれていた。また特異的受容体である IGF1R や IGF2R は低いレベルで発現していたものの、IGF1 の発現は認められなかった。羊膜上皮細胞の増殖因子としては EGF が知られ、*in vitro* 実験でも多く用いられているが、単離羊膜上皮細胞において EGF 受容体は強く発現しているものの、EGF はほとんど発現していなかった。羊膜間質細胞でも同様の結果であった。また主要な増殖因子である FGF ファミリーについても、FGF11 が低いレベルで発現している以外は、単離羊膜上皮細胞での発現は捉えられなかった。上記の結果は、羊膜上皮細胞の増殖が autocrine や juxtacrine ではコントロールされていないことを示唆する一つの所見と考えられた。またヒト羊膜上皮細胞が *in vivo* では増殖能が極めて厳密にコントロールされていることの証左の一つとも考えられた。

また血管新生を促進する主要な増殖因子の発現について見てみると、FGF ファミリーについては前述したが、PDGF/VEGF ファミリーでは VEGFA や PDGFA が中等度に発現している以外は、発現レベルは概して低く抑えられているか発現していなかった。なお同ファミリーに属し胎盤に高発現する PGF(PIGF)は単離羊膜上皮細胞ではほとんど発現していなかった。なおこれら増殖因子の特異的受容体をコードする KDR(FIk-1)、FLT1、PDGFRA、PDGFRB の各遺伝子は発現していなかった。アンジオポエチンファミリーについては、ANGPT1、ANGPT2 とも発現は見られなかった。TGF- ファミリーでは TGFB1、TGFB2、TGFB3 とも発現は認められなかった。Ephrins の発現については、全体的に発現レベルは低かった。以上の発現パターンの結果を、血管新生を主に抑制する働きのあるマトリックス細

胞蛋白 SPARC と THBS1 の羊膜高発現と併せて考察すると、羊膜の avascular な構造を反映する遺伝子発現パターンとなっていることが示された。

羊膜は構造の維持のためコラーゲンを主とした構造的細胞外マトリックスの恒常性を維持することが重要である。これに関与する Matrix metalloproteinases (MMPs) とそのインヒビターである tissue inhibitors of metallo- proteinases (TIMPs) について mRNA 発現をみると、前期破水例とも関連する主要な MMP である MMP1、2、9 はいずれも単離羊膜上皮細胞で発現しておらず、一方、TIMPs については、TIMP4 は発現していなかったが、TIMP1-3 は非常に高いレベルを示した。このような MMPs/TIMPs の発現パターンは、羊膜の構造的細胞外マトリックスの恒常性維持に重要であると考えられた。

5．主な発表論文等
なし

6．研究組織

(1) 研究代表者

浅井 哲 (ASAI, Satoshi)
東海大学・医学部・客員講師
研究者番号：70383867