

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592414

研究課題名(和文) 妊娠恒常性維持機構における羊膜マトリクス細胞蛋白の役割

研究課題名(英文) The role of matrix cellular proteins in amniotic membrane

研究代表者

峰岸 一宏 (Minegishi, Kazuhiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30276331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)各妊娠時期での羊膜マトリクス細胞蛋白の発現変化：SPARC mRNA発現は、妊娠後期に40%減少し、TSP1は3倍に増加した。(2)羊膜プロスタグランジン合成酵素の発現変化：COX2 mRNAのみが妊娠後期に2倍に増加した。(3)流動細胞計測法を用いた羊膜上皮細胞分離法の確立：当初の上皮細胞増殖が不安定で、実験計画の変更を余儀なくされたため、新たな分離法を確立した。(4)羊膜上皮細胞における網羅的遺伝子発現解析：初代培養で増殖因子のmidkineやFGF2発現が低く、免疫抑制因子HLA-G発現は高かった。継代後midkine、FGF2の発現は急速に増加し、HLA-G発現は減少した。

研究成果の概要(英文)：(1) Expression changes of matrix cellular proteins of the amniotic membrane in mid and late gestation: the expression of SPARC mRNA was reduced by 40% at the late gestation. Expression of TSP1 was increased three-fold in late gestation. (2) Expression changes of prostaglandin synthesis enzyme: only COX2 mRNA expression was increased twice at the late gestation. (3) Establishment of amniotic epithelial cell separation method using flow cytometry: because there was instability in the cell growth of the original amniotic epithelial cells, it was forced to change the experimental plan. A new separation method was established. (4) Comprehensive gene expression analysis in epithelial cells obtained by flow cytometry: in primary epithelial cells, the expression of midkine and FGF2 involved in the proliferation was low, the expression of HLA-G related to immunosuppression was higher. After passage, the expression of midkine and FGF2 was increased rapidly, HLA-G expression was decreased.

研究分野：産婦人科

キーワード：羊膜上皮細胞 マトリクス細胞蛋白

1. 研究開始当初の背景

近年、臓器の機能を失った患者に対して、機能補完を目的とした再生医療が期待されており、その細胞供給源として羊膜が着目されている。過去の報告において、羊膜細胞が肝・膵への分化誘導に加え、心筋組織、軟骨など様々な組織への分化能を持つ多能性幹細胞を含むことが示されている。一方で、治療的な胎児鏡挿入による羊膜穿孔がその後封鎖されないこと (*Gratacos E, et al., Placenta, 2006*) や、妊娠後期の羊膜細胞で Ki67 などの細胞増殖マーカーが認められないとの報告がある。つまり、羊膜が様々な組織への分化能を持つ多能性幹細胞を含み、かつ創傷治癒促進作用を有する一方で、妊娠下での羊膜自身の修復能力が極めて低く、細胞増殖が活発ではないという相反性がある。このことは、妊娠恒常性維持に必要な羊膜での細胞増殖・分化の制御機構の存在が示唆される。

元来羊膜は、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発育に必要な子宮内環境を保持する性格を持つ。児の成熟以前に出産する早産は、周産期死亡や生存後遺症を引き起こすことが知られている。その原因に羊膜破綻に続く前期破水があることから、临床上においても、羊膜組織維持や破綻の機序を解明することは重要である。

2. 研究の目的

本研究では、羊膜における細胞外マトリクス蛋白の一種であり、組織修復や細胞増殖・分化制御を担うマトリクス細胞蛋白の発現、機能について検討することで、妊娠恒常性維持機構における羊膜の役割を究明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 妊娠時期における羊膜でのマトリクス細胞蛋白の発現変化の検討

妊娠中期 (18~23 週) および妊娠後期 (37~39 週) から採取した羊膜から羊膜上皮細胞を単層初代培養し、マトリクス細胞蛋白である secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC)、Thrombospondin (TSP)1、TSP2、Tenascin-C (TNC) の mRNA の発現について、TaqMan realtime RT-PCR 法により検討した。

(2) 妊娠時期における羊膜でのプロスタグランジン合成酵素の発現変化の検討

生理活性物質であるプロスタグランジンが、子宮収縮や陣痛に関連し、分娩発来機構で重要な役割を担うとされ、またプロスタグランジン E2 が細胞外マトリクス中のフィブロネクチンの軟化を促すことが示されている (*Tamba et al., PNAS, 2008*)。そのため、妊娠中期 (18~23 週) および妊娠後期 (37~39 週) から採取した羊膜から羊膜上皮細胞を単層初代培養し、プロスタグランジン合成酵素である、cyclooxygenase (COX)1、COX2、prostaglandin E synthase (PTGES)1、PTGES2、PTGES3 の mRNA の発現について、TaqMan realtime RT-PCR 法により検討した。

(3) flow cytometry を用いた羊膜上皮細胞・間葉系細胞の分離法の確立

当初の羊膜上皮細胞および間葉系細胞の単層初代培養方法に、細胞・組織増殖において不安定性が認められ、実験計画の大幅な遅延と変更を余儀なくされたために、新たに flow cytometry を用いた細胞分離法の確立を目指した。妊娠後期 (37~39 週) 羊膜を採取し、トリプシン・コラゲナーゼ処理を行い、羊膜上皮特異的蛋白である EpCAM を用いて、蛍光活性化セルソーター (FACS) で細胞分離を行う。分離された細胞の形態評価、EpCAM および間葉細胞特異的蛋白の Vimentin を用いて

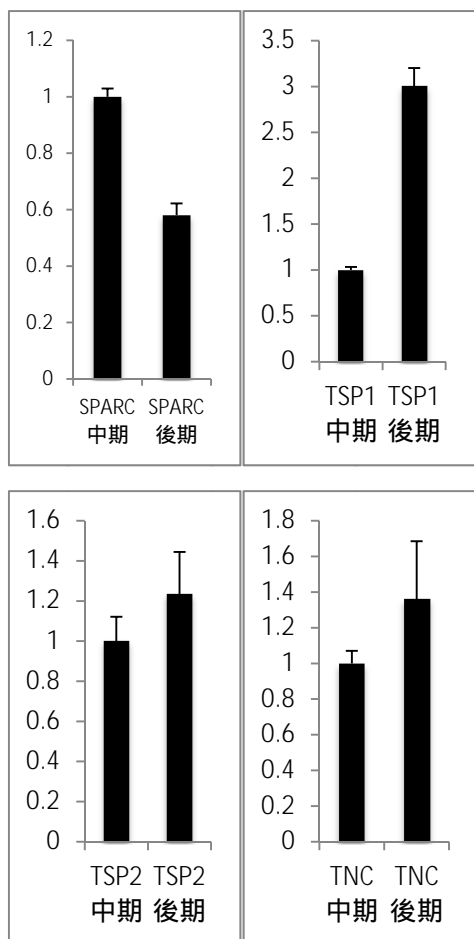
免疫染色を行い、羊膜上皮細胞を確認した。

(4) FACS による新たな細胞分離法によって得られた上皮細胞・間葉系細胞における網羅的遺伝子発現解析

FACS による新たな細胞分離法により得られた羊膜上皮細胞の特性について検討するため、羊膜採取部位ごと(胎盤部・辺縁部)の相違や、初代培養細胞および継代後細胞における遺伝子発現の違いを microarray により比較検討した。

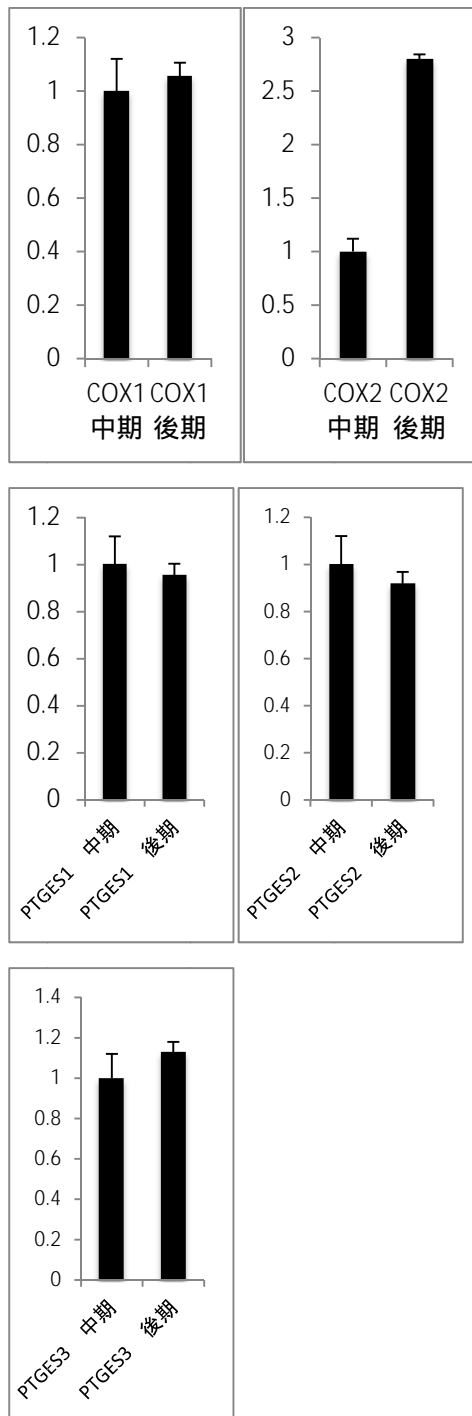
4. 研究成果

(1) SPARC mRNA の発現は、妊娠中期から後期にかけて、約 40% の低下傾向を示した。一方で TSP1 の発現は妊娠後期が中期に比べ約 3 倍に増加していた。TSP2 や TNC については明らかな変化を認めなかった(図 1)。



< 図 1 妊娠中後期における各マトリクス細胞蛋白の遺伝子発現変化 >

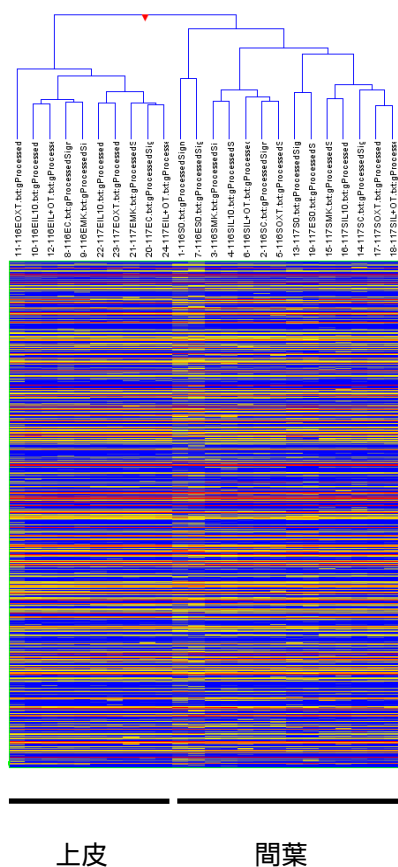
(2) プロスタグランジン合成酵素のうち、COX2 mRNA のみが妊娠中期から後期にかけて、約 2 倍の増加を示した(図 2)。一方で COX1、PTGES1、PTGES2、PTGES3 については明らかな変化を認めなかった。



< 図 2 妊娠中後期におけるプロスタグランジン合成酵素の遺伝子発現変化 >

(3) FACSの結果、90%以上の特異性を持ってEpCAM陽性細胞と陰性細胞の分離が可能となった。また、死細胞の指標である Propidium Iodide 陽性細胞は全体の20~30%に抑えることが出来た。分離した細胞において、それぞれ EpCAM、Vimentin の特異的発現が認められ、FACSを用いた羊膜上皮細胞の安定的な分離法を確立した。

(4) 初代羊膜上皮細胞において、増殖・分化に関与するmidkine やFGF2の発現が低く、免疫抑制に関連するHLA-Gの発現は高かった(図3)。継代後、midkine、FGF2の発現は急速に増加し、HLA-G発現は減少した。total RNAを用いた定量的RT-PCRでも同様の結果を確認した。これらの遺伝子発現はIL-10投与によって明らかには変化しなかった。なお羊膜の分布における遺伝子発現の差異は認めなかった。



< 図3 microarrayによる遺伝子発現解析 >

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峰岸一宏 (Kazuhiro Minegishi)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：30276331

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石本人士 (Hitoshi Ishimoto)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：10212937