

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791863

研究課題名(和文)胎盤血管内皮由来 iPS 細胞の樹立及び疾病モデル(ブタ)に対する治療戦略の創成

研究課題名(英文) Establishment of endothelial cells from placental vessels derived iPS cells and Generation of therapeutic strategies for disease model animals.

研究代表者

牧野 初音(MAKINO, HATSUNE)

東京大学・分子細胞生物学研究所・研究員

研究者番号：90392498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胎児付属物(胎盤・羊膜)由来細胞株を樹立に成功しそれらの心筋細胞や血管細胞への高い分化能を示してきた。本研究では上記の細胞を用いた心不全・心筋梗塞など各種心疾患に対する新しい治療法の可能性を検討した。ヒト胎児付属物由来細胞に由来するiPS細胞株樹立に成功した。胎盤血管内皮細胞を特徴づける遺伝子として内皮細胞特異的分子だけでなく心臓血管の恒常性維持を担う因子も導かれた。マウス胎盤の胎仔に由来する組織に心筋分化能をもつ細胞が存在した。ラビリンスおよび絨毛膜有毛部において心筋前駆細胞特異的遺伝子陽性細胞が観察された。以上の結果は心筋分化能をもつ細胞の胎盤における局在を示した新しい知見である。

研究成果の概要(英文)：Cell lines derived from human placenta and amnion have been established. And also it has been shown that these cells differentiate into cardiomyocytes and vascular cells. In this study, using the above cell, the possibility of new treatments for various types of heart disease such as heart failure and myocardial infarction were examined. Several iPS cell lines derived from human placenta and amniotic-derived cells were established. Factor responsible for homeostasis of cardiovascular not only endothelial cell-specific molecule was listed up as genes that characterize placental vascular endothelial cells. Cells that can differentiate into cardiomyocytes were localized in the part of tissue derived from fetus of mouse placenta. Myocardial progenitor cell-specific gene-positive cells were observed in the labyrinth layer and chorion frondosum of mouse placenta. These results are novel findings indicate that cells with myocardial differentiation ability were localized in placenta.

研究分野：細胞生物学

キーワード：心疾患 細胞治療 胎盤 心筋細胞 心筋前駆細胞 心筋分化誘導 心組織再生

1. 研究開始当初の背景

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に進む中、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おらず、またES細胞は容易に心筋細胞に分化するが免疫的拒絶や腫瘍形成の問題を指摘されていた。

妊娠から出産までの期間、まだ未熟な胎児の臓器に代わって肺や腎臓などの役割を果たしているのが胎児付属物(胎盤、羊膜、臍帯)(図1)である。



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。

胎盤は上皮細胞増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、インシュリン様成長因子など、多様な増殖因子を発現している極めて特殊な組織であり、ヒト生体内において他に類を見ない。このように胎児を形作り成長させることに特化している組織であることから、以前より幹細胞や特殊な細胞の存在が考えられていたが、申請時、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始めていた。

研究代表者は「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」、この3条件を満たす細胞を得ることを目標に研究を進める中で胎盤に着目し、絨毛膜板(引用文献、図2)や羊膜(引用文献、図2,図3)に由来する細胞から拍動する心筋細胞を、また羊膜および胎盤の一部(引用文献、図2)に由来する細胞と胎盤の血管(引用文献、図3、図4)に由来する細胞から骨格筋を作り出すことに成功していた。

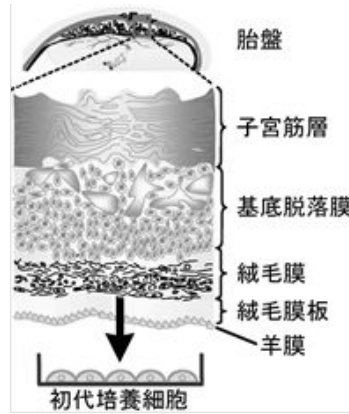


図2 ヒト胎盤の模式図

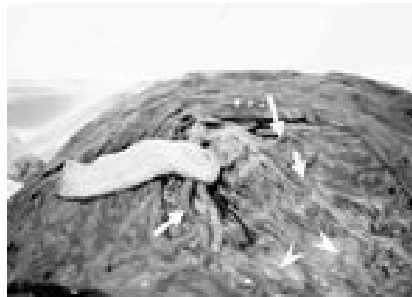


図3 ヒト胎盤動脈とヒト胎盤静脈の識別
胎盤動脈(静脈血を含む血管、矢頭)
胎盤静脈(動脈血を含む血管、矢印)

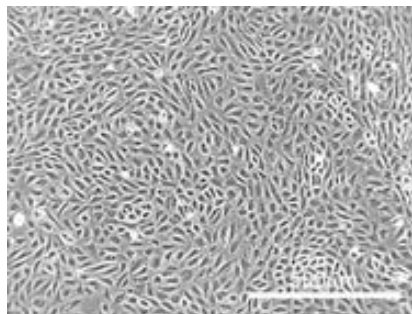


図4 ヒト胎盤血管内皮細胞
(スケールバー:500μm)

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、胎盤には成体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。

2. 研究の目的

胎盤・羊膜由来細胞株、および多分化能を持つ胎盤・羊膜細胞由来 iPS 細胞株を樹立し、それらの特性解析を行う。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るだけでなく、自分自身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。安全かつ倫理的な問題がなく、長期保存が可能、同種の細胞

が大量に調整できるという観点から、具体的にはヒト胎盤細胞を血管内皮細胞に分化させる、ヒト胎盤細胞を元にiPS細胞を樹立し、その細胞を血管内皮細胞に分化させる、このいずれかの方法で得られる血管内皮細胞を用いた各種心疾患に対する新しい治療システムの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)ヒト胎盤細胞、ヒト羊膜細胞、ヒト胎盤血管内皮細胞の樹立

ヒト胎児付属物(胎盤、羊膜、臍帯)を細胞の供給源とする。多検体からヒト胎盤細胞、ヒト羊膜細胞、ヒト胎盤血管内皮細胞の分離・培養を行い、多数の細胞株を樹立し、再現性のある安定した細胞培養系を確立する。

(2)ヒト胎盤細胞、ヒト羊膜細胞、ヒト胎盤血管内皮細胞に由来するiPS細胞株樹立

(1)で得られる細胞株に4遺伝子(OCT3/4・SOX2・KLF4・C-MYC)を組み込むことでiPS細胞株を樹立する。

(3) (1)と(2)の特性解析

(1)と(2)で得られる細胞の網羅的遺伝子発現解析(Affimetrix社GeneChip)、抗体を用いた免疫染色、細胞表面抗原解析、細胞形態変化、増殖、特定の遺伝子あるいはタンパク質の発現などから多角的な細胞プロファイリングを行う。

(4)ヒト胎児付属物由来細胞およびそれらに由来するiPS細胞の細胞・組織形態解析、機能分子解析を行い、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を検討する。また、生体内における機能評価を目的として、モデルマウス作製と細胞移植を行う。

4. 研究成果

幹細胞は多岐に渡る可能性を有し、再生医療や細胞移植の最適対象として期待されている。その中でも間葉系幹細胞は再生医療という治療戦略の重要な一翼を担う。現在、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。このような背景の中、先行研究において、組織量が豊富でかつ非侵襲的に得られるヒトの胎盤および羊膜に由来する細胞株の樹立に成功し、それらの筋細胞や血管細胞への高い分化能を持つ可能性を示してきた。

ヒト胎児付属物(胎盤・羊膜・臍帯)由来の細胞を血管内皮細胞に分化させる、その細胞を元にiPS細胞を樹立し、その細胞を血管内皮細胞に分化させる、前述の2通りの方法で得られる血管内皮細胞を用いた心不全・心筋梗塞など各種心疾患に対する新しい細胞治療の可能性を具現化することを目的

として以下の研究を遂行した。

ヒト胎盤血管内皮細胞を含むヒト胎盤細胞の特性解析の一環として、免疫染色、および細胞表面抗原解析を行った結果、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(FIk-1)、Flt-1、動脈血管内皮細胞マーカー(CXCR4、CD44)のマーカーの発現が観察された(図5)。

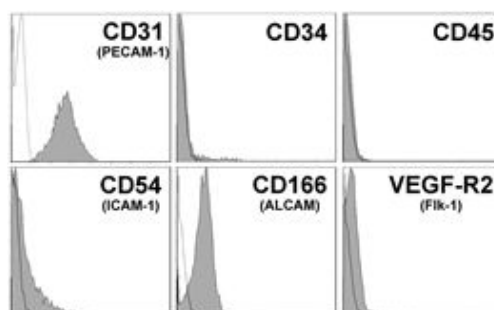


図5 胎盤血管内皮細胞の表面抗原解析
胎盤血管内皮細胞は血管内皮細胞マーカー(CD31、CD54、VEGF-R2)陽性、血管内皮先駆細胞マーカー(CD34)陽性、中胚葉性血管芽細胞マーカー(CD166)陽性、血球マーカー(CD45)陰性を示した。

新規に得られた胎児付属物細胞および継代を重ねた細胞株の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)から、由来組織や継代数によって細胞の性質が異なることを明らかにした。この際、研究代表者が保有する様々なヒトの他の組織由来の細胞の発現遺伝子情報と比較することによって以下のより詳細な特性解析を行うことができた。本研究の目標の一端にヒトの冠動脈疾患、虚血、肺高血圧、脳血管疾患、先天性心疾患患者の予防と治療であることから、その病態回復を効果的にサポートする細胞が必要と考え、網羅的発現遺伝子プロファイリング解析と細胞表面抗原解析結果を精査した結果、階層的クラスター分析を行った結果、胎盤血管内皮細胞を特徴付ける遺伝子として内皮細胞を規定する分子として知られているPECAM1と血管発達に寄与する内皮細胞由来分泌因子であるEGF様因子EGF7が導かれた。また、胎盤絨毛膜板細胞を特徴付ける遺伝子として心臓血管の恒常性の維持に主要な役割を担うNPPB(BNP)が導かれた。

ヒト胎児付属物のひとつ、ヒト羊膜由来の細胞にレトロウイルスを用いて4種の遺伝子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)を導入することにより、iPS細胞の樹立に成功した(図6(a))。樹立したiPS細胞において、未分化マーカータンパク(NANOG、OCT4、TRA-1-60、SOX2)の発現(図6(b))および内在性の未分化マーカー遺伝子の発現が認められた(図6(c))。多分化能性を明らかにするために樹立したiPS細胞を免疫不全マウス(NOD/SCID/IL-2R^{-/-})に移植した結果、

細胞は生着し、腫瘍化は観察されず、三胚葉を含むテラトーマ形成が認められた(図6(e))。

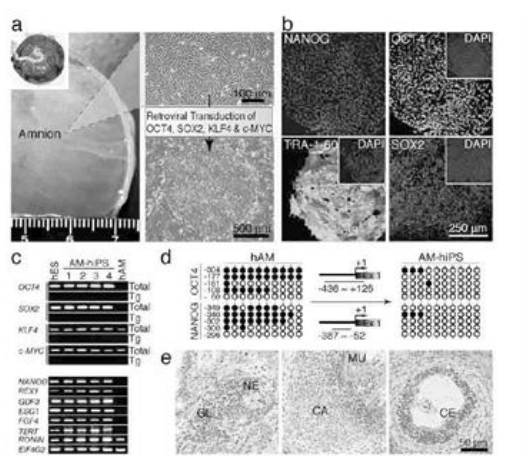


図6 ヒト羊膜細胞由来 iPS 細胞の樹立
ヒト羊膜由来細胞にレトロウイルスを用いて4種の遺伝子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)を導入した結果、iPS細胞の樹立に成功した(a)。ヒト羊膜細胞由来 iPS 細胞において、未分化マーカータンパク(NANOG、OCT4、TRA-1-60、SOX2)の発現が認められ(b)、また内在性の未分化マーカー遺伝子の発現も確認できた(c)。ヒト羊膜細胞由来 iPS 細胞の多分化能性を明らかにするためにテラトーマ形成を試みたところ、三胚葉を含むテラトーマ形成が認められた(e)。

本研究において樹立した心筋細胞や血管細胞への高い分化能を持つヒト胎児付属物由来の細胞が胎盤および胎盤血管内皮組織のどこに存在しているのかはいまだ不明である。将来のヒトへの移植法の臨床的実現化を想定し、組織内の局在を明らかにし高効率で分取して治療に用いることが臨床応用の近道であると考え、容易に入手できる実験動物、マウスの胎盤を用いて上記の細胞の局在を明らかにすることを目標として以下の研究を行った。マウス胎盤における心筋分化能をもつ細胞の有無を確認することを目的として、胎生期マウス胎盤の胎仔に起因する領域由来の細胞とMEF(マウス胎仔由来線維芽細胞)を共培養した結果、心筋細胞特異的遺伝子である心筋トロポニンT陽性細胞が確認できた。この結果はマウス胎盤の胎仔由来の組織に心筋分化能をもつ細胞が含まれていることを示唆するものであった。また、マウス胎盤のラビリンス層および絨毛膜有毛部において心筋前駆細胞特異的遺伝子陽性細胞が観察された。この結果は、心筋分化能をもつ細胞がこれらの領域に局在する可能性を示した本研究によって初めて得られた知見である。

血管内皮に存在するCD34陽性細胞が未分化細胞(前駆細胞)として機能するという報告や成体マウスにおいて転写因子Sal1遺伝子の発現が心臓血管近傍のCD34陽性領域で

のみ観察されることから推測すると、血管内皮細胞自体が心筋梗塞、心臓再生に寄与している可能性も考えられる。今後は胎盤に含まれる心筋トロポニンT陽性細胞のみならず、CD34陽性細胞および心筋前駆細胞特異的遺伝子陽性細胞を分取し、ヒト胎盤に存在する心筋分化能をもつ細胞の特性解析を進めながら、臨床応用の前段階として、上記の細胞を用いた心筋梗塞(MI)マウスを用いた心機能再生、および上記の細胞の心筋再生の不可能な時期(胎生10日目以降)のマウス心臓における挙動を評価したいと考えている。すでにヒト胎児付属物由来細胞とそれを用いたiPS細胞を樹立に成功し、それらの特性評価ができていることから、マウスで得られた知見を利用して、スムーズに高度な機能と構造を持ったヒトの心臓組織再生実現に向けた取り組みに移行できるに違いない。

<引用文献>

Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A., 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells., *Experimental Cell Research*, 査読有, Vol.313, No.12, 2007, pp.2550-62,

URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482707002091>

Tsuji 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., *Circulation Research*, 査読有, Vol.106, No.10, 2010, pp.1613-23, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.205260.

Kawamichi 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., *Journal of Cellular Physiology*, 査読有, Vol.223, No.3, 2010, pp.695-703, DOI: 10.1002/jcp.22076.

Cui 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. Human Molecular Genetics, 査読有、Vol.20, No.2, 2011, pp.235-44、DOI: 10.1093/hmg/ddq458.

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 4件)

Aino M, Nishida E, Fujieda Y, Orimoto A, Mitani A, Noguchi T, Makino H, Murakami S, Umezawa A, Yoneda T, Saito M. Isolation and characterization of the human immature osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy. 査読有、Vol.14, No.12, 2014, pp.1731-44、DOI: 10.1517/14712598.2014.960387

Ishii R, Kami D, Toyoda M, Makino H, Gojo S, Ishii T, Umezawa A. Placenta to cartilage: direct conversion of human placenta to chondrocytes with transformation by defined factors. Molecular Biology of the Cell, 査読有、Vol.23, No.18, 2012, pp.3511-21、DOI: 10.1091/mbc.E11-10-0869

Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. Arthritis Research & Therapy, 査読有、Vol.14, No.3, 2012, pp.R136、DOI: 10.1186/ar3869

Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. PLoS One, 査読有、Vol.7, No.1, 2012, pp.e29677、DOI: 10.1371/journal.pone.0029677

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 1件)

Toyoda M, Nagata S, Makino H, Akutsu H, Tada T, and Umezawa A. Springer International Publishing AG, Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. Chapter 18: Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Amnion Cell. Lineage-Specific Differentiation Protocol, Springer Protocols Handbooks. Ye, Kaiming; Jin, Sha (Eds.), 1st Edition, pp 249-264、DOI: 10.1007/978-1-61779-267-0_18

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

牧野初音(MAKINO, Hatsune)
東京大学・分子細胞生物学研究所
・特任研究員
研究者番号: 90392498