

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861308

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の発症機序の解明 - 患者臍帯由来iPS細胞を用いた解析 -

研究課題名(英文) To uncover the pathogenesis of preeclampsia.

## 研究代表者

網田 光善 (Amita, Mitsuyoshi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センター・医員

研究者番号：30420061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群は、妊娠初期の栄養膜細胞(trophoblast)の母体子宮脱落膜への浸潤不全が病因の一つと考えられている。しかし、本疾患の診断は妊娠20週以降になされるため、妊娠初期の疾患発生のメカニズムに対する研究は困難である。本研究の目的は、妊娠高血圧症候群の患者自身の臍帯を用いて、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立したのち、trophoblastに分化させる事で、最終的には妊娠高血圧症候群に代表されるtrophoblast関連妊娠合併症の疾患モデルを確立し、疾患の発生メカニズムを明らかにする事である。

研究成果の概要(英文)：One of the cause of preeclampsia is thought to be poor placentation developed in early pregnancy. Understanding the pathogenesis of the diseases has been hampered by inaccessibility to the early stages of human placental tissue. In this study, we examined to derive iPSC from human umbilical cord and differentiate into trophoblast. Longer term goal is to generate iPSC from umbilical cords of preeclampsia patients to generate abnormal placental models to uncover the mechanisms of the disease.

研究分野：産婦人科学

キーワード：妊娠高血圧症候群 iPS細胞 trophoblast

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群は全妊婦の約3~4%に発生するが、重症化すると、母体の肝機能障害、腎機能障害や呼吸循環障害を引き起こし、また、児に対しては、子宮内胎児発育不全や常位胎盤早期剥離による早産・未熟児で分娩となるリスクが上昇するなど、母児共に致命的となりうる重篤な妊娠合併症である。妊娠高血圧症候群の病因は未だ不明であるが、妊娠初期に trophoblast の子宮脱落膜への浸潤不全が起こることにより、後の胎盤血液灌流が減少し本症が惹起されると考えられている。しかし、本症の診断は妊娠20週以降になされるため、臨床検体を用いた、妊娠初期における発症のメカニズムの研究は極めて困難である。

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)に対して、TGF-βファミリー、とくに bone morphogenetic protein 4(BMP4)を作用させることにより、trophoblast への分化が誘導されるという報告が、2002年に Xuらにより初めて報告され(Xu RH, et al. 2002 Nat Biotechnol 20(12): 1261-1264)、以後多くのグループにより、これを支持する結果が報告されている(Golos TG, et al.(2006), Das P, et al.(2007), Schilz LC, et al.(2008), Sudheer S, et al.(2012))。我々もヒトES細胞にBMP4、ActivinA阻害剤(A83-1)、FGF2受容体阻害剤(PD173074)を投与することにより、多核の合胞体栄養膜細胞(syncytiotrophoblast)に分化することを確認した。

近年、分化したヒトの線維芽細胞(fibroblast)に、4種類の遺伝子、OCT4、SOX2、KLF4、cMYCを導入することにより、ES細胞と同様に多分化能を有する、人工多能性幹細胞(iPS細胞)が樹立された。iPS細胞はES細胞と同様に非常に多くの細胞に分化できる多分化能(pluripotency)を有しているが、ヒトES細胞がかかえる「ヒト妊卵を用いて作成しなければならない」という倫理的問題を克服できるばかりではなく、元の細胞のエピジェネティックな記憶を引き継いでいると考えられるため、様々な疾病の病因究明、新薬の開発、あるいは再生医療に用いることができるのではないかと期待されている。

以上のような学術的背景があり、iPS細胞もヒトES細胞同様の方法を用いて、特定の細胞に分化を誘導することができると考えられるが、これまでのところ、BMP4を用いてiPS細胞からtrophoblastを分化誘導したという報告はない。

臍帯は胎盤同様、胎児の付属物であり、妊娠高血圧症候群の症例の臍帯からiPS細胞を作成することにより、本症に伴うエピジェネティックな変化を記憶しつつ、多分化能を有する細胞を作成可能である。さらに、臍帯由来のiPS細胞にBMPを作用させることにより、妊娠高血圧症候群の疾患モデルとなるtrophoblastが作成できるのではないかと考え

た。

### 2. 研究の目的

(1)ヒトiPS細胞にBMP4およびActivinA阻害剤(A83-1)、FGF2受容体阻害剤(PD173074)を投与することにより、ES細胞と同様にtrophoblastに分化することを確認すること。

(2)妊娠高血圧症候群患者および、正常妊娠のヒト臍帯由来のfibroblastからiPS細胞を作成したのち、trophoblastに分化させることにより、正常妊娠と妊娠高血圧症候群患者におけるtrophoblastの違いを検討すること。

### 3. 研究の方法

(1)倫理委員会の承認後、患者から書面での同意を得た後、大学病院(University of Missouri)にて分娩した患者から臍帯を採取し、ヒト臍帯由来のfibroblastを培養した。Okitaらが確立したプロトコルを用い(Okita K, et al. 2011 Nat Method)、得られたfibroblastにエレクトロポーション法を用いてplasmid遺伝子を導入し、iPS細胞を作成し以下の実験を行った。

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)およびiPS細胞にBMP4、およびBMP4+A83-1、PD173074(BAP)を投与し、形態学的変化を観察した。

BMP4、BAP投与時の培養液中の、syncytiotrophoblastのマーカーである、ヒト胎盤絨毛性ゴナドトロピン(hCG)とプロゲステロン(P4)の濃度をELISA法を用いて計測した。

(2)倫理委員会の承認後、2014年2月1日~2015年5月31日までに山形大学医学部附属病院で分娩した患者のうち、書面での同意を得られた正常妊娠57例と妊娠高血圧症候群11例から分娩後臍帯を採取し培養を行った。臍帯採取後、1日以内に48well組織培養ディッシュで5mm大にカットした臍帯を培養、1~3週間継続した。Fibroblastの発生が確認されたら、組織培養用25mlフラスコ、ついで75mlフラスコへと順次継代し、十分量のfibroblastが得られたものは凍結保存した。正常妊娠由来、および妊娠高血圧症候群由来の臍帯でfibroblast発生までの日数、発生数、最終的にfibroblastの保存に至った症例の割合を比較検討した。

### 4. 研究成果

(1)作成したiPS細胞における、多分化能のマーカーである、POU5F1、NANOG、SSEA-4、TRA-1-60が発現を、免疫蛍光染色法にて検討した。ES細胞と同様に、iPS細胞でも均一にこれらのマーカーの発現を認め、今回作成したiPS細胞が多分化能を有していると考えられた。

次に、ES細胞、およびiPS細胞にBMP4、BMP4+A83-1、PD173074(BAP)を投与

し、形態変化を観察した。形態変化は BAP 投与開始後 2 日目から、BMP4 単独投与では 3 日目から観察され、BAP 投与では 6 日目には、多核で大型の細胞が確認できるようになった (図 1)。この細胞は、免疫蛍光染色で trophoblast マーカーである、絨毛性ゴナドトロピン (CGA)、サイトケラチン 7 (KRT7) が陽性であること、また、核は GATA2 が陽性であることが確認された。

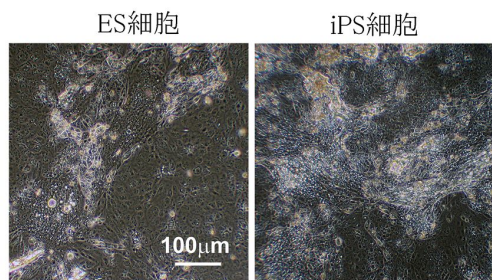


図 1 BAP 投与 6 日目の ES 細胞および iPS 細胞

次に、これらの細胞が胎盤性ホルモンを産生しているかを確認するため、培養液を連日採取し、培養液中の hCG および P4 の濃度を ELISA 法で測定した (図 2)。iPS 細胞、ES 細胞とも、BMP4、BAP 投与により、hCG、P4 を産生した。iPS 細胞と ES 細胞を比較した場合、BAP 投与では hCG、P4 とともに投与 5 日目から検出されたが、両ホルモン産生のピークは iPS 細胞では投与 7 日目、ES 細胞では投与 8 日目と、iPS 細胞のほうが早くピークを迎えた。一方、BMP4 を単独投与した場合、ES 細胞、iPS 細胞ともに、hCG と P4 産生のピークは投与 8 日目で両者に差は認められなかった。ES 細胞、iPS 細胞ともに、ホルモン濃度は BMP4 単独投与時に比べ、BAP 投与時に高値となった。

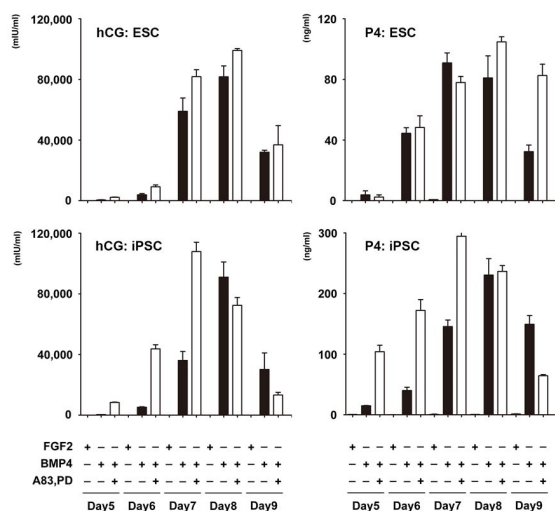


図 2 BMP4、BAP 投与による ES 細胞と iPS 細胞の胎盤性ホルモン産生の推移

以上の結果から、ヒト臍帯 fibroblast から

産生した iPS 細胞は、ES 細胞と同様に、BMP4 あるいは BAP 投与により、trophoblast に分化することが示唆された。

(2) 正常妊娠および、妊娠高血圧症候群の患者由来の臍帯を採取した。研究期間内に正常妊娠 (NP) 57 例と妊娠高血圧症候群 (PIH) 11 例から臍帯を採取した。それぞれの年齢、分娩週数、分娩方法を示す (表 1)。年齢、分娩週数は両群間で差は認められなかった。分娩方法 (帝王切開 (CS)、自然分娩 (NVD)) を比較すると、NP 群 22/57 (38.5%) に対して PIH 群 9/11 (81.8%) と PIH 群で帝王切開分娩が多かった。

	NP (n=57)	PIH (n=11)	P value
年齢	33.07±5.55	33.00±6.13	0.97
分娩週数	37.6W±2.98D	36.9W±2.90D	0.44
分娩方法	CS:22 NVD:35	CS:9 NVD:2	
Growth days	11.63±1.89	13.45±2.58	0.007
Well number	10.21±7.47	6.63±5.98	0.14

表 1 正常妊娠群 (NP) と妊娠高血圧症候群 (PIH) の比較

臍帯採取後、1 日以内に培養を開始し、培養開始日から fibroblast が発生するまでの日数を比較したところ、NP 群では 11.63±1.89 日で発生するのに対し、PIH 群では 13.45±2.58 日と約 2 日発生が遅く、統計学的に有意差を認めた。

また、1 症例あたりの培養ディッシュ 48well 中の fibroblast の発生がみられた well の数を比較したところ、NP 群 10.21±7.47、PIH 群 6.63±5.98 と、有意差を認めないものの、NP 群で多い傾向が認められた。

更に、最終的に fibroblast を凍結保存できた割合を比較すると、NP 群では 46/57 (80.7%) の症例で凍結保存が可能であったのに対し、PIH 群では 6/11 (54.5%) の症例で凍結保存できたのみで、およそ半分の症例では fibroblast が発現しないか、十分な細胞数が得られなかった (図 3)

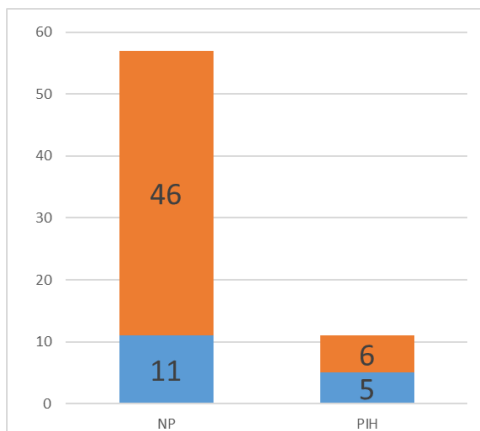


図 3 NP 群、PIH 群それぞれの fibroblast 獲得症例数

(3)以上の結果から以下のことが明らかとなった。

ヒト臍帯由来の fibroblast から作成した iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、BMP4 あるいは BAP を投与することにより、trophoblast へと分化することが示唆された。

正常妊娠、および妊娠高血圧症候群患者の臍帯を比較すると、fibroblast の発生率は妊娠高血圧症候群由来の臍帯で低値となり、また発生までの日数も妊娠高血圧症候群由来の臍帯で長くなった。

本研究期間内には、妊娠高血圧症候群由来の臍帯が十分に獲得できなかったこと、および、獲得できた臍帯からの fibroblast の発生率が低かったことから、妊娠高血圧症候群の臍帯由来からの iPS 細胞を利用した疾患モデル作成には至らなかった。しかし、fibroblast 発現の段階で、すでに正常妊娠由来の臍帯と差を認めたことを考えると今後症例を蓄積し、十分量の疾患由来の fibroblast を得ることができれば、妊娠高血圧症候群の特徴を有した trophoblast の作成すなわち疾患モデルの作成ができるのではないかと期待される。

#### 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 5 件)

Differentiation of trophoblast cells from human embryonic stem cells: to be or not to be? Roberts RM, Loh KM, Amita M, Bernardo AS, Adachi K, Alexenko AP, Schust DJ, Schulz LC, Telugu BP, Ezashi T, Pedersen RA. *Reproduction*. 2014 Apr 10;147(5):D1-12. doi: 10.1530/REP-14-0080. Print 2014 May. (査読有り)

Brachial-to-ankle pulse wave velocity as an independent prognostic factor for ovulatory response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Amita M, Matsuo K, Hasegawa A, Kurachi H. *J Ovarian Res*. 2014 Jul 10;7:74. doi: 10.1186/1757-2215-7-74. eCollection 2014. (査読有り)

Predictive factors for oocyte retrieval failure in controlled ovarian hyperstimulation protocols: a retrospective observational cohort study. Hasegawa A, Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Matsukawa J, Nagase S. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015 Jun 2;13:53. doi: 10.1186/s12958-015-0052-x. (査読有り)

Clomiphene citrate down-regulates estrogen receptor- $\alpha$  through the ubiquitin-proteasome pathway in a human endometrial cancer cell line. Amita M, Takahashi T, Igarashi H, Nagase S. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Jun 15;428:142-7. doi: 10.1016/j.mce.2016.03.029. Epub 2016 Mar 23. (査読有り)

Comparison of syncytiotrophoblast generated from human embryonic stem cells and from term placentas. Yabe S, Alexenko AP, Amita M, Yang Y, Schust DJ, Sadovsky Y, Ezashi T, Roberts RM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 10;113(19):E2598-607. doi: 10.1073/pnas.1601630113. Epub 2016 Apr 5. (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

Amita M, Ezashi T, Schulz LC, Schust DJ, and Roberts RM. Trophoblast cells generated from human induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from umbilical cord by using BMP4 can be disease models for early placental disorders. 第 70 回米国生殖医学会議 ハワイ・コンベンション・センター(ハワイ、米国) 2014 年 10 月 18 - 22 日

Amita M, Roberts RM. Trophoblast cells generated from human induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from umbilical cord by using BMP4 can be disease models for early placental disorders. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 2015 年 4 月 9 - 12 日

[図書](計 2 件)

網田光善、鈴木聡子、永瀬智. 不妊・不育症診療パーフェクトガイド 『臨床婦人科産科』2016 増刊号 vol.70 no.4 (大道正英、藤原浩、亀井良政編) 医学書院 2016 : p130 - 133, p145 - 147

網田光善、齊藤英和. 女性不妊における治療薬の基礎と実践: いつ・だれに・どう使うか - GnRH アナログ. 薬局 2017;68(2)p55-59

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

網田 光善 (AMITA MITSUYOSHI)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センター・医員  
研究者番号: 30420061