

論文の内容の要旨

論文題目：

ヒト絨毛細胞の一次培養系の確立とそれを用いた低酸素刺激に対するヒト絨毛細胞の反応に関する生理学的、病理学的研究

指導教員 藤井 知行 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月 入学

医学博士課程 生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 永松 健

ヒト胎盤の形成発達において絨毛細胞は中心的役割を果たす。絨毛細胞には主に 2 つの分化の方向性がある。前駆細胞である *cytotrophoblast* (CT) が合胞体を形成し絨毛表面を被覆する *syncytiotrophoblast* (ST) を形成する方向性と、CT が付着絨毛先端で増殖し、*cell column* を形成しつつ浸潤能獲得して子宮壁内へと浸潤する *extra-villous trophoblast* (EVT) への分化の方向性である。特に、EVT の浸潤は脱落膜内～子宮筋層内腔側約 1/3 の深さの血管壁に及び、子宮壁の血管構造が再構築され、それに伴い絨毛間腔へと流入する母体血液量が飛躍的に増大する。この EVT の働きは *first trimester* から *second trimester* 前半において胎盤形成の大きな原動力となっている。また、妊娠高血圧症候群、子宮内胎児発育不全、習慣流産などの異常妊娠では EVT の細胞機能異常を背景とした胎盤形成不全が示唆されている。

胎盤局所で絨毛細胞をとりまく酸素濃度は妊娠週数、胎盤内での位置により変化する。そして、この局所酸素濃度が EVT の増殖、浸潤を制御する重要な因子となっているこ

とが明らかとなってきた。一般的に創傷治癒、腫瘍発育において知られるように低酸素刺激は血管新生を促進する要素である。EVT の重要な役割である子宮壁内の血管構造の再構築においては種々の血管新生因子の関与が想定される。しかし、局所酸素濃度が EVT の血管新生因子の発現にどのような影響を与え、血管構造変化に関与するかについては全く未解明であった。

このように EVT の細胞機能の研究は胎盤形成、発達についての生理的、病理的機構解明に深く結びついている。しかし、EVT 研究における障害として初代培養の困難があり、定量的解析を行うに足る安定した培養系が確立していないことが挙げられる。

そこで本研究の目的としてまず、①初代 CT 分化培養モデルを確立し、その培養モデルを用いて②培養酸素濃度が EVT の細胞機能 (増殖、分化) に与える影響について調べ、さらに③血管新生での中心的機構である vascular endothelial growth factor (VEGF) ファミリー分子の CT における低酸素刺激に対する発現変化の検討を行った。

①CT 分化培養モデルの確立

妊娠初期の人工妊娠中絶例よりインフォームドコンセントの上入手した胎盤組織より密度勾配遠心法と CD9 抗体でコーティングした磁気ビーズによる negative selection との組み合わせにより高純度の未分化な CT を分離した。細胞接着性の安定と EVT への統一的な分化を生じさせることを目標として、培養条件の至適化を行った。培養 medium のカルシウム濃度による培養状態の違いを検討し、培養器にコーティングする細胞外基質として laminin、fibronectin、collagen type 4 で細胞接着性を比較した。つづいて、培養 CT から EVT への分化状況を、EVT の分化マーカーである CD9、HLA-G 及び発現する integrin の種類についてフローサイトメトリー法、細胞免疫染色法で確認した。

低カルシウム濃度の medium を用いて collagen type 4 上で分離した CT を培養することで 144 時間までの単層で安定した接着状態を維持できる系を確立した。この方法で培養した CT では分離直後には CD9、HLA-G が低発現であり、培養時間とともに発現上昇を認めた。また表面に発現する integrin は $\alpha 6$ が低発現、 $\alpha 5 \beta 1$ が高発現であり、 $\alpha 1$ の発現は分離直後には検出されなかったが、培養時間に伴い急激に増加した。培養 CT のこれらの変化は付着絨毛先端で CT から EVT への分化と一致した変化であった。

②低酸素刺激が培養 CT の増殖、分化に与える影響について

まず、①において確立した CT 分化培養モデルを利用して、同一の胎盤から分離した CT を 20%、8%、2% の 3 つの異なる酸素濃度条件下で培養し、72 時間後の細胞数を比較した。酸素濃度の低下に従い細胞数が増加し、培養 CT は低酸素濃度下では増殖が促進されることが確認された。

酸素濃度が CT 分化に与える影響を調べるため同一の胎盤から分離した CT を異なる

酸素濃度条件下で 72 時間培養し、HLA-G、CD9、integrin $\alpha 1$ の発現をフローサイトメトリー法で検討した。CD9、integrin $\alpha 1$ の発現は 2%酸素濃度条件下では 20%条件と比べて減弱した。一方で HLA-G は酸素濃度の影響を受けないことが判明した。

③低酸素刺激と VEGF システムバランスの変化

低酸素刺激が CT での VEGF 関連分子の発現にどのような影響を与えるかについて検討するため、VEGF ファミリーの代表的リガンドである VEGF、placenta growth factor (PlGF) とそれらの生理的アンタゴニストである soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) の発現を中心に実験を進めた。CT のみならず比較のため胎盤構成細胞である villous fibroblast (VF)、human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) についても検討した。蛋白レベルでの発現変化は、培養細胞の免疫染色あるいは medium 内の濃度を ELISA 法にて計測することにより解析した。mRNA レベルでの発現変化は real-time PCR 法により確認した。

低酸素刺激により CT 培養上清中では sFlt-1 の濃度が増加し、CT 内の mRNA 量も上昇した。それに対して VF、HUVEC では sFlt-1 発現変化は生じなかった。低酸素刺激による VEGF の mRNA 発現増加は CT、HUVEC、VF に共通していた。低酸素刺激で VF 培養上清中では free VEGF (sFlt-1 と結合していない VEGF) 濃度が上昇した。CT 培養上清中では total VEGF (VEGF の総量) が増加していたが、free VEGF は検出されなかった。これは同時に存在する sFlt-1 の濃度上昇により VEGF の増加が打ち消されたためと考えられた。free PlGF は低酸素刺激により CT 上清中で濃度が低下し、HUVEC 上清中では変化を認めなかった。CT 細胞内の PlGF の mRNA 量は酸素濃度の変化を生じておらず、上清中の free PlGF の低下は同時に産生される sFlt-1 が低酸素刺激により増加したことによる 2 次的変化と考えられた。

本研究において、妊娠初期胎盤から高純度の CT を分離し、低カルシウムの medium と collagen type 4 をコーティングした培養容器を用いることで安定した培養状態を維持することが可能となった。培養 CT は時間経過とともに extra-villous type への分化を示し、CT の分化培養モデルを確立できた。

低酸素刺激により培養 CT の増殖能は亢進した。付着絨毛先端で CT が増殖して生じる cell column の形成は妊娠初期には活発であるが、中期以降は減少する。これが胎盤内の酸素濃度の変化に伴う現象であることが本研究の結果から示唆された。EVT の分化マーカーである CD9、integrin $\alpha 1$ は EVT の浸潤に重要な働きを有することが知られている。これらの分子の発現が酸素濃度による制御を受けることを確認した。EVT はその浸潤過程において、酸素濃度の高い母体側へ方向へと移行する。その酸素濃度変化によりこれらの浸潤関連分子の発現が影響を受けていることが示された。しかし、同じく EVT への分化に伴って発現が増加する HLA-G については酸素濃度の影響を認めず、

酸素濃度に依存しない分化制御因子も存在すると考えられる。

低酸素刺激に対しての胎盤構成細胞の VEGF システムバランスの検討では、低酸素刺激により sFlt-1 の発現を増加することは CT に特徴的な反応であった。この sFlt-1 の増加により CT 培養上清中では、2 次的に free VEGF は抑制され、free PlGF が低下していた。この CT の一連の反応は低酸素による血管新生促進という一般的概念と矛盾しているように思われる。CT が EVT へと分化し脱着膜内へと浸潤し、子宮壁内の血管構造を再構築する過程は通常の血管新生とは異なった現象であるが、これは CT における酸素濃度に対する特殊な VEGF システムバランスの調節に起因する可能性がある。また、妊娠高血圧症候群の妊婦末梢血で sFlt-1 の上昇、PlGF の低下が近年報告されている。これについては、今回の研究より妊娠高血圧症候群での重要な病理機序である胎盤内低酸素状態により CT での sFlt-1 の産生増加、および free PlGF の 2 次的減少に起因することが示唆され、胎盤内低酸素に対する CT の反応に起因した VEGF システムバランスの変化が妊娠高血圧症候群の病理機序と深く結びついていることが示された。