審査の結果の要旨

氏名　　永松　　健

本研究はヒト胎盤の形成おける中心的役割を担う extra-villous trophoblast (EVT)の細胞機能と酸素濃度との関わりについて明らかにすることを目的としている。そのために EVT の初代培養系を確立し、その培養系を中心として異なる酸素濃度下に培養した絨毛細胞の増殖、分化、VEGF 関連因子発現について解析を行い、下記の結果を得ている。

1．EVT の分化培養モデルを確立した。その過程において、妊娠初期胎盤から cytotrophoblast (CT)を高純度に分離し、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至適培養条件を得た。この条件下で培養 CT が時間経過とともに extra-villous type への分化を生じることを、EVT の分化マーカーの発現上昇によって確認した。

2．同一胎盤から得た CT を異なる酸素濃度下で培養し細胞数の変化を WST－8アッセイにて比較することで、低酸素刺激により培養 CT の増殖能は亢進することを示した。

3．低酸素刺激によって EVT の分化マーカーである CD9、integrin α1 の細胞膜上への発現が抑制されることをフローサイトメトリー法にて示した。これにより、酸素濃度は CT から EVT への分化へ影響する因子であることを確認した。その一方で別の分化マーカーである 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ことについて示唆を得た。

4．胎盤構成細胞であるCT、villous fibroblast (VF)、human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) の培養を行い、これらの細胞が低酸素刺激に対して VEGF 関連因子の発現をどのように変化するかについて蛋白、mRNA のレベルで解析が行われた。低酸素刺激に対して、3 種類のすべての細胞で VEGF の発現上昇が確認された。また、PlGF の発現には変化が生じなかった。それに対して、sFlt-1 に関して低酸素刺激により sFlt-1 の発現を増加することは CT に特徴的な反応であり、VF、HUVEC では認められない反応であった。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。以上より CT は酸素濃度に対して VEGF システムバランスの特殊な調節機構を持つことが示された。

以上、本論文ではまず、従来定量的実験に耐えうる培養系がなかった EVT 初代培養法を確立した。この培養法は将来的にヒト胎盤の研究に大きな貢献を与えるものである。また、それを用いて低酸素刺激が EVT の増殖、分化、血管新生機能に影響を与えることを示した。これらの事実は胎盤形成における生理的メカニズムの解明、また妊娠高血圧症候群の病態機序の解明に寄与し、学位の授与に値するものと考えられる。