

学位論文

Hypoxia enhances the induction of human amniotic mesenchymal side population cells into vascular endothelial lineage through upregulation of gene expressions associated with angiogenesis.

(ヒト羊膜間葉系 SP 細胞の血管内皮細胞への分化誘導における低酸素の効果)

DM08024 丸山直子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻  
医療工学群 臨床工学  
指導教授 小林弘祐

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 要旨

ヒト羊膜間葉系 SP 細胞は未分化で多能性のある細胞である。また、免疫寛容の性質をもち、倫理的な問題も少ないため、再生医療の分野において応用されつつある。この研究目的は、未分化な幹細胞集団である羊膜間葉系 SP 細胞を対象とし、血管内皮細胞への分化誘導に低酸素条件が有効であるかどうかを評価することである。

帝王切開にて得られた胎盤より羊膜を採取し、酵素処理によって羊膜間葉系細胞を分離した。Hoechst33342 にて染色し FACS を用いて SP 細胞を抽出した。得られたヒト羊膜間葉系 SP 細胞を誘導培地(DMEM/F12+2% FBS+50 ng/ml VEGF)を用いて常酸素(20% O<sub>2</sub>)または低酸素(1% O<sub>2</sub>)の環境下で 1 週間または 2 週間、I 型コラーゲンコートディッシュ上で培養した。コントロールとして VEGF を含まない通常培地(DMEM/F12+2% FBS)を用いた。

誘導後、Real-time PCR と免疫組織染色により、血管内皮マーカーの発現を調べた。Real-time PCR の結果によると、VEGF を添加し低酸素下で培養した群では、VEGF を添加し常酸素下で培養した群と比較すると、KDR, VCAM, Flt-1, vWF の発現が有意に高いことがわかった。また、免疫組織染色の結果によると、KDR と VE-cadherin のタンパクの発現は VEGF を添加し常酸素および低酸素下で 2 週間培養した両群において陽性であった。低酸素下での血管内皮細胞への分化誘導に HIF が関与しているか調べるために HIF-1 下流の遺伝子をマイクロアレイにより調べたところ、誘導前に比べて VEGF を添加して低酸素下で 2 週間培養した群において、VEGFA, Flt-1, EPO, ENO-1, ADM, EGLN-3 といった HIF-1 によって制御される遺伝子が 2 倍以上に発現が大きくなっていた。

羊膜間葉系 SP 細胞は VEGF を添加し低酸素条件で培養することにより血管内皮マーカーの遺伝子やタンパクの発現が増強され、血管内皮細胞への分化が進んだことが認められた。それは HIF-1 の活性化に伴い血管新生に関連する遺伝子の発現が増進されたためと考えられた。

## 目次

1 序論 .....	1
2 方法 .....	5
2-1 羊膜間葉系 SP 細胞の準備 .....	5
2-1-1 胎盤処理 .....	5
2-1-2 羊膜上皮細胞と間葉系細胞の単離 .....	6
2-1-3 羊膜間葉系 SP 細胞の sorting .....	6
2-1-4 羊膜間葉系 SP 細胞の継代培養 .....	7
2-2 血管内皮細胞への分化誘導培養 .....	7
2-3 Real-time PCR .....	7
2-3-1 total RNA の精製 .....	7
2-3-2 cDNA の合成 .....	8
2-3-2 Real-time PCR の開始 .....	9
2-4 免疫組織化学 .....	11
2-5 マイクロアレイ解析 .....	12
2-6 統計 .....	12

3	結果.....	13
3-1	血管内皮マーカーの遺伝子発現.....	13
3-2	血管内皮マーカーおよび Oct3/4 のタンパク発現.....	13
3-3	マイクロアレイ解析.....	14
4	考察.....	15
5	結論.....	17
6	謝辞.....	18
7	引用文献.....	19
8	図表.....	22

## 1 序論

精子と卵子の受精で生じる受精卵は、1つの細胞から個体を生み出す全能性 (totipotency) を持つ。全能性は卵割に伴い徐々に失われ、胚盤胞になると栄養外胚葉 (trophoblast ; TE) と内部細胞塊 (inner cell mass ; ICM) の2つの細胞集団へと分かれる。TE は胎盤などの胚外組織を作り、ICM は胎児のすべての細胞 (体細胞および生殖細胞) と一部の胚外組織 (羊膜) に分化する多能性 (pluripotency) を有している。ICM からは、多能性を維持した胚性外胚葉 (epiblast) と、分化細胞である原始内胚葉が生じ、子宮壁内に着床する。Epiblast は、原腸形成により三胚葉へと分化し、多能性を失う。一部の細胞は始原生殖細胞 (primordial germ cell ; PGC) となり、生殖巣に移動する。ICM や PGC からは多能性幹細胞が樹立される。三胚葉からは体性幹細胞 (組織幹細胞) を経て各臓器、組織が作られる。出生後も体性幹細胞は組織に潜んでおり、細胞数の維持に関わっていると考えられる。

多能性幹細胞の代表例は胚性幹 (embryonic stem : ES) 細胞である。ES 細胞は着床直前の初期胚である胚盤胞から樹立される。胚盤胞は胎盤などの胚外組織に分化する TE と、胎児へと分化する ICM から成るが、この ICM を体外で培養することに成功したのが ES 細胞である。ES 細胞は未分化なまま半永久的に分裂を繰り返す高い増殖能と、三胚葉系の様々な細胞へと分化する多能性 (pluripotency) を有している。多くの体性幹細胞が未分化性を保ちながら培養し続けることが困難であるのに対して、ES 細胞の未分化維持能は際だっており、いくつかの未分化維持に重要な機能を持った遺伝子が知られているが、特に中心的な転写因子は v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC) 、POU domain class 5 transcription factor 1 (Oct3/4) 、SRY (sex determining region Y)-box 2 (Sox2) 、Nanog homeobox (Nanog) であると同定された(1)。ES 細胞の多能性を維持する液性因子として leukemia inhibitory factor (LIF) が同定された。LIF シグナルは signal transducer and activator of transcription 3 (stat3) へと伝達される。活性化した stat3 は核内へと移行し、様々な下流遺伝子の発現制御を行う。LIF 非存在下でも stat3 の活性のみで未分化を維持できることから、stat3 の下流遺伝子は多能性維持に必須な遺伝子が含まれると考えられた。同定されている下流遺伝子の中で最も効果の大きい転写因子として MYC が知られている(2)。Oct3/4 は ES 細胞、初期胚および生殖細胞において特異的に発現する POU ファミリー転写因子として同定された。ES 細胞において Oct3/4 の発現量を抑制すると栄養外胚葉へ分化する。一方、ES 細胞において Oct3/4 を過剰発現させると、原始内胚葉や中胚葉への分化が誘導される。3方向 (未分化、栄養外胚葉への分化、原始内胚葉や中胚葉への分化) へのスイッチとして作用する(3)。Sox2 は Sox 遺伝子ファミリーに属し、ES 細胞、初期胚および生殖細胞に加えて神経幹細胞において発現する。Sox2 は内部細胞塊と ES 細胞の両方で分化多能性維持に必須の役割を果たす。NANOG はホメオボックス転写因子であり、その発現は Oct3/4 や Sox2 に比較してより多能性細胞に局限した発現をする遺伝子である。また 2 方向 (未分化と原始内胚葉への分化) へのスイッチとして作用し、多能性を促

進する転写因子である(4)。

体性幹細胞は成体の各種組織に存在し、発生や修復に携わる生理的な細胞である。ES 細胞との比較で体性幹細胞の特徴を表現すると、まず、分裂速度は遅い。生体に存在する体性幹細胞の大部分は静止期(G0 期)にあると考えられ、細胞周期から逸脱しているか、あるいは非常にゆっくりと細胞周期が動いていると考えられる。幹細胞を考えるうえで細胞周期は非常に重要な意味をもつ。また、老化した成体においても幹細胞を生存させ続けるために、幹細胞ではテロメラーゼ活性が高く、テロメア長が保たれていると考えられる。もう一つの特徴として、幹細胞は臓器全体からみると非常に頻度が低いことが挙げられる。最もよく研究が進んでいる造血幹細胞では、骨髄細胞の約  $10^5$  個に 1 個しか幹細胞が存在しない。幹細胞と分化した細胞の間には TA 細胞 (transit amplifying cell) と呼ばれる非常によく分裂する細胞があり、この細胞の増殖により、多くの分化細胞が産生される。すなわち、未分化な幹細胞はあまり分化しない一方で、分化の方向に向かった細胞は活発に増殖・分化することにより、幹細胞システム全体が維持されているのである。分化能に関しては、複数の細胞に分化するものが多いことから多能性 (multipotency) と表現されるが、ES 細胞の多能性 (pluripotency) と比べると分化の方向が限定される。また、1 種類の終末分化細胞にしか分化できない単能性 (unipotency) の幹細胞も存在する。血液細胞や消化管上皮、皮膚上皮細胞など寿命が比較的短い細胞には幹細胞が存在し、これらの細胞を一生の間供給し続けることは一世紀前から知られていた。しかし、神経や骨格筋といった再生しない臓器・組織にも幹細胞が存在することが明らかになっている。体性幹細胞は骨髄や血液、角膜や網膜、肝臓、消化管、皮膚、精巣などで発見されており、脳や心臓など、従来は幹細胞が存在しないと思われていた場所でも確認されている。骨髄に存在する間葉系幹細胞は、骨髄細胞のみならず、骨格筋細胞、心筋細胞、骨細胞など他の種類の細胞へも分化することがわかった(5)。Verfaillie らのグループにより、骨髄に多能性幹細胞が存在することが報告され、血管内皮細胞に分化する細胞として中胚葉系前駆細胞 (mesodermal progenitor cell: MPC) をヒト骨髄より分離し、報告した。さらに、この細胞は外胚葉由来の神経細胞、内胚葉由来の肝細胞など三胚葉への分化能を有することが報告され、multipotent adult progenitor cell (MAPC) と名付けられている(6)。

体性幹細胞を純化する方法の一つとして、Hoechst 33342 という DNA に結合する色素を用い、抗体を使用しない方法がある。Hoechst 33342 は、Bisbenzimid というクラスに属す蛍光色素で、細胞透過性が非常に高く、そのため生きた細胞に細胞を固定することなく取り込まれる。また、単一の色素でありながら UV で励起されると、450 nm (Blue) および 675 nm (Red) の蛍光を発し、通常の細胞周期アッセイで見られる G0/G1 および S/G2 の分画のほかに、G0/G1 よりもさらに暗い部分に非常に特異なパターンをもつ Hoechst 陰性の細胞集団を観察することができる。Goodell らはマウス骨髄細胞を Hoechst33342 で染色し、fluorescence activated cell sorter (FACS) を用いて、縦軸に 450 nm の蛍光強度、横軸に 675 nm の蛍光強度をとって 2 次元解析を行ったところ、両波長の蛍光強度が共に弱い領域の細胞群集団

が存在することを見だし、Side Population Cells（以下 SP 細胞）と名付けた(7)。また、その後の研究から SP 細胞はマウスやヒトに限らず種を超えて存在すること、また、骨髄以外の肝臓や筋肉など種々の組織にも存在することがわかった(8-11)。この SP 細胞分画はベラパミルなどの multi drug resistance (MDR) 分子阻害薬を添加すると完全に消失することから、MDR 様の分子によって細胞内から色素が汲み出されることにより G0/G1 よりもさらに暗い部分を生じると考えられてきたが、その原因遺伝子として BCRP1 (breast cancer resistance protein 1) が必須であると報告されている(12)。この Hoechst33342 の蛍光強度が低ければ低いほど未分化な細胞である。言い換えれば、未分化な細胞ほど蛍光色素をより細胞外に汲み出す能力が高いことを示唆する。

個体形成に参加しない胚体外組織中にも体細胞に分化しうる細胞の存在が報告されている。胚体外組織のうち、羊膜は内部細胞塊より形成されるが、発生途中で個体形成から外れるという発生学的特徴がある。盤胞における内部細胞塊が、胚盤葉上層および下層に分かれた後、上層がさらに外胚葉と、羊膜上皮の元となる羊膜芽細胞に分かれ、発生してくる。また、羊膜間葉系細胞は中胚葉のうち、胚外壁側中胚葉より形成される。このように羊膜細胞は ES 細胞が分化した組織より由来する胎児由来の組織である。そのため、胚体外組織の中でも特に羊膜組織中の細胞に多能性幹細胞が含まれている可能性があると考えられている。これまでに、羊膜上皮および間葉系細胞において未分化細胞の特徴を示す遺伝子 Oct-4 の発現、神経幹細胞に発現する Nestin および Musashi-1 の発現が確認され、羊膜由来細胞に未分化な細胞群が含まれること(13)、またニューロン、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへの分化を確認し、多能性があることが報告されている(14)。また、羊膜はほとんど血管成分を含まず免疫寛容の性質をもつため、同種移植に用いても急性拒絶反応を起こさない(15)。羊膜は、低い免疫原性をもち human leukocyte antigen (HLA) class II は発現せず、class I の発現も低い(16)。種々の免疫抑制因子を産生することで免疫反応を抑制するシステムも有し、羊膜上皮に発現する CD59 は補体系の免疫反応を抑制する(17)。さらに、interleukin-1 receptor antagonist (IL-ra), IL-10, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs), thrombospondin (TSP)-1, collagen (Col) XVIII は、羊膜上皮細胞と間質細胞に発現し、免疫抑制および血管新生抑制に関わる因子である(18)。また、羊膜は通常出産後に破棄されるため、倫理的問題が少なく細胞の供給が豊富である。これらの理由から、羊膜は再生医療の分野において新しい材料として応用されつつある。

これまでに、ヒト羊膜間葉系細胞はニューロン、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへの分化は報告されているが(14)、血管内皮細胞へ分化することを検討した報告は少ない。Koning, J.M.らは羊膜間葉系細胞を内皮細胞培地(EGM-2)を用いて培養を行ったところ、形態学的に線維芽細胞様から血管内皮様になり、アセチル化 low-density lipoprotein (LDL)の取り込みも確認され、マトリゲル上での網目構造が構築された。血管形成の可能性は示したが、成熟した血管に発現する vascular endothelial (VE)-cadherin や von Willebrand factor (vWF)は発現しないと報告した(19)。



なお、EGM-2 には human epidermal growth factor (hEGF)、ヘパリン、ヒドロコルチゾン、fetal bovin serum (FBS)、human fibroblast growth factor-basic (hFGF-B)、アスコルビン酸、vascular endothelial growth factor (VEGF)、R3-insulin-like growth factor (IGF)-1、50 mg/ml ゲンタマイシン 50  $\mu$ g/ml アンホテリシン-B (GA-1000)が添加されている。新生血管構築の実験においては、羊膜間葉系細胞をマトリゲル上で培養したとき、VEGF を添加して誘導を行うことで血管新生はより促進されたことが確認されており、VEGF は羊膜間葉系細胞を血管内皮細胞へ分化させるのに有用であることが示されている。VEGF は fms-like tyrosine kinase (Flt)-1 や kinase domain region (KDR) といった VEGF レセプターの発現を増強するだけでなく、さらに intercellular adhesion molecule (ICAM)-1、CD34、vWF などの血管内皮細胞に特異的なマーカーの発現を誘発させることが報告されている (20)。また、ヒト羊水由来細胞も間葉系細胞として用いられており、EGM-2 培地を用いてマトリゲル上で培養したところ、網状構造が観察され、アセチル化 LDL の取り込みも認められた。さらに攪拌機でせん断応力を加えながら EGM-2 培地で培養したところ、CD31 や vWF の mRNA やタンパクの発現増強が確認され、5%の低酸素条件で培養したところ、VEGF や placental growth factor (PGF) の mRNA の有意な発現が認められたことが報告されている(21)。

血管新生はさまざまな低酸素環境によって誘発される。例えば、未熟児の網膜症(22)、創傷部の血管新生(23, 24)、腫瘍血管新生(25, 26)など虚血に陥った組織において低酸素や増殖因子の影響で血管新生が促進される。低酸素条件での血管新生に重要な役割を果たすのは低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor : HIF)システムである。低酸素条件下では VEGF の転写が促進され、VEGF のレセプターである Flt-1 や KDR の発現も増強される。それによってさらに VEGF が盛んに分泌される(27)。

われわれの研究目的は、より未分化な幹細胞集団である羊膜間葉系 SP 細胞を対象とし、血管内皮細胞への分化誘導に低酸素条件が有効であるかどうかを評価することである。誘導因子 VEGF の有無、低酸素(1%)と常酸素(20%)、誘導期間を 1 週間および 2 週間として検討を行った。血管再生は器官再生や組織再生において不可欠であり、再生医療の発展の中心的役割を担うと考えられる。免疫拒絶反応が起きにくい羊膜細胞を用いて血管を再生できたら治療の応用範囲は広がると考えられる。

## 2 方法

本研究は北里大学医療衛生学部の倫理委員会の承認（2009-015「羊膜幹細胞の分子生物学的特徴についての網羅的検討」）を得て行ったものである。

### 2-1 羊膜間葉系 SP 細胞の準備

試料：帝王切開を予定していた妊婦にインフォームドコンセントを行い、出産後に得られた胎盤を用いて実験を行った。

使用薬液：

DMEM+：DMEM (Sigma-Aldrich) , 10mM HEPES buffer (Sigma-Aldrich), 2% FBS (Sigma-Aldrich), 10 mg/mL streptomycin, 10000U/mL penicillin, and 200 $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

PBS(-)：Phosphate buffered saline without calcium and magnesium

Trypsin-EDTA solution：0.1% Trypsin (Sigma-Aldrich), 0.01% EDTA (DOJIN) in PBS(-)

Enzyme solution：DMEM+、1 mg/mL Collagenase (Sigma-Aldrich), 0.1% (v/v) Dispase II (Roche), 0.01% (w/v) Dnase I (Sigma-Aldrich)

AEC culture medium：DMEM/F12 (1:1 mixture; Sigma-Aldrich), 5%FBS, 10 mg/mL streptomycin, 10000 U/mLpenicillin, 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 10 ng/mL recombinant human epidermal growth factor (PEPROTECH)

AMC culture medium：DMEM/F12, 5% FBS, 10 mg/mL Streptomycin, 10000 U/mL Penicillin, and 100  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol, 10 ng/mL recombinant human epidermal growth factor, 10 ng/mL recombinanthuman fibroblast growth factor-basic (PERPROTECH), 10 ng/mL recombinant human leukemia inhibitory factor (CHEMICON)

#### 2-1-1 胎盤処理

- ①帝王切開にて採取されたヒト胎盤および胎膜を、500mL DMEM+の入った 3000mL ビーカーに入れた。操作は無菌条件下で行った。
- ②胎盤および胎膜をトレイに取り出し、クリーンベンチ内において PBS(-)で洗浄した。また、作業中は羊膜を乾燥させないように注意した。
- ③鉗子を用いて胎盤と臍帯の接合部より胎膜から羊膜を剥離した。羊膜は無血管性の組織で半透明、また裂傷に対して強いため、絨毛膜、脱落膜と区別できる。
- ④羊膜を 3×3cm 程度の切片にハサミで切り、200mL ビーカー内で PBS(-)により洗浄した。
- ⑤膜の両面に付着した血液を cell scraper を用いて除去した。

⑥PBS(-)中でさらに小さい切片 ( $1.5 \times 1.5\text{cm}$  程度) に鉋で切り分けた。

## 2-1-2 羊膜上皮細胞と間葉系細胞の単離

### 1) 羊膜上皮細胞の単離

- ①trypsin-EDTA solution を 20 本の 50ml コニカルチューブに分配し、 $37^{\circ}\text{C}$  に加温した。
- ②羊膜の切片を暖めた 5 本の trypsin-EDTA solution (T-E1) に均等に分布し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 25 分間振盪した。
- ③trypsin-EDTA 処理後の羊膜を次の trypsin-EDTA solution (T-E2) に移し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 15 分間振盪した。
- ④その間に、T-E1 チューブを 1,500rpm で 5 分間遠心操作を行い、沈殿したペレット (羊膜上皮系細胞; AECs) を培養液 (hAEC-1) に懸濁して 1 本のチューブに集めた。
- ⑤懸濁液を cell strainer (BD, 352350) で濾過し、hAEC-1 の細胞数を血球計算器で数えた。
- ⑥trypsin-EDTA 処理を繰り返し、hAECs を 4 回採取した。
- ⑦すべての hAEC の細胞数を数えた。
- ⑧AEC culture medium に細胞を  $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  の密度で播種した。5-7 日後、hAECs は culture dish に接着し、上皮系細胞様の形状を示した。

### 2) 羊膜間葉系細胞の単離

- ①enzyme solution を  $37^{\circ}\text{C}$  に加温した。
- ②trypsin-EDTA 処理後の羊膜を DMEM+ で洗浄した。
- ③羊膜の切片を DMEM+ 中でさらに小さく ( $5 \times 5 \text{ mm}$ ) 切り、加温した enzyme solution の入った 5 本のチューブに均等に入れ、 $37^{\circ}\text{C}$  で 60 分間振盪した。
- ④酵素処理後の残留物をステンレスメッシュで濾しとった。細胞溶液を 50 mL チューブに入れ、1500 rpm で 5 分間遠心操作した。
- ⑤ペレットを新しい培養液で懸濁し、cell strainer で濾過した。
- ⑥細胞数を数え、AMC culture medium に  $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  の密度で播種した。2-3 日後、hAMCs は culture dish に接着し、繊維芽細胞様の形状を示した。

## 2-1-3 羊膜間葉系 SP 細胞の sorting

得られた羊膜間葉系細胞を蛍光色素 Hoechst33342 で染色し、紫外線 (UV) レーザーで励起した。fluorescence activated cell sorter (EPICS Altra; Beckman Coulter) により、励起された細胞が発する 2 種類の蛍光から縦軸に波長 450nm の蛍光強度、横軸に波長 675nm の蛍光強度をとり、二次元解析を行った。両波長の蛍光強度が共に弱い細胞集団を SP (Side Population) 細胞群、他の細胞を MP (Main Population) 細胞群としてソーティングして得られた。

\*ただし、この SP 細胞のソーティングの工程は非公開であるため、本学医療衛生

学部の桜川客員教授に委託した。

#### 2-1-4 羊膜間葉系 SP 細胞の継代培養

得られた羊膜間葉系 SP 細胞を、I 型コラーゲンコートディッシュ (Iwaki) 上で 37°C、5% CO<sub>2</sub> で専用の増殖培地を用いて培養した。細胞が 90% コンフルエントになったところで 0.1% trypsin-EDTA solution によって細胞を剥離し、細胞数をカウントし、 $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度になるように播種した。

羊膜間葉系 SP 細胞用の増殖培地：

Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich)

+5% FBS (Sigma-Aldrich)

+10 ng/ml platelet-derived growth factor (PDGF)-BB (PeproTech)

+10 ng/ml human Leukemia Inhibitory Factor (hLIF) (Chemicon-Merck Millipore)

+10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (PeproTech)

#### 2-2 血管内皮細胞への分化誘導培養

羊膜間葉系 SP 細胞を増殖培地を用いて 4~5 継代まで培養したのち、増殖培地を吸引除去し PBS(-) で洗い流した。50 ng/mL VEGF (PeproTech) と 2% FBS を添加した DMEM/F12 を血管内皮分化誘導用の培地として用い、I 型コラーゲンコートディッシュ上で、常酸素濃度 (Normoxia、20% O<sub>2</sub>) と低酸素濃度 (Hypoxia、1% O<sub>2</sub>) の条件下で行った。また、培養期間は 1 週間および 2 週間とした。コントロール培地として 2% FBS を含む DMEM/F12 を用いた。血管内皮分化誘導用培地とコントロール培地は 2 日ごとに培地交換を行った。羊膜間葉系 SP 細胞を血管内皮細胞へ誘導培養を行った後は、Real-time PCR と免疫組織化学によって血管内皮マーカーの発現を調べ、評価を行った。

## 2-3 Real-time PCR

血管内皮細胞に特異的な mRNA の発現を検出するために、quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)を用いた。

### 2-3-1 total RNA の精製

使用した試薬；

培養細胞中の RNA の安定化：RNAprotect<sup>®</sup> Cell Reagent (QIAGEN)

total RNA 精製：RNeasy Plus Mini Kit<sup>®</sup> (QIAGEN)

- ①細胞培養液あるいは保存液量の 5 倍容量の RNAprotect Cell Reagent を添加し、ピペティング、ボルテックスにより混和した。
- ②細胞と RNAprotect Cell Reagent のミックスをマイクロ遠心チューブに入れ、5,000 ×g で 5 分間遠心操作した。上清をピペットで完全に除去した。チューブを軽くたたいてペレットをルーズにした。β-mercapethanol を加えた Buffer RLT Plus を 350 μl 添加し、1 分間ボルテックスすることにより、細胞を破碎した。
- ③2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder スピンカラムにライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで 2 分間遠心操作し、ホモジナイズした。
- ④ライセートを 2 ml のコレクションチューブにセットした gDNA Eliminator スピンカラムに入れ、8,000 ×g (10,000 rpm) 以上で 30 秒間遠心操作した。カラムを捨てて濾液を保存した。濾液に同容量の 70%エタノールを添加し、ピペットでよく混和した。
- ⑤サンプルを 2 ml のコレクションチューブの中にセットした RNeasy スピンカラムにアプライし、8,000 ×g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作し、濾液を捨てた。
- ⑥コレクションチューブを再使用し、700 μl の Buffer RW1 を RNeasy スピンカラムに添加した。8,000 ×g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作し、スピンカラム・メンブレンを洗浄し、濾液を捨てた。
- ⑦RNeasy スピンカラムに 500 μl の Buffer RPE を添加し、8,000 ×g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作することによってカラムを洗浄し、濾液を捨てた。
- ⑧RNeasy スピンカラムに 500 μl の Buffer RPE を添加し、カラムを乾燥させるために 8,000 ×g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作した。RNeasy スピンカラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、最高スピードで 1 分間遠心操作を行った。
- ⑨RNeasy スピンカラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブにセットし、RNase フリー水 30 μl を直接スピンカラムのメンブレンに添加した。8,000 ×g (10,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作を行い、RNA を溶出した。溶出液を用いて再度 8,000 ×g (10,000 rpm) 以上で遠心操作を行い、高濃度の RNA を得た。

### 2-3-2 cDNA 合成

使用した試薬：iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)

抽出した total RNA を、iScript reaction mix (Oligo dT primer と random primer の混合)を用いて以下の手順で cDNA を合成した。

- ①5×iScript reaction mix 4μL、iScript reverse transcriptase 1μL を混合し、RNA sample を 10ng とし Total Volume が 20μL になるように Nuclease-free water で調節した。
- ②混合液をサーマルサイクラーに入れ、25℃で 5 分、42℃で 30 分、85℃で 5 分、4℃で 2 分以上インキュベートした。

### 2-3-2 Real-time PCR の開始

①定量化するために cDNA テンプレートの濃度を 10 倍、100 倍、1000 倍と TE Buffer で薄めて希釈系列を作った。

②Flt-1、KDR、VCAM、vWF、ハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) の 5 種類の上流プライマーと下流プライマーをそれぞれ用意し(table 1)、DNA テンプレートを 1 $\mu$ L と iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)を 10 $\mu$ L を調整し、Total Volume が 20 $\mu$ L になるように、滅菌 MilliQ 水で調節した。

※iQ SYBR Green Supermix には、PCR に必要な TaqDNA ポリメラーゼ、dNTP、Buffer と、蛍光色素である SYBR Green が含まれている。また、SYBR Green は、二本鎖 DNA に結合すると蛍光が増強する色素である。

③調合した混合液をリアルタイム PCR 用の 96well low Multiplate (Bio-Rad)に入れた。測定誤差を考慮してトリプリケートをとった。マイクロプレートをサーマルサイクラー (Chromo4 system : Bio-Rad)のブロックに置き、8 連フラットキャップで蓋をした。

④Real-time PCR のデータ解析には Opticon Monitor Ver3.0 (Bio-Rad)のソフトを使用した。サンプル容量とプロトコールを入力し、実行した。プロトコールは次の通りである。

```
..... 1.Incubate at 95°C for 00:09:00
..... 2.Incubate at 94°C for 00:00:30
..... 3.Incubate at 60°C for 00:01:00
..... 4.Plate Read
..... 5.Goto line 2 for 39 times
..... 6.Incubate at 65°C for 00:10:00
..... 7.Melting Curve from 65°C to 95°C,read every 0.2°C,hold 00:00:02
..... END
```

⑤目的の遺伝子発現量はハウスキーピング遺伝子の値を基準とし相対比として求めた。

## 2-4 免疫組織化学

- ①well plate に 500 $\mu$ L の培養液を入れ、各 well に Culture Cover (matsunami, C1100)を沈め、細胞を播種した。
- ②誘導培養後、各 well から培養液を除去し、PBS(-)を 500 $\mu$ L 添加、洗浄した。
- ③PBS(-)を除去後、4%paraformaldehyde (PFA)を 500 $\mu$ L 添加し、室温にて 10 分間、固定を行った。
- ④PFA を除去後、-20℃に冷却したメタノールを 500 $\mu$ L 添加し、-20℃にて 10 分間、細胞膜透過処理を行った。
- ⑤メタノールを除去後、0.05% Tween20 で 3 回洗浄した。
- ⑥Tween20 を除去後、スキムミルクを添加し、60 分間室温にて震盪、ブロッキングを行った。
- ⑦スキムミルクを除去後、一次抗体 anti human vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 mouse IgG (1:100; Immunotech), anti human KDR mouse IgG (1:100; Sigma), anti human vascular endothelial (VE)-cadherin mouse IgG (1:100; R&D), anti human vWF mouse IgG (1:50; Santa Cruz Biotechnology)をそれぞれPBS(-)で希釈し、各 well に 200 $\mu$ L ずつ添加した。Control は PBS(-)のみを添加した。60 分間室温にて震盪、一次抗体反応を行った。
- ⑧一次抗体を除去後、PBS(-)で 2 回洗浄した。
- ⑨PBS(-)を除去後、二次抗体 Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse goat IgG (Molecular Probes-Life Technologies)を 500 倍に PBS(-)で希釈し、各 well に 200  $\mu$  L ずつ添加した。60 分間室温にて震盪、二次抗体反応を行った。
- ⑩二次抗体を除去後、PBS(-)で 3 回洗浄し、スライドガラス上に封入し、標本を作製した。
- ⑪作成した標本について共焦点レーザー顕微鏡(IX70; Olympus)にて各蛍光の検出を行った。
- ⑫同様に Oct3/4 の発現も調べた。一次抗体は anti human Oct3/4 rabbit IgG (1:200; Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated anti rabbit goat IgG (1:500; Molecular Probes-Life Technologies)を用いた。

得られた RGB 画像のシグナル強度を数値化するために画像解析ソフトである ImageJ (National Institutes of Health)を用い、血管内皮マーカーは緑色のピクセル数、Oct3/4 は赤色のピクセル数をそれぞれ計算した。



## 2-5 マイクロアレイ解析

羊膜間葉系 SP 細胞を VEGF 添加した血管内皮分化誘導用培地を用いて低酸素条件下( $O_2$ : 1%)で 0 週間、2 週間培養した群についてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイは一枚で 47,000 以上の転写産物の解析が可能である、GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)を用いた。血管内皮誘導用培地を吸引し PBS で洗浄後に、トリプシンを用いて細胞を剥がした。Total RNA は 2-3-1 で述べたのと同様に RNeasy Mini Kit®(Qiagen)を用いて抽出した。最初に得られた RNA の 260nm と 280nm の吸光度を測定し RNA 濃度を定量し、吸光度比が  $1.9 < A_{260nm}/A_{280nm} < 2.0$  以内にあることを確認することで RNA の純度が高いことを確認した。簡単に説明すると、1 $\mu$ g の mRNA から T7-Oligo (dt) Primer をによって first-strand cDNA が合成した。続いて second-strand cDNA を合成し、その後ビオチンラベル化したヌクレオチドを用いて *in vitro* で cRNA を転写させた。増幅度は RNA の 50-100 倍となる。cRNA は細かくフラグメント化して、マイクロアレイに注入し、一晩ハイブリダイゼーションを行った。それからマイクロアレイを洗浄し、ストレプトアビジン-フィコエリトリンによって染色し、GeneChip Scanner 3000® (Affymetrix)でスキャンした。マイクロアレイにハイブリダイズされた cRNA から発する蛍光量を測定し遺伝子発現量として変換された。GAPDH の 3'/5'比は 1.34 と 1.63 と許容範囲内であった。BioB スパイクコントロールはすべての GeneChip において発現していた。BioC、BioD、Cre においても強い蛍光強度が確認された。BioB、BioC、BioD、Cre は大腸菌やバクテリオファージ P1 に由来する遺伝子で、ハイブリダイゼーションの質を確認するために加えられた。背景の蛍光強度は 93.8 と 102.6 であり、十分に低いことが確認された。遺伝子発現量のデータはエクセルファイルとして保存し、解析を行なった。

## 2-6 統計

Real-time PCR、免疫組織化学の結果は mean+SD で示し Bonferroni の多重比較を行った。P<0.05 を有意な差とした。

### 3 結果

#### 3-1 血管内皮マーカーの遺伝子発現

羊膜間葉系 SP 細胞の血管内皮細胞への分化能を調べるために KDR、Flt-1、VCAM、vWF の血管内皮マーカーの発現を real-time PCR によって評価をおこない、常酸素 VEGF(-)をコントロールとし、常酸素 VEGF(+)、低酸素 VEGF(-)、低酸素 VEGF(+) の 4 群において比較を行った。また、培養時間は 1 週間および 2 週間とした。

1 週間培養を行ったところ、KDR、VCAM、vWF においては変化がみられなかったが、Flt-1 は VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行った群において発現量の増加が確認された。(Fig.1)

2 週間培養すると、KDR、Flt-1、VCAM、vWF の発現量は VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養した群において増加した(Fig.2)。VEGF 存在下にて常酸素条件、VEGF 非存在下にて低酸素条件下で培養を行うとコントロールと比べて有意な差はみられなかった。一方、VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行った群では、VEGF 存在下にて常酸素条件下で培養した群に比べて有意に KDR、Flt-1、VCAM、vWF の発現量が増加した。このように低酸素条件下では VEGF による血管内皮細胞への分化が促進された。

#### 3-2 血管内皮マーカーと Oct3/4 のタンパク発現

羊膜間葉系 SP 細胞を VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間誘導培養後に、VCAM、KDR、vWF、VE-cadherin の血管内皮マーカーのタンパクの発現を免疫組織化学によって調べた。KDR と VE-cadherin は VEGF 存在下で常酸素および低酸素条件下で培養を行った両群において発現が確認された。一方、VCAM、vWF の発現は確認できなかった(Fig.3A)。ヒト肺動脈血管内皮細胞をポジティブコントロールとして使用しすべてのマーカーにおいて発現を確認した。画像解析ソフトの ImgeJ を用いて緑色のピクセル数を計算し発現量を定量化したところ、KDR では VEGF 存在下にて常酸素および低酸素条件下で培養を行った両群においてコントロール群に比して有意に発現していることがわかった( $P<0.01$ )。VE-cadherin においては VEGF 存在下にて常酸素条件下で培養を行った群においてコントロール群に比して有意に発現していることが確認され( $P<0.05$ )、さらに VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行った群では常酸素下で培養を行った群に比して有意に発現が大きいことがわかった( $P<0.01$ )(Fig.3B)。

血管内皮細胞へ誘導培養を行った後に、未分化な細胞が残っているかどうかを調べるために Oct3/4 のタンパクの発現を免疫組織化学によって確認した。誘導培養の条件は VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養し、誘導時間は 0、1、2 週間とした(Fig.4)。誘導前(0 週間)の羊膜間葉系 SP 細胞では Oct3/4 の強い発現がみられ、未分化な細胞であることが確認された。VEGF 存在下にて低酸素条件下で 1 週間誘導培養すると Oct3/4 の発現は 0 週間に比べると有意に減少したがまだ発現が残っていた。2 週間の誘導培養の後、Oct3/4 の発現はほぼ完全に消失した。Oct3/4 のタンパクの発現は培養時間とともに減少した。

### 3-3 マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析によって幹細胞マーカーと神経幹細胞マーカーの遺伝子発現を調べた。羊膜間葉系 SP 細胞を VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間誘導した群において、誘導前(0 週間)と比べると幹細胞マーカーである Nanog homeobox (NANOG) (4, 28)、POU domain class 5 transcription factor 1 (OCT3/4) (3, 29)、growth differentiation factor 3 (GDF3) (30) の発現が 1/2 以下に減少していた。Kruppel-like factor 4 (KLF4) (31)、v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC) (2)、SRF (sex determining region Y)-box 2 (SOX2) (32)、RNA exonuclease 1 homolog (REX1) (33)、fibroblast growth factor 4 (FGF4) (34)、telomerase reverse transcriptase (TERT) (35) の発現は VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間誘導した群では、誘導前(0 週間)に比べるとわずかに減少または同程度であった。神経幹細胞マーカーである nestin (36)と musashi (37) の発現は VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間誘導後に減少した。また、間葉系細胞マーカーである vimentin (VIM)(38)、fibronectin 1(FN1)(39)、cadherin 2 type 1 (CDH2)(40)、collagen type I alpha 1 (COL1A1)(41) は誘導前も VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間培養後も高発現であった(Table 2)。

低酸素条件下での誘導に HIF が関連しているかを調べるために、HIF-1 の下流遺伝子を選び、発現を調べた。VEGFA(42)、Flt-1(43)、erythropoietin (EPO)(44)、enolase (ENO)-1(45)、adrenomedullin (ADM)(46)、egl nine homolog (EGLN)-3(47)は HIF-1 の活性によって発現が促進されることが知られているが、それらの遺伝子発現は VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間誘導した群では誘導前と比べて 2 倍以上に発現が増加していた(Table 3)。

#### 4 考察

羊膜間葉系 SP 細胞が低酸素環境下で効果的に血管内皮細胞へ分化するかどうかを明らかにするために、羊膜間葉系 SP 細胞を VEGF を含む血管内皮分化誘導培地で低酸素(1% O<sub>2</sub>)および常酸素(20% O<sub>2</sub>)の条件で培養を行った。低酸素に暴露すると、1)KDR, Flt-1, VCAM, vWF などの血管マーカーの遺伝子発現が有意に増強し、2)KDR や VE-cadherin のタンパク発現の増加もみられた。また、3) HIF-1 下流遺伝子の発現増加も認められた。2 週間 VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行うと、血管内皮マーカーの発現は増強した。VEGF 存在下にて低酸素条件下で 1 週間培養を行ったとき Oct3/4 のタンパクの発現が確認されたが、2 週間の低酸素条件下ではほぼ完全に消失した。これらの結果より、羊膜間葉系 SP 細胞をこの条件で血管内皮細胞へ誘導するには 1 週間の培養では不十分であり、一方 2 週間の培養によって血管内皮細胞へ分化が進んだことが示唆された。しかし、これらの条件では成熟した血管内皮細胞に発現する VCAM や vWF のタンパクの発現は確認することができなかった。VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間培養するという誘導条件で得られた羊膜間葉系 SP 細胞のキャラクターは、血管内皮前駆細胞のキャラクターと似ていた。培養時間や酸素濃度を調節することで vWF や VCAM の mRNA の発現が増強され、より成熟した血管内皮細胞へと誘導できる可能性がある。

羊膜間葉系細胞は VEGF などいくつかの増殖因子が含まれる EGM-2 培地で培養を行うと血管内皮細胞へ誘導されたという報告があるが、vWF や VE-cadherin といった成熟した血管内皮細胞に発現するマーカーは確認されていない(19)。また、VEGF のレセプターである Flt-1 や KDR はもともと羊膜間葉系細胞に発現していて、VEGF に暴露することで Flt-1、KDR、ICAM-1 の発現が増強されることが確認されている(20)。これらの結果は羊膜間葉系細胞が血管内皮細胞への分化能をもち、ヘテロな細胞集団であることを示している。羊膜間葉系 SP 細胞は羊膜間葉系細胞からわずか 0.1-0.2% の割合で採取されるため、より均一で未分化な細胞集団である。そのため、今回の研究においては誘導前の羊膜間葉系 SP 細胞において、Flt-1 や KDR の発現は低く、Oct3/4 は高発現であることが観察された。羊膜間葉系 SP 細胞を VEGF 存在下にて低酸素条件下で 2 週間培養することで Flt-1、KDR、VCAM、vWF の遺伝子発現および KDR や VE-cadherin のタンパクの発現が増強された。羊膜間葉系 SP 細胞は non-SP 細胞に比べてより多能性をもった幹細胞が密に含まれているので、再生医療の分野において有用な細胞源であると考えられる。

骨髄間葉系幹細胞もまた再生医療の分野で候補となる細胞であり多く研究されている。酸素濃度を骨髄の生理的な濃度(4-7%)まで下げると骨髄間葉系細胞の増殖が活発になることが報告されている(48)。また、多能性をもった細胞を間葉系の細胞へ分化させるには低酸素条件が有効であると注目を集めている。酸素濃度、培養時間、低酸素で前培養をするかしないかによって骨、軟骨、脂肪への分化効率に大きな影響を与える(49)。それらの研究で血管をターゲットにしたものはないが、間葉系細胞を分化させるのには低酸素が重要な役割を果たしているのは明らかである。羊膜間葉系 SP 細胞を血管内皮細胞へ分化誘導させることにおいても低酸素が

重要な因子であることがわかった。

低酸素条件下では HIF-1 の効果によって VEGF の転写が促進されることが知られている。VEGF のレセプターである KDR(50), Flt-1(43)の発現も増強され、さらに VEGF が盛んに分泌される。羊膜間葉系 SP 細胞を低酸素条件下で効果的に血管内皮細胞へ誘導されたことに HIF が関与しているかどうかを調べるために、HIF-1 の下流遺伝子の発現をマイクロアレイによって調べた。すると、VEGF-A(42)、Flt-1(43)、EPO(44)、ENO-1(45)、ADM(46)、EGLN-3(47)といった HIF の活性によって転写が亢進されると知られる遺伝子の発現が VEGF 存在下にて低酸素条件下で2週間誘導した後に増強していることがわかった。この結果より、低酸素条件下において HIF システムが活性化され、それによって VEGF や VEGF レセプターの発現が増強され血管内皮細胞への分化誘導が進んだことが推測された。

羊膜間葉系 SP 細胞は VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行うと、血管内皮細胞の方向へ誘導された。それは HIF システムの活性化によって血管新生に関与する遺伝子の転写が促進されたためと考えられた。

## 5 結論

羊膜間葉系 SP 細胞が低酸素環境下で効果的に血管内皮細胞へ分化するかどうかを明らかにするために、羊膜間葉系 SP 細胞を VEGF を含む血管内皮分化誘導培地で低酸素(1% O<sub>2</sub>)および常酸素(20% O<sub>2</sub>)の条件で培養を行った。低酸素に暴露すると、KDR, Flt-1, VCAM, vWF などの血管マーカーの遺伝子発現が有意に増強し、KDR や VE-cadherin のタンパク発現の増加もみられた。また、HIF-1 下流遺伝子の発現増加も認められた。羊膜間葉系 SP 細胞は VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行うとにより、血管内皮細胞への分化誘導が進んだ。それは HIF システムの活性化によって血管新生に関与する遺伝子の転写が促進されたためと考えられた。

## 6 謝辞

本研究を遂行するにあたり、たくさんの方々のご指導やご助言を賜りました。みなさまに厚くお礼申し上げます。

指導教官の小林弘祐教授、小久保謙一准教授、には研究を進めるにあたりもっとも身近で情熱をもってご指導いただきました。研究方針の決め方、論理的な考え方、論文の書き方など、これから研究をどう続けていくかノウハウを教えていただきました。医療衛生学部の桜川宣男客員教授、小林護先生には羊膜細胞の採取や実験手技などの専門的な知識から最新の話題までたくさんのご教授をいただきました。また実験にご協力を頂き、ご迷惑をお掛けすることも多々ありました。ここに深く感謝とお詫びを申し上げます。

博士論文主査を担当してくださった、北里英郎教授、副査を担当してくださった氏平政伸准教授、稲岡秀検准教授、鍵谷豪講師には専門的なご助言をいただき、博士論文をより充実した内容にすることができました。

また、本研究室や他研究室の先輩、同期や後輩と研究に関する様々なアドバイスやディスカッションのおかげで様々な分野の研究を知り、視野が広がりました。

博士論文を完成することができたのは、たくさんの方のみなさまの支えとご協力のおかげです。改めて、深く感謝するとともに厚くお礼申し上げます。

平成 25 年 8 月

丸山 直子

## 7 引用文献

1. Takahashi K; Tanabe K; Ohnuki M; Narita M; Ichisaka T; Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
2. Cartwright P; McLean C; Sheppard A; Rivett D; Jones K; Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005;132(5):885-96.
3. Niwa H; Miyazaki J; Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24(4):372-6.
4. Mitsui K; Tokuzawa Y; Itoh H; Segawa K; Murakami M; Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003;113(5):631-42.
5. Wagers AJ; Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-48.
6. Schwartz RE; Reyes M; Koodie L; Jiang Y; Blackstad M; Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002;109(10):1291-302.
7. Goodell MA; Brose K; Paradis G; Conner AS; Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183(4):1797-806.
8. Goodell MA; Rosenzweig M; Kim H; Marks DF; DeMaria M; Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997;3(12):1337-45.
9. Welm BE; Tepera SB; Venezia T; Graubert TA; Rosen JM; Goodell MA. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol*. 2002;245(1):42-56.
10. Wulf GG; Luo KL; Jackson KA; Brenner MK; Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica*. 2003;88(4):368-78.
11. Uchida N; Fujisaki T; Eaves AC; Eaves CJ. Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP) phenotype. *J Clin Invest*. 2001;108(7):1071-7.
12. Zhou S; Schuetz JD; Bunting KD; Colapietro AM; Sampath J; Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. United States 2001. p. 1028-34.
13. Sakuragawa N; Kakinuma K; Kikuchi A; Okano H; Uchida S; Kamo I, et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res*. 2004;78(2):208-14.
14. Kobayashi M; Yakuwa T; Sasaki K; Sato K; Kikuchi A; Kamo I, et al. Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer. *Cell Transplant*. 2008;17(3):291-301.
15. Sakuragawa N; Yoshikawa H; Sasaki M. Amniotic tissue transplantation: clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. *Brain Dev*. 1992;14(1):7-11.
16. Wolbank S; Peterbauer A; Fahrner M; Hennerbichler S; van Griensven M; Stadler G, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1173-83.
17. Lefebvre S; Adrian F; Moreau P; Gourand L; Dausset J; Berrih-Aknin S, et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol*. 2000;61(11):1095-101.
18. Hori J; Wang M; Kamiya K; Takahashi H; Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea*. 2006;25(10 Suppl 1):S53-8.
19. Konig JM; Huppertz B; Desoye G; Parolini O; Frohlich JD; Weiss G, et al. Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. *Stem Cells Dev*. 2011.
20. Alviano F; Fossati V; Marchionni C; Arpinati M; Bonsi L; Franchina M, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007;7:11.
21. Zhang P; Baxter J; Vinod K; Tulenko TN; Di Muzio PJ. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. *Stem Cells Dev*. 2009;18(9):1299-308.
22. Ashton N; Ward B; Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular



- reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol.* 1954;38(7):397-432.
23. Knighton DR; Silver IA; Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery.* 1981;90(2):262-70.
  24. Knighton DR; Hunt TK; Scheuenstuhl H; Halliday BJ; Werb Z; Banda MJ. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science.* 1983;221(4617):1283-5.
  25. Thomlinson RH; Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer.* 1955;9(4):539-49.
  26. Folkman J; Merler E; Abernathy C; Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 1971;133(2):275-88.
  27. Pugh CW; Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9(6):677-84.
  28. Chambers I; Colby D; Robertson M; Nichols J; Lee S; Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003;113(5):643-55.
  29. Nichols J; Zevnik B; Anastassiadis K; Niwa H; Klewe-Nebenius D; Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998;95(3):379-91.
  30. Levine AJ; Brivanlou AH. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development.* 2006;133(2):209-16.
  31. Li Y; McClintick J; Zhong L; Edenberg HJ; Yoder MC; Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood.* 2005;105(2):635-7.
  32. Avilion AA; Nicolis SK; Pevny LH; Perez L; Vivian N; Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003;17(1):126-40.
  33. Ben-Shushan E; Thompson JR; Gudas LJ; Bergman Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol.* 1998;18(4):1866-78.
  34. Yuan H; Corbi N; Basilico C; Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 1995;9(21):2635-45.
  35. Yang C; Przyborski S; Cooke MJ; Zhang X; Stewart R; Anyfantis G, et al. A key role for telomerase reverse transcriptase unit in modulating human embryonic stem cell proliferation, cell cycle dynamics, and in vitro differentiation. *Stem Cells.* 2008;26(4):850-63.
  36. Kaneko Y; Sakakibara S; Imai T; Suzuki A; Nakamura Y; Sawamoto K, et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci.* 2000;22(1-2):139-53.
  37. Park D; Xiang AP; Mao FF; Zhang L; Di CG; Liu XM, et al. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(12):2162-71.
  38. Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1982;51:219-50.
  39. Armstrong PB; Armstrong MT. A role for fibronectin in cell sorting. *J Cell Sci.* 1984;69:179-97.
  40. Kawamura-Kodama K; Tsutsui J; Suzuki ST; Kanzaki T; Ozawa M. N-cadherin expressed on malignant T cell lymphoma cells is functional, and promotes heterotypic adhesion between the lymphoma cells and mesenchymal cells expressing N-cadherin. *J Invest Dermatol.* 1999;112(1):62-6.
  41. Bourdon MA; Wikstrand CJ; Furthmayr H; Matthews TJ; Bigner DD. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1983;43(6):2796-805.
  42. Forsythe JA; Jiang BH; Iyer NV; Agani F; Leung SW; Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16(9):4604-13.
  43. Gerber HP; Condorelli F; Park J; Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997;272(38):23659-67.
  44. Wang GL; Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA

binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993;268(29):21513-8.

45. Semenza GL; Roth PH; Fang HM; Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1994;269(38):23757-63.

46. Nguyen SV; Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265(2):382-6.

47. Pescador N; Cuevas Y; Naranjo S; Alcaide M; Villar D; Landazuri MO, et al. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem J*. 2005;390(Pt 1):189-97.

48. Lennon DP; Edmison JM; Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;187(3):345-55.

49. Das R; Jahr H; van Osch GJ; Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):159-68.

50. Waltenberger J; Mayr U; Pentz S; Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*. 1996;94(7):1647-54.

## 8 図表

Table 1. RT-PCR のプライマー設計

	forward primers	reverse primers
GAPDH	5'-GGCC TCCA AGGA GTAA GACC-3'	5'-AGGG GTCT ACAT GGCA ACTG-3'
KDR	5'-AGCC AGCT CTGG ATTT GTGG A-3'	5'-CATG CCCT TAGC CACT TGGA A-3'
Flt-1	5'-GCGC TTCA CCTG GACT GACA-3'	5'-GAAA CTGG GCCT GCTG ACAT C-3'
VCAM1	5'-ATTG ACTT GCAG CACC ACAG-3'	5'-ATCT CCAG CCTG TCAA ATGG-3'
vWF	5'-AGAT GTTT GCCT ACGG CTTG-3'	5'-CAGC CTGT GACC CTCT TCTC-3'

Table 2. マイクロアレイによる幹細胞マーカー、神経幹細胞マーカー、間葉系細胞マーカーの遺伝子発現解析

Gene Title	Detection	Hypoxia VEGF(+) 2week / 0week	Author/ (Ref.)
<b>Stem cells markers</b>			
Kruppel-like factor 4 (gut), KLF4	P/ P	0.98	Li Y, et al. (31)
v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog, MYC	P/ P	0.88	Cartwright P, et al. (2)
Nanog homeobox, NANOG	A/ A	0.08	Chambers I, et al. (28) Mitsui K, et al. (4)
POU domain class 5 transcription factor 1, OCT3/4	A/ A	0.47	Nichols J, et al. (29) Niwa H, et al. (3)
SRY (sex determining region Y)-box 2, SOX2	A/ A	1.00	Avilion AA, et al. (32)
RNA exonuclease 1 homolog, REX1	A/ A	0.83	Ben-Shushan E, et al. (33)
growth differentiation factor 3, GDF3	A/ A	0.24	Levine AJ, et al. (30)
fibroblast growth factor 4, FGF4	A/ A	0.81	Yuan H, et al. (34)
telomerase reverse transcriptase, TERT	P/ P	0.67	Yang C, et al. (35)
<b>Neural stem cells markers</b>			
nestin, NES	P/ A	0.09	Kaneko Y, et al. (36)
musashi homolog 1, MSI1	A/ A	0.71	Park D, et al. (37)
<b>Mesenchymal cells markers</b>			
vimentin, VIM	P/ P	1.07	Lazarides E, et al. (38)
fibronectin 1, FN1	P/ P	0.97	Armstrong PB, et al. (39)
N-cadherin, CDH2	P/ P	0.98	Kawamura K, et al. (40)
collagen type I alpha 1, COL1A1	P/ P	1.20	Bourdon MA, et al. (41)

P: Present, A: Absentを示す。

Table 3. マイクロアレイによる HIF-1 下流遺伝子の遺伝子発現解析

Gene Title	Detection	Hypoxia VEGF(+) 2week / 0week	Author/ (Ref.)
vascular endothelial growth factor A, VEGFA	P/ P	2.0	Forsythe JA, et al. (42)
fms-related tyrosine kinase 1, Flt-1	P/ P	2.7	Gerber HP, et al. (43)
erythropoietin, EPO	A/ A	6.6	Wang GL, et al. (44)
enolase 1, ENO1	P/ P	2.0	Semenza GL, et al. (45)
adrenomedullin, ADM	P/ P	6.3	Nguyen SV, et al. (46)
egl nine homolog 3, EGLN3	P/ P	17.9	Pescador N, et al. (47)

P: Present, A: Absentを示す。

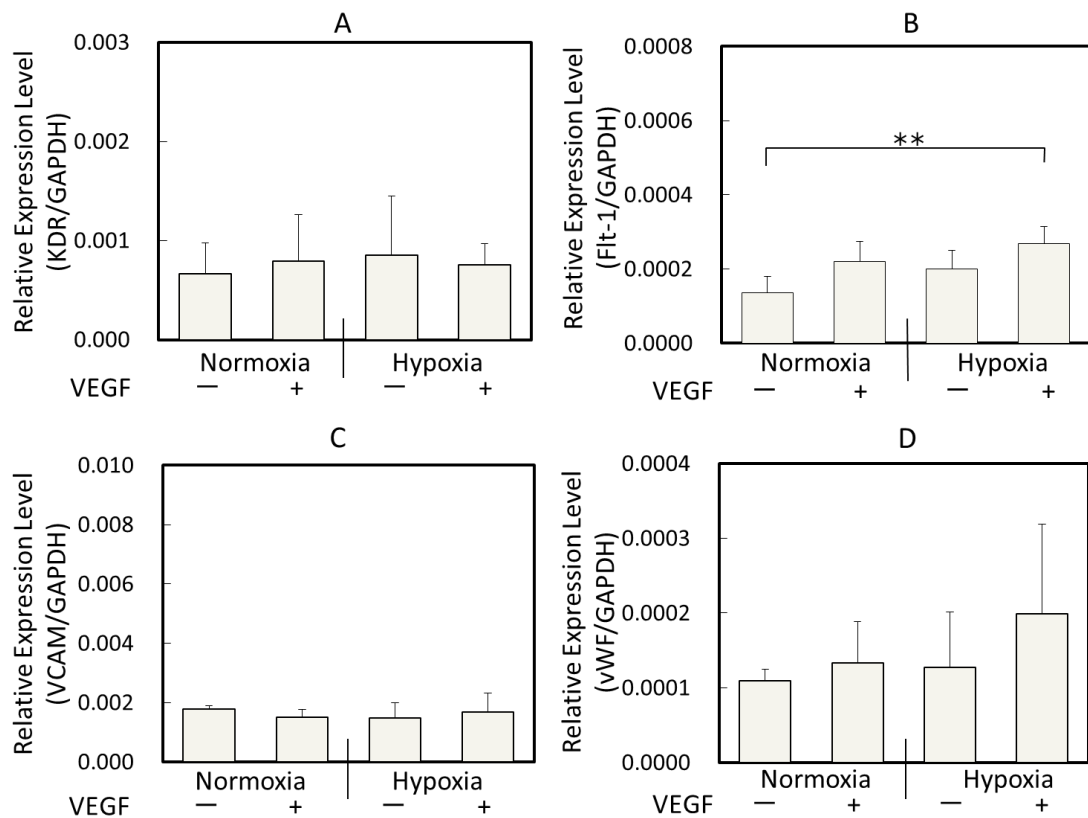


Fig. 1 Real-time PCR による誘導 1 週間後の血管内皮マーカー遺伝子発現の結果

(A) KDR, (B) Flt-1, (C) VCAM, (D) vWF. mean + SD (n = 5); \*\*( $P < 0.01$ )

1 週間培養を行ったところ、KDR、VCAM、vWF においては変化がみられなかったが、Flt-1 は VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行った群において発現量の増加が確認された。

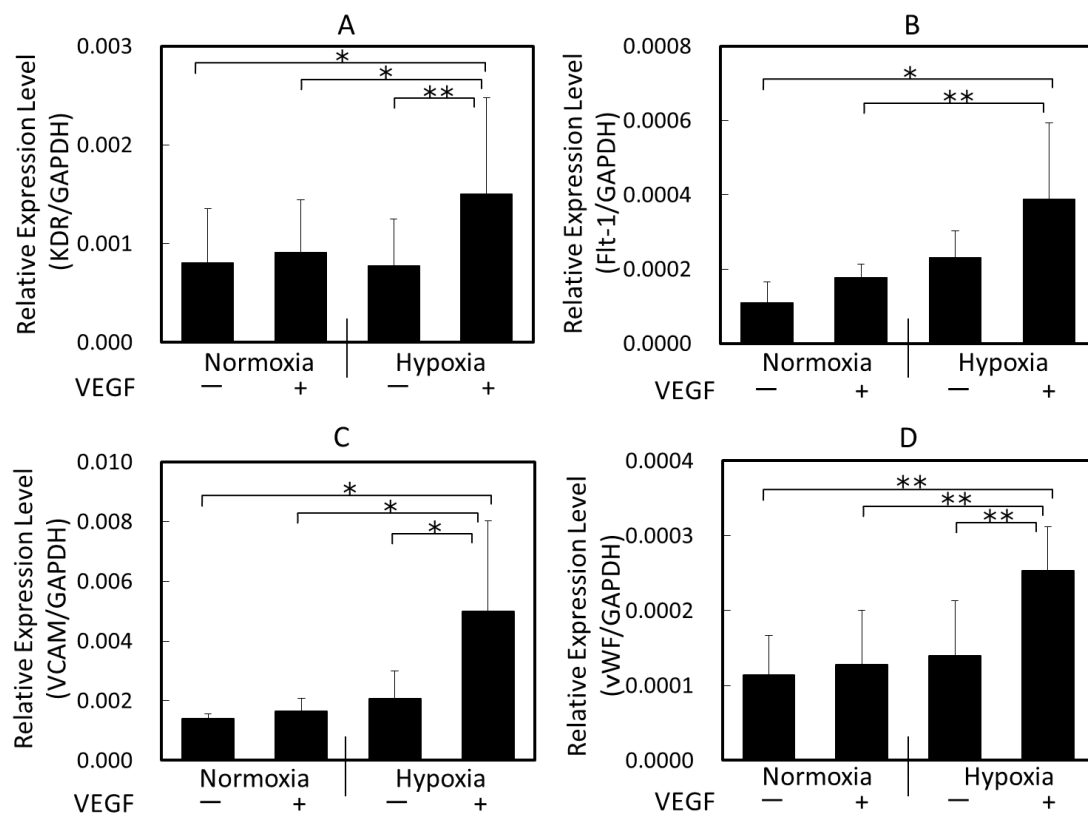


Fig. 2 Real-time PCR による誘導 2 週間後の血管内皮マーカー遺伝子発現の結果

(A) KDR, (B) Flt-1, (C) VCAM, (D) vWF. mean + SD (n = 5); \* ( $P < 0.05$ ) \*\* ( $P < 0.01$ )

VEGF 存在下にて低酸素条件下で培養を行った群では、VEGF 存在下にて常酸素条件下で培養した群に比べて有意に KDR、Flt-1、VCAM、vWF の発現量が増加した。

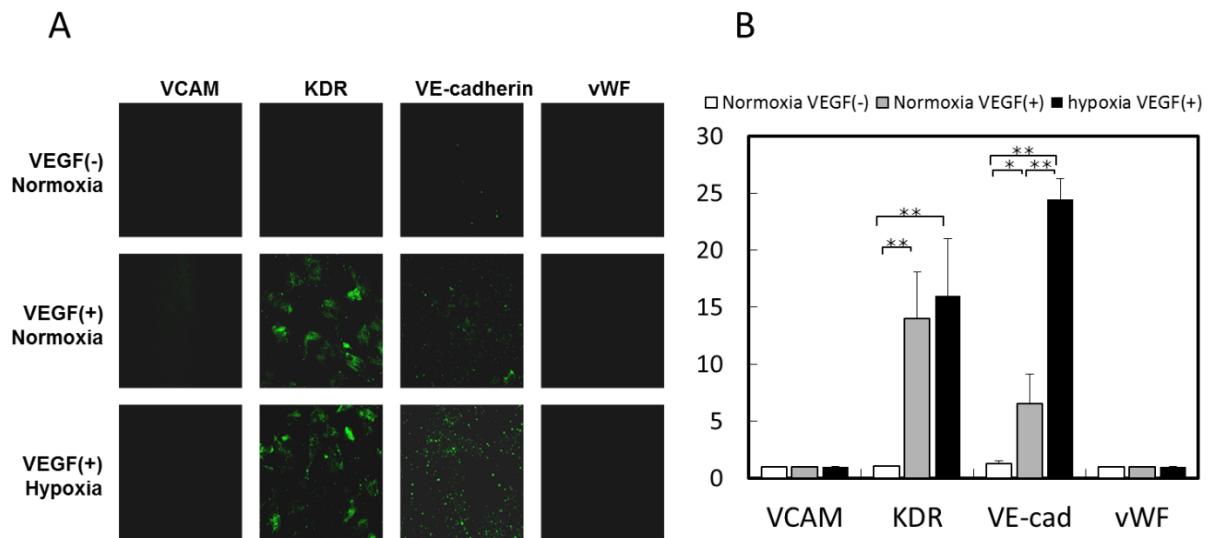


Fig. 3

(A) 免疫組織化学による2週間誘導後の血管内皮マーカーのタンパク発現の結果

(B)画像解析ソフトを用いたタンパク発現の定量化

mean + SD (n = 4); \* ( $P < 0.05$ ) \*\* ( $P < 0.01$ )

KDR と VE-cadherin は VEGF 存在下で常酸素および低酸素条件下で培養を行った両群において発現が確認された。一方、VCAM、vWF の発現は確認できなかった。



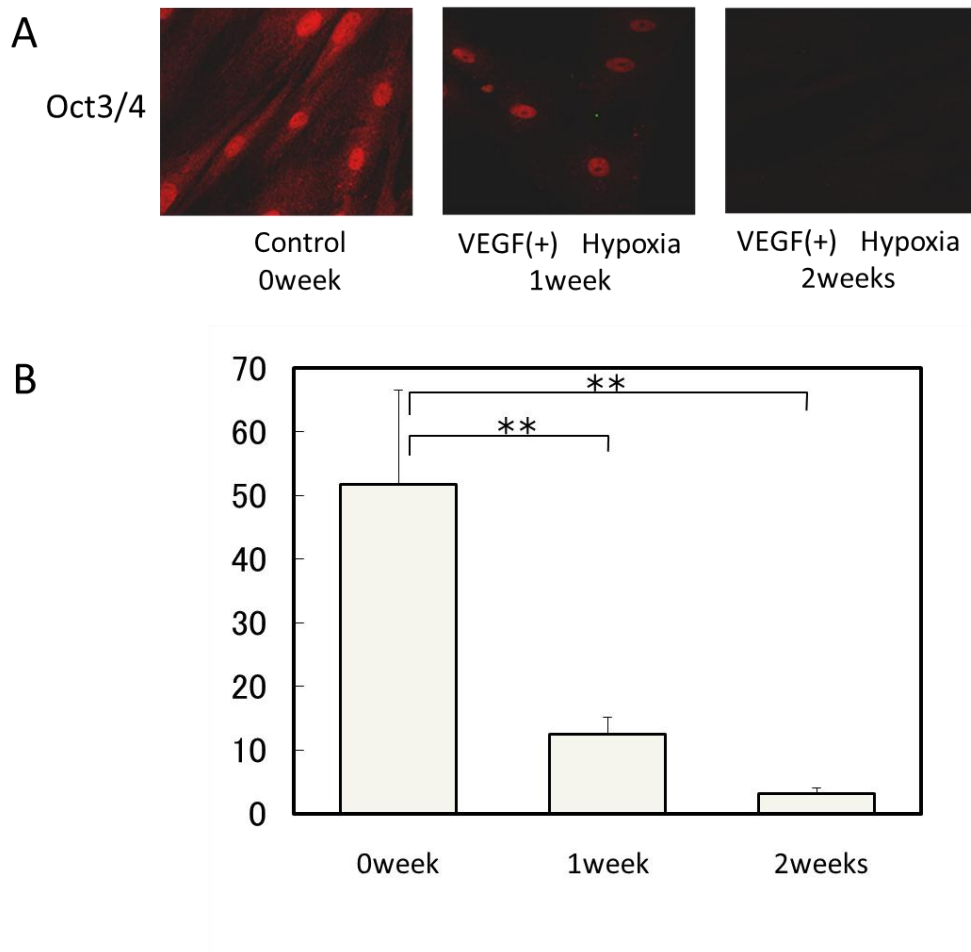


Fig. 4

(A) 免疫組織化学による 1 週間および 2 週間誘導後の Oct3/4 のタンパク発現の結果

(B) 画像解析ソフトを用いたタンパク発現の定量化

mean + SD (n = 4); \*\* ( $P < 0.01$ )

VEGF 存在下にて低酸素条件下で 1 週間誘導培養すると Oct3/4 の発現は 0 週間に比べると有意に減少したがまだ発現が残っていた。2 週間の誘導培養の後、Oct3/4 の発現はほぼ完全に消失した。