

学 位 論 文 要 旨

氏 名 丸山 直子



論 文 題 目

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)

指 導 教 授 承 認 印

小林 弘祐



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)

丸山直子

諸言

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。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。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。重要なことに、羊膜は胚盤胞の内部細胞塊に由来し、胎児由来の組織である。それゆえ、羊膜間葉系細胞が多能性を持つと考えられる。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-3/4 の発現、神経幹細胞に発現する nestin および musashi-1 の発現を確認し、羊膜由来細胞に未分化な細胞群が含まれることが報告された。

間葉系幹細胞の血管内皮細胞への誘導には低酸素条件が有効であることが報告されている。低酸素条件では様々な転写因子が応答するが、特に低酸素誘導因子である Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α が働き、血管新生に関連する種々の遺伝子の転写を亢進させる。

また、各組織に低率で存在する幹細胞の集団、Side Population(SP)細胞が注目されている。SP 細胞は DNA 結合色素である Hoechst33342 に陰性で、未分化で均一な細胞集団である。SP 細胞はマウス、サル、ヒトなどの哺乳類、さらに骨髄、骨格筋、心臓などからも分離され、多能性が報告され、種および臓器を越えて存在する幹細胞である。桜川らはヒト羊膜上皮細胞および間葉系細胞から SP 細胞をそれぞれ単離することに成功し、ヒト羊膜間葉系 SP 細胞に Oct3/4 が発現したことを免疫染色により確認している。また神経細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへの分化を確認し、多能性があることを確認した。

われわれの研究目的は、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。血管内皮誘導因子(VEGF)の有無、低酸素(1%)と常酸素(20%)、誘導期間 1 週間および 2 週間の条件で検討を行った。

方法

本研究は本学医療衛生学部研究倫理委員会の承認を得て実施した(#2009-015)。事前にインフォームドコンセントを実施した妊婦より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 (hAM-SP)細胞は 4 継代程度まで増殖培地 (DMEM/F12+5% FBS+10 ng/ml hLIF+10 ng/ml hFGF-B+10 ng/ml PDGF-BB) を用いてタイプ I コラーゲンコートディッシュ上で増殖させた。

hAM-SP 細胞を血管内皮細胞へ分化させるために、誘導培地(DMEM/F12+2% FBS+50 ng/ml

VEGF)を用いて常酸素(20% O₂)または低酸素(1% O₂)環境下で一週間または二週間、タイプ I 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)にて一週間または二週間培養した。培養液交換は二日毎に行った。

hAM-SP 細胞を分化誘導培養後に血管内皮細胞マーカー(KDR, Flt-1, vWF, VE-cadherin, VCAM)の発現を real-time PCR 法および蛍光免疫染色法を用いて調べた。また、誘導後一週間後および二週間後の Oct3/4 の発現を蛍光免疫染色法にて調べた。誘導前と VEGF を添加し低酸素下で二週間誘導後の hAM-SP 細胞を Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)を用いてマイクロアレイ解析をおこなった。

結果

血管内皮への分化を評価するために、real-time PCR にての血管内皮細胞マーカー(KDR, Flt-1, vWF, VCAM)の発現を調べたところ、一週間の誘導では KDR, VCAM, vWF は変化がみられなかった。Flt-1 は VEGF を添加し低酸素下で誘導した群において発現が増加していた。二週間の誘導後には、VEGF を添加し低酸素下で培養した群において hAM-SP 細胞は KDR, Flt-1, VCAM, vWF の発現を増強させた。VEGF なしで低酸素下のみで培養した群とコントロール群(VEGF なし、常酸素下)とでは有意な差は認められなかった。一方、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、VEGF なし低酸素下で培養した群と比較しても VEGF を添加し低酸素下で培養した群では、KDR, VCAM, Flt-1, vWF の発現が有意に高い結果となった。このように、低酸素下で培養することによって VEGF による血管内皮細胞への分化が促進された。

蛍光免疫染色法により、hAM-SP 細胞を VEGF を添加し常酸素または低酸素下で二週間培養後に血管内皮マーカー(VCAM, KDR, vWF, VE-cadherin)の発現を調べた。KDR と VE-cadherin は VEGF を添加し常酸素および低酸素下で培養した両群において陽性であった。VCAM と vWF は陰性であった。画像解析ソフト(ImageJ)を用いてピクセル数をカウントしたところ、KDR は誘導前に比して VEGF を添加し常酸素および低酸素下で培養した群において有意に発現していた。VE-cadherin は誘導前に比して VEGF を添加して常酸素下で培養した群において有意に発現が認められ、低酸素下で培養した群においてさらに強い発現が認められた。誘導後に未分化な細胞が残っているか調べるために蛍光免疫染色法により Oct3/4 の発現を調べたところ、誘導前では Oct3/4 の強い発現が認められ、VEGF を添加して低酸素下で一週間培養した群では発現が消失していた。

マイクロアレイにより、誘導前と VEGF を添加し低酸素下で二週間培養した群において幹細胞マーカーを調べたところ、NANOG, Oct3/4, GDF3 は誘導後に 1/2 以下に発現が減っていた。Klf4, MYC, SOX2, REX1, FGF4, TERT は誘導後に大きな変化は認められなかった。神経幹細胞マーカーである nestin, musashi は誘導後に発現が減っていた。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二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。

考察

hAM-SP 細胞を低酸素条件によって効率的に血管内皮細胞に誘導培養できるかを明らかにするために hAM-SP 細胞を VEGF 添加した培地を用いて低酸素下(1% O₂)または常酸素下(20% O₂)で培養した。hAM-SP 細胞を低酸素下で誘導した結果、1) KDR, Flt-1, VCAM, vWF といった血管内皮細胞マーカーの遺伝子発現が増え、2) KDR や VE-cadherin のタンパクの発現が増強し、3) HIF 下流遺伝子の発現は増進された。VEGF を添加し低酸素下で二週間培養すると、血管内皮マーカーの発現が強まった。Oct3/4 の発現は一週間の誘導では認められたが、二週間の誘導ではほぼ消失した。これらの結果より、hAM-SP 細胞は一週間の誘導では不十分であるが、二週間の誘導により血管内皮へ分化が進んだと考えられた。しかしながら、VEGF を添加し低酸素下で二週間誘導するという条件では、VCAM と vWF のタンパクの発現は確認できず、完全な血管内皮細胞とは一致しなかった。VCAM と vWF の mRNA の発現は増進が認められたので、誘導時間の延長によってより成熟した血管内皮細胞へ分化できる可能性がある。

低酸素下では HIF-1 の活性化により VEGF の転写が促進されることはよく知られているが、VEGF のレセプターである Flt-1 や KDR の転写も増進される。なぜ低酸素下において hAM-SP 細胞は効率よく血管内皮細胞へ分化が進んだのか、HIF の関与を調べるために、HIF 下流遺伝子の変化をマイクロアレイにより解析した。VEGF を添加し低酸素下で培養した群において VEGF-A, Flt-1, EPO, ENO-1, ADM, EGLN-3 などの HIF 下流の遺伝子の発現は増強した。このことより、HIF システムの活性化により VEGF や VEGF レセプターが発現し血管内皮細胞への分化が進んだのではないかと考えられた。

hAM-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細胞への分化が認められた。それは HIF 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。