特集：再生医学と免疫疾患

総 説

Pregnancy associated progenitor cells による臓器修復の可能性

須波 玲, 多賀谷 光, 平田 修司

The role of pregnancy associated progenitor cells in the regeneration of injured maternal organs

Rei SUNAMI, Hikaru TAGAYA and Shuji HIRATA

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Yamanashi

(Received October 24, 2010)

summary

Microchimeric fetal cells are present in the maternal body over a long period and thought to have the ability to colonize multiple tissues and organs. They are found in a wide range of maternal tissues affected with variety of diseases, thus, there is a possibility that they may contribute tissue repair and regeneration. To assess their possibility of use in regenerative medicine, we investigated whether fetal cells regenerate infarcted maternal organs.

We crossbred wild female mice with male transgenic mice, expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP), and total hysterectomies were performed at the day 6 of pregnancies. On day 60 after the operations, the mice were injected with streptozotocin (STZ) to induce multiple organs injuries. We also created the ischemic organ injury model; myocardial infarction model and cerebral infarction model. Detection and quantification of fetal cells were then attempted in a variety of maternal organs via a fluorescent microscope and quantitative PCR amplification of the gfp transgene. Fetal cells were detected only in maternal bone marrow before maternal organs injuries were induced, however, they were detected not only in bone marrow but also in the maternal injured organs. Histological analysis showed that differentiated fetal cells were observed and their morphological appearance was indistinguishable from their maternal counterparts.

These results indicate that fetal cells sustained their population in the maternal bone marrow, may have contributed to the maternal tissue regeneration.

Key words——fetal cell microchimerism (FCM); pregnancy associated progenitor cells (PAPCs); stem cell; enhanced green fluorescent protein (EGFP)

抄 録

母体の血液中および骨髄中には多分化能を有する胎児由来細胞 (pregnancy associated progenitor cells : PAPCs) が存在し, 母体の免疫学的排除を受けることなく長期にわたって生存することで fetal cell microchimerism (以下 FCM) が形成される. PAPCs の生理的意義について明らかにするために母体の臓器傷害との関連について検討を行った. EGFP transgenic mouse オスと wild type mouse メスを交配させ, 妊娠 6 日目に子宮を摘出した. 摘出後 60 日目に streptozotocin (以下 STZ) 投与による薬物性臓器傷害モデルと虚血性臓器傷害として心筋梗塞モデルと脳梗塞モデルを作成した. 傷害臓器における胎児細胞の有無ならびに, その形態について定量的 PCR 法および蛍光顕微鏡を用いて解析した. 子宮摘出後 60 日目の時点では母獣骨髄以外の諸臓器からは胎児細胞は検出されなかった. 臓器傷害モデルでは骨髄のみならず, 傷害臓器において特異的に胎児細胞が検出された. 組織学的には傷害臓器に特異的な単核の EGFP 陽性細胞が検出された. 以上の結果から, FCM の由来となる母体骨髄に生着した胎児細胞は, 免疫学的排除を受けることなく母獣の傷害臓器に特異的な集積を示すことから, これを修復すべく機能している可能性がある.

母児間には胎盤による関門機構が存在するにも関わらず, 母体の血液中および組織中には, 胎児由来細胞が存在し, その一部は分娩後も長期にわたって

存在し続ける. この現象は fetal cell microchimerism (以下 FCM) として Liegeois ら^{1,2)}によって 1977 年に初めて報告された. FCM の由来となる胎児細胞は, 自己複製能と多分化能を有する幹細胞に近い性質を持つことから, pregnancy associated

progenitor cells (以下 PAPCs) と呼ばれ³⁾, その一部と考えられる胎児細胞は母体の血液や骨髄中の造血幹細胞分画をはじめ種々の幹細胞分画中に存在することが報告されている^{4~6)}. FCM が母体に及ぼす影響を疾患との関連において初めて報告したのは, Artlett ら⁷⁾で, 彼らは自己免疫性疾患である全身性強皮症の一部が, PAPCs によって引き起こされることを報告している. この報告を受けて, 多くの自己免疫疾患においても同様の検討がなされ, 甲状腺機能異常を呈する自己免疫疾患においても FCM が病態発現の原因となることが明らかとなっている. しかし胎児由来細胞は自己免疫疾患以外の多くの疾患においても, 母体の病変部位に高頻度に検出され

ることから, FCM に由来した胎児細胞は主に臓器傷害の修復に関与していると考えられ^{8,9)}, 動物モ

交配系

CAG-EGFP (H-2b) ♂ × C57BL/6J (H-2 b) ♀
× BALB/c (H-2 d) ♀
× NOD/SCID ♀

*Real time PCR

EGFP

sense primer : 5'-TGCTGCTGCCCGACAA-3'
antisense primer : 5'-TGTGATCGCGTTCTCGTT-3'
probe : 5'-(FAM)-CCACTACCTGAGCAGCC-(TAMRA)-3'

Apolipoprotein B (内因性コントロール)

sense primer : 5'-CGTGGGCTCCAGCATTCTA-3'
antisense primer : 5'-TCACCAGTCATTCTGCCTTTG-3'
probe : 5'-(VIC)-CCTTGAGCAGTGCCGACCATTG-(TAMRA)-3'

図 1

図 2

デルにおける母獣臓器傷害と FCM との関連も報告されている^{10~12)}。このことは分娩経験のある乳癌罹患者においては、血液中に胎児由来細胞数が検出されないか、検出されたとしても正常者と比較して有意に少ないとの報告¹³⁾からも示唆される。そこで胎児細胞の母体への移行過程や母体内での動態について母体免疫反応との関連から解析を行い、PAPCs による母体の臓器傷害の修復の可能性についてマウスモデルを用いて検討を行った。

母獣への胎児細胞の移行過程における母獣免疫能との関連

Enhanced green fluorescent protein (以下 EGFP) を遺伝子導入した transgenic mouse¹⁴⁾ のオスと wild type のメスとを交配させることで、緑色蛍光を発する胎児由来細胞を母獣諸臓器において検出する実験系を用いた。母獣の免疫能が胎児細胞の移行に与える影響について検討を行うために、NOD/SCID mouse と wild type mouse として同系である C57BL/6、異系交配として BALB/c のメスをそれぞれ用いた。妊娠 6 日目、13 日目、19 日目、産褥 30 日目、60 日目に母獣の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、骨髄および脳を摘出し、定量的 PCR 法および蛍光顕微鏡を用いた組織学的検査に胎児由来細胞の検出を試みた (図 1)。

母獣諸臓器中において明瞭な緑色蛍光を発する胎児由来細胞が妊娠 6 日目から検出された。これらはいずれも単核で、かつ、臓器特異的な細胞形態を有

するものであった (図 2)。このような胎児由来細胞の検出率は妊娠 6 日目においては、NOD/SCID mouse と wild type との間で有意差を認めなかったが (図 3)、妊娠 13 日目以降では、NOD/SCID mouse において有意に高かった。また wild type メスにおいては、異系交配と比較して同系交配において有意に高かった (図 4)。NOD/scid では、分娩後も妊娠中と同程度に母獣諸臓器において胎児細胞が検出されたが、wild type においては速やかに減少し、骨髄以外の臓器においては、産褥 60 日目には検出感度以下となった (図 5)。

以上の結果から、①妊娠中期以降から母獣の免疫系による胎児細胞の排除機構が存在すると考えられ、妊娠中は、これを免れる細胞集団が母獣諸臓器に一定頻度で存在すること、②分娩後には、大部分の胎児細胞が排除され、母獣骨髄に極めて少数の細胞集団のみが残存することが明らかとなった。我々は胎児細胞の母獣への移行は、妊娠期間を通じて生じる現象ではなく、妊娠初期に母獣骨髄に生着した多分化能を有する胎児細胞に由来している可能性があることを先に報告している¹⁵⁾。したがって、PAPCs の由来は妊娠初期に母体骨髄の stem cell niche に生着した細胞集団の可能性はある。そこで、母獣に生着する胎児細胞の特徴について、より詳細に解析するために満期分娩後に母獣に臓器傷害を誘発し、その修復過程において検出される胎児細胞の特徴について解析を行った。

図 3 Fetal cell microchimerism in the various maternal organs at the day 6 of pregnancy

Fetal cells whose morphological features were that of differentiated organ specific cells were microscopically assessed. The numbers of these fetal cells in the whole 50 mm sections of each organ were counted.

図4 Fetal cell microchimerism in the various maternal organs at the day 19 of pregnancy

Fetal cells whose morphological features were that of differentiated organ specific cells were microscopically assessed. The numbers of these fetal cells in the whole 50 mm sections of each organ were counted.

*P < 0.01, #P < 0.05 vs. NOD/SCID in each organ.

図5 Fetal cell microchimerism in the various maternal organs after delivery (C57BL/6) Fetal DNA was presented as the amount of fetal DNA in GE per 1×10^5 maternal (total) GE.

GE : genome equivalents

PAPCsによる母獣傷害臓器修復の可能性

前述の同系交配 (C57BL/6) において、満期分娩後 60 日目の母獣と、これとは別に妊娠 6 日目に妊娠子宮を摘出し、組織学的に胎仔細胞が検出されなくなる術後 60 日目の母獣に、薬物性臓器傷害および虚血性臓器傷害を誘発したモデルをそれぞれ作成し、傷害部位における胎仔細胞の有無ならびに特徴について検討を行った。薬物性臓器傷害モデルは糖尿病モデル動物の作成に用いられる streptozotocin (以下 STZ) を 1 mg/body/day を腹腔内に 2 回

投与して作成した。STZ は高容量の投与によって脾臓のみならず、肝臓および腎臓にも急性の薬物性臓器傷害が誘発されることが報告されている^{16,17)}。虚血性臓器傷害モデルとして、冠動脈左前下行枝を末梢側 1/3 の位置で結紮した心筋梗塞モデルと右側総頸動脈を結紮した脳梗塞モデルを作成して用いた。虚血性臓器傷害モデルにおいては、術後 7, 14, 28 日後に心臓および脳を摘出し、結紮側を ischemic site, 対側を normal site として同一個体で比較検討を行った。

臓器傷害誘発後に胎仔遺伝子が検出されたのは、

図 6

表 1

Day after operation		7	14	28
Organ	Group			
Heart	Ischemic	35.0 ± 21.1*	38.7 ± 18.4*	44.4 ± 19.9*
	Normal	2.0 ± 3.9	4.8 ± 3.6	3.4 ± 3.9
Brain	Ischemic	28.6 ± 31.8*	29.9 ± 27.9*	34.3 ± 33.4*
	Normal	1.6 ± 2.8	1.2 ± 2.8	2.8 ± 4.2

EGFP transgene in the ischemic organs after the ligation of coronary or carotid artery. Fetal DNA was presented as the amount of fetal DNA in GE per 1×10^5 maternal (total) GE. GE: genome equivalents. Data are expressed mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ vs. normal site.

いずれのモデルも骨髄と傷害臓器のみであった。更に傷害臓器における胎仔遺伝子の検出率は、満期分娩モデルと妊娠初期（6日目）子宮摘出モデルとの間で有意差を認めなかった。STZによる薬物性臓器傷害モデルにおいては、母獣肝臓、腎臓および膵臓で、それぞれ肝細胞、腎尿管上皮細胞および膵腺房細胞の形態を有する胎仔細胞が検出された（参考文献15で報告）。虚血性臓器傷害モデルにおいては、ischemic siteにおける胎仔遺伝子の検出率はnormal siteと比較して、術後7日目の時点から有意に増加した（表1）。組織学的に胎仔細胞が検出されたのは、ischemic siteのみであり、術後14日目以降に、臓器特異的な形態を有する胎仔細胞（心筋細胞、神経細胞および神経膠細胞）が検出された（図6）。これらはいずれも単核の細胞であり、HE染色では母獣細胞との区別は不可能であり、成熟細胞へと分化したものである可能性が高いと考え

られた。

以上の結果から、母獣に生着した胎仔細胞は、傷害部位に特異的な集積を示し、かつこれまで報告されている造血系、間葉系以外の臓器特異的な細胞へも分化しうることが明らかとなった。胎仔細胞が母獣の傷害部位において母体の免疫学的排除を受けることなく、臓器特異的な細胞へと分化する現象は、その修復機構への関与を示唆しており、他の幹細胞にはない特有の性質と考えられる。

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）および人工多能性幹細胞（iPS細胞）の飛躍的な研究の進展は細胞移植療法に大きく貢献することを期待されているが、使用における倫理的問題、移植時の拒絶反応、ドナーの確保などの様々な問題が存在する。一方、PAPCsを利用した細胞療法は自らの胎児細胞を回収するという制約はあるものの、FCMの由来となる胎児由来幹細胞が分娩後に破棄される臍帯血ならびに羊膜から比較的高頻度に回収することが可能であり、かつFCMの由来となる胎児細胞に対しては長期にわたり母体の免疫学的寛容が成立していることから拒絶反応を受けずに高い生着率が得られる可能性が高いことから、母体に対する再生医療を展望するうえで、有力な治療源になり得ると考えられる。

文 献

- 1) Liegeois A, Escourrou J, Ouvre E, Charreire J : Microchimerism : a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplant Proc* 9 : 273-276, 1977.

- 2) Liegeois A, Gaillard MC, Ouvre E, Lewin D : Microchimerism in pregnant mice. *Transplant Proc* **13** : 1250–1252, 1981.
- 3) Khosrotehrani K, Bianchi DW : Multilineage potential of fetal cells in maternal tissue : a legacy in reverse. *J Cell Sci* **118** : 1559–1563, 2005.
- 4) Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S : Male progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 705–708, 1996.
- 5) Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW : Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA* **292** : 75–80, 2004.
- 6) O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, Kennea N, Sandison A, Anderson JR, Roberts IA, Fisk NM : Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet* **364** : 179–182, 2004.
- 7) Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA : Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *NEJM* **338** : 1186–1191, 1998.
- 8) Johnson KL, Samura O, Nelson JL, McDonnell M, Bianchi DW : Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C : evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology* **36** : 1295–1297, 2002.
- 9) Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Samura O, Lee SL, Bianchi DW : Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women : a case-control study. *Lancet* **358** : 2034–2038, 2001.
- 10) Wang Y, Iwatani H, Ito T, Horimoto N, Yamato M, Matsui I, Imai E, Hori M : Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. *Biochem Biophys Res Commun* **325** : 961–967, 2004.
- 11) Khosrotehrani K, Reyes RR, Johnson KL, Freeman RB, Salomon RN, Peter I, Stroh H, Guegan S, Bianchi DW : Fetal cells participate over time in the response to specific types of murine maternal hepatic injury. *Hum Reprod* **22** (3) : 654–661, 2007.
- 12) Tan XY, Liao H, Sun L, Okabe M, Xiao ZC, Dawe GS : Fetal microchimerism in the maternal brain : A novel population of fetal progenitor or stem cells able to cross the blood-brain barrier? *Stem cells* **23** : 1443–1452, 2005.
- 13) Gadi VK, Nelson JL : Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res* **67** : 9035–9038, 2007.
- 14) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y : 'Green mice' as source of ubiquitous green cells. *FEBS Letter* **407** : 313–319, 1997.
- 15) Sunami R, Komuro M, Yuminamochi T, Hoshi K, Hirata S : Fetal cell microchimerism develops through the migration of fetus-derived cells to the maternal organs early after implantation. *J Reprod Immunol* **84** : 117–123, 2010.
- 16) Levine BS, Henry MC, Port CD, Rosen E : Toxicologic evaluation of streptozocin (NSC85998) in mice, dogs and monkeys. *Drug and Chemical Toxicology* **3** : 201–212, 1980.
- 17) Honjo K, Doi K, Doi C, Mitsuoka T : Histopathology of streptozocin-induced diabetic DBA/2N and CD-1 mice. *Laboratory animals* **20** : 298–303, 1986.