

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15608

研究課題名(和文)着床・初期胎盤形成における絨毛・子宮内膜幹細胞の維持機構とその破綻の病態の解明

研究課題名(英文)The role of trophoblast or endometrial stem cell in implantation and development of trophoblasts

研究代表者

加藤 聖子(Kato, Kiyoko)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10253527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：まずヒト絨毛細胞株(HTR8-SVneo)より、SP細胞とnon-SP細胞を分離した。SP細胞はnon-SP細胞に比べて、幹細胞の特性であるSP再出現率・継代コロニー形成能・長期増殖能・絨毛幹細胞マーカー(CDX2)発現も亢進していた。Ly6D遺伝子は絨毛SP細胞の増殖、未分化性の維持、運動能に重要な遺伝子であることを示した。

次に不妊治療中の採卵時に採取した子宮内膜を用いて、その後の着床率との関連を解析した。着床不成功例では成功例に比較し、老化細胞率・p21の発現・細胞周期でのG0/G1期の割合が有意に高く、両者の間で分泌が亢進しているサイトカインの種類に違いが見られた。

研究成果の概要(英文)：We analyze the role of trophoblast or endometrial stem cell in implantation and development of trophoblasts. First of all, we isolated the side population cells of trophoblast cells, HTR-SVneo using FACS analysis. The proportion of next generated SP cells, a potential of serial colony formation, a long-term proliferation activity and the level of CDX2 were enhanced in SP cells compared with non-SP cells. Ly6D gene was the most overexpressed gene in SP cells and it was important for the maintenance of stemness of SP cells. Next, we analyzed the correlation between the aging signals in endometrial cells and the success of implantation. The ratio of senescence cells, the levels of p21 and the ratio of G0/G1 phase of cell cycle were enhanced in the endometrial cells of the implantation failure cases. There was a difference of the secretion of inflammatory cytokines from the endometrial cells between success cases and failure cases of implantation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：絨毛細胞 幹細胞 子宮内膜 老化 絨毛幹細胞 着床 子宮内膜幹細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

着床は胚盤胞の外側を構成する栄養外胚葉 (trophectoderm) が子宮内膜上皮に接着し、分化した栄養膜細胞 (trophoblast) が子宮内膜間質に浸潤していく現象で、サイトカイン、ホルモン、各種 MMP、増殖因子や免疫細胞などの関与が報告されている。マウスでは絨毛幹細胞 (TS) が樹立されたが、ヒト絨毛幹細胞の詳細は不明である。我々は Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞 (SP 細胞) を分離する方法を用いてヒトの正常子宮内膜や絨毛細胞に SP 細胞が存在し幹細胞様の特性を示すことを報告した (Kato K et al. Hum Reprod.2007, Takao T et al. PloS One 2011)。予備的実験により両 SP 細胞ともに上皮間葉移行 (EMT) 関連遺伝子群の発現が亢進していたが、着床現象における子宮内膜幹細胞、絨毛幹細胞の役割についての報告はなく、EMT の関与についても詳細は不明である。正常組織幹細胞の維持には幹細胞自身の性質の他に、ニッチと呼ばれる微小環境が重要であり、初期胎盤では絨毛・子宮内膜がお互いにその役割を果たしている可能性がある。最近死滅せずに生き残った老化細胞が、炎症性サイトカインや炎症性ケモカイン、プロテアーゼといったタンパクなどを分泌していることが明らかになり、SASP (Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれている。幹細胞維持機構の破綻と細胞老化の関係はまだ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、着床不全・流産の病態を幹細胞維持機構と周囲微小環境 (ニッチ) の破綻、その結果としての細胞老化誘導という新しい視点でとらえ、着床・初期胎盤形成における絨毛・子宮内膜の幹細胞の果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 絨毛 SP 細胞の分離と特性の解析

ヒト絨毛細胞株 (HTR8-SVneo) より、SP 細胞と non-SP 細胞を分離し幹細胞の特性である SP 再出現率、継代コロニー形成能、長期増殖能、絨毛幹細胞マーカー (CDX2) 発現を比較検討する。

マイクロアレイやメチレーションアレイを用いて、HTR8-SVneo-SP 細胞と non-SP 細胞の間で発現に差がある遺伝子を同定する。

分化条件で SP 細胞を培養し、栄養膜細胞に分化させ、で同定した SP 細胞で発現が亢進している遺伝子群の中から、分化により発現が減少する幹細胞マーカーを同定する。

で同定された幹細胞マーカー cDNA を組込んだ発現ベクターを作製し形質導入した過剰発現系や siRNA 導入により発現抑制系を作製し、SP 出現率、増殖能、運動能、浸潤能とともに EMT 関連シグナル分子 (Vimentin, Twist, Snail, fibronectin 等) の

mRNA, 蛋白の発現を解析する。

(2) ヒト子宮内膜細胞の幹細胞維持や細胞老化に関するシグナルと着床との関連の解析

同意を得た不妊治療中の患者から、診療の一環として採取された着床前の子宮内膜を初代培養し、SP 細胞の出現率や我々の予備的実験で幹細胞に発現が亢進していた ABCG2, ALDH1, IL-1R1, HER2 の発現を mRNA, 蛋白レベルで解析する。

上記細胞を用いて細胞老化に関する p21, p16, p53 や細胞老化特異的 ガラクトシダーゼ (SA-gal) の発現、細胞と細胞培養液中、同時期に採取された血液を用いて SASP (Senescence-associated secretory phenotype) 関連する炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1)、炎症性ケモカイン (IL-8, CXCL9) MMPs の発現を解析する。以上の発現と着床率との関与を検討する。

4. 研究成果

(1) 絨毛 SP 細胞の分離と特性の解析

ヒト絨毛細胞株 (HTR8-SVneo) より、SP 細胞と non-SP 細胞を分離した。SP 細胞は non-SP 細胞に比べて、幹細胞の特性である SP 再出現率・継代コロニー形成能・長期増殖能がいずれも増加していた。また、マウス絨毛幹細胞マーカー (CDX2) 発現も亢進していた。

マイクロアレイやメチレーションアレイを用いて、HTR8-SVneo-SP 細胞と non-SP 細胞の間で発現に差がある遺伝子群を同定した。Ly6D 遺伝子が SP 細胞で最も発現が亢進している遺伝子であった。

分化条件で SP 細胞を培養し、栄養膜細胞に分化させ Ly6D は分化により発現が減少していた。

Ly6D siRNA 導入により発現抑制系を作製し解析したところ、SP 出現率、増殖能、運動能、継代コロニー形成能はいずれも低下し、EMT 関連シグナル分子 (, fibronectin) の mRNA, 蛋白の発現も低下した。

以上より、Ly6D は絨毛 SP 細胞の増殖、未分化性の維持、運動能に重要な遺伝子であることが示された。

(2) ヒト子宮内膜細胞の幹細胞維持や細胞老化に関するシグナルと着床との関連の解析

同意取得後、不妊治療中の採卵時に採取した子宮内膜検体や血液を用いて、その後の着床率との関連を解析した。

妊娠反応陽性を着床成功例とした。着床不成功例では成功例と比較し、細胞老化特異的 ガラクトシダーゼ (SA-gal) 染色陽性の老化細胞の増加・p21 の発現・細胞周期での G0/G1 期の割合が有意に高かった。

両者の間で分泌が亢進しているサイトカ

インの種類に違いが見られた。

幹細胞マーカーの一つである ALDH1 の発現はマウスでは老化により減少し、着床不成功例で老化細胞数増加とともに、減少していた。また、SASP に関連することが報告されている複数のサイトカインの発現や分泌が老化マウスや着床不成功例でそれぞれ亢進していた。

以上の成果により、老化に伴い子宮内膜幹細胞が減少し、増加する老化細胞から分泌されるサイトカインによる SASP が着床不全の病態に關与することが示唆された。

これらの結果はSTEMセルエイジングに伴う子宮内膜幹細胞の枯渇・劣化・内膜機能の低下が受精卵の着床を阻害していることを意味しており、がんや神経・筋肉の変性疾患だけではなくSTEMセルエイジングが引き起こす病態の中に子宮内膜機能低下による着床不全も含まれることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Michikawa T, Morokoma S, Yamazaki S, Fukushima K, Kato K, Nitta H: Air Pollutant Exposure within a Few Days of Delivery, and Placental Abruptio in Japan. *Epidemiology*. 28(2):190-196. 2017.3
doi: 10.1097/EDE.0000000000000605.

Michikawa T, Morokuma S, Yamazaki S, Fukushima K, Kato K, Nitta H: Exposure to air pollutants during the early weeks of pregnancy, and placenta praevia and placenta accrete in the western part of Japan. *Environ Int*. 92-93: 464-470, 2016.5
doi: 10.1016/j.envint.2016.4.037.

Masuda Ayako, Katoh Noriko, Nakabayashi Kazuhiko, Kato Kiyoko, Sonoda Kenzo, Kitade Mari, Takeda Satoru, Hata Kenichiro, Tomikawa Junko: An improved method for isolation of epithelial and stromal cells from the human endometrium. *J Reprod Dev*. (The Journal of reproduction and development) 62(2): 213-8, 2016.4
doi: 10.1262/jrd.2015-137. Epub 2016 Feb 8.

Inagaki T, Kusunoki S, Tabu K, Okabe H, Yamada I, Taga T, Matsuomoto A, Makino S, Takeda S, Kato K: Up-regulation of lymphocyte antigen 6 complex expression in side-population cells derived from a human trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Human Cell*, 29(1)10-21, 2016,1

doi: 10.1007/s13577-015-0121-7. Epub 2015 Jul 30.

Kyo S, Kato K: Endometrial Cancer Stem Cell as a Potential Therapeutic Target. *Semin Reprod Med*. 33(5): 341-349, 2015.9
doi: 10.1055/s-0035-1563407. Epub 2015 Aug 18.

Asanoma K, Liu G, Yamane T, Miyanari Y, Takao T, Yagi H, Ohgami T, Ichinoe A, Sonoda K, Wake N, Kato K: Regulation Mechanism of TWIST1 Transcription by BHLHE40 and BHLHE41 in Cancer Cells. *Mol Cell Biol*. 35(24):4096-109, 2015.9
doi: 10.1128/MCB.00678-15. Epub 2015 Sep 21.

Hachisuga M, Oki S, Kitajima K, Ikuta S, Sumi T, Kato K, Wake N, Meno C: Hyperglycemia impairs left-right axis formation and thereby disturbs heart morphogenesis in mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(38): E5300-7, 2015.9
doi: 10.1073/pnas.1504529112. Epub 2015 Sep 8.

Okamoto K, Tsunematsu R, Tahira T, Sonoda K, Asanoma K, Yagi H, Yoneda T, Hayashi K, Wake N, Kato K: SNP55, a new functional polymorphism of MDM2-P2 promoter, contributes to allele-specific expression of MDM2 in endometrial cancers. *BMC Med Genet (BMC medical genetics)*. 16(1): 1-15, 2015.8
doi: 10.1186/s12881-015-0216-8.

Ohmaru T, Fujita Y, Sugitani M, Shimokawa M, Fukushima K, Kato K: Placental elasticity evaluation using virtual touch tissue quantification during pregnancy. *Placenta*. 36(8): 915-20, 2015.8
doi: 10.1016/j.placenta.2015.06.008. Epub 2015 Jun 24.

[学会発表](計 6 件)

加藤聖子: 特別講演: 産婦人科における幹細胞研究とその臨床応用 第8回産婦人科内分泌研究会 2016年9月29日: 東京都(文京区・東京ガーデンパレス)

Kato K: Identification and characterization of human trophoblast stem-like cells. The 102nd Annual Congress of Korean Society of Obstetrics and Gynecology 2016.9.23(23 ~ 24), Seoul, Korea

Ohmaru T, Asanoma K, Kondo Y, Hidaka N, Fujita Y, Kato K: International Session

Poster : Group 29 Placenta : ISP-29-1. The expression of fibrosis related factor in villous stroma of placenta complicated with preeclampsia is induced by hypoxia and TGF stimulation.第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016 年 4 月 22 日 (21-24) : 東京都 (東京国際フォーラム)

Kato K : Symposium ,Uterine Corpus : Identification and characterization of endometrial cancer stem-like cells. The 4th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology 2015.11.14 (12-14) : Seoul, Korea

加藤聖子 : 日本癌治療学会・日本癌学会合同 シンポジウム 8 がん治療のゲノム個別化 Precision Medicine を目指す多様な視点 : がん幹細胞ー子宮体がん幹細胞の生物学的特性の解析と治療開発への展望 . 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015 年 10 月 30 日 : 京都市

加藤聖子 : 教育講演 3 : 子宮体癌の発生・進展機構の解明と新規治療法の開発 がん幹細胞の観点から 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 2015 年 4 月 12 日 : 横浜市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 聖子 (KATO Kiyoko)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 10253527

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()