

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：15K20121

研究課題名(和文) 分化誘導型胎盤栄養膜細胞を用いたCDX2のエピジェネティックな分子機構

研究課題名(英文) Epigenetic molecular mechanism of CDX2 using differentiation-induced placental trophoblast cells

研究代表者

北村 茜 (Kitamura, Akane)

東北大学・医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：50736402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスでは、胚盤胞期に栄養外胚葉細胞(TE)が、Cdx2遺伝子の発現亢進とOct3/4遺伝子の発現低下により、細胞運命が決定されることが知られている。このTEは、将来胎盤組織へと分化する。しかし、ヒトの場合、胚盤胞でのCDX2遺伝子の発現量は低い。本研究では、当研究室で樹立に成功したヒトトロホプラスト幹細胞(TS細胞)を用い、CDX2遺伝子の発現とその発現を調節する分子機構について解析した。その結果、ヒトTS細胞では、CDX2遺伝子の発現は抑制され、ヒト胚体外組織への細胞運命決定への関与は極めて低いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトでは、将来胎盤となる栄養外胚葉への分化に、いかなる分子がどのようなエピジェネティックな分子機構を介して決定され、維持されるかは未解決の問題である。本研究では、ヒトCDX2遺伝子の胎盤発生に関わる役割について検討した。ヒト及びマウスの異種動物間でCDX2遺伝子の機能について、その特異性、連続性、多様性を明らかにすることで、胎盤を有する哺乳類の進化に果たす役割について理解することができる。また、ヒト胎盤におけるCDX2の機能解析は、正常な胎盤発生、分化の理解および流産、胎盤の発生異常やそれに起因する胎児疾患の原因解明にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：The specification of mouse trophoblast (TE) lineage involves the transcription factor Cdx2 and Oct 3/4. At mouse morula stage, Cdx2 proteins demonstrate restricted expression in the outer cells of TE and Oct 3/4 in inner cell of the inner cell mass. In human, the molecular mechanism of TE commitment remains obscure. We examined on Cdx2 function in TE determinations using human trophoblastic stem (TS) cells, which we derived from cytotrophoblasts and blastocysts. Unlike in a mouse TE lineage, human CDX2 and OCT3/4 proteins not expressed in TE and TS cells. The promoter regions of human CDX2 showed hypermethylation and had repressive histone modifications. We speculated that CDX2 does not function as TE determination in human.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒト胎盤発生 CDX2 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類では、受精後の胚盤胞期に、胚体細胞系列 (内部細胞塊 : ICM) と胚体外細胞系列 (栄養外胚葉 : TE) が最初の細胞分化を起こす。前者は、胎児性幹細胞 (ES 細胞) で全能性を維持し、後者はトロホプラスト幹細胞 (TS 細胞) で、多能性を示し、将来胎盤組織へと分化する。両者は、同じゲノム配列を持つにも関わらず、全く異なる細胞系譜を辿る。これには、エピジェネティックな修飾機構の存在が推測されている。

(2) マウスでは ES 細胞と TS 細胞の分化決定に、それぞれ Oct3/4 遺伝子と Cdx2 遺伝子が必須であることが知られている (Rossant. Nature Review. 2007)。また、ES 細胞に Cdx2 遺伝子を過剰発現させると、TS 様細胞に変換することも報告され、両者の発現量比で、ES 細胞と TS 細胞の分化の方向性を決定しているという仮説が立てられている (Niwa. Cell. 2005)。しかし、ヒト胎盤では、CDX2 遺伝子の発現量は低く、免疫染色法でも胚盤胞で発現は認めないため、ヒト発生過程では、マウスと同じ分子機構が機能するのか明らかではない。

(3) 当研究室では、ヒト分化誘導型胎盤栄養膜モデル細胞株 (TS 細胞) の樹立に成功している。この細胞株は、初期胎盤絨毛の細胞性栄養膜細胞から樹立した細胞株で、培養液に数種類の転写因子と増殖因子を添加することにより、安定に長期間未分化を維持できる。また、転写因子を除くとすみやかに合胞体栄養膜細胞 (ST 細胞) へと分化する性質を有する。

2. 研究の目的

本研究では、まずヒト胎盤組織への分化過程における CDX2 遺伝子の役割を明らかにするため、ヒト TS 細胞株を用い、CDX2 遺伝子の発現とエピジェネティックな分子機構について解析する。次に、胎盤の分化に伴う CDX2 遺伝子の機能について、TS 細胞の細胞特性、分子特性の変化を経時的に明らかにする。さらに、マウス TS 細胞株における Cdx2 の遺伝子発現や分子機構と比較し、胚体外組織の発生、分化における種特異性と保存性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト胎盤栄養膜細胞での CDX2 遺伝子の発現とエピゲノム解析 :

ヒト初期胎盤絨毛細胞における CDX2 の発現 :

胎盤組織は細胞性栄養膜細胞 (CT) と合胞体栄養膜細胞 (ST) を高純度に分離した。消化酵素を用いて単一な細胞に分離し、抗体を用いて、高純度の精製細胞を抽出した (図 1)。次に、各細胞群より、DNA/RNA を抽出した。RNA は、cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法にて CDX2 遺伝子の発現を比較解析した。コントロールとして全胎盤組織 RNA を用いた。

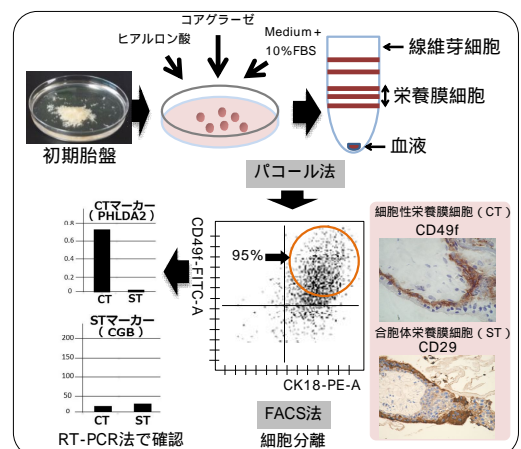


図 1 妊娠初期胎盤絨毛より構成細胞を精製

CDX2 発現量の解析：

ヒト TS 細胞、ES 細胞、生体の CT 細胞より、RNA を抽出した。cDNA 合成後、リアルタイム PCR 法を用いて、CDX2 遺伝子の発現量を解析した。

CDX2 遺伝子のエピゲノム解析：

CDX2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾について解析した。

・ DNA メチル化の解析：

細胞から抽出した DNA は Bisulphite 処理後 PCR を行い (Bisulphite-PCR 法) クローニングベクターを用いシーケンスした。少なくとも 10 個のクローンについて解析し、PCR 領域内の全てのメチル化部位について解析した。ELF5 遺伝子のプロモーター領域のメチル化と比較した。

・ ヒストン修飾の解析：

同細胞核より蛋白質-DNA 複合体を抽出。超音波ソニケーターで粉碎後、活性型修飾の解析には、抗ヒストン H3-K(リジン)9 と H3-K14 のアセチル化および抗 H3-K4 のジメチル化抗体を利用した。一方、不活性化型には抗ヒストン H3-K9 ジメチル化および抗 H3-K27 のトリメチル化抗体を利用した。それぞれ免疫沈降後、PCR によりヒストン修飾の有無について解析した。

(2) ヒトTS細胞を用いたCDX2遺伝子の機能解析と分子間相互作用：

siRNA 強制発現用ベクターの作製と細胞の樹立：

CDX2 遺伝子のノックダウン用の siRNA を 2 種類設計した。強制発現用ベクター (pcDNA) にクローニングし、ヒト TS 細胞にトランスフェクションした。CDX2 蛋白の減弱 (消失) はウェスタンブロッティングによって確認した。ノックダウン効率は、リアルタイム PCR によって測定した。

CDX2 ノックダウン TS 細胞株の形態学的変化と細胞増殖能の解析：

CDX2 ノックダウン TS 細胞の細胞形態とコロニー形成能を測定した。細胞周期分布はフローサイトメトリー (FACS) で解析し、正常 (WT) 細胞と比較した。

CDX2 ノックダウン TS 細胞における分子間相互作用：

CDX2 遺伝子の永続性ノックダウン TS 細胞株を樹立し、RNA を抽出した。ヒト胎盤特異的な未分化マーカー (EOMES, ID2, ERBB) と ES 特異的マーカー (OCT3/4) の遺伝子発現量を比較した。また、ノックダウン CS 細胞株を分化誘導し、胎盤特異的分化遺伝子マーカー (MASH2, HPL) の発現量の比較と巨細胞の出現の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) ヒト胎盤栄養膜細胞での CDX2 遺伝子の分子機構の解明：

まず、初期 CT 細胞と TS 細胞の CDX2 の発現量について検討した結果、ES 細胞と同様の発現量であることが判明した(図2)。次に、2種類ヒト TS 細胞を用いて、CDX2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾について解析を行なった。DNA メチル化の解析は Bisulphite-PCR 法で、ヒストン修飾の解析では、活性型修飾の解析には、抗ヒストン H3-K9 と H3-K14 のアセチル化および抗 H3-K4 のジメチル化抗体を利用した。一方、不活性化型には抗ヒストン H3-K9 ジメチル化および抗 H3-K27 のトリメチル化抗体を利用した。それぞれ免疫沈降後、PCR によりヒストン修飾の有無について解析した。その結果、CDX2 遺伝子のプロモーター領域(320bp)は、高メチル化状態であることが明らかとなった(図3)。同様に、ヒストン修飾も不活性化型で有意な変化を認めない。一方 ES 細胞でも、高メチル化状態を維持していることが判明した。この結果はメチル化阻害剤を添加して、再確認した。これらの結果より、マウスとは異なり、ES と TS の分化維持過程には、CDX2 遺伝子の転写活性が作用しない事が示唆された。

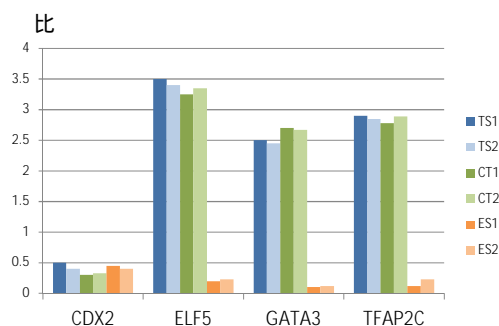


図2 CDX2 の遺伝子発現

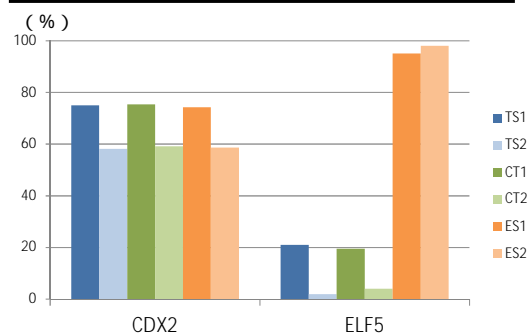


図3 CDX2 プロモータのメチル化解析

(2) 未分化栄養膜細胞株を用いたCDX2遺伝子の機能解析と分子間相互作用：

一過性に遺伝子発現を抑制する CDX2 遺伝子のノックダウン(KD)TS 細胞(3株)を用いて、未分化 TS マーカー遺伝子(ELF5, GATA3)の発現解析を行なった。その結果、いずれも発現量に有意な差を認めなかった(図4)。両遺伝子のプロモーター領域について、メチル化の解析を行ったところ、TS 細胞に比べ高メチル化状態を示した

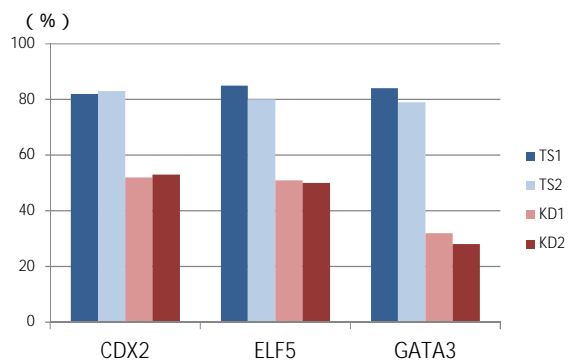


図4 ヒストン修飾 (H3K9 ジメチル化)

(平均値：78.2%)。ノックダウン効率は約40%であったが、細胞形態に大きな変化はみられなかった。以上結果より、ヒト TS の分化と維持過程には、転写因子 CDX2 遺伝子発現は、必ずしも必要でないことが示唆された。今後、CDX2 遺伝子の KO 細胞を作製し、検証することが必要と考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Hattori H, Kitamura A, Takahashi F, Kobayashi N, Sato A, Miyauchi N, Nishigori H, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Kuriyama S, Metoki H, Yaegashi N, Nakai K, Arima T; Japan Environment & Children's Study Group. The risk of secondary sex ratio imbalance and increased monozygotic twinning 1 after blastocyst transfer: data from The Japan Environment and Children's Study. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 17:27.2019. doi: 10.1186/s12958-019-0471-1. 査読有
2. Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T, Arima T. Association of four imprinting disorders and ART. **Clinical Epigenetics** 11:21.2019. doi: 10.1186/s13148-019-0623-3. 査読有
3. Hiura H, Hattori H, Kobayashi N, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Kitamura A, Kikuchi H, Yoshida H, Arima T. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from frozen-thawed blastocyst transfer. **Clinical Epigenetics**. 9:79. 2017. doi: 10.1186/s13148-017-0379-6. 査読有
4. Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. **Sci Rep**. 7:42336. 2017. doi: 10.1038/srep42336. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 第 39 回日本分子生物学会年会「ヒト凍結融解胚移植胎盤における microRNA の網羅的解析」樋浦仁、服部裕充、岡江寛明、千葉初音、宮内尚子、北村茜、菊地裕幸、吉田仁秋、有馬隆博 横浜 (11/30/2016)

〔図書〕(計 2 件)

1. Miyauchi N, Kitamura A, Hiura H, Okae H, Kobayashi N, Hattori H, Takahashi S, Arima T. Epigenetic Alterations in Human Sperm. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer Nature. 1-16. 2017.6.
2. 有馬隆博、宮内尚子、北村茜、樋浦仁、岡江寛明、千葉初音、生殖補助医療とインブリンティング異常の予防、Pharma Medica 34(4): 47-51、メディカルレビュー社 2016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。