

令和元年6月20日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20171

研究課題名(和文) TS細胞を用いた、 β -cateninの胎盤形成に果たす役割に関する研究研究課題名(英文) Study on the role of β -catenin in placental formation using TS cells

研究代表者

上條 慎太郎 (KAMIJO, SHINTARO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：70570878

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)： β -cateninが幹細胞においては多分化能獲得に必須であり、栄養膜細胞系列では胎盤形成と着床維持に関与していることが推察される。胎盤を構成する栄養膜細胞系列の幹細胞であるTS細胞を用いて詳細に解析することにより、発生学や生殖医療の発展向上を目指した基礎研究として貢献し、その成果の臨床への応用を目指す。

マウス胚において β -cateninをノックアウトすると三胚葉への分化運命が決定する原腸形成期に胚致死となる。そのため我々はコンディショナルノックアウト法を用いて β -catenin-KO-TS細胞を樹立し、 β -cateninが着床においてどのような役割を果たしているかを解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外受精において、胚盤胞までの培養については培養室での観察下で行えるため今までも様々な知見が得られている。一方で着床は生体内で起こるため、胚の着床機能についてはわかっていないことが多い。本研究は、着床に関わる因子としてカテニンを同定し、その胚盤胞における機能や着床機能に対する影響を解明することを目的とした研究である。

着床に関わる因子を解明することによって、着床不全の原因の解明の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is speculated that β -catenin is essential for pluripotency in stem cells and is involved in placental formation and maintenance of implantation in trophoblast cell lineages. By analyzing this function in detail using TS cells that are stem cells of the trophoblast cell line that composes the placenta, it contributes as a basic research aiming at the development and improvement of developmental science and reproductive medicine, and the clinical results Aim for the application of

If β -catenin is knocked out in mouse embryo, embryonic lethality occurs at the gastrulation phase (embryonic day 6.5) where the differentiation fate to the three germ layers is determined. Therefore, we succeeded in establishing β -catenin-KO-ES cells using conditional knockout method. Furthermore, we will establish β -catenin-KO-TS cells and elucidate what role β -catenin plays in implantation.

研究分野：生殖医療

キーワード：幹細胞 奇形腫 胚細胞腫瘍 カテニン

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

1. 研究開始当初の背景

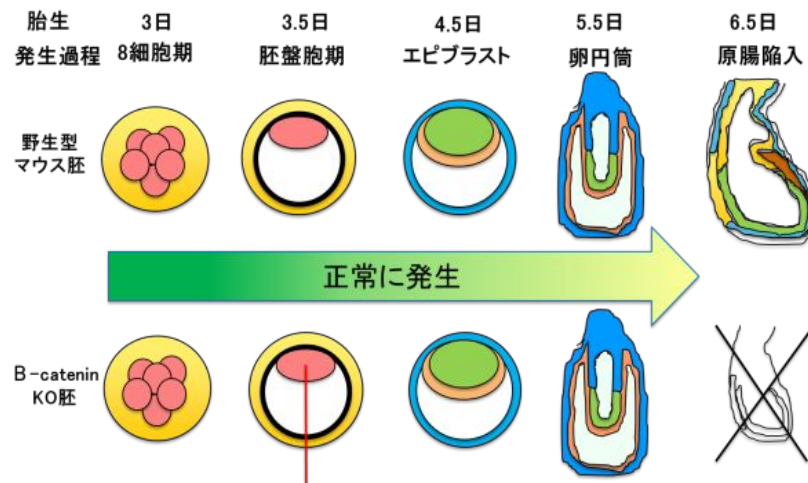
-catenin は体内に広く存在するタンパク質であり、その機能は、Eカドヘリンと協調した細胞間接着に関するものと、Wnt シグナルの伝達を介した -catenin/Wnt 経路への関与の、大きく2つがある。-catenin/Wnt 経路は線虫からヒトまで広く保存されているシグナル伝達経路であり、標的遺伝子は100種類以上の多岐にわたっている。

2. 研究の目的

-catenin の幹細胞における役割に着目し、多能性幹細胞の性質維持についての理解を深めると共に、着床前期胚の遺伝子制御について個々の遺伝子を調べることによって、着床のメカニズムや着床不全に対する示唆を得る事を目的とした。

3. 研究の方法

前研究で胚性幹 (ES) 細胞や胎児性癌 (EC) 細胞の未分化性維持機構に関する分子レベルでのアプローチや、胚の着床前後の発生過程で起こる一連の分子機構解析研究の知見から、カテニンが関連したシグナル伝達系が幹細胞の未分化性維持および分化に関与することが示唆された。



カテニンホモノックアウト(-cat /)胚は胚性致死となるため、ノックアウト個体での交配はできない。そのため胚の獲得にはヘテロ同士の交配が条件付き(コンディショナル)ノックアウトが必要となる。本研究では、カテニン遺伝子を loxP サイトで挟み Cre 配列をプロタミン Prm や透明帯タンパク Zp3 のプロモーター下に組み込んだ transgene を用いて、精子や卵におけるカテニン発現のみをノックアウトしたコンディショナルノックアウトマウス(-catenin floxed/floxed Tg prm-cre / -catenin floxed/floxed Tg zp3-cre)を作成し、-cat / 精子と -cat / 卵を受精させることによって -cat / 胚を得た。その胚盤胞から幹細胞を樹立することによって、-catenin の幹細胞における役割を解析した。

4. 研究成果

(1)

得られた -cat / 胚は着床部位の不均一や着床直後の胚喪失を起こして全て胚性致死となった。また前研究において、-cat / 胚から胚性幹(ES)細胞を樹立したところ、未分化性や自己複製能は保たれていたものの、分化誘導実験においては悪性胚細胞腫瘍が形成されること、また骨や皮膚への分化能が失われていることが示され、多分化能が失われていることが明らかになった。

以上の知見から -catenin が着床・胎盤形成に関与していると推定し、その機能解析のために着床・胎盤形成に関わっていると考えられている栄養膜幹(TS)細胞を用いることとした。既報のプロトコルに基づいて TS 細胞樹立を試みた(Tanaka et al., 1998)。TS 細胞の確認には既報の如く鏡検による形態の観察と RT-PCR と免疫染色にて TS 細胞マーカーである Cdx2 の発現

を根拠とした。

(2)

まず予備実験として ICR 系統マウスの TS 細胞樹立を試行した。鏡検によって幹細胞様の細胞が樹立できることを確認し、RT-PCR と免疫染色によって Cdx2, Eomes 陽性であることを確認した。樹立効率は 20%程度であった。

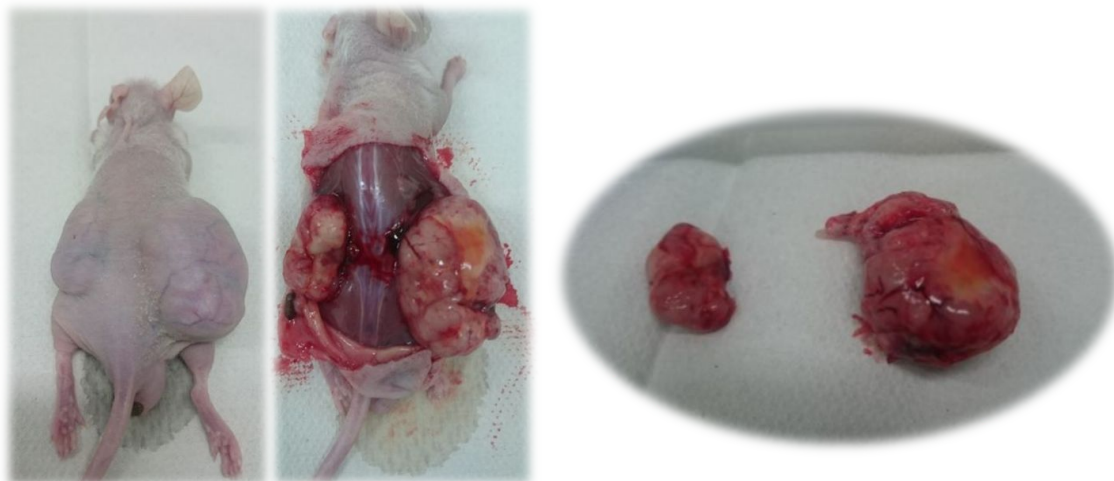
(3)

次に本実験の研究対象である $-cat$ / 胚からの TS 細胞を試行した。しかし 1 年以上の試行においても、Tanaka らのプロトコールでは TS 細胞の樹立が出来なかったため、プロトコールを変更し(Ohinata, Tsukiyama et al., 2014)、TS 細胞様の形態の細胞を 2 株確認した。樹立効率は 0.8%程度と極めて低いものであった。

	個数	%
Blast.	247	
P1	51	20.6
P2	12	4.8
P3	7	2.8
P4	<u>2</u>	<u>0.8</u>

樹立された細胞を RT-PCR 解析したところ、TS 細胞マーカである Cdx2 や Eomes の発現は認めず、ES 細胞マーカである Oct4 や Nanog の発現を認めており、ES 細胞の混入なども疑われたが、一方で Fgf4 の発現が低い、Lifr の発現を認めないなど ES 細胞としても合致しない解析結果を示しており、新規細胞である可能性が示唆された。

さらに樹立された細胞は、自己複製能は有するもののヌードマウスへの移植をする奇形腫作成による分化誘導実験においては、胚細胞腫瘍様の腫瘍化を示し、多分化能を持たないことが確認された。



以上の結果より、 $-catenin$ をノックアウトすることによって TS 細胞の樹立効率が著しく落ちる、もしくは幹細胞としては樹立できないことが確認され、胎盤の形成には $-catenin$ が必要である可能性が示唆された。

(4)

一方で、新たな $-cat$ / 胚の性質として、*in vitro* での胚盤胞形成率の低下が見出された。*in vivo* においては 95%以上であった胚盤胞形成率が、*in vitro* では 20%以下と著明に低下しており、明らかに培養環境の際による低下が疑われた。

そこで *in vivo* と *in vitro* の桑実胚と胚盤胞における RNA 発現解析を施行し、培養環境が *-catenin* 機能に及ぼす影響について検討した。培養環境の差異によって発現する遺伝子は大きく異なり、さらにその差異は特定のものではなく *stochastic* なものである傾向があった。それらの差異による変異が *-catenin* の欠損によって顕在化していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。