

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890024

研究課題名（和文）ヒト胎盤トロフォブラスト幹（TS）細胞の樹立と分化過程における分子機構に関する研究

研究課題名（英文）The establishment of trophoblast stem cell in human and molecular analyses of their differentiation.

研究代表者

齋藤 昌利（SAITO MASATOSHI）

東北大学・病院・助教

研究者番号：00451584

研究成果の概要：

本研究では、本研究ではヒト胎盤トロフォブラスト幹（TS）細胞を分離、細胞特性を明らかにし、マウス TS 細胞株と比較した。またヒト TS 細胞株の樹立を目的とした。その結果、ヒト及びマウスの TS 細胞の相違点があきらかとなり、ヒト TS 細胞株の樹立を進めている。これらの成果は、ヒト胎盤の発生、機能に関する基礎研究に必要であると同時に、今後生殖医療や再生医療ゲノム創薬、薬物毒性評価などの方面で臨床応用可能である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：ヒト・トロフォブラスト幹(TS)細胞、胎盤分化、SP(side population)細胞、シグナル伝達機構

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の胎児の生存には、正常な機能を有する胎盤の存在が必須である。動物の種により胎盤組織構築は多様性を有するが、その機能、発生機序は共通である。すなわち胎盤は母体と胎児間で栄養交換を司る器官で、受精後最初に分化（細胞運命決定）が起こる組織である。またその主要構成成分は栄養膜細胞

（トロフォブラスト）である。トロフォブラスト幹（TS）細胞は自己複製能を維持し、胎盤構成細胞への分化が可能な細胞である。また、胚盤胞に注入するとキメラ胎盤が形成され、栄養膜細胞系列にのみ分化が限定される特徴を有する。

(2) 自己複製と未分化能を併せ持つヒト TS

細胞は未だ世界中で樹立の報告はない。従来、胎盤絨毛細胞に関する研究は初代培養細胞や絨毛癌細胞を使用し、それより得られた様々な情報から正常細胞での機能を類推するという方法論あるいは遺伝子変異マウス胎盤の病理組織学的解析により行われてきた。しかし、絨毛癌細胞では様々な分子機構が破綻しており、これらを用いた研究結果をそのまま正常絨毛細胞へと演繹するには無理がある。

(3) 胎盤幹 (TS) 細胞は均一な細胞集団で未分化を継代維持でき、容易に分化も可能である。そのため *in vivo* では解析されない詳細な分子機構や分子間相互作用の解析できる。ヒト TS 細胞の樹立はこれまでの技術と知識で十分可能な計画である。この細胞は、ヒト胎盤の発生、機能に関する研究に必須で極めて重要である。またエピジェネティックな分子機構の解明は、胎盤の分化過程を理解する上で重要である。また TS 細胞は自己複製と未分化能を併せ持つ。また未分化幹細胞が特定の細胞系譜への分化を開始するにあたっては、未分化状態を維持する機構の破綻と分化方向を規定するエピジェネティックな分子機構の始動がある。さらにヒト TS 細胞株の樹立は既に樹立しているマウス TS 細胞株と比較し、ヒト及びマウスでの胎盤発生及び組織構築の違いを遺伝子レベルで解析することが可能となる。またヒト TS 細胞株の樹立は、既に樹立しているマウス TS 細胞株と比較し、種間の胎盤発生や組織構築の違いを遺伝子レベルで解析することも可能となる。

また、ヒト TS 細胞はヒト胎盤の発生、機能に関する基礎研究に必要であると同時に、今後生殖医療や再生医療、ゲノム創薬、薬物毒性評価などの方面で臨床応用可能である点は、期待される成果が非常に大きい。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではヒト胎盤トロフォブラスト幹 (TS) 細胞を分離、細胞特性を明らかにし、マウス TS 細胞株との比較をする。またヒト TS 細胞株の樹立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト TS 細胞の分離

まずインフォームドコンセントを得て、人工妊娠中絶施行例より初期胎盤絨毛を採取

する。酵素処理および濃度勾配法を用いて栄養膜細胞を分離した後、Hoechst 染色し FACS で SP 細胞を分離する。さらに FACS を用い SP (side population) 細胞を分離し、この細胞群の特性からヒト TS 細胞であることを確認する。

(2) ヒト TS 細胞の樹立

胎盤 SP 細胞は未分化を維持するため、Bmi1 遺伝子をレンチウイルスを用いて細胞内感染させ、マウス TS 細胞と同様の条件で培養する。境界明瞭な上皮様細胞を単離培養する。TS 細胞であることの確認は、TS 特異的未分化マーカー (ERR β , CDX2) の発現を RT-PCR 法を用いて行う。この細胞は冷凍保存する。次にヒト TS 細胞は FGF4 及びヘパリンを除いた培養系に移し、巨細胞の出現の有無を確認し、胎盤分子マーカー (4311, PL-1) の発現を確認する。TS 細胞は 10-20 代継代を繰り返し、変化がないことを表面抗原マーカー (CD44, 54 陽性、CD45, 29 弱陽性、CD31, AC133 陰性) で調べる。また、組織特異性に関し GATA2, CFBF の発現がみられ、TAL1, Klf-1 の発現がないことも確認する。染色体は G-band 法にて解析する。また胎盤ホルモン (HPL, HCG) の産生を ELISA 法にて測定する。

(3) マウス TS 細胞との比較

マウス TS 細胞でも同様の検討を行い共通点、相違点を明確にする。分化により変化を受ける遺伝子のマイクロアレイの解析より、胎盤分化に影響するシグナル伝達機構について解析する。

(4) ヒト胎盤組織の構築 ;

3次元 (体外) 培養や SCID マウスを用いた異所性培養を行い、マウス、ヒトの胎盤組織構築の違いを再現可能か検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト TS 細胞の分離 ;

人工妊娠中絶施行例より初期胎盤絨毛を採取。酵素処理および濃度勾配法を用いて栄養膜細胞を分離した後、Hoechst 染色し FACS で SP (side population) 細胞を分離。免疫染色で表面抗原マーカー CD44, CD54 陽性、CD45, CD29 弱陽性、CD31, AC133 陰性で TS 細胞の特性を示した。RT-PCR 法にて、マウス TS 細胞と比較し、TS 細胞特異的発現のみられる (EOMES, CDX2) の発現が著しく亢進していることが判明した (図 1)。

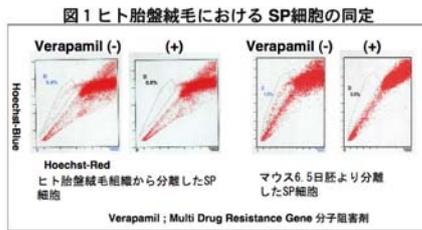
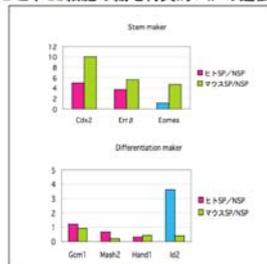


図2 ヒトTS細胞の絨毛特異的マーカーの遺伝子発現



(2) ヒト TS 細胞の樹立

胎盤 SP 細胞は、マウス TS 細胞と同様の条件で培養し、コロニー形成を確認した。境界明瞭な上皮様細胞を現在単離培養中である。今後安定な細胞株を維持するためには、10-20代の継代培養が必要であり、特性の変化がないことも確認しなければならない。

【問題点や変更点】

期間内に十分な結果が得られなかった点は、ヒト TS 細胞株の機能活性、分化に伴う分子機構の解明を行うことである。変更点は、胎盤 SP 細胞は未分化を維持するため、Bmi1 遺伝子をレンチウイルスを用いて細胞内感染させずに、マウス TS 細胞と同様の条件で培養した点である。

【研究の意義】

今後生殖医療、再生医療への新たな技術開発や胎盤蛋白、酵素の精製、分離や薬剤の胎盤への影響など幅広く正確な情報を提供でき、トランスレーショナル、リサーチの基盤へと発展させることが可能である所に本研究の意義がある。またヒトTS細胞は、ヒト胎盤の発生、機能に関する研究に必須で極めて重要である。

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)

[学会発表] (計7件)

①第53回 日本生殖医学会総会学術集会 神戸 2008/10/23

流産後の胎盤絨毛におけるインプリント遺伝子の解析と精液性状・患者背景との関係
佐藤晶子 大津英子 長木美幸 熊迫陽子 後藤香里 城戸京子 日下千賀子 小池恵 佐藤久子 宇津宮隆史 鈴木史彦 齋藤昌利 林千賀 有馬隆博

②第26回 日本受精着床学会総会・学術講演会 福岡 2008/8/28

不妊治療後の流産時に得られた胎盤絨毛におけるゲノムインプリント遺伝子の解析
佐藤晶子 大津英子 長木美幸 熊迫陽子 後藤香里 城戸京子 日下千賀子 小池恵 佐藤久子 宇津宮隆史 鈴木史彦 齋藤昌利 林千賀 有馬隆博

③第49回 哺乳動物卵子学会 名古屋 2008/5/17

ART 後の流産におけるゲノムインプリント解析
佐藤晶子 大津英子 長木美幸 熊迫陽子 後藤香里 城戸京子 日下千賀子 小池恵 佐藤久子 宇津宮隆史 鈴木史彦 齋藤昌利 林千賀 有馬隆博

④第65回 日本生殖医学会九州支部会 博多 2008/4/27

ART 後の流産産物におけるゲノムインプリント遺伝子の解析
佐藤晶子 大津英子 長木美幸 熊迫陽子 後藤香里 城戸京子 日下千賀子 小池恵 佐藤久子 宇津宮隆史 鈴木史彦 齋藤昌利 林千賀 有馬隆博

⑤第3回 日本生殖再生医学会 東京 2008/3/30

ART 後の流産産物におけるゲノムインプリント遺伝子の解析
佐藤晶子、大津英子、長木美幸、熊迫陽子、後藤香里、城戸京子、日下千賀子、小池恵、佐藤久、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、有馬隆博

⑥第3回 日本生殖再生医学会 東京 2008/3/30

男性不妊症精子におけるゲノムインプリントの解析

小林久人、樋浦仁、佐藤晶子、大津英子、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、八重樫伸生、佐々木裕之、有馬隆博

⑦ 第30回日本分子生物学会 横浜
2007/12/14

男性不妊症の精子におけるインプリント異常

小林久人、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、佐藤晶子、宇津宮隆史、八重樫伸生、有馬隆博

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 昌利 (SAITO MASATOSHI)
東北大学・病院・助教
研究者番号：00451584

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし