

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16135

研究課題名(和文) ヒトES細胞から胚体外細胞系譜への分化転換に伴う分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism involving the transdifferentiation of human embryonic stem cells into extraembryonic lineage

研究代表者

小林 記緒 (KOBAYASHI, Norio)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10803885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト受精卵は胚体と胚体外の両方に分化可能な全能性を有するが、この分化全能性は着床期以降に消失する。この仕組みを解明するため、ヒト胚性幹(ES)細胞から栄養膜幹(TS)細胞へ分化転換を行った。分化転換した細胞は増殖・分化能の低下を示し、霊長類特異的なインプリント遺伝子C19MCが関与していることを突き止めた。本研究はヒト特異的なインプリント制御が分化全能性の消失に関与する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

霊長類特異的なインプリント遺伝子C19MCはTS細胞では高発現しているが、ES細胞および分化転換細胞では発現しておらず、ES細胞からTS細胞への分化転換を阻害するエピジェネティック障壁として機能していた。よって、ヒト受精卵における胚体と胚体外細胞の運命決定にC19MCのインプリント制御が関与している可能性が考えられる。また、C19MCの遺伝子座は霊長類に高度に保存されており齧歯類では保存されていない。今後、ヒト特異的な発生機構の解明が、不妊や流産の原因の解明や安全な生殖補助医療の提供などに役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the epigenetic mechanisms of the first cell fate commitment in humans. We show that naive human embryonic stem (ES) cells can transdifferentiate into trophoblast stem (TS) cells, but primed ES cells cannot. Our transcriptome and methylome analyses reveal that a primate-specific miRNA cluster on chromosome 19 (C19MC) is active in naive ES cells but epigenetically silenced in primed ones. Moreover, genome and epigenome editing using CRISPR/Cas systems reveal that C19MC is essential for the maintenance of TS cells and activation of C19MC allows the derivation of TS cells from primed ES cells. Thus, we reveal that C19MC activation confers differentiation potential into trophoblast lineages on human ES cells. Since C19MC is exclusively expressed in the placenta after implantation, we propose that silencing of C19MC in the epiblast lineage may function as an epigenetic barrier preventing ectopic differentiation of trophoblast cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：栄養膜幹細胞(TS細胞) 胚体外細胞系譜 胚体外細胞系 分化転換

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (HDP) は、妊娠によって妊婦が高血圧を発症する疾患であり、胎児発育不全の原因になるとともに母体に様々な合併症を引き起こす。HDP の発症には、母体側の要因だけでなく、胎盤形成の異常や、胎盤から分泌される血管新生阻害物質などが関与すると考えられている。先行研究から、HDP 患者の胎盤で DNA メチル化の異常が報告されており、胎盤における DNA メチル化や、ヒストン修飾などのエピゲノム制御の異常が、HDP の病態に関与していることが予想される。しかし、HDP の病態形成に関与する胎盤のエピゲノム特性にはいまだ不明な点が多い。本研究室では、妊娠初期のヒト胎盤より単離した細胞性栄養膜細胞 (CT 細胞) より、長期培養可能なヒト栄養膜幹細胞 (ヒト TS 細胞) の樹立に成功した [1]。ヒト TS 細胞は、増殖能をはじめとする妊娠初期の CT 細胞の特徴を維持し、CT 細胞から分化する絨毛外栄養膜細胞 (EVT 細胞) や合体栄養膜細胞 (ST 細胞) への分化誘導が可能である。さらに、本研究室では出産後の胎盤からヒト TS 細胞を樹立する方法を発見しており、HDP の症例から非侵襲的に検体を得ることができる (未発表データ)。HDP 患者の胎盤における遺伝子発現やエピゲノム修飾の異常を明らかにすることができれば、HDP の病態形成の理解に大きく役立つことが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、正常および HDP 由来の満期胎盤から採取した CT 細胞、そしてそれらの細胞から樹立したヒト TS 細胞を用いて、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピゲノム修飾の違いや、エピゲノムの異常によって生じる遺伝子発現の違いを明らかにし、HDP の発症機序の理解につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 正常妊娠および HDP 症例から得られた満期胎盤から、ソーティングによって CT 細胞を分取する。
- (2) 正常胎盤と HDP 胎盤の遺伝子発現を RNA-seq および miRNA-seq により比較する。
- (3) 正常胎盤と HDP 胎盤のエピゲノム修飾を比較するため、CUT&TAG-seq によるヒストン 修飾解析および Methyl-seq による DNA メチル化解析を行う。

4. 研究成果

(1) 正常妊娠 3 例、HDP 6 例について、満期胎盤由来の CT 細胞をソーティングし、RNA-seq、miRNA-seq による遺伝子発現解析をおこなった。少数の遺伝子は疾患特異的なパターンを示したものの、全体的に疾患の有無による違いは小さかった。これらの結果から、満期胎盤 CT 細胞においては、HDP の有無による遺伝子発現の差は比較的小さいことが明らかになった (図 1)。

(2) ヒストン修飾の比較のため CUT&TAG-seq によって H3K4me3、H3K4me1、H3K27ac、H3K36me3、H3K27me3、H3K9me3 修飾を解析した結果、満期胎盤 CT 細胞においては、HDP の有無によるヒストン修飾の差は小さいことが明らかになった (図 2)。

(3) 重症 HDP 3 例から得られた満期胎盤由来 CT 細胞について Methyl-seq 解析を行い、すでに行われていた正常満期胎盤由来 CT 細胞の DNA メチル化解析の結果と比較したところ、満期胎盤 CT 細胞においては、HDP の有無による DNA メチル化の差は小さいことが明らかになった。

本研究により、満期胎盤由来の CT 細胞では、正常群と HDP 群の間で遺伝子発現やエピゲノム修飾に大きな差がないことが明らかになった。

CT 細胞は、増殖を繰り返し分化することで EVT 細胞や ST 細胞を供給することが主な役割である。EVT 細胞は母体組織に浸潤して血管を拡張する役割を担うことから、その機能不全は血管のリモデリング不全により HDP 発症につながる可能性がある。ST 細胞は母体との間のガス・栄養交換およびホルモン産生を行っており、HDP 患者の血中で増加して血圧を上昇させる sFLT1 も ST 細胞から分泌される。したがって今回得られた結果は、HDP 発症につながる遺伝子発現やエピゲノム修飾の変化は EVT 細胞や ST 細胞で起きている可能性を示唆しており、今後 HDP 胎盤由来の TS 細胞から分化させた EVT 細胞や ST 細胞の解析を行うことで、HDP 病態形成のメカニズムを明らかにできる可能性がある。

<引用文献>

[1] Okae H et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. Cell Stem Cell. 2018 Jan 4;22(1):50-63.e6.

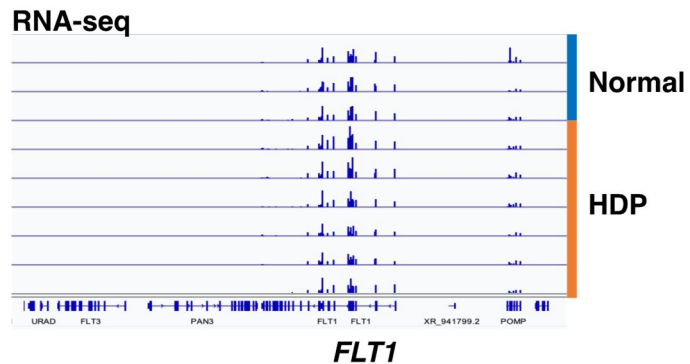


図 1 HDP の原因となる sFLT1 をコードする FLT1 遺伝子周辺の遺伝子発現

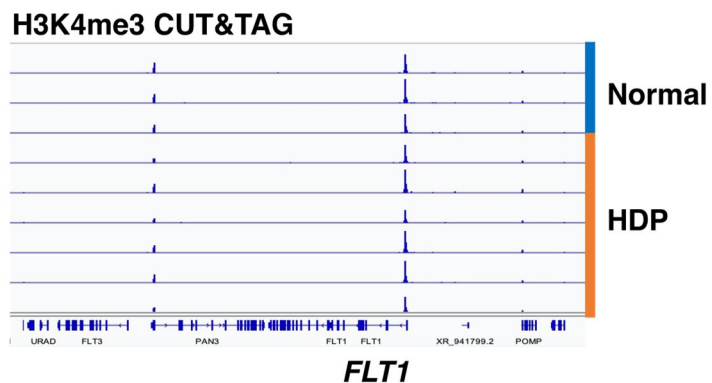


図 2 HDP の原因となる sFLT1 をコードする FLT1 遺伝子周辺の H3K4me3 ヒストン修飾

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shun Shibata, Eri H Kobayashi, Norio Kobayashi, Akira Oike, Hiroaki Okae, Takahiro Arima.	4. 巻 12
2. 論文標題 Unique features and emerging in vitro models of human placental development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol .	6. 最初と最後の頁 301-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12347.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hattori Hiromitsu, Hiura Hitoshi, Kitamura Akane, Miyauchi Naoko, Kobayashi Norio, Takahashi Souta, Okae Hiroaki, Kyono Koichi, Kagami Masayo, Ogata Tsutomu, Arima Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of four imprinting disorders and ART	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0623-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Sota, Okae Hiroaki, Kobayashi Norio, Kitamura Akane, Kumada Kanako, Yaegashi Nobuo, Arima Takahiro	4. 巻 116
2. 論文標題 Loss of p57KIP2expression confers resistance to contact inhibition in human androgenetic trophoblast stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 26606 ~ 26613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1916019116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 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 & Childrens Study Group	4. 巻 17
2. 論文標題 The risk of secondary sex ratio imbalance and increased monozygotic twinning after blastocyst transfer: data from the Japan Environment and Children's Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12958-019-0471-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 有馬隆博、岡江寛明、小林記緒
2. 発表標題 ヒト胎盤幹細胞のエピジェネティクス
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡江寛明、小林記緒、有馬隆博
2. 発表標題 分化全能性の消失に関わるインプリント遺伝子の同定
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第113回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡江寛明、小林記緒、有馬隆博
2. 発表標題 Epigenetic restriction of human pluripotency by silencing of the chromosome 19 miRNA cluster
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林記緒
2. 発表標題 ヒト胚性幹細胞の栄養膜幹細胞への分化転換
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 宮内尚子、服部裕充、小林記緒、樋浦仁、有馬隆博	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 ART治療における遺伝的安全性とリスク	

1. 著者名 服部裕充、小林記緒、岡江寛明、有馬隆博	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 加齢によるエピジェネティクス変異	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------