

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：20380159

研究課題名（和文） ウシ栄養膜幹細胞系の確立

研究課題名（英文） Establishment of bovine trophoblastic cell lines

研究代表者

橋爪 一善 (HASHIZUME KAZUYOSHI)

岩手大学農学部・教授

研究者番号：10355737

研究成果の概要（和文）：

ウシの着床および胎盤形成機構を解明するため、そのツールとしてウシ体外受精胚からウシ栄養膜細胞系の確立を試みた。培養基質や培養法を検討し、サイトカインの一種 TGF β superfamily の Bone Morphologic Protein 4 (BMP4) を添加培養することにより効率的にウシ栄養膜細胞系を作出する方法を開発した。これまで作出が極めて難しく世界でも 2 系しか作出されていないウシ栄養膜細胞系を 12 系新たに確立した。また、確立した細胞系の特性解析に着手し、確立した細胞系は発現する遺伝子および分子特性から少なくとも特性が異なる 4 特異細胞系を含むことを確認した。また、これらの細胞系は細胞基質を変化させることにより細胞分化の誘導が可能であり、幹細胞を含む細胞譜系の検証に有効なツールを提供すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to raise the trophoblastic cell lines from in vitro fertilized embryonic cells for analyzing the mechanism of bovine implantation and placentogenesis. In exploring these mechanisms, trophoblastic cell lines can provide substantial information. Unfortunately, there are few cell lines for this purpose in cattle because of the difficulty of raising successive cell stock in the long term. In this study, 12 new cell lines were established using bone morphogenetic protein 4 (BMP4). These cell lines were maintained for around 30 passages, and they retained trophoblastic characteristics and expressed bovine trophoblastic genes: placental lactogen, interferon- τ , pregnancy-associated glycoprotein 1, and prolactin-related protein 1. Although the gene expression patterns were different among cell lines and depended on the cells, there were at least four characteristics. All of them expressed bovine POU domain class 5 transcription factor 1 and caudal-type homeobox 2. The expression of these genes was confirmed by quantitative RT-PCR and immunohistochemical detection. These results suggest that BMP4 is involved in the raising of trophoblast cell lines from early embryonic cells and the newly developed cell lines can provide different types of bovine trophoblastic cells with different cell lineages. This may constitute a significant new tool for the examination of trophoblastic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：細胞・組織、生体分子、遺伝子、発現制御

1. 研究開始当初の背景

妊娠成立の鍵は受精、着床、胎盤形成といった妊娠初期の母体と受精胚の相互作用の適、不適が重要であることは言うまでもない。ウシにおける不受胎の大部分(90%)は妊娠初期に生じることが明らかで、栄養膜細胞の分化、増殖と胎盤形成の不具合によって過言でない。胎盤は子宮内膜組織と胚側の栄養膜細胞とから形成される。そのため栄養膜細胞の機能や遺伝子発現調節機構の解明は着床の成立、胎盤の形成に必須である。

生体内での栄養膜細胞機能は各種要因の複雑な相互作用が関連しており、その機能やネットワークを検証することは難しい。これまで生体外モデルとしてウシ栄養膜細胞の培養系の確立を試み、ウシ栄養膜細胞系1(Bovine trophoblast 1, BT-1, Shimada et al 2001, Hashizume et al 2006)細胞を作製した。この細胞系はウシ胎盤特有の胎盤性ラクトジェン(Placental lactogen, PL)やインターフェロン・タウ(interferon tau, IFN- τ)を産生し、現在250代を越えてなお継代維持が可能である。また、本細胞系は、ごく最近、内在性レトロウイルス遺伝子を発現していることが確認された特異的な細胞系である(馬場ら, 2007)。しかしながらこの細胞系の遺伝子発現を任意に制御することやウシ胎盤特有の二核細胞への効果的な分化誘導には成功していない。一方、マウスでは胎盤特有細胞への誘導が可能なマウス栄養膜幹細胞系(trophoblast stem cell, TS 細胞, Tanaka et al 1998)が確立されている。両者の差は幹細胞を任意に制御できるかどうかであり、その意義は大きく異なる。ウシにおける着床や胎盤形成を生体外で検証するより適したモデルを開発するために、本研究では、任意に栄養膜細胞の分化、増殖を調節できる幹細胞系の作出、確立を試み、その機能解析をする。

2. 研究の目的

受精胚からウシ栄養膜細胞系を容易に作出する方法を開発すると共に、その細胞特性を明らかにすることが目的である。そのため

(1) 培養系の確立、(2) 細胞譜系の検証、(3) 分化、増殖制御機構の解明について検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養系の確立

胚盤胞胚から幹細胞系を効率的に作出する適正な培養液組成の検討、胚発生培養から幹細胞系培養への転換時期について検

討すると共に、異なる特性を持つ栄養膜細胞系を作出する手法を確立する。

これまで胎子由来の線維芽細胞の培養液を増殖維持に使用し、ウシ栄養膜細胞系作出を試みた経験では、培養後4-5世代までの継代が限度であった。そこで、長期間継代可能で再現性の高い手法を開発するため、TGF β ファミリーなどの各種のサイトカインを検証する。

(2) 細胞譜系の検証

ウシ生体内、すなわち胎盤における栄養膜細胞は、単核の栄養膜細胞から二核細胞あるいは多核の細胞となると考えられている。確立された細胞系の細胞特性および細胞譜系を発現する遺伝子動態をマイクロアレイなどのより検証する。また、生体内の胎盤での栄養膜細胞の譜系を調査するため、妊娠中の胎盤絨毛叢から栄養膜細胞を分取、細胞分取装置(Cellsorter, FACS)により核相を同定、発現する特異遺伝子との関連性を検索する。加えて、既存のBT-1細胞で確認されたコラーゲンコート上培養による多核化誘導の効果およびより効率的な多核化誘導法を検索する。

(3) 分化、増殖制御機構の解明

栄養膜細胞特異遺伝子の発現制御機構をエビジェネティックな解析並びに特異遺伝子の発現を抑制するsiRNAなどにより検討する。

4. 研究成果

(1) 培養系の確立

既に確立しているウシ栄養膜細胞系(BT-1)の増殖および胚盤胞の活性化を確認した骨形成因子4(BMP4)を体外受精胚の培養系に添加することにより、幹細胞系の作出が可能かを検証した。また、後年度に予定していた

表1 BMP4添加による細胞系確立

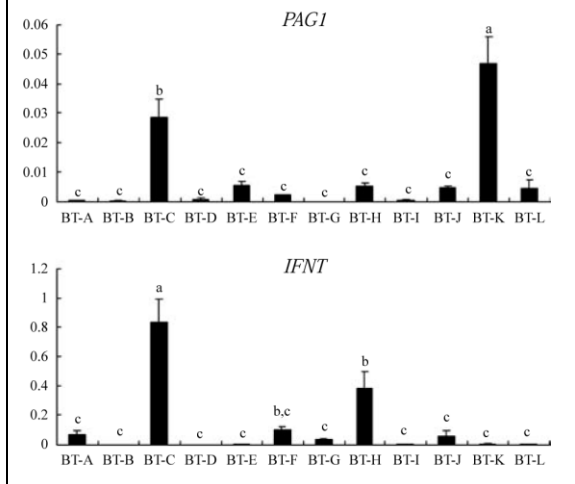
BMP4 (ng/ml)	Attachment (%)	Spread (%)	Growing ratio (%)					Name of cells
			PDL5	PDL10	PDL15	PDL20	PDL25	
Control (0)	63.2 (31/49) ^a	57.1 (28/49)	57.1 (28/49)	36.7 (18/49)	2 (1/49)	2 (1/49)	2 (1/49)	BT-D
1	85.3 (35/41)	80.4 (33/41)	80.4 (33/41)	46.3 (19/41)	7.3 (3/41)	7.3 (3/41)	7.3 (3/41)	BT-A, BT-E, BT-F
10	80.4 (33/41)	75.6 (31/41)	75.6 (31/41)	46.3 (19/41)	12.2 (5/41)	7.3 (3/41)	7.3 (3/41)	BT-B, BT-C, BT-G
100	78 (32/41)	75.6 (31/41)	75.6 (31/41)	41.5 (17/41)	12.2 (5/41)	12.2 (5/41)	12.2 (5/41)	BT-H, BT-I, BT-J, BT-K, BT-L

a: No. of development embryos/No. of used embryos.

ウシ栄養膜二核細胞に特異的に発現する胎盤性ラクトジェン(PL)およびプロラクチン関

連タンパク質 1 (PRP-1)の上流域におけるメチル化状態を解析した。BMP4 の添加は、容量依存的に栄養膜細胞の伸展と増殖を高進した。体外受精により得た胚盤胞に BMP4 を 1-100ng/ml 添加、7 日間培養し、その後 20% 牛胎子血清 および 100 μ M beta-mercaptoethanol を含む TCM-199 培地に同様の BMP4 を添加して 6 日間継続培養した後、継代維持培養を続けた。添加量にかかわらず、約 80% の受精胚は培養皿に接着、伸展した。その効率は約 80% と無添加区の 60% に比較して高かった。最終的に無添加区では 1 細胞系、100 ng/ml 添加区では 5 細胞系、総計 12 細胞系が確立でき、BT-A~BTL とした。また、BMP4 添加区由来細胞系は、細胞増殖速度や効率は無添加区に比べ高く、BMP4 の添加は長期間継代可能なウシ栄養膜細胞系の策出を促進するものと推察された。

図 1 特異遺伝子の動態



(2) 細胞譜系の検証

①特異遺伝子の網羅的検索

独自に作成したオリゴマイクロアレイ解

表 2 特異遺伝子発現細胞の比率

Cell	CSH1-positive	IFNT-positive
BT-A	0/404 (0) ^a	43/264 (16.2)
BT-B	0/544 (0)	0/626 (0)
BT-C	3/266 (1.1)	100/301 (33.2)
BT-D	1/225 (0.4)	0/277 (0)
BT-E	3/470 (0.6)	11/360 (3.1)
BT-F	3/356 (0.8)	21/264 (8.0)
BT-G	0/503 (0)	19/241 (7.9)
BT-H	0/293 (0)	88/333 (26.4)
BT-I	5/258 (1.9)	0/330 (0)
BT-J	14/299 (4.7)	0/381 (0)
BT-K	26/364 (7.1)	0/314 (0)
BT-L	10/344 (2.9)	12/376 (3.2)

析から確立した 12 細胞系は多くの栄養膜細

胞特異遺伝子群を発現量の差はあるが共有していた。その内 bCSH1(PL), bPRP1, bPAG1 および bIFNT 遺伝子の定量的な発現動態結果から細胞系毎に特異的な発現パターンのあることを見出し、細胞系を 4 分類した。4 遺伝子を発現しないもの(BT-B)、4 遺伝子を発現するもの(BT-C, BT-E, BT-F, BT-H, BT-J)、bCSH1、bPRP1、bPAG1 を発現、bIFNT を発現しないもの (BT-D, BT-I, BT-K, BT-L)、主として bIFNT だけを発現するもの (BT-A, BT-G)。

②生体由来栄養膜細胞の分取、分類と核相

妊娠中期の胎盤栄養膜を帝王切開により採取、密度勾配遠心法およびフローサイトメータで採取した。分画層の上層には主として diploid、下層に tetraploid および hexaploid の細胞を確認した。deploid では CSH1 遺伝子の認めず、未分化マーカーである SOX2 遺伝子の発現を認めた。tetraploid および hexaploid 各画分では CSH1 陽性、SOX2 陰性細胞が主であった。未分化で幹細胞と推測される細胞は、上層の diploid 画分に含まれることが、確認できた。すなわち、ウシ栄養膜細胞は単核細胞から多核細胞が出現することが示唆され、その分化と CSH1 発現が深く関連すると推測された。

③多核化の誘導

多核化要因を検証するため、新しく確立したウシ栄養膜細胞の多核化を試み、既知の細胞系、BT-1 細胞と同様にコラーゲンゲル上での誘導が可能であることが判明した。その効果は少なくとも 1 週間以上の培養によりより効果的であることが確認できた。

新規に確立した細胞系から 4 細胞系(BT-B, BT-C, BT-H, BT-K)を抽出し、3つの異なる細胞基質条件下で、bCSH1 および bPRP1 の発現を指標として細胞の分化能を検証した。いずれの細胞系においてもマトリジェル基質上での培養が分化誘導に最も有効であること並びに 4 細胞系のうち BT-C が最も高い分化能を有することを確認した。

(3) 分化、増殖制御機構の解明

①bCSH1 および bPRP1 メチル化動態の解析

BT-1 細胞を用いた栄養膜細胞系特異的な遺伝子 CSH1 および PRP-1 の上流域のメチル化動態をバイサルファイト法および脱メチル化剤を用いて検証し、両遺伝子は同じ細胞に発現することを確認した。また、人為的な脱メチル化、メチル化付加は、両遺伝子の発現にエピジェネティックな制御系が関わることを示唆している。加えて、これら遺伝子のメチル化状態の変動が細胞の分化と深く関わることを示している。これらの結果は確立したウシ栄養膜細胞が、栄養膜細胞系の分化を検証する有用なツールであることを示

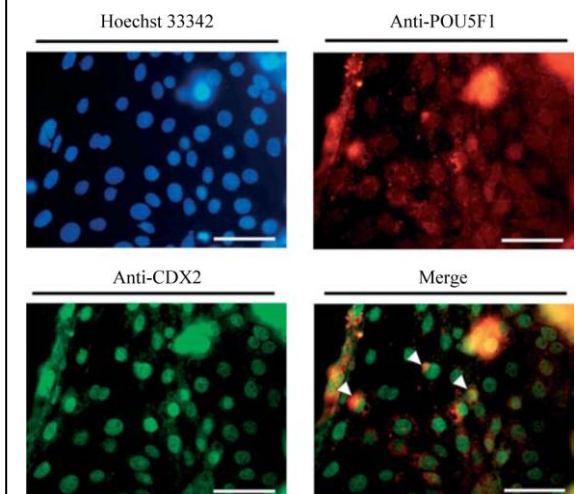
している。

② 栄養膜細胞の遺伝子発現制御

研究代表者らが過去に確立、300 継代を越す細胞機能が安定している BT-1 細胞に、IFNT および POU5F1 をターゲットとする人工的 miRNA を導入して遺伝子発現の抑制を試みた。細胞内の両遺伝子の発現量は変化しなかったが、miR-POU5F1 導入により bCSH1 遺伝子発現の上昇を認めた。

新規ウシ栄養膜細胞幹細胞系の特性評価前年、20 年度に確立した新たなウシ栄養膜細胞系作出方法により、12 細胞系を確立、継続して培養、細胞特性の解析に用いた。インターフェロン・タウ (IFN τ)、プロラクチン関連たんぱく質 (PRPs)、胎盤性ラクトジェン (PL)、CDX2 などの発現から、抽出した 12 の細胞系は大別して 3 分類した。これら 12 細胞系はいずれも 30 代以上の継代および凍結保存が可能であり、長期の継代可能な細胞群である

図 2 転写因子の発現



ことが明らかとなった。また、これらの細胞は形態学および上記のたんぱく質発現から、既確立ウシ栄養膜細胞系、BT-1 と異なる特性をあわせもつ細胞であることが判明し、今後の研究遂行の対象細胞と重要な要因を内在すると推測される。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

① 橋爪一善、高橋透、木崎景一郎、着床とプロラクチン -ウシ PRL/GH ファミリーは着床誘導物質か?-. Hormone Frontier in Gynecology, 査読無、18、2011、31-38

② Suzuki Y, Koshi K, Imai K, Takahashi T,

Kizaki K, Hashizume K. Bone morphogenetic protein 4 accelerates the establishment of bovine trophoblastic cell lines. Reproduction, 査読有、142, 2011, 733-43.

③ Baba K, Nakaya Y, Shojima T, Muroi Y, Kizaki K, Hashizume K, Imakawa K, Miyazawa T. Identification of novel endogenous betaretroviruses which are transcribed in bovine placenta. J Virology 査読有、85、2011、1237-1245

④ Sugawara K, Kizaki K, Herath CB, Hasegawa Y, Hashizume K., Transforming growth factor beta family expression at the bovine feto-maternal interface. Reprod Biol Endocrinol, 査読有、8、2010、120

⑤ Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K., Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. Reprod Biol Endocrinol, 査読有、8、2010、60

⑥ Ochiai K, Yoshikawa Y, Oonuma T, Tomioka Y, Hashizume K, Morimatsu M., Interactions between canine RAD51 and full length or truncated BRCA2 BRC repeats. Veterinary J, 査読有、190、2011、293-295

⑦ Ochiai K, Yoshikawa Y, Yoshimatsu K, Oonuma T, Tomioka Y, Takeda E, Arikawa J, Mominoki K, Omi T, Hashizume K, Morimatsu M. Valine 1532 of human BRC repeat 4 plays an important role in the interaction between BRCA2 and RAD51., FEBS Lett., 査読有、585、2011、1771-1777

⑧ Koshi K, Ushizawa K, Kizaki K, Takahashi T, Hashizume K., Expression of endogenous retrovirus-like transcripts in bovine trophoblastic cells. 査読有、Placenta, 32, 2011, 493-9.

⑨ Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K., Cloning and expression of SOLD1 in ovine and caprine placenta, and their expected roles during the development of placentomes., BMC Dev Biol. 査読有、10、2010、9

⑩ Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Kizaki K, Hashizume K. Cleaved bovine prolactin-related protein-I stimulates vascular endothelial cell proliferation. Mol Cell Endocrinol. 査読有、323, 2010, 277-281

[学会発表] 計 (13) 件 うち招待講演計 (0) 件

① Iwashita S, Nakashima K, Ohno-Iwashita Y, Kizaki K, Hashizume K, Imajoh-Ohmi S, Song S-Y, Differential cleavage of Bucentaur family members, intrinsically disordered/unstructured

proteins, in bovine placentome、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010.12.9、神戸

② Nakaya Y, Koshi K, Kizaki K, Baba K, Imakawa K, Hashizume K, Miyazawa T、Functional characterizations and expressional profiles of bovine endogenous retrovirus envelope proteins、The 22nd Workshop on Retroviral Pathogenesis、2010.11.21、California(USA)

③ 仲屋友喜、越勝男、木崎景一郎、馬場健司、今川和彦、橋爪一善、宮沢孝幸、ウシ内在性レトロウイルスのエンベロープタンパク質の発現と機能解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010.11.8、徳島

④ 落合和彦、吉川泰永、大沼俊名、橋爪一善、森松正美、イヌ乳腺腫瘍関連遺伝子 Brca2 の BRC repeat4 のアミノ酸配列が Rad51 との相互作用に及ぼす影響、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010.9.16、帯広

⑤ 越 勝男、牛澤浩一、細江実佐、高橋 透、木崎景一郎、橋爪一善、ウシ内在性レトロウイルスエンベロープ遺伝子の胎盤形成に果たす役割、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010.9.16、帯広

⑥ 大田友和、牛澤浩一、細江実佐、高橋 透、山口高弘、木崎景一郎、橋爪一善、ウシ子宮内膜における T 細胞の動態と細胞障害性因子の発現解析、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010.9.16、帯広

⑦ Mishra B, Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K、Expression of ADAMTS-1 in the cyclic and pregnant bovine endometrium、第 103 回日本繁殖生物学会大会、2010.9.4、十和田

⑧ 木村美貴、木崎景一郎、橋爪一善、ウシ子宮内膜間質細胞の遺伝子発現動態に及ぼす培養基質の影響、第 103 回日本繁殖生物学会大会、2010.9.2、十和田

⑨ 越 勝男、牛澤浩一、細江実佐、高橋 透、木崎景一郎、橋爪一善、ウシ胎盤における内在性レトロウイルスエンベロープ遺伝子の発現解析、第 103 回日本繁殖生物学会大会、2010.9.2、十和田

⑩ Kizaki K, Kimura M, Iga K, Takahashi T, Hashizume K、Active roles of heparin-binding EGF-like growth factor and its receptor in bovine endometrium during implantation、Soc. for the Study of Reprod. 43rd Ann. Meeting、2010.8.2、Milwaukee (USA)

⑪ Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Kizaki K, Hashizume K、Expression of the endogenous retrovirus-like transcripts in bovine placenta、Soc. for the Study of Reprod. 43rd Ann. Meeting、2010.8.2、Milwaukee (USA)

⑫ Hashizume K, Suzuki Y, Imai K, Takahashi T, Kizaki K、Specific characters of new established

bovine trophoblastic cell lines、Soc. for the Study of Reprod. 43rd Ann. Meeting、2010.8.1、Milwaukee (USA)

⑬ Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K、Differential expression of EMMPRIN regulates endometrial remodeling during early gestation in the cow、Soc. for the Study of Reprod. 43rd Ann. Meeting、2010.8.1、Milwaukee (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋爪 一善 (HASHIZUME KAZUYOSHI)
岩手大学農学部・教授
研究者番号：10355737

(2) 研究分担者

木崎 景一郎 (KIZAKI KEIICHIRO)
岩手大学農学部・准教授
研究者番号：40337994

(3) 連携研究者

高橋 透 (TAKAHASHI TORU)
農業生物資源研究所生殖機構ユニット・主任研究員
研究者番号：20355738
(H20→H21：研究協力者)

(4) 研究協力者

今井 敬 (IMAI KEI)
家畜改良センター・技術部
研究者番号：70343994