

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590301

研究課題名（和文） Wnt シグナルによる胎盤形成制御の分子機構

研究課題名（英文） Regulation of placenta development by Wnt signaling

研究代表者

中村 勉（NAKAMURA TSUTOMU）

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：30302798

研究成果の概要（和文）：胎盤の絨毛組織（胎盤の外側が子宮壁に入り込んだもので、胎児と母体との連絡に関与）が形成される際には、シンサイチンというタンパク質の働きで起こる細胞融合が重要であることが知られている。私たちは、シンサイチンが Gcm1 というタンパク質の制御を受け、Gcm1 がさらに Wnt シグナルの制御を受けていることを明らかにした。すなわち、「Wnt シグナル→Gcm1→シンサイチン→細胞融合」という制御経路を世界に先駆けて示した。

研究成果の概要（英文）：Cell fusion has a critical role in various developmental processes. However, the signals that regulate cell fusion remain poorly understood. We showed that Wnt signaling directly targets the GCM1/syncytin pathway and thereby regulates the fusion of placental syncytiotrophoblast cells. Our results demonstrate a signal transduction pathway that regulates cell fusion, and may provide intriguing perspectives into the various biological and pathological processes that involve cell fusion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：シグナル伝達、発現制御、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 私たちは、 β -catenin と複合体を形成する新規タンパク質 B9L を同定し、 β -catenin/TCF4 複合体と協調的に Wnt 標的遺伝子の転写活性化に関与することを示した（Cancer Res 64, 8496-8501, 2004）。さらに B9L ノックアウトマウスを作製し、表現型の解析を行った。その結果、胎生 10.5 日には発育遅滞が生じ胎生 11.5 日までに致死となること、その原因が胎生 8.5 日以降に生じ

る胎盤形成不全であることを見出した。マウスでは、胎生 8.5 日に漿膜と尿膜が融合し、続いて尿膜側の血管が漿膜側に陥入・分枝して、胎生 10 日までに複雑に入り組んだラビリンス層を形成し、この構造が後の胎盤形成の基盤となる。組織学的解析の結果、B9L ノックアウトマウスでは、尿膜血管の陥入・分枝が起こらないためにラビリンス層が形成されないことを見出した。以上の結果から、B9L を介した Wnt シグナルは、尿膜血管の陥

入・分枝を誘導することによってラビリンス層の形成を制御しており、胎盤形成に必須の役割を果たすことが明らかになった。これらの知見をさらに分子レベルの解析へと発展させるため、本研究の着想に至った。

(2) 分子レベルの解析の手がかりとして、私たちは転写因子 *Gcm1* (Glial cell-missing 1) に着目した。*Gcm1* は漿膜の特定の細胞のみに発現し、ラビリンス層形成の際に尿膜血管の陥入点を規定している。興味深いことに、*Gcm1* ノックアウトマウスは B9L ノックアウトマウスと極めて良く似た表現型を示し、尿膜血管の陥入が起こらず胎生 11 日までに致死となる。私たちは、胎生 9.5 日前後のラビリンス層において B9L と *Gcm1* の発現領域が一致していることや、B9L ノックアウトマウス胎盤では *Gcm1* 遺伝子の発現が顕著に減少していることを見出した。これらの結果から、*Gcm1* 遺伝子が B9L の下流で発現誘導をうけると考えられた。*Gcm1* 遺伝子の発現調節領域 (第 2 イントロン) の塩基配列を検索した結果、TCF4 結合配列がマウスで 7 か所、ヒトでは 9 か所見つけた。さらに、 β -catenin の CHIP-on-chip データベース (東京大学先端科学技術研究センター・油谷浩幸教授) により、*Gcm1* 遺伝子の第 2 イントロンのうち最も 3' 側の TCF4 結合配列を含む 879bp の断片が同定された。この領域が β -catenin/TCF4 に応答する領域であることは、ルシフェラーゼアッセイでも確認できた。したがって、*Gcm1* 遺伝子が Wnt シグナルの直接の標的遺伝子で B9L/ β -catenin/TCF4 複合体により転写誘導をうけることは、ほぼ確定的である。B9L ノックアウトマウスでは、Wnt シグナルに応答した *Gcm1* 遺伝子の発現誘導ができず、尿膜血管陥入点を規定できないため、ラビリンス層の形成不全を来したと考えられた。

(3) したがって、B9L ノックアウトマウスの胎盤形成異常の解析により、“Wnt シグナル→*Gcm1* 発現誘導→尿膜血管陥入の誘導”という経路が強く示唆された。

2. 研究の目的

B9L の生理機能を解明するため、B9L ノックアウトマウスに認められる胎盤の形成異常の分子機構について解析する。特に、B9L による胎盤形成制御の分子機構として強く示唆されている“Wnt シグナル→B9L/ β -catenin/TCF4 複合体→*Gcm1* 発現誘導→尿膜血管陥入の誘導”という経路を、より in vivo に近い実験系を用いて立証する。

3. 研究の方法

B9L による胎盤形成制御の分子機構として強く示唆されている、

“Wnt シグナル→B9L/ β -catenin/TCF4 複合体→*Gcm1* 発現誘導→尿膜血管陥入の誘導”という経路の存在をより確実に立証するため、in vivo に近い実験系を用いて解析を行う。経路を前後半に分け、初年度は、「Wnt シグナル→B9L/ β -catenin/TCF4 複合体→*Gcm1* 発現誘導」の部分の解析を行う。*Gcm1* 遺伝子が Wnt シグナルの直接の標的遺伝子であることは、現在までにほぼ確定的になっている。本研究では、これらの実験系に比べてより in vivo に近い状態を反映している TS

(trophoblast stem) 細胞および絨毛癌細胞株 Bewo を用いて、Wnt シグナルおよび B9L/TCF4/ β -catenin 複合体に依存して *Gcm1* の発現が誘導されることを示す。次年度以降は、経路の後半の「*Gcm1* 発現誘導→尿膜血管陥入の誘導」の部分に焦点を絞って解析を行い、その分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) マウスの胎盤形成過程では、胎生 8.5 日に漿膜と尿膜が接触した後、漿膜の *Gcm1* 発現細胞が融合して syncytiotrophoblast になり、尿膜血管の陥入を誘導する。この現象をよく反映する in vitro 系として、絨毛癌細胞株 Bewo が知られている。Bewo 細胞を forskolin 処理すると、相互に融合して syncytiotrophoblast 様に分化するが、この際に *Gcm1* の発現が上昇する。このとき *Gcm1* だけでなく、Axin2 および BAMBI 等の既知の Wnt 標的遺伝子も発現が上昇することを、リアルタイム RT-PCR により見出した。また、*Gcm1* 遺伝子の TCF4 結合配列を用いた CHIP 法により、*Gcm1* の発現上昇に相関して β -catenin/TCF4 シグナルの活性化が起こっていることを見出した。さらに、B9L、 β -catenin および TCF4 をノックダウンすると、forskolin 処理による *Gcm1* の発現上昇が阻害されることを見出した。これらの知見から、*Gcm1* 遺伝子が Wnt シグナルおよび B9L/TCF4/ β -catenin 複合体により直接的に転写調節を受ける標的遺伝子であることを明確に証明した。この結果により、B9L による胎盤形成制御の分子機構として強く示唆されている、「Wnt シグナル→B9L/ β -catenin/TCF4 複合体→*Gcm1* 発現誘導」というシグナル伝達経路の存在を立証することができた。

(2) Wnt/ β -catenin シグナルの下流で *Gcm1* により転写調節される遺伝子の候補として、細胞融合制御因子 syncytin-1 および-2 に着目し、ノックダウン実験およびノックアウトマウスを用いた in vivo 解析を行った。その結果、syncytin が、Wnt シグナルの下流で *Gcm1* により発現制御をうけ、細胞融合が制御されることを見出した。

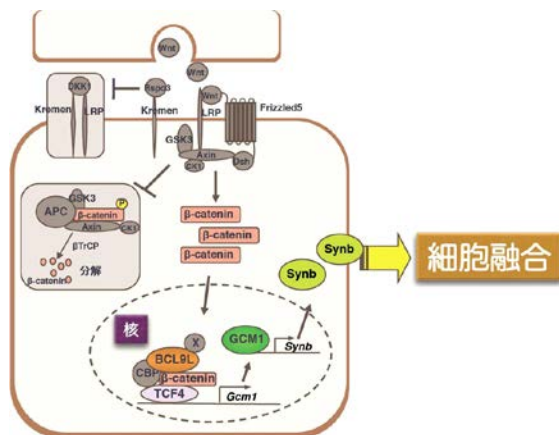
① BeWo 細胞において、B9L、 β -catenin あ

るいは TCF4 をノックダウンすると、syncytin-1 および-2 の発現が抑制される。したがって、syncytin-1 および-2 は Wnt/ β -catenin シグナルの下流で Gcm1 により発現制御をうけていることが示された。

② syncytin-1 および-2 は細胞融合制御因子であることが知られている。実際、BeWo 細胞において、B9L、 β -catenin あるいは TCF4 をノックダウンすると、細胞融合が抑制されることを見出した。

③ B9L ノックアウトマウスの胎盤において、syncytin-B の発現が抑制されており、さらに電顕観察の結果、絨毛の栄養芽細胞の融合および分化が阻害されていることを見出した。

(3) 以上の結果を総合し、「Wnt/ β -catenin/B9L シグナル→転写因子 GCM1 の発現誘導→細胞融合誘導因子 Syncytin の発現誘導→栄養芽細胞の融合」という経路を証明し、細胞融合を制御する上流シグナルを初めて明らかにした(下図)。さらに、Wnt/ β -catenin シグナルと細胞融合のリンクを世界に先駆けて示したことになる。



(4) Wnt シグナルは組織の再生に必要で、その過剰な活性化はがんにつながる事が分かっている。GCM1 や syncytin は胎盤以外の組織でも発現しており、syncytin は乳がんや子宮内膜がんでの発現が報告されていることから、今回明らかとなった細胞融合制御機構が他の組織でも普遍的に働いている可能性があり、組織の再生や細胞のがん化の新しい仕組みの解明につながる可能性が出てきた。

(5) ヒト Gcm1 遺伝子は、マウスのラビリンス層に相当する絨毛で発現している。子宮内胎児発育遅延 (intrauterine growth retardation; IUGR) の発症に絨毛の分枝形成不全が関係していることから、IUGR のような胎盤疾患の発症に Gcm1 遺伝子が何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。ま

た、子癩前症 (妊娠 20 週から産後 1 週間の間に発症する高血圧で、タンパク尿を伴う) において胎盤 Gcm1 遺伝子の発現低下が認められている。IUGR と子癩前症はヒト妊娠例の 5~10% を占め、胎児死亡や乳幼児死亡の重大な原因となる。今後のさらなる研究により、胎盤疾患の本態と発症機構の解明にも寄与できると考えられる。胎盤において Wnt シグナルが細胞融合を制御することにより、正常なシンシウムと絨毛の形成を規定していることが明らかになったため、胎盤絨毛の発育不全に起因するヒトの妊娠異常のメカニズム解明や治療法の開発につながる事も期待される。

(6) 細胞融合は筋細胞、破骨細胞、胎盤のシンシウムなど特定の細胞・組織のみで見られる限定的な生物現象と考えられてきたが、近年では組織の修復・再生やがんの浸潤・転移にも関与することが示唆されている。研究成果が直ちに応用研究につながるわけではないが、例えば細胞融合を促進する薬剤の開発により組織の修復・再生を効率化できれば、臓器移植において輸送に伴う虚血・再循環傷害から移植臓器を保護・修復することが可能になる可能性がある。逆に細胞融合を阻害する薬剤の創製により、がんの浸潤・転移を抑制できる可能性もある。本研究の成果はこれらの創薬の分子標的としての応用が期待される。

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 2 件)

① Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, Senda T, Nonaka A, Aburatani H, Nakamura T, Akiyama T. Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway. Nature Commun 2, 548, 2011. 査読有

DOI: 10.1038/ncomms1551

② Nakamura T, Hayashi T, Mimori-Kiyosue Y, Sakaue F, Matsuura K, Iemura S, Natsume T, Akiyama T The PX-RICS-14-3-3 ζ / θ complex couples N-cadherin- β -catenin with dynein-dynactin to mediate its export from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 285, 16145-16154, 2010. 査読有 <http://www.jbc.org/content/285/21/16145.long>

[学会発表] (計 2 件)

① 松浦憲, 地神貴史, 谷上賢瑞, 森下保幸,

足達俊吾, 千田隆夫, 油谷浩幸, 中村勉, 秋山徹. Wnt/ β -catenin シグナルが細胞融合シグナルを制御する新規シグナル伝達経路の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22 日, 大阪.

② 中村勉, 林寛敦, 那須-西村教子, 坂上史佳, 森下保幸, 夏目徹, 松浦憲, 秋山徹. PX-RICS は N-cadherin/ β -catenin 複合体の小胞体-ゴルジ体輸送を制御する. ミニシンポジウム(細胞間接着研究の新展開), 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009 年 6 月 3 日, 名古屋.

[その他]

報道関連情報

① プレスリリース 「Wnt シグナルによる細胞融合制御メカニズムの解明」 2011 年 11 月 23 日

② 東大、Wnt シグナルによる細胞融合制御のメカニズムを解明 マイナビニュース 2011 年 11 月 25 日

③ 東大、Wnt シグナルによる細胞融合制御のメカニズムを解明 Yahoo ニュース 2011 年 12 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 勉 (NAKAMURA TSUTOMU)
東京大学・分子細胞生物学研究所・講師
研究者番号: 30302798

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: