

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592405

研究課題名(和文) マウス胎盤形成に関わる核マトリックス関連蛋白 Satb の解析

研究課題名(英文) Nuclear matrix associating factors, Satb, are novel regulators of murine placentation

研究代表者

浅野間 和夫 (ASANOMA, Kazuo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30380413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：マウス、ラットの栄養膜細胞の分化を制御する分子として核マトリックス関連分子 Satb1、Satb2 を同定した。Satb1、Satb2 は栄養膜細胞を未分化な幹細胞の状態に保つために必要な分子である。Satb1、Satb2 が転写因子として制御する標的遺伝子として栄養膜幹細胞の維持に必須である Eomes を同定した。すなわち、Satb1、Satb2 は Eomes の発現を上げることで未分化状態の維持に寄与していることが分かった。以上の結果を論文として発表した (Asanoma et al., 2012)。

研究成果の概要(英文)：We identified novel regulators of trophoblast cell differentiation, Satb1 and Satb2. They had been known as nuclear matrix associating molecules. Satb1 and Satb2 are necessary to maintain rodent trophoblast cells at stem cell condition. We also discovered Eomes as a target gene of Satb1 and Satb2. Eomes is a well-known regulator necessary for maintenance of trophoblast stem cells. Therefore, Satb1 and Satb2 upregulate Eomes expression to keep trophoblast cells from differentiation. We published these results as a paper (Asanoma et al., 2012).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：胎盤 栄養膜幹細胞 分化 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

胎盤は母体と胎児間の物資の受け渡しを担う器官でありその主体をなすのが特殊に分化した細胞系列である栄養膜細胞である。栄養膜細胞の分化にかかわる分子機構はその一端が明らかになったのみで未知の部分が多い。我々は自身が樹立したラットの栄養膜細胞株の in-vitro 分化モデルにおいてマイクロアレイを行った (Asanoma et al., 2011)。全ゲノム規模の遺伝子発現プロファイルにおいて未分化細胞特異的に発現している遺伝子として Satb1 を同定した。Satb1 のサブファミリーである Satb2 についても我々の解析により未分化な栄養膜細胞に特異的に発現していることが分かった。この発現形式はラットだけでなくマウスでも同様であった。Satb1 は Tリンパ球の分化に関わり、Satb2 は骨芽細胞の分化を司ることが知られていたが胎盤や栄養膜細胞の分化に関わる働きについては知見がなかった。

### 2. 研究の目的

栄養膜細胞において未分化細胞特異的に発現している Satb1、Satb2 が栄養膜細胞の分化に果たしている機能を明らかにする。また Satb1、Satb2 が標的とする分子経路を明らかにする。さらにゲノム規模の探索を含めた分子生物学的手法を用いることにより栄養膜細胞の分化機構を総括的に理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Satb1、Satb2 の機能解析:ラット栄養膜幹細胞株にレンチウイルスベクターを用いて Satb1、Satb2 をノックダウンさせた。また、逆にアデノウイルスベクターを用いて栄養膜幹細胞に Satb1、Satb2 を過剰発現させた。細胞の表現型は mRNA レベル、タンパクレベルでの分化マーカー遺伝子の発現解析と Flow Cytometry を用いた DNA の倍加の評価。

(2) Satb1、Satb2 の標的遺伝子の同定、解析:ラット栄養膜幹細胞中で Satb1、Satb2 の遺伝子発現を操作した際に生じるマーカー遺伝子の発現変化から標的遺伝子候補を絞った。それらの遺伝子のプロモーター領域を解析し、Satb1、Satb2 の結合配列を持つものを抽出した。抽出された候補標的遺伝子のプロモーター領域をもつレポーターを作成し、Satb1、Satb2 の過剰発現とノックダウンがレポーター活性及ぼす影響を調べた。また、Satb1、Satb2 の結合候補領域を用いてゲルシフト解析、クロマチン免疫沈降解析を行った。

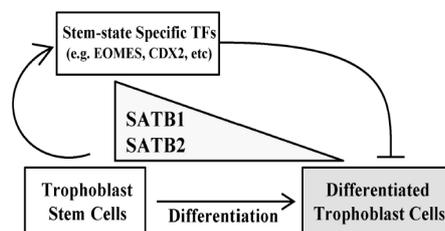
(3) 全ゲノム規模の Satb1、Satb2 標的遺伝子の解析: hemagglutinin (HA) でタグした Satb1、Satb2 をマウスの栄養膜幹細胞に強制発現させ、抗 HA 抗体でクロマチン免疫沈降を行い、次世代シーケンサーによる解析を試みた。

### 4. 研究成果

(1) Satb1、Satb2 の機能解析:ラットの栄養膜幹細胞株、マウスの栄養膜幹細胞株を用いて Satb1、Satb2 の発現をノックダウンしたところい

れの細胞株も未分化条件で培養しているにもかかわらず、細胞増殖が抑制され自発的に栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜細胞、栄養膜迷路細胞、グリコーゲン細胞の各細胞系列に分化した。また、ラットの栄養膜細胞株 Rcho - 1 に Satb1、Satb2 を強制発現させたところ分化誘導に対して抵抗性を示して未分化状態を維持し、高い細胞増殖能が保たれた。

(2) Satb1、Satb2 の標的遺伝子の同定、解析: 栄養膜細胞中で Satb1、Satb2 の発現を操作させることで発現が変化した分化マーカーの中で栄養膜幹細胞の未分化維持を司る中心的な遺伝子に注目することとした。すなわち Cdx2、Eomes、Id2、Gata3、Ascl2 にまず注目した。Satb1、Satb2 の強制発現により Cdx2、Eomes、Id2、Ascl2 の発現が上がり、Gata3 の発現が抑制された。Satb1、Satb2 のノックダウンではこれと逆の変化が生じた。まず Cdx2 のプロモーター領域を調べたところ Satb1、Satb2 の結合配列 (SBS) は存在しなかった。そこで次に Eomes に注目した。Eomes は Satb1、Satb2 の発現操作によって発現が特に大きく動く遺伝子であった。Eomes のプロモーター領域には SBS が存在し、Eomes のレポーターを作成して Satb1、Satb2 を強制発現させたところレポーター活性が上がり、ノックダウンしたところ、活性が下がった。SBS に変異を入れたレポーターを用いたところ、Satb1、Satb2 の発現操作による活性変化が消失した。Eomes の SBS を用いてゲルシフト解析を用いたところ、タンパクとの複合体を形成し、Satb1、Satb2 に対する抗体を添加するといずれもスーパーシフトを認めた。また HA タグした Satb1、Satb2 をラット栄養膜細胞に強制発現させ、抗 HA 抗体でクロマチン免疫沈降したところ Eomes の SBS が共沈降した。以上の結果により Satb1、Satb2 は栄養膜幹細胞の維持に中心的な役割をもつ Eomes の発現を上げることにより栄養膜幹細胞の未分化維持に寄与していることが分かった。この発現調節は Satb1、Satb2 が Eomes のプロモーター領域に存在する SBS にヘテロ二量体として直接結合することで転写活性化させることであることが判明した。以上の結果を論文として発表した (Asanoma et al., 2012)。



(Asanoma et al., J Biol Chem 2012 より)

また、Id2、Gata3 のプロモーター領域にも SBS が存在し、レポーターを作成して解析したところ、Satb1、Satb2 の制御を受けることが分かり、また、ゲルシフト解析を行ったところこれらの SBS との直接的な結合を認める

結果であった。つまり、Satb1、Satb2 は Eomes 以外にも Id2、Gata3 などの分化調節因子の発現に関与することが分かった。

(3) 全ゲノム規模の標的遺伝子解析：以前の報告によると Satb1、Satb2 は T 細胞において多数の遺伝子を同時に転写制御することが報告されている。栄養膜細胞においても同様に Satb1、Satb2 が複数の遺伝子を同時に転写調節することが考えられる。Satb1、Satb2 が転写調節する遺伝子を全ゲノム規模で解析することにした。我々は当初、栄養膜幹細胞モデルとして従来汎用されていた Rcho-1 細胞を主に用いていたが Rcho-1 細胞は絨毛癌由来であることから、分化機構がより明らかなマウス栄養膜幹細胞 (mTSC) を用いることとした。Hemagglutinin (HA) でタグした Satb1、Satb2 をアデノウイルスにて mTSC に遺伝子導入し、核抽出物から抗 HA 抗体を用いて Satb-DNA 複合体の免疫沈降を試みた。しかし、mTSC を用いたクロマチン免疫沈降の段階で十分な精度の検体が得られず、この方向での解析は頓挫した。

(4) 子宮体癌における Satb の発現・機能解析：次に当初の目標には表していなかったが子宮体癌における Satb の発現機能解析を開始した。正常子宮内膜と比して癌組織においては Satb1/2 のいずれの発現も上昇していた。子宮体癌細胞株についても、大部分の細胞株において Satb1/2 の豊富な発現を認めた。まず、Satb1/2 の発現を Ishikawa、HEC1A の細胞株においてノックダウンしたところいずれにおいても細胞増殖の低下を認めた。今後、転移、浸潤能を中心に機能解析を進めていく予定である。

(5) 転写因子 NF1C によるダイオキシン受容体 (AHR) の転写調節機構が子宮体癌の増殖・浸潤を制御する：AHR は癌の進展を促進することが報告されていたが、AHR の発現調節機構については不明であった。我々は転写因子 NF1C が一塩基多型依存的に AHR の転写を制御し、子宮体癌の浸潤能を制御することを見出した (Li et al., 2013)。当研究代表者が実験の中心的な働きを担い、corresponding author を務めた。

## 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6件)

Konno T, Rempel LA, Rumi MA, Graham AR, Asanoma K, Renaud SJ, Soares MJ, Chromosome-substituted rat strains provide insights into the genetics of placentation. *Physiological Genomics*, 43, 930-941, 2011.

Takao T, Asanoma K, Kato K, Fukushima K,

Tsunematsu R, Hirakawa T, Matsumura S, Seki H, Takeda S, Wake N, Isolation and characterization of human trophoblast side-population (SP) cells in primary villous cytotrophoblasts and HTR-8/SVneo cell line. *PLoSOne*, 6, e21990, 2011.

Asanoma K, Kubota K, Chakraborty D, Renaud SJ, Wake N, Fukushima K, Soares MJ, Rumi MA., SATB homeobox proteins regulate trophoblast stem cell renewal and differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 2257-2268, 2012.

Li D, Takao T, Tsunematsu R, Morokuma S, Fukushima K, Kobayashi H, Saito T, Furue M, Wake N, Asanoma K, Inhibition of AHR transcription by NF1C is affected by a single nucleotide polymorphism, and is involved in suppression of human uterine endometrial cancer. *Oncogene*, 32, 4950-4959, 2013.

Takao T, Asanoma K, Tsunematsu R, Kato K, Wake N, The maternally expressed gene Tssc3 regulates the expression of MASH2 transcription factor in mouse trophoblast stem cells through the AKT-Sp1 signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 42685-42694, 2012.

Wake N, Takao T, Asanoma K, Kato H. Establishment of a new diagnostic method for hydropic villi by using TSSC3 antibody. *Journal of Obstetric and Gynaecology Res.*, 39, 1230-1235, 2013.

[学会発表](計6件)

Asanoma Kazuo, Wake Noio, Establishment of trophoblast cell lines from rat blastocysts possessing the capacity to differentiate into multiple trophoblast cell lineage, 63th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology, 2011.08.29.

浅野間和夫、福嶋恒太郎、和氣徳夫、マウス栄養膜細胞の分化を制御する新たな分子、核マトリックス関連分子 Satb1、Satb2 の解析、日本産科婦人科学会第64回学術講演会、2012.04.15.

Kazuo Asanoma, Kaiyu Kubota, Damayanti Chakraborty, Stephen J. Renaud, Norio Wake, Kotaro Fukushima, Michael J. Soares, M. A. Karim Rumi, Regulation of trophoblast differentiation by nuclear matrix associated gene, Satb1 and Satb2, International Federation of Placenta Association Meeting 2012, 2012.09.18.

浅野間和夫、恒松良祐、諸隈誠一、福嶋恒太郎、小林裕明、齋藤俊章、加藤聖子、和氣徳夫、転写因子 NF1C は一塩基多型依存的にダイオキシン受容体の転写を抑制し、子宮内膜癌の増殖・浸潤

を制御する,第65回日本産婦人科学会学術講演会,2013.05.10.

浅野間 和夫,高尾 知佳,恒松 良祐,諸隈 誠一,福嶋恒太郎,小林 裕明,齋藤俊章,加藤 聖子,和氣徳夫,ダイオキシン受容体は一塩基多型依存的に転写制御され、子宮体癌の増殖・浸潤に関わる,第12回に本婦人科がん分子標的研究会学術集会,2013.07.06.

浅野間 和夫,高尾 知佳,恒松 良祐,諸隈 誠一,福嶋恒太郎,小林 裕明,齋藤俊章,加藤 聖子,和氣徳夫,ダイオキシン受容体は一塩基多型依存的に転写制御され、子宮体癌の増殖・浸潤に関わる,第54回日本婦人科腫瘍学会学術講演会,2013.07.19.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野間和夫 (ASANOMA Kazuo)  
九州大学病院・産科婦人科・助教  
研究者番号：30380413

### (2) 研究分担者

福嶋恒太郎 (FUKUSHIMA Kotaro)  
九州大学病院・産科婦人科・講師  
研究者番号：40304779

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：