

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659768

研究課題名（和文） 胚体外細胞系列への細胞運命決定機構とヒト胎盤由来幹細胞の樹立

研究課題名（英文） The cell determination to extraembryonic tissue and the human placental stem cell.

研究代表者

有馬 隆博 (ARIMA TAKAHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80253532

研究成果の概要（和文）：胎盤は受精後、胚体細胞系列と胚体外細胞系列に最初の分化が起こる組織である。胎盤組織へと分化する栄養外胚葉は、胚盤胞期に Cdx2 の発現亢進と Oct3/4 の発現低下により、胚体組織より分化し、細胞運命が決定する。本研究では、トロホブラスト幹細胞（TS 細胞）を用い、Cdx2 の発現調節する分子機構として、DNA メチル化及びヒストン修飾に着目した。その結果、TS 細胞への分化にはエピジェネティックな分子機構が作用する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The first cell differentiation in the mammalian development separates the trophoblast and embryonic cell lineages, resulting in the formation of the trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) in blastocysts. Cdx2 gene expressed strongly in TE and Oct3/4 expressed in ICR. In this study, we determined the epigenetic mechanism of Cdx2 gene expression using trophoblastic stem cell (TS cell).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

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：ヒト胎盤幹細胞、エピジェネティクス、細胞分化、ゲノムインプリンティング

1. 研究開始当初の背景

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あり、受精後、胚盤胞では、胚体細胞系列（内部細胞塊：ICM）と胚体外細胞系列（栄養外胚葉：TE）に最初の分化（細胞運命決定）が起こる。両者は、同じゲノム配列を持つにも関わらず、全く異なる細胞系譜を辿る。これには、エピジェネティックな修飾機構の存在が予想される。前者の未分化幹細胞は胎児性幹細胞（ES 細胞）、後者はトロホブラスト幹細胞（TS 細胞）として知られている。ES 細胞、TS 細胞の未分化維持と細胞運命決定には、それぞれ Oct3/4 と Cdx2 が

必須の蛋白として知られている (Rossant. Nature Review. 2007)。また、ES 細胞に Cdx2 を過剰発現させると、TS 様細胞に変換することも報告され、両者の発現量比で、分化の方向性が決定しているという仮説がたてられている (Niwa. Cell. 2005)。しかし、どのような分子機構で、遺伝子発現が制御されているのかは未だ明らかではない。

2. 研究の目的

TS 細胞は、均一な細胞集団で未分化な状態を継代維持でき、ある条件下で容易に分化させることが可能な細胞である。つまり、TS 細胞は、形態的变化を確認しながら、in vivo では解析できない分子機構や分子間相互作用

用の解析も可能な細胞である。本研究では、TS 細胞を用い、Cdx2 遺伝子のエピジェネティックな分子機構と分子間相互作用について解析する。また、ヒト TS 細胞株を樹立することを目的とする。そのため、

- (1) TE 分化への Cdx2 遺伝子の分子機構の解明：TS 細胞と ES 細胞を用いて Cdx2 遺伝子のエピジェネティックな修飾（DNA メチル化とヒストン修飾）について解析し、組織特異的な発現調節について明らかにする。
- (2) TS 細胞における Cdx2 遺伝子と Oct3/4 の分子間相互作用：一過性および永続性に、遺伝子発現を抑制する Cdx2 遺伝子のノックダウン TS 細胞と Oct3/4 遺伝子強制発現 TS 細胞株を樹立し、細胞特性や未分化 TS マーカー遺伝子に与える影響について分子間相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 胚体外細胞系列分化への Cdx2 遺伝子の分子機構の解明：

①TS 細胞と ES 細胞の Cdx2 発現量の解析：C57/B6, ICR 系マウスより樹立した TS 細胞と ES 細胞より、RNA 抽出した。cDNA 合成後、リアルタイム PCR 法を用いて、Cdx2 遺伝子の発現量を解析した。

②Cdx2 遺伝子のエピゲノム解析：

Cdx2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾について解析した。TS 細胞と ES 細胞の Cdx2 遺伝子発現量との相関を調べた。

DNA メチル化の解析：細胞から抽出した DNA は Bisulphite 処理後 PCR を行い (Bisulphite-PCR 法)、クローニングベクターを用いシークエンスした。少なくとも 10 個のクローンについて解析し、PCR 領域内の全てのメチル化部位について解析した。

ヒストン修飾の解析：同細胞核より蛋白質-DNA 複合体を抽出する。超音波ソニケーターで粉碎後、活性型修飾の解析には、抗ヒストン H3-K (リジン) 9 と H3-K14 のアセチル化および抗 H3-K4 のジメチル化抗体を利用した。一方、不活化型には抗ヒストン H3-K9 ジメチル化および抗 H3-K27 のトリメチル化抗体を利用した。それぞれ免疫沈降後、PCR によりヒストン修飾の有無について解析した。

(2) TS 細胞における Cdx2 遺伝子の機能解析と分子間相互作用：

①siRNA 強制発現用ベクターの作製と細胞の樹立：Cdx2 遺伝子のノックダウン用の siRNA を複数設計した。強制発現用ベクター (pcDNA) にクローニングし、TS 細胞に

トランスフェクションした。Cdx2 蛋白の減弱 (消失) はウェスタンブロッティングによって確認した。ノックダウン効率は、リアルタイム PCR によって測定し、抑制効果に差を認める細胞株を、以下の実験に用いた。

②Cdx2 ノックダウン TS 細胞株の形態学的変化と細胞増殖能の解析：Cdx2 ノックダウン TS 細胞株の細胞形態とコロニー形成能を測定した。細胞周期分布はフローサイトメトリー (FACS) で解析し、正常 (WT) の TS 細胞と比較した。

③Cdx2 ノックダウン TS 細胞株における分子間相互作用：Cdx2 遺伝子の永続性ノックダウン TS 細胞株を樹立し、RNA を抽出した。TS 特異的未分化遺伝子マーカー (Eomes, Id2, ErrB) と ES 特異的マーカー (Oct3/4) の遺伝子発現量を比較した。また、ノックダウン TS 細胞株を分化誘導し、TS 特異的分化遺伝子マーカー (4311, mash2, P1-1) の発現量の比較と巨細胞の出現の有無を確認した。

(3) TS 細胞における Oct3/4 遺伝子と Cdx2 遺伝子の分子間相互作用：

①Oct3/4 強制発現用ベクターの作製と TS 細胞への遺伝子導入：Oct3/4 遺伝子 cDNA を RT-PCR で合成し、強制発現用ベクター (pcDNA) にクローニングした。Electroporation 法を用い、TS 細胞株にトランスフェクションし、強制発現細胞株を樹立した。Oct3/4 蛋白の発現はウェスタンブロッティングによって確認した。

②Oct3/4 強制発現 TS 細胞株の細胞特性：Oct3/4 強制発現 TS 細胞株の細胞形態変化とコロニー形成能の解析をした。また、TS 特異的未分化遺伝子マーカー (Eomes, Id2, ErrB) の発現量を解析した。

③Cdx2 遺伝子の発現およびエピゲノム解析：同様に、複数の Oct3/4 強制発現 TS 細胞株を用い、Cdx2 遺伝子の発現およびエピゲノム解析、DNA メチル化とヒストン修飾を行なった。また、この TS 細胞株は分化誘導し、細胞形態、巨細胞の出現の有無と TS 特異的分化遺伝子マーカー (4311, mash2, P1-1) の発現量の比較を行なった。

4. 研究成果

(1) 胚体外細胞系列分化への Cdx2 遺伝子の分子機構の解明について

まず、均一な細胞集団で未分化な TS 細胞を用いて、Cdx2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾について解析を行なった。DNA メチル化の解析は

Bisulphite-PCR法を用いて解析し、PCR領域内の全てのメチル化部位について解析した。ヒストン修飾の解析では、同細胞核より蛋白質-DNA複合体を抽出。超音波ソニケーターで粉碎後、活性型修飾の解析には、抗ヒストンH3-K(リジン)9とH3-K14のアセチル化および抗H3-K4のジメチル化抗体を利用。一方、不活化型には抗ヒストンH3-K9ジメチル化および抗H3-K27のトリメチル化抗体を利用。それぞれ免疫沈降後、PCRによりヒストン修飾の有無についてPCR解析した。その結果、Cdx2遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化を解析したところ、低メチル化状態でヒストン修飾も活性型で有為な変化を認めた。反対に胎児性幹細胞(ES)では、高メチル化状態とヒストンの不活化を維持していた。この結果はメチル化阻害剤やヒストン阻害剤を添加して、再確認した。この結果より、ESとTSの分化過程には、Cdx2遺伝子のエピジェネティックな分子機構が作用する事が示唆された。

(2) TS細胞におけるCdx2遺伝子の機能解析と分子間相互作用について

一過性に遺伝子発現を抑制するCdx2遺伝子のノックダウンTS細胞(3株)を用いて、未分化TSマーカー遺伝子(ErrB, Eomes)の発現解析を行なった。その結果、いずれも発現量は20%以下に減少した。両遺伝子のプロモーター領域について、メチル化の解析を行ったところ、TS細胞に比べ高メチル化状態を示した(平均値:78.2%)。ノックダウン効率は約40%であったが、細胞形態に大きな変化はみられなかった。次に、永続性に遺伝子発現を抑制するCdx2遺伝子のノックダウンTS細胞株(3株)を樹立した。2種類の未分化TSマーカー遺伝子の発現量は減弱し、ヒストン修飾も活性型(抗ヒストンH3-K(リジン)9とH3-K14のアセチル化および抗H3-K4のジメチル化抗体)で有為な変化を認めた。一方、非活性型ヒストン修飾には、ほとんど変化はみられなかった。

(3) TS細胞におけるOct3/4遺伝子とCdx2遺伝子の分子間相互作用について

Oct3/4遺伝子強制発現TS細胞株(2株)でも同様な傾向、つまり未分化TSマーカー遺伝子の発現量の減弱、ヒストン修飾も活性型(抗ヒストンH3-K(リジン)9とH3-K14のアセチル化および抗H3-K4のジメチル化抗体)で有為な変化を認め、非活性型ヒストン修飾には、ほとんど変化はみられなかった。

これらの結果より、TSの分化過程には、Cdx2遺伝子のエピジェネティックな分子機構を介した遺伝子発現が作用する事が示唆された。また、ヒト胎盤幹細胞の分離は既に

行っている。Cdx2遺伝子の発現の維持は、細胞の樹立や継代に必須の現象であると予想され、今後ヒト細胞を用い、検証が必要である。

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)

[雑誌論文](計13件)

1. Hiura H, Okae H, Miyachi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. **Human Reproduction** 27 (8), 2541-2548, 2012. 10.1093/humrep/des197 査読有
2. Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyachi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T. High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics**. 5, 8-17, 2012. 10.1186/1755-8794-5-8 査読有
3. Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, Arima T, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. **Cell and Tissue**. 347, 457-465, 2012. 10.1007/s00441-011-1307-2 査読有
4. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. **Hum Mol Genet**. 10 (3), 548-558, 2012. 10.1093/hmg/ddr488 査読有
5. 有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明 Japanese Journal of Reproductive Endocrinology 「生殖補助医療由来の先天性ゲノムインプリンティング異常症」日本生殖内分泌学会雑誌 17, 54-58, 2012. jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201202294903513781 査読無
6. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori T, Nakazono T, Arima T, Makino N. The physical ability of elderly female Japanese patients with cerebrovascular disease correlates with the telomere length in their

- peripheral blood leukocytes. **Aging Clinical and Experimental Research**. 57, 137-143, 2011. 10.1159/000314633 査読有
7. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Arima T, Makino N. The correlation between the clinical laboratory data and the telomere length in peripheral blood leukocytes of Japanese female patients with hypertension. **The Journal of Nutrition, Health and Aging (JNHA)**. 15, 240-244, 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21369674> 査読有
 8. Maeda T, Oyama J, Higuchi Y, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori Y, Nakazono T, Arima T, Mimori K, Makino N. The physical ability of Japanese female elderly with cerebrovascular disease correlates to the telomere length and subtelomeric methylation status in their peripheral blood leukocytes. **Gerontology**. 57, 137-143, 2011. 10.1159/000314633 査読有
 9. Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, Arima T. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis. **Fertil and Steril**. 95, 129-134, 2011. 10.1016/j.fertnstert.2010.06.076 査読有
 10. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P. J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyanagi K, Soloway P. D. & Sasaki H. Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. **Science**. 332, 848-852, 2011. 10.1126/science.1203919 査読有
 11. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 宮内尚子, 佐藤美美 ゲノムインプリンティングと発がん 癌と化学療法. 癌と化学療法社 1745-1749, 2011. <http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/38110/1745> 査読無
 12. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子 母子の健康と環境影響 助産雑誌 医学書院 62, 11, 2011. http://www.medbook.jp/eshopdo/refer/refer.php?sid=ns13533&cid=37&scid=211&mcid=&me=&vmode=&view_id=665-65-11&PHPSESSID=95fa583906e9fda3b226b39bc36e7518 査読無
 13. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 阿部千鶴, 林千賀 ARTにおけるエピジェネティクス異常 産婦人科の実際 金原出版株式会社 741-750, 2011. <http://search.jamas.or.jp/link/ui/201191627> 査読無
- [学会発表] (計4件)
1. 有馬隆博, 乏精子症とゲノムインプリンティング、日本生殖再生医学会・第8回学術集会、2013年3月10日、東京
 2. 有馬隆博, 生殖医療とエピジェネティクス、日本不妊カウンセリング学会・第11回学術集会、2012年6月8日、東京
 3. 有馬隆博, ARTにおけるエピジェネティクス機構、日本生殖再生医学会・第7回学術集会、2012年3月25日、東京
 4. Arima T, ART and Epigenetic Errors - Abnormal DNA methylation in imprinting disorders after ART, The International Ovarian Conference 2012, 17 MAR 2012, Tokyo, Japan.
- [図書] (計3件)
1. 千葉初音, 岡江寛明, 有馬隆博, 株式会社メディカルドゥ、遺伝子医学MOOK25号、印刷中 2013.
 2. Arima T, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. INTECH. DNA METHYLATION. 29: 183-192, 2012
 3. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 京都大学学術出版会、卵子学 122-131, 2011.
- [産業財産権]
- 出願状況 (計1件)
- 名称: ヒト精子の質的機能評価システムに応用するDNAメチル化解析システムの開発
 発明者: 有馬 隆博
 権利者: 東北大学
 種類: 特許
 番号: P20110420 PCT出願
 出願年月日: 2012年5月16日
 国内外の別: 外国
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者

有馬 隆博 (ARIMA TAKAHIRO)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 80253532

(2) 研究分担者

樋浦 仁 (HIURA HITOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70451523

岡江 寛明 (OKAE HIROAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10582695