

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659738

研究課題名(和文) 栄養膜におけるクロマチン転写制御機構に着目した胎盤絨毛形成・妊娠維持機構の解明

研究課題名(英文) The chromatin transcriptional control mechanism in the villus trophoblast which aimed to elucidate system of villus formation and maintaining pregnant status

研究代表者

石川 源 (Ishikawa, Gen)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20287767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤の栄養膜の機能について、融合・多核化(シンシチウム化)した合体体栄養膜の機能には未解明な点が多く残されている。

本研究はシンシチウム化した核に転写活性があるか否かを見極め転写制御機構の一端を明らかにし絨毛形成や妊娠維持機構の解明に結びつけることを目的とした。結果、満期胎盤の終末絨毛を固定し蛍光免疫染色を行い、クロマチン活性を示唆する染色像を得た。絨毛癌細胞株BeWoをフォルスコリン添加して培養し細胞融合を惹起。実験的シンシチウム化モデルとして蛍光免疫染色を行い融合した核にクロマチン活性を示唆する染色像を得た。更にメチル化阻害剤5aza-dCを添加しシンシチウム化について形態的变化を観察した。

研究成果の概要(英文)：The function and molecular mechanism of syncytiotrophoblast which shows fused multi-nuclear structure configuring apical layer of feto-maternal blood barrier has not fully been solved.

This study aimed to clarify whether syncytiotrophoblast which shows fused and multi-nuclear unique structure has transcriptional activity or not. And aimed to elucidate some part of transcriptional control of syncytiotrophoblast to develop understanding of mechanism of trophoblast formation and maintaining pregnant state.

As results, morphological findings which suggest chromatin activity were obtained in the terminal villous nuclei after immunohistochemistry. BeWo cells were cultured with forskolin to induce cell fusion. Morphological findings which suggest chromatin activity were obtained in the fused BeWo cells' nuclei after fluorescent. Additionally, morphological changes were observed under the condition of culture with 5aza-deoxycytidine.

研究分野：産科学

キーワード：胎盤 トロホプラスト クロマチン制御

## 1. 研究開始当初の背景

はじめに：胎盤の栄養膜は、融合・多核化(シンシチウム化)し、合胞体栄養膜となって母体胎児間血液関門を構成しています。栄養膜が有する機能の一部は解明されていますが、未分化な栄養膜細胞が分化して融合・多核化するシンシチウム化の過程には、なお未解明の部分が多く残されています。

ヒト胎盤では、絨毛組織の外層を構成する栄養膜が絨毛間腔を介して母体血液と接し、妊娠維持や胎児発育に機能します。栄養膜の最外層を構成するのは多核化し、合胞体細胞塊構造を有するシンシチオトロフォブラストであり、その下層にあるサイトトロフォブラスト同士が細胞融合することによって形成されるとされています。この現象はシンシチウム化と言われ、独特の多核化と細胞融合の過程は、生体内においては、類似の現象が筋原線維や骨芽細胞などで見られるのみです。

多核化したシンシチオトロフォブラストにおいて、核に転写機能が維持されているか否か。この命題に対し論争が続いてきました。

本研究代表者の石川源は、これまでヒト胎盤絨毛組織、特に栄養膜の構造と機能の解明に注目して研究を行って来ました。これまでの研究の過程で、正期分娩したヒト胎盤シンシチオトロフォブラストにおいて、細胞小器官が強く発現していることを免疫染色によって見出しています。このようにヒト胎盤から得た絨毛組織において、サイトトロフォブラストや胎児血管内皮細胞には見出せないような細胞小器官の強い発現が、シンシチオトロフォブラストにおいて特異的に認められることは、上述した論争においても、シンシチオトロフォブラストの核・クロマチンに転写活性があることを強く示唆するものです。以上のような石川のプレリミナリーな実験結果が本研究課題の背景となりました。

## 2. 研究の目的

本研究では「シンシチウム化した核に転写活性があるか否か」という命題についてそれを見極め、シンシチウム化した栄養膜の核・クロマチンの転写活性について、転写制御機構の一端を明らかにし、胎盤の絨毛形成や妊娠維持機構の解明に結びつけることを目的としました。

## 3. 研究の方法

機関内倫理委員会による承認のもと、以下の方法で実験を行いました。

(1)正常妊娠の正期予定帝王切開娩出胎盤を検体として用い、終末絨毛を選択的に切離後、4%パラホルムアルデヒドにより固定。0.2% Triton-X 100, 0.5% Borohydride にて permeabilization 処理し、2%カゼインにて非特異反応をブロック。一次抗体として抗 RNA Polymerase II 抗体 (mouse,

monoclonal, COVANCE)抗 DNMT1 抗体 (rabbit, polyclonal, abcam)を用い、クロマチン活性の指標としました。二次抗体には、各動物種に合わせて Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 594 を用い、蛍光免疫染色を行いました。

(2)絨毛癌細胞株 BeWo (細胞番号 JCRB9111. JCRB 細胞バンク)を用い、DMEM/F-12 + 10%FBS にて、6穴プレートにカバーガラスを設置し、各ウェル内に BeWo 細胞を ( $5 \times 10^4$  cells/mL の濃度で)播種し、培養しました。セミコンフルエントとなった段階で、培養液にフォルスコリン 20  $\mu$ M 添加し、24, 48, 72, 96 時間後にカバーガラスを回収し、4%パラホルムアルデヒドで固定。(1)の方法と同様に、蛍光免疫染色を行いました。

(3)絨毛癌細胞株 BeWo (細胞番号 JCRB9111. JCRB 細胞バンク)を(2)に準じて6穴プレートにカバーガラスを設置し、各ウェル内に BeWo 細胞を ( $5 \times 10^4$  cells/mL の濃度で)播種し、培養しました。クロマチン活性とメチル化阻害との関連を調べるため、メチル化阻害剤である 5aza-deoxycytidine を添加することとし、以下のように実験を行いました。セミコンフルエントとなった段階で、培養液にフォルスコリン 20  $\mu$ M 添加群、フォルスコリン 20  $\mu$ M + 5aza-deoxycytidine 添加群に分け、24, 48, 72, 96 時間後にわたりシンシチウム化について形態的变化を観察しました。

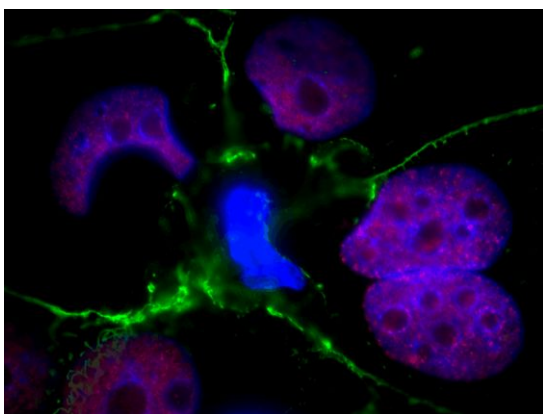
(4)正常妊娠の正期予定帝王切開娩出胎盤を検体として用い、採取した胎盤組織を直ちに洗浄後細切し、0.25%トリプシン (Sigma-Aldrich)および0.25%コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich)液で37 20分間穏やかに震盪。得られた細胞懸濁液を濾過後、遠心分離 (300g  $\times$  10分)し、再懸濁しました。この懸濁液をパーコール重層液上に積層し遠心分離 (2800g  $\times$  25分)し、栄養膜細胞層を回収しました。回収した栄養膜細胞を DMEM/F-12 + 15%FBS にて培養し、初代培養モデルとしました。セミコンフルエントとなった段階で、5aza-deoxycytidine 添加群と非添加群に分けてメディウム交換を行い、24, 48, 72 時間後にわたり、シンシチウム化について、形態的变化を観察しました。

## 4. 研究成果

(1)正期胎盤終末絨毛の蛍光免疫染色では、合胞体栄養膜の核において、抗 RNA Polymerase II 抗体、抗 DNMT1 抗体ともに染色性が認められました。しかし、細胞性栄養膜に比して染色性は弱く、核により染色性は異なっていました。固定や permeabilization 処理のプロセスを変えましたが、これらによる効果は一定ではありませんでした。染色性に一定の法則は認められませんでした。以上から、正期胎盤終末絨毛において、合胞体栄養膜にクロマチン活性を示唆する抗体の染

色性が認められましたが、核の染色性のみでは無く、機能解析的アプローチが求められるものとして課題が残されました。

(2) 絨毛癌細胞株 BeWo を用いた実験的検証では、フォルスコリン添加により細胞融合が惹起され、いずれの核においても、抗 RNA Polymerase II 抗体、抗 DNMT1 抗体ともに染色性が認められました(図 1)。細胞融合は、フォルスコリン添加後、継時的に強く示され、過去の細胞小器官に関する観察では、24 時間後より 48 時間や 72 時間で強い変化を示しましたが、今回検討した抗体について、継時的な変動は明らかとはなりませんでした。

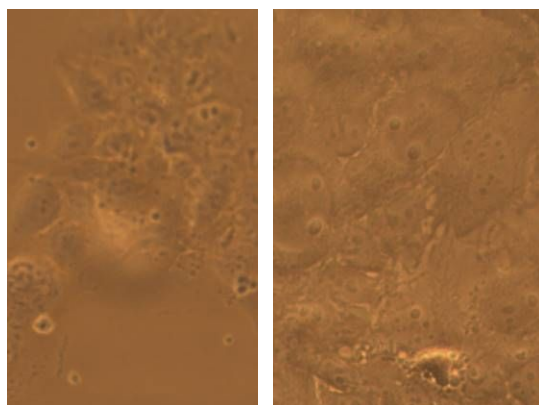


【図 1】フォルスコリン添加 72 時間の BeWo の蛍光免疫染色像(一次抗体: 抗 DNMT1 抗体)を示す。画面右側に細胞隔壁を失い、細胞融合して核が隣接していることがわかる。赤: 抗 DNMT1 抗体, 緑: 抗 E-cadherin 抗体, 青: DAPI。隔壁を失い隣接した核において、ともに抗 DNMT1 抗体の染色性が認められた。

(3) 絨毛癌細胞株 BeWo に対し、フォルスコリンによる細胞融合惹起しメチル化阻害を加えた実験的検証では、プレリミナリーな実験成果では、 $5\mu\text{M}$  の 5aza-deoxycytidine 添加により、BeWo の有意な長期培養(延命)が認められていましたが、本研究課題開始当初、BeWo の増殖が安定しなかったため、5aza-deoxycytidine 添加条件を変えて至適濃度を再検討しました。すなわち、5aza-deoxycytidine を  $0.1\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$ ,  $2.5\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $25\mu\text{M}$  の 6 種類の濃度条件を設定し、繰り返し培養を行いました。結果として、増殖を阻害しない上限の濃度として、改めて  $5\mu\text{M}$  を見出し、細胞傷害性が低く安定して増殖し、かつメチル化阻害作用によりシンシチウム化への影響を及ぼす条件で実験的検証を行うために添加培養実験を繰り返し行いました。予想外の結果として、5aza-deoxycytidine 添加環境下、時間経過とともに、細胞がカバーガラスから遊離してしまい、(2)で示したような、フォルスコリン添加環境下 72 時間において、メチル化阻害がシンシチウム化に及ぼす影響を検証することは困難でした。対策として、カバーガラ

スにシラン、ポリリジン等のコーティング処理を試み、剥離防止を試みました。ポリリジンコートが最も剥離防止効果を示すことを確認し得ましたが、本研究期間はこの時点で終了となりました。

(4) 正期胎盤終末絨毛の初代培養にメチル化阻害を加えた実験的検証では、初代培養による栄養膜細胞の自発的な融合が活発に認められ、繰り返し実験を行いました。メチル化阻害の効果を経形的に捉えることは難しく(図 2)、その後、培養細胞を溶解回収し、immunoblotting によりタンパク発現を解析する手法に切り替えました。メチル化阻害による初代培養株における syncytin の発現を解析することとし、RIPA バッファー(WAKO)による細胞の溶解回収を進めた段階で、本研究期間が終了となりました。



【図 2】正期胎盤終末絨毛の初代培養像。左: 対照(メチル化阻害非添加)。播種後 96 時間。右: メチル化阻害(5aza-deoxycytidine 添加  $5\mu\text{M}$ )。播種後 96 時間・添加後 24 時間。初代培養では、フォルスコリン添加無しに自発的な細胞融合が起こっており、メチル化阻害剤添加の有無によっても経形的比較は困難だった。

#### <まとめ>

帝王切開娩出胎盤による終末絨毛の免疫染色や、絨毛癌細胞株 BeWo によるフォルスコリン誘導性 cAMP 依存性の細胞融合(実験的シンシチウム化)において、クロマチン制御に働くタンパクに対する抗体で染色性が得られ、本研究の当初の命題であった「シンシチウム化した核に転写活性があるか否か」について、免疫染色から活性が示唆されました。手法として、Immunoblotting や、DNA メチル化解析を用いなかったのは、局在を明らかにしたいためでしたが、一定の法則性は得られませんでした。5aza-deoxycytidine 添加によるメチル化阻害を試みましたが、行った実験系では、シンシチウム化に及ぼすメチル化または脱メチル化の影響は明らかにできませんでした。今後、Immunoblotting や、HELMET 法などを用い、明らかにできるかどうか、新たな課題が見えてきました。

## 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 3件)

瀧澤 俊広, 吉武 洋, 石川 源, 竹下 俊行, 松原 茂樹, 胎盤の構造と機能【胎盤生理から病態へ】産婦人科の実際 62巻8号 pp. 1025-1031,

石川 源, 胎盤栄養膜細胞の合胞体化時の細胞内小器官の調節に関する機能形態学的解析(Functional Morphology on Modulation of Cell Organelle at Syncytialization of Placental Trophoblast), 日本医科大学医学会雑誌 8巻4号 pp. 313-314,

石川 源, 妊娠高血圧症候群胎盤において発現変動を認める microRNA の診断マーカーとしての可能性の検討、およびその胎盤における機能解明, 日本妊娠高血圧学会雑誌 20巻 pp. 60-61

〔学会発表〕(計 3件)

IFPA 2012 Hiroshima Meeting (第18回国際胎盤学会), Hiroshima, Japan.

2013年9月19日

Dramatic Alterations in Microtubule Nucleation in Fused BeWo Cells

Gen Ishikawa, Toshiyuki Takeshita, William Ackerman, Dale Vandre, John M. Robinson

2013 Society for Gynecologic Investigation (SGI) 60th Annual Scientific Meeting, Orlando, FL, U.S.A.

2013年3月20日

S-111 Marked Alterations in Microtubule Nucleation in Fused BeWo Cells

Gen Ishikawa, Toshiyuki Takeshita, William Ackerman, Dale Vandre, John M. Robinson

第65回 日本産科婦人科学会学術講演会

2013年5月10日, 札幌市.

ISP-7-1. Remarkable Alterations in Microtubule Nucleation in Fused BeWo Cells

Gen Ishikawa, John M. Robinson, Atsuko Ishikawa, Toshihiro Takizawa, Toshiyuki Takeshita

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 源 (ISHIKAWA Gen)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20287767

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

John Robinson (ROBINSON John)

神戸沙織 (KAMBE Saori)

倉品隆平 (KURASHINA Ryuhei)

間瀬有里 (MASE Yuri)