

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450470

研究課題名(和文) 栄養膜細胞のCdx2遺伝子発現制御に作用するインプリント遺伝子の探索

研究課題名(英文) Analysis of the imprinted genes regulating Cdx2 expression in mouse trophoblast stem cells.

研究代表者

小川 英彦(Ogawa, Hidehiko)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20339089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、雄核発生胚由来栄養膜幹細胞(ATSC細胞)におけるFgf4非依存的なCdx2発現機構を解明し、Cdx2発現制御に関わる雌雄ゲノムの役割を明らかにすることを目的とした。ATSC細胞においてFgf4非依存的にCDX2を発現する細胞を検出した結果、本来発現しないはずの巨細胞においてCDX2陽性が認められた。また、TS細胞におけるCdx2の発現にはMEK-ERK経路が関与しているが、ATSC細胞ではMEK-ERK経路のみならずMEK-ERKを介さない経路の関与が示唆された。本研究で新たに明らかとなったATSC細胞特異的特性がCdx2発現制御に関わる雌雄ゲノムの解明に向けた鍵となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the function of parental genomes for the placentation in mice, the regulation of Cdx2 expression in trophoblast stem cells derived from androgenetic embryos (ATS cells) has been examined. CDX2-positive giant cells were detected in ATS cells. Moreover, Cdx2 was expressed via MEK-ERK and non-MEK-ERK pathway. These unique characteristics in ATS cells may provide the novel information to understand the function of parental genomes for Cdx2 expression.

研究分野：動物発生工学

キーワード：胎盤形成 栄養膜幹細胞 雌雄ゲノム 発生・分化 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

胎盤は哺乳動物特有に見られる臓器であり、マウスでは迷路層栄養膜細胞、海綿状栄養膜細胞、栄養膜巨細胞からなる。胎盤は、胎子の循環系の内外へ栄養物や代謝産物を運搬するという重要な機能を担うほか、妊娠中の母体と胎子とが生理的協調性を保つために必要な多くのステロイド、ポリペプチドやプロスタグランジン等を合成している。このように、胎盤は妊娠の維持や胎子形成に不可欠であることから、胎盤の形成機構を解明することは発生学のみならず生殖医療の観点からも非常に重要である。

1983年、マウス雌核発生胚および雄核発生胚の発生能解析が行われ、その結果、胎盤形成は雌ゲノムにより抑制され雄ゲノムにより促進されることが示された (Surani et al., Science 1983)。その後、雌雄ゲノム特異的発現を示すインプリント遺伝子がヒトおよびマウスで同定され、機能解析および発現制御解析の研究が精力的に進められてきた。我々は、胎盤形成における雌雄ゲノムの機能解析を飛躍的に進展させるために、雌核発生胚および雄核発生胚から胎盤の幹細胞である栄養膜幹細胞 (TS 細胞) の樹立を試みた (「胎盤形成過程における雌雄ゲノムの役割の解明」 科研費若手研究(B) H17-18 小川 (代表))。その結果、雄核発生胚からのみ TS 細胞が樹立できた。樹立した雄核発生胚由来 TS 細胞 (ATS 細胞) から分化した細胞における遺伝子発現解析の結果、迷路層栄養膜細胞や海綿状栄養膜細胞への分化は見られず、栄養膜巨細胞への分化のみが認められた (Ogawa et al., Placenta 2009)。妊娠 9.5 日の雄核発生胚において栄養膜巨細胞の異常増殖が観察されたことから、ATS 細胞の分化能は生体内のものを反映していた (論文投稿中)。さらに、ATS 細胞を用いたゲ

ノムワイドな DNA メチル化解析の結果、マウス 1 番染色体 1C2 領域の *Gpr1-Zbdf2* 遺伝子間に存在する 3 つの父方アレルメチル化 DMR (Differentially Methylated Region) を同定した。さらに、この DMR の上流に位置する *Gpr1* 遺伝子が、新規父方発現インプリント遺伝子であることを明らかにした (Hiura et al., Nucleic Acids Res 2010)。以上の結果、我々が樹立した ATS 細胞の分化能および DNA メチル化を始めとするゲノムインプリンティング制御が生体のものを忠実に反映していたことから、ATS 細胞が胎盤形成における雌雄ゲノムの機能解析に強力なツールとなることを確信した。

ATS 細胞の特徴のうち *Fgf4* 非存在下でも *Cdx2* の発現が維持される点に着目した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ATS 細胞特異的にみられる *Fgf4* 非存在下での *Cdx2* 発現維持機構を明らかにすることにより、*Cdx2* の発現制御に作用するインプリント遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 供試細胞

ATS 細胞 2 株を使用した。また、受精卵由来 TS 細胞をコントロールとした。

(2) 免疫染色

Fgf4 除去後、0、2、4 日目の TS 及び ATS 細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで 20 分間固定した。固定後、膜透過液 (0.25% TritonX-100 / PBS) で 10 分間処理し、PBS で洗浄後、ブロッキング液 (1% BSA を含む PBS) 中で 1 時間静置した。ブロッキング後、抗 *CDX2* 抗体と一晚、4℃ で反応させた。PBS で洗浄後、Alexa594 標識抗マウス IgG 抗体

(Invitrogen)による二次抗体反応を1時間行った後、洗浄液で洗浄し、DAPIによる核染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 阻害剤処理

TS及びATS細胞を最終濃度20 µMのMEK-ERK阻害剤、U0126を添加した培養液で、1、2、4日間培養した。細胞を回収後、サンプルバッファーを加えてタンパク質を抽出した。

(4) ウェスタンブロット

10%ゲルを用いてSDS-PAGEを行った。その後、PVDFメンブレンにトランスファーした。5%スキムミルクを含むTBST溶液でブロッキングを行い抗CDX2抗体と一晩反応させた。TBST溶液で洗浄後、ECL Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibodyと反応させた。TBST溶液で洗浄後、検出キットECL Prime Western Blotting Detectionと反応させた後、LAS-1000で検出した。

(5) マイクロアレイ解析

Fgf4除去後0及び3日目にtotal RNAを抽出し、GeneChip® 3' IVT Express kit (Affymetrix)を用いてIn Vitro Transcription (IVT)によりcDNAの合成とcDNAを鋳型にしたcRNA増幅及びビオチンラベリングを行った。IVTで得られたcRNA 20 µlのうち1 µlを20倍希釈した上でNanoDrop 1000を用いて濃度を測定し収量を算出した。また質的評価としてExperion RNA StdSens (Bio Rad)に供しcRNAのサイズ分布を確認した。GeneChip® Mouse Genome430 2.0のチップコンポーネント:49 Formatに従い、cRNA量が15 µgとなる様に溶媒量を算出・調製し5 × fragment bufferを用いて94で35分間インキュベートしcDNAを断片化した。増幅、

ビオチンラベル及び断片化を施したcRNAを用いてGeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)チップへのハイブリダイズを行うため、cRNAを混合したハイブリダイゼーションカクテルを49 Formatに従い、ハイブリダイゼーションカクテルを調製しチップにアプライした。その後GeneChip® Hybridization oven 640 (Affymetrix)にて45 / 60rpmの条件で16時間ハイブリダイゼーションを行った。AGCCにより出力されたFgf4除去後0日目のTS細胞 (n=2) , Fgf4除去後3日目のTS細胞 (n=2)とFgf4除去後0日目のATS細胞 (n=2) , Fgf4除去後3日目のATS細胞 (n=2) 計8サンプルの遺伝子発現データCELファイルをGene Spring 12.0 (Agilent Technology)に新規エクスペリメントとしてインポートした。インポート時にNormalizeとBaseline補正を含むSummarizationを行った。解析対象をRAW値100以上を少なくとも1サンプル以上示したプローブとし、すべてのサンプルでRAW値100未満のプローブは解析対象から除外した。

(6) ATS細胞特異的*Cdx2*発現制御因子の探索

Fgf4除去後0日目と3日目のTS細胞の間で5.0倍以上遺伝子発現が増加または減少した遺伝子を抽出し、リストを作成した。作成したリストにFgf4除去後0日目と3日目のATS細胞でのFold Changeを適用し、両者間で発現増減が2倍以内のプローブに絞り込んだ。

(7) Real-time PCR

DNase処理を行ったtotal RNAを鋳型にcDNAを合成した。合成したcDNAをPower SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)と各遺伝子プライマーを用

いて 7500 Fast Real-Time PCR System 及び、その制御ソフト 7500 System Sequence Detection Software version 1.3.1.21 (Applied Biosystems) で Real Time PCR を行い、蛍光強度を計測することで発現定量解析を行った。

(8) siRNA を用いた *Id2* ノックダウン TS 細胞の遺伝子発現解析

Lipofectamine RNAi MAX Reagent (Life technologies) を用いて *Id2* siRNA (si *Id2*) を細胞に導入した。その後、72 時間培養し、Real-time PCR により遺伝子の定量解析を行った。

4 . 研究成果

(1) CDX2 陽性細胞

TS 細胞において、CDX2 陽性細胞の割合は、Fgf4 除去後 0 日目には 80% であったが、除去後 4 日目には 5% まで低下した。一方、ATS 細胞における CDX2 陽性細胞の割合は、Fgf4 除去後 0 日目には 100% であったが、除去後 4 日目には 80% であった。以上の結果から、ATS 細胞では Fgf4 除去後も CDX2 陽性細胞が維持されることが明らかとなった。そこで、CDX2 陽性細胞と核の大きさとの関連性を調べた。その結果、TS 細胞では巨核化した細胞で CDX2 の発現は認められなかったが、ATS 細胞では、巨核化した細胞の約 80% が CDX2 陽性であった。以上の結果から、ATS 細胞では巨核化した細胞においても CDX2 を発現していることが明らかとなった。

(2) U0126 が *Cdx2* の発現に及ぼす影響

MEK-ERK 阻害剤 U0126 の阻害効果を検証するために、Fgf4 存在下で培養した TS 細胞に U0126 を添加し、*Cdx2* の発現量を Real time PCR により定量解析した。その結果、*Cdx2* の発現が著しく低下したことから、TS 細胞に

おいて *Cdx2* の発現は U0126 により抑制されることが明らかとなった。そこで、ATS 細胞に U0126 を添加し *Cdx2* の発現を定量解析した結果その発現量が半分にまでしか減少しなかった。以上の結果から、ATS 細胞における *Cdx2* の発現は、MEK-ERK 経路のみならず MEK-ERK を介さない経路の関与が示唆された。

(3) *Cdx2* の発現制御因子の候補遺伝子の選出

Cdx2 の発現制御に関わる遺伝子の候補を選出するために候補となる遺伝子群を Fold Change によって抽出した。Fold Change の値は *Cdx2* の遺伝子の変動に近い変動を示す遺伝子を選出した。TS53 株で分化誘導による発現が 5.0 倍以上変動したプローブを抽出した結果、579 プローブ (426 遺伝子) が選出された。これら 579 プローブのうち、ATS2 株で分化誘導による発現が 2.0 倍以内に収まったプローブを抽出した結果、288 プローブ (225 遺伝子) が抽出された。選出した 225 遺伝子について遺伝子の機能に着目し、細胞増殖、胚発生、分化に関与すると報告されている遺伝子を選んだ。結果、4 つの遺伝子 *Id2*, *Pdzrn3*, *Dnmt3b*, *Gtf2i* を選出した。

(4) 候補遺伝子の Real Time PCR による定量発現解析

候補遺伝子とした 4 遺伝子 : *Id2*, *Pdzrn3*, *Dnmt3b*, *Gtf2i* について TS 細胞と ATS 細胞の分化誘導による遺伝子発現の変動を検証するため、Real Time PCR による遺伝子の定量発現解析を行った。その結果、*Id2* のみがマイクロアレイ解析結果と同様に TS53 の分化誘導により発現が低下したが、ATS2 では分化誘導しても発現を維持していた。そこで、*Id2* を最終的な候補遺伝子とした。

(5) siRNA を用いた *Id2* ノックダウン TS 細胞の遺伝子発現解析

Id2 ノックダウン ATS2 を作成して再び total RNA を回収し、Real Time PCR を行い、*Id2* 遺伝子の発現低下によって *Cdx2* の発現が低下するかどうか定量発現解析を行った。その結果、*Cdx2* の発現低下は認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

(1) Ogawa H, Watanabe H, Kono T. Deficiency of genomic reprogramming in trophoblast stem cells following nuclear transfer. *Cell Reprogram* (2015) 17:115-23.

(2) Ogawa H, Takyu R, Morimoto H, Toei S, Sakon H, Goto S, Moriya S, Kono T. Cell proliferation potency is independent of FGF4 signaling in trophoblast stem cells derived from androgenetic embryos. *J Reprod Dev* (2016) 62:51-8.

(3) Goto S, Cao F, Kono T, Ogawa H. Microarray analysis of differentially expressed genes in inner cell mass and trophectoderm of parthenogenetic embryos. *J Mamm Ova Res* (2016) 33:45-54.

[学会発表](計 1 件)

(1) 小川英彦、上田真弓、河野友宏 3次元培養法を用いた栄養膜幹細胞からの胎盤様構造体構築 第55回日本卵子学会 平成26年5月19日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

小川 英彦 (OGAWA HIDEHIKO)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 20339089

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: