

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462567

研究課題名(和文)胎盤特異的発現を示す細胞融合抑制タンパク：サブレスシンのin vivo機能解析

研究課題名(英文)In vivo functional analysis of cell fusion suppressor : Suppressyn

研究代表者

杉本 潤 (Sugimoto, Jun)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10315476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：サブレスシン(Suppressyn)は細胞融合を負に調節する細胞融合抑制タンパクである。この機能をより生体に近い状態で解析するため、ヒト胎盤に由来する絨毛初代培養細胞を用いた融合抑制効果の検証と、マウスサブレスシン遺伝子の単離・同定を計画した。

本研究助成により、当研究室独自の絨毛初代培養細胞の単離・培養法が確立され、より詳細な機能解析が可能となった。さらに、ノックアウトマウス作製の為、マウスサブレスシン遺伝子の単離を試みた結果、4つの候補遺伝子を得ることができた。今後これらの結果を発展、応用することにより、in vivoでのサブレスシンタンパクの融合抑制能解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Suppressyn is one of the first human proteins to be identified that inhibits cell-cell fusion. We have developed an efficient method for isolation and culture of primary trophoblast cells that allows the study of suppressyn ex vivo. In addition, murine placenta RNAseq expression analysis was used to identify potential mouse suppressyn equivalents. Expression of the four candidate transcripts was confirmed in murine placentas, and functional analysis of these is currently in progress. Our results may help to better define an in vivo role for suppressyn in normal human placental development.

研究分野：分子生物学

キーワード：サブレスシン 細胞融合抑制 絨毛初代培養細胞 内在性レトロウイルス 胎盤 シンシチン

1. 研究開始当初の背景

本申請者は、胎盤特異的に発現する細胞融合抑制タンパクを発見し、Suppressyn(サプレシン)と命名した。このタンパクは、その胎盤特異的発現から、妊娠中の合胞体形成を伴う胎盤形成維持に重要な働きを持つと考えられる。細胞融合抑制タンパク・サプレシンの機能解析は以下のような重要性をもつ。

- (1)世界で初めて発見された細胞融合抑制タンパクである。
- (2)胎盤の形成不全に起因する習慣性流産、子宮内胎児発育不全(IUGR)等の疾患発症メカニズム解明への貢献が予想され、解析結果によっては、遺伝子診断、治療のための新たな手法の開発につながる可能性がある。
- (3)細胞融合に関する新規の知見が得られ、産婦人科領域のみにとどまらず生物学一般にも重要な研究課題を提供すると考える。細胞融合を利用して感染するウイルスの感染防御、細胞融合が関与する疾患への治療薬の開発が期待される。

今回サプレシンタンパクの細胞融合抑制能をより生体に近い状態で解析するため、ヒト胎盤由来初代培養細胞を用いた検証(ex vivo)、ノックアウトマウス作製による検証(in vivo)を計画した。

2. 研究の目的

サプレシンタンパクの機能解析は始まったばかりであり、より詳細な分子メカニズムの解明が必要である。特に細胞融合抑制効果に関して、これまでの研究は絨毛細胞株を用いた *in vitro* での実験であったことからより生体内の環境に近い実験系での機能解析が必須であった。

そこで、ヒト胎盤組織に由来する絨毛細胞より初代培養を試み、サプレシン遺伝子をノックダウンする(機能を喪失させる)ことにより、これら細胞においても融合抑制効果が確認されることを検証しようと考えた。さらに、マウスにおける相同な遺伝子(配列は異なるが同じ細胞融合抑制機能を持つ遺伝子)を同定し、将来のノックアウトマウス作製に応用しようと考えた。

3. 研究の方法

(1)ヒト生体内での生理機能の証明には、胎盤組織に由来する初代培養細胞を用いた検証が不可欠である。そこでヒトの正常胎盤組織より絨毛細胞を選択的に回収し、初代培養を行った後、サプレシン遺伝子をノックダウンさせ合胞体形成能の変化を検証する。今回、独自の初代培養細胞の単離・培養法を確立した。

- 帝王切開により得られた満期胎盤サンプルより絨毛細胞を多く含む組織部位を物理的に選択して回収する。
- 組織を酵素処理(0.25%トリプシン、80U/ml DNase I)により消化し細胞を細分する。
- 得られた細胞は、20-70% Percoll による比重依存的な遠心分離を行い分離し、目的の細胞群を回収する。
- これら栄養膜細胞を多く含む細胞集団を、専用の培地で数時間培養し、培養皿に付着した細胞のみを回収する。この細胞を絨毛初代培養細胞として、次の検証実験に用いた。

これら細胞を用いて siRNA によるサプレシン特異的な遺伝子ノックダウンを行い、細胞融合能の変化を検証した。融合能は、融合していない細胞の数を計測することにより評価した。

(2)サプレシン・ノックアウトマウスの作製のため、マウスにおけるサプレシン相同遺伝子の単離・同定を行う。ヒト内在性レトロウイルスの解析の難しさは、これら遺伝子の配列が種を超えて保存されていないことである。(マウスはヒトサプレシン遺伝子配列を持っていない)このことから単純に遺伝子配列からその相同遺伝子を見いだせる単一遺伝子とは違い、マウスゲノム中の内在性レトロウイルス配列の中からサプレシン遺伝子とは配列レベルでの相同性はないが、同じ細胞融合抑制能をもつレトロウイルス由来遺伝子(タンパク)を単離しなければならない。この単離同定は非常に困難をとまなうことが予想されるが、今回より効率的な方法として、次世代シーケンサーを用いた解析法を考案した。

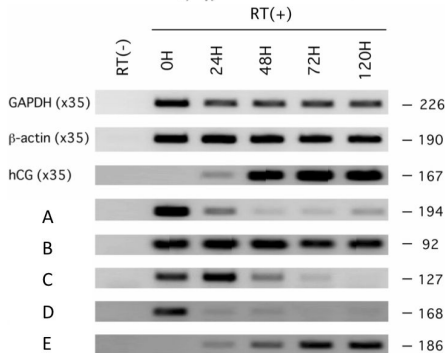
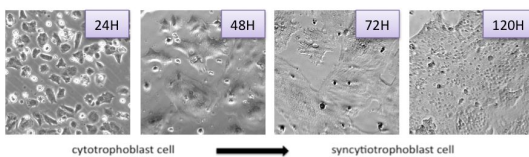
- 妊娠マウスよりマウス胎盤を回収し mRNA を精製、マウス胎盤 RNA ライブラリーを作製する。作製した RNA ライブラリーを次世代シーケンサーによりくまなく塩基配列決定し、得られた遺伝子配列の繰返し度に応じて発現の高低を確認する。(RNAseq 解析) 今回、予備的実験として、データベース上に既に登録されているマウス胎盤由来 RNAseq 解析結果を利用し、候補遺伝子の簡易検索を行った。
- 候補遺伝子配列を PCR 法により増幅し、哺乳類用の発現ベクターにクローニングした。
- マウスのシンシチン遺伝子は既に明らかになっており、Syncytin-A である。マウス・サプレシン候補遺伝子を強制発現させた細胞(293T)に

Syncytin-A 遺伝子を発現させ、誘導される細胞融合を抑制することができ、クローンをスクリーニングする。これにより候補マウスサプレシン遺伝子を同定することができる。

4. 研究成果

(1) ヒト絨毛初代培養細胞による解析

これまで、多くの研究者により満期胎盤由来絨毛初代培養細胞の分離、培養が行われ報告されてきた。我々もこれら報告に準じて試みたが、いずれの条件も満足のいく分化状態の初代培養細胞を得ることができなかった。そこで、単離方法、培養方法をアレンジし、当研究室独自の絨毛初代細胞培養法を確立している。単離した絨毛初代細胞は、24時間後には細胞融合が確認でき、120時間後には多核でシート状の融合細胞が認められた。(図上段) 絨毛細胞の分化を示す分化マーカーの一つである hCG(絨毛性ゴナドトロピン) は単離後では全く発現が確認されないが(栄養膜細胞を示唆する)120時間後には非常に強い遺伝子発現が確認できた。(図下段 hCG の欄) このことから、これら細胞が細胞融合により分化した合胞体栄養膜細胞であることが示唆された。同じように胎盤形成に強く関与していると考えられる細胞融合関連遺伝子の発現(図下段 A-E)を調べたところ、これまでに報告されている各遺伝子の発現パターンと一致した結果が得られた。以上の結果は、栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞への融合を伴った分化の過程を、忠実に培養フラスコ内で再現できた結果であると考えている。



この解析法の確立により、これまで考えられてきた細胞とは異なる細胞で、サブ

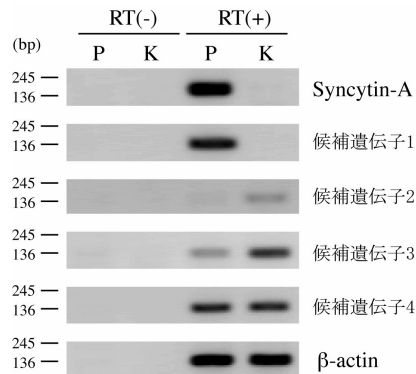
レシン遺伝子の発現が確認され、細胞融合前の細胞で主に機能していることが明らかとなった。さらに、サプレシン抗体によるタンパクの局在解析を試みたところ、細胞融合による絨毛細胞の分化後も、単一の細胞(融合していない細胞)でのみサプレシンタンパクが発現していることが明らかとなった。つまりサプレシンの発現により細胞融合が抑えられていることが示唆される。

また、siRNAによる特異的なサプレシン遺伝子ノックダウン解析では、融合していない細胞の数がコントロールと比べて有意に減少していることが明らかとなった。

以上の結果、ヒトの生体環境に近い絨毛初代培養細胞を用いた検証でも、サプレシンタンパクの細胞融合抑制タンパクとしての機能が示唆された。

(2) マウスサプレシン遺伝子単離・同定

これまでに予備的実験として、データベース上に登録されているマウス胎盤由来 RNAseq 解析結果を簡易に検証した。この結果、胎盤で高発現する非常に興味深い候補遺伝子4つが明らかになっている。RT-PCR 解析の結果、このうち一つが胎盤特異的な発現を示し、残りの3つは胎盤を含む組織での発現が確認された。(下図参照) これら候補遺伝子を PCR 法によりマウスゲノム DNA より増幅し、哺乳類用の



P: Placenta K: Kidney

発現ベクターにクローニングした。ヒト 293T 細胞にこれら4つの候補遺伝子を強制発現させ、細胞融合抑制効果の検証を進めている。

今後、これら4つの候補遺伝子に細胞融合抑制効果が確認されれば、マウスサプレシンとして、より詳細な機能解析を行う予定である。また、この候補遺伝子を ES 細胞またはマウス受精卵で遺伝子破壊を試み、サプレシン遺伝子が存在しないノックアウトマウスを作製する。これらマウスの交配実験により、胎盤形成における影響の有無を検証し、サプレシンタンパクの細胞融合抑制効果を *in vivo* で確認する予定である。

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 1 件)

- ・ Sugimoto J, Sugimoto M, Bernstein H, Jinno Y, Schust D. A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion. Sci Rep. 2013 Mar 15;3:1462. (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

- ・ 杉本 潤、金城忠嗣、Schust Danny、小田高也、青木陽一、陣野吉廣 絨毛初代培養細胞を用いたサプレシンの発現・機能解析、第 23 回日本胎盤学会 2015 年 11 月 東京都・JA 共済ビル
- ・ 杉本 潤、小田高也、Schust Danny、陣野吉廣 6 種類の遺伝子多型/異型を持つ HERV-Fb1 遺伝子の細胞融合抑制効果の検証 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 神奈川県・横浜市・パシフィコ横浜
- ・ 杉本 潤、小田高也、Danny Schust、陣野吉廣 細胞融合抑制タンパクをコードする HERV-Fb1 遺伝子で見つかった 6 種類の遺伝子型の機能解析 第 21 回日本胎盤学会 2013 年 10 月 愛知県・名古屋市・ウインクあいち
- ・ Danny J. Schust, Jun Sugimoto, Takaya Oda and Yoshihiro Jinno. Could a novel, retrovirally-derived inhibitor of trophoblast syncytialization play a role in limiting cell fusion between extravillous trophoblast and maternal decidua? European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE) 2013 London

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 潤 (SUGIMOTO, Jun)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10315476