

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16K11118  
研究課題名（和文）ヒト胎盤分化成熟機構の解明：分化ステージの異なる細胞を分取し比較するアプローチ

研究課題名（英文）The study of human trophoblast differentiation

研究代表者  
石原 直恵（琴村直恵）（Ishihara, Naoe）  
藤田医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50571791  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：JEG-3細胞株は、ヒト胎盤未分化栄養膜細胞のモデル細胞である。我々は、分化誘導したJEG-3細胞には、分化初期から後期までの細胞が存在することを見出した。この分化ステージの不均一な細胞集団より未分化及び分化細胞を分取することを目的に、分化した栄養膜細胞で発現するアロマターゼと分化後期の特徴である核の凝集を検出するレポーター細胞株の作製を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
レポーター細胞株を用いて未分化及び分化細胞を分取できれば、分化関連因子を同定出来る可能性がある。それにより、胎盤の主要構成細胞である栄養膜細胞の分化過程を解明に寄与することが出来ると思う。

研究成果の概要（英文）：Human choriocarcinoma JEG-3 cells have been used as a model system for researching differentiation of trophoblast cells. When JEG-3 cells were cultured in a differentiation condition, the cells were not uniformly differentiated; some of them showed condensed nuclei and/or aromatase expression, which are known as differentiation features of trophoblast cells. In this study, to separate differentiated and undifferentiated cells, we established cell lines transfected with fluorescent reporters, which allowed us to observe nuclear shape and aromatase expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：胎盤 栄養膜細胞 分化 アロマターゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

栄養膜細胞は胎盤の主要な構成細胞であり、胎児と母体間の選択的な物質交換、胎盤ホルモン(エストロゲン、hCGなど)の分泌という機能を担っている。栄養膜細胞には、未分化栄養膜細胞、分化栄養膜細胞、合体体栄養膜細胞と分化ステージの異なる細胞が存在する(図1)。未分化栄養膜細胞は未分化性を維持したまま増殖するが、一部の細胞が分化栄養膜細胞へと分化し、その後、核の凝集や細胞融合した特徴を持つ合体体栄養膜細胞へと分化し、最終的にアポトーシスを起こし胎盤栄養膜より遊離する。この分化の流れが正常に起こることにより、胎盤は成熟しその機能を維持することが出来る。従って、栄養膜細胞の分化制御機構の解明は、産婦人科領域に有用な知見をもたらすことが期待できる。我々は、ヒト未分化栄養膜細胞のモデル細胞である JEG-3 細胞株のアロマトラーゼ(エストロゲン合成酵素)遺伝子の発現機構を解析してきた。その過程で、JEG-3 細胞を分化誘導処理すると、アロマトラーゼ陽性の細胞や、凝集した核を持つ細胞など、不均一な細胞が出現することを見出した。アロマトラーゼの発現は分化中期、核の凝集は分化後期の特徴であるため、分化誘導処理した JEG-3 細胞は胎盤の栄養膜細胞と同様に分化ステージの不均一な細胞集団の可能性があると考えた。

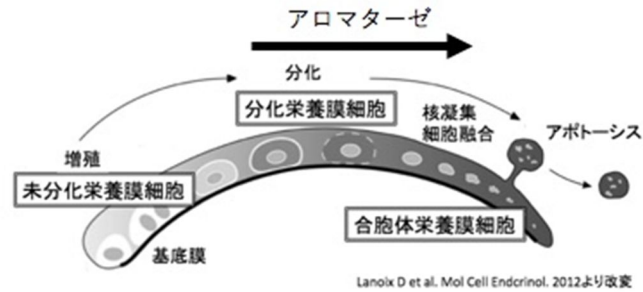


図1. 胎盤栄養膜細胞の分化

この分化の流れが正常に起こることにより、胎盤は成熟しその機能を維持することが出来る。従って、栄養膜細胞の分化制御機構の解明は、産婦人科領域に有用な知見をもたらすことが期待できる。我々は、ヒト未分化栄養膜細胞のモデル細胞である JEG-3 細胞株のアロマトラーゼ(エストロゲン合成酵素)遺伝子の発現機構を解析してきた。その過程で、JEG-3 細胞を分化誘導処理すると、アロマトラーゼ陽性の細胞や、凝集した核を持つ細胞など、不均一な細胞が出現することを見出した。アロマトラーゼの発現は分化中期、核の凝集は分化後期の特徴であるため、分化誘導処理した JEG-3 細胞は胎盤の栄養膜細胞と同様に分化ステージの不均一な細胞集団の可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

JEG-3 細胞がヒト胎盤栄養膜細胞の分化過程を反映した不均一な細胞集団であることを検証し、その細胞集団から未分化及び分化状態の細胞を分取するシステムを作ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) JEG-3 細胞が分化ステージの不均一な細胞集団であることを検証するために、分化した栄養膜細胞の指標となるアロマトラーゼの発現と核の凝集を調べた。アロマトラーゼの発現は、免疫染色法と in situ ハイブリダイゼーション(ISH)法により検討した。核の凝集は、免疫染色時に DAPI で核を染色して検討した。

(2) 未分化及び分化状態の細胞を分取するために、CRISPR-Cas9 システムを用いてアロマトラーゼ遺伝子を蛍光タンパク遺伝子に置き換えたレポーター細胞株を作製し、その有用性を検討した。

### 4. 研究成果

(1) アロマトラーゼの発現を指標とした JEG-3 細胞の不均一性の検証

#### 免疫染色法による検討

通常培養した細胞と分化誘導培養した細胞について、アロマトラーゼ抗体を用いた免疫染色を行い、JEG-3 細胞の分化ステージを比較検討した。分化誘導培養は、コンフルエントな細胞をフォルスコリン処理することとした。その結果、どちらの培養条件下でも、JEG-3 細胞集団にはアロマトラーゼ陽性と陰性の細胞が混在していることが明らかになった。アロマトラーゼ陽性細胞の比率は、通常培養では 10% 未満、分化誘導培養でも 20% 程度であった。さらに、陽性細胞同士は集まって存在する傾向があり、この傾向は分化誘導培養した細胞で顕著であった。また、凝集した核を持つ細胞は分化誘導培養した場合に特異的に認められた。以上より、今回の分化誘導培養条件を用いれば分化初期から後期までの細胞が出現するため、分化ステージの異なる細胞を分取する材料として適していると結論した。

#### ISH 法による検討

JEG-3 細胞のアロマトラーゼの不均一な発現が遺伝子転写レベルで制御されているかを検討するために、ISH 法によりアロマトラーゼの mRNA の検出を試みた。その結果、JEG-3 細胞にはアロマトラーゼ遺伝子(CYP19A1)からの転写産物が見られる細胞と見られない細胞が混在していることが確認できた(図2)。そして、免疫染色の結果と同様に、アロマトラーゼ遺伝子を発現した細胞は集まって存在する傾向が認められた。

以上より、アロマトラーゼ遺伝子の発現と核の凝集は、JEG-3 細胞の分化ステージを識別する有効な指標となると考えた。

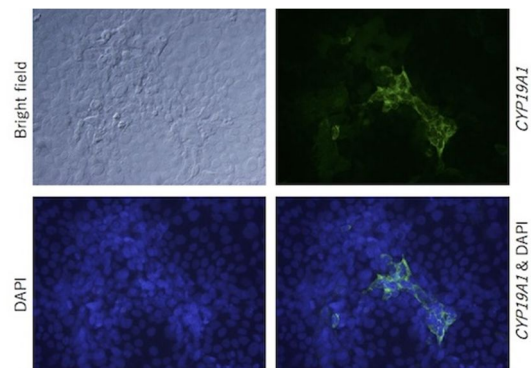


図2 ISH法によるアロマトラーゼ陽性細胞の検出

## (2) 分化ステージをモニターする為のレポーター細胞株の作製と検証

### ヒストン H2B を蛍光標識した細胞株の作製

ヒストンはクロマチンの主要なタンパクであるため、このタンパクを蛍光標識した細胞は生細胞で核の形を識別可能となる(Kanda T. et al., Curr.Biol. 1998)。凝集した核を持つ細胞を生細胞で識別する為に、ヒストン H2B の C 末端に赤色蛍光タンパクを融合したキメラタンパクをコードする発現ベクターを JEG-3 細胞に導入した。作製した細胞株 (H2B-mCherry 株) を分化誘導し蛍光顕微鏡で観察したところ、正常な形の核を持つ細胞と凝集した核を持つ細胞が確認できた。分化誘導した H2B-mCherry 株にはアロマターゼ陽性と陰性の細胞が混在していることを免疫染色により確認した。以上より、H2B-mCherry 株は親株と同様の特徴を維持しており、アロマターゼ遺伝子の発現をモニターするレポーター細胞株の作製に使用可能と判断した。

### アロマターゼ遺伝子の発現をモニターするレポーター細胞株の作製

CRISPR-Cas9 を用いた相同組換えによるノックイン法により H2B-mCherry 株のアロマターゼ遺伝子を緑色蛍光タンパク (GFP) 遺伝子に置換したレポーター細胞株の作製を試みた。組み換えのドナー DNA には、GFP 遺伝子及びピューロマイシン耐性遺伝子をアロマターゼ遺伝子の転写開始点前後に挟んだプラスミドを用いた。H2B-mCherry 株にドナー DNA をトランスフェクションした後、ピューロマイシンを添加培養することで耐性株を得た。トランスフェクションは複数回行い、各トランスフェクションにより得られた耐性株をクローニングした。これにより、複数の独立したクローンを回収した。得られたクローンについて、ドナー DNA 側とアロマターゼ遺伝子側のプライマーを用いてゲノム DNA の PCR を行い、ドナー DNA が正しくノックインされたクローンを選別した。それらクローンについて分化誘導し蛍光顕微鏡で観察したが、GFP の蛍光を検出できるクローンは存在しなかった。蛍光が観察できなかった原因として、GFP の蛍光強度がアロマターゼ遺伝子の発現をモニターするには十分でなかった、あるいは GFP 遺伝子の挿入位置に問題があった可能性を考えている。

以上の結果を踏まえ 2020 年度からの研究課題では、アロマターゼ遺伝子の直下に IRES を挟んで薬剤耐性あるいは感受性の遺伝子を挿入した細胞株の作製を計画している。これらの細胞株では、挿入した遺伝子の発現はアロマターゼ遺伝子の発現制御下にあるので、薬剤を添加培養することで、薬剤耐性株の場合は分化した細胞が、薬剤感受性株の場合は未分化細胞が回収できると期待している。

### <引用文献>

Lanoix D., Lacasse A-A., Reiter R.J., Vaillancourt C. (2012) Melatonin: The smart killer: The human trophoblast as a model Mol. Cell. Endocrinol. 348, 1-11 doi: [10.1016/j.mce.2011.08.025](https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.025)

Kanda T., Sullivan K.F., Wahl G.M. (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. Curr.Biol.8, 377-385

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoe Kotomura Satoru Tsunemine Masahiro Kuragano Takahiro Asanuma Hiromi Nakagawa Katsunori Tanaka Yota Murakami	4. 巻 23
2. 論文標題 Sfh1, an essential component of the RSC chromatin remodeling complex, maintains genome integrity in fission yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 738-752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12629.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoru Ishihara, Naoe Kotomura, Naoki Yamamoto, Hiroshi Ochiai	4. 巻 531
2. 論文標題 Ligation-mediated PCR with a back-to-back adapter reduces amplification bias resulting from variations in GC content	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2017.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原悟、笹川洋平、亀田健、山下隼人、琴村直恵、阿部真之、下野洋平、二階堂愛
2. 発表標題 転写開始点でのクロマチンの部分凝集は遺伝子の転写量と負の相関を示す
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原悟、笹川洋平、琴村直恵、山下隼人、二階堂愛
2. 発表標題 ヌクレオソームの凝集度の違いでクロマチンを分画する
3. 学会等名 2018年度日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 琴村直恵、原田信広、石原悟
2. 発表標題 卵巣顆粒膜細胞でのCYP19遺伝子は2カ所のオープンクロマチン領域によって転写調節される
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	原田 信広  (Harada Nobuhiro)  (00189705)	藤田医科大学・医学部・教授   (33916)	
研究 分担者	石原 悟  (Ishihara Satoru)  (00300723)	藤田医科大学・医学部・講師   (33916)	