

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592390

研究課題名(和文)胎盤発生過程におけるCdx2のエピジェネティックな分子機構とヒト胎盤幹細胞の樹立

研究課題名(英文)Epigenetics of Cdx2 gene on the extraembryonic cell lineage and human trophoblastic stem cell.

研究代表者

菅原 準一 (SUGAWARA, Junichi)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：60280880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤組織へと分化する胚体外組織(TE)は、胚盤胞期にCdx2の発現亢進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、1)胎盤幹(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った。その結果、Cdx2遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化は低メチル化状態であること、ヒストン修飾も活性型である事が判明した。2)Cdx2遺伝子のノックダウン効果が認められたTS細胞株を用い、形態変化と細胞周期について解析した結果、増殖能の低下とG1アレストが認められた。この事実よりTS細胞の分化・維持にはCdx2遺伝子が重要な役割をする事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The increased expression of Cdx2, and more differentiated embryonic body tissue to the blastocyst stage, extra-embryonic tissue to differentiate into placental tissue (TE) determines the cell fate. In this study, using 1) placental stem (TS) cells, and subjected to analysis for histone modification and DNA methylation of Cdx2 gene promoter region. As a result, the DNA methylation of the promoter region of the gene Cdx2 be low methylation status, that histone modifications are also active was found. As a result of using a TS cell line knockdown 2) of the Cdx2 gene was observed, were analyzed for cell cycle and morphological changes, G1 arrest was observed and reduced growth potential. From this fact, the differentiation and maintenance of TS cells, that Cdx2 gene plays an important role has been suggested.

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：胎盤幹細胞 エピジェネティクス 細胞系譜

1. 研究開始当初の背景

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)の最初に分化(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)、後者はトロホプラスト幹細胞(TS細胞)として、自己複製能を維持し、胎児、胎盤構成細胞への分化が可能な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、分化の方向性を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、発現制御が行なわれているのかは未だ明らかではない。

2. 研究の目的

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、分化に伴う Cdx2 遺伝子の機能について、細胞特性、分子特性の変化を明らかにする。さらに、ヒト未分化胎盤絨毛細胞に、CDX2 を遺伝子導入し、ヒト TS 細胞株を樹立し、検証する事を目的とする。

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

TS細胞とES細胞の発現量の解析:

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。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。

Cdx2 遺伝子のエピゲノム解析 (DNA メチル化とヒストン修飾):

Cdx2 遺伝子発現調節領域(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、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:**各細胞の DNA を用い、DNA メチル化解析を行った。TS 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ケンスする。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を行った。

・**ヒストン修飾の解析:**ヒストン修飾の解析には Chip-PCR 法(クロマチン免疫沈降法)を用いた。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解析を行った。

(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

siRNA 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、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トングによって確認。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用いた。

Cdx2 ノックダウン TS 細胞株における分子間相互作用:

Cdx2 遺伝子を永続性にノックダウンした TS 細胞株を樹立し、RNA を抽出。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。同様に、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, PI-1)の発現量の比較と巨細胞の出現の有無を確認。

(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

Oct3/4 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。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。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。

Oct3/4 強制発現 TS 細胞株の細胞特性:
複数の発現量の異なる 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について観察。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。

Cdx2 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を行なった。

(4) ヒト TS 細胞の樹立と検証

ヒト TS 細胞の分離:
インフォームドコンセントを得て初期胎盤絨毛組織より酵素処理および濃度勾配法を用いて栄養膜細胞を分離した後、Hoechst 染色し FACS で約 1 % に存在する SP(side population)細胞を分離した。ヒト TS 細胞樹立: CDX2 遺伝子を導入したヒト絨毛細胞は、マウス TS 細胞と同様の条件で培養。境界明瞭な上皮様細胞をトリプシン処理し単離培養。TS 細胞であることは、形態学および ERR , CDX2 , OCT3/4 遺伝子等の RT-PCR 法による発現解析により確認。

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

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 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。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、低メチル化状態であることが明らかとなった。同様に、ヒストン修飾も活性型で有意な変化を認めた。胎児性幹細胞(ES)でも解析したが、高メチル化状態を維持していた。この結果はメチル化阻害剤を添加して、再確認した。これらの結果より、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

TS 細胞における Cdx2 遺伝子の機能と分子間相互作用について解析した。そのため、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した。まず、ノックダウン効果(40%)が認められた TS 細胞株を用い、形態変化と細胞周期について解析した結果、増殖能の低下と G1 アレストが認められた。永続性ノックダウン TS 細胞株では、TS 特異的未分化遺伝子マーカー(Eomes, Id2, ErrB)の発現低下が認められた。

(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

Oct3/4 強制発現用ベクターを作製し、TS 細胞へ遺伝子導入した。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。しかし、TS 細胞株の細胞形態変化とコロニー形成能に変化はみられなかった。この事実より、TS 細胞の維持には、Oct3/4 の発現だけでなく、他の転写因子も働く事が示唆された。

(4) ヒト TS 細胞の樹立と検証

TS 細胞細胞群は表面抗原マーカー CD44, CD54 陽性、CD45, CD29 弱陽性、CD31, AC133 陰性で TS 細胞の特性を示した。また、マウス TS 細胞と比較し、TS 細胞特異的発現のみられる Id2 の発現が著しく亢進していることが判明した。しかし、長期培養では増殖が確認されなかった事から、ヒト TS 細胞の培養至適条件が、マウスと異なる事が示唆された。

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 5 件)

樋浦仁、有馬隆博

生殖補助医療とエピジェネティクス
エピジェネティクス 基礎研究から産業応
用への展望

シーエムシー出版 査読無

2014 印刷中

千葉初音、有馬隆博

生殖医療と児の奇形、エピジェネティクス異
常

医学のあゆみ(医歯薬出版)査読無

2014 印刷中

Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N,
Sato F, Sato A, Arima T. DNA methylation
errors in imprinting disorders and
assisted reproductive technology. *Pediatr
Int*. 査読有 2013 Oct;55(5):542-9. doi:
10.1111/ped.12185.

Sugawara J, Suenaga K, Hoshiai T, Sato
T, Nishigohri H, Nagase S and Yaegashi N.
Efficacy of recombinant human soluble
thrombomodulin in severe postpartum
hemorrhage with disseminated
intravascular coagulation. *Clin Appl
Thromb/Hemost*, 査読有 19(5):557-61. 2013.
doi: 10.1177/1076029612443305.

千葉初音、岡江寛明、有馬隆博

ヒト生殖補助医療(ART)とエピジェネティ
クスの異常

遺伝子医学MOOK(メディカルドゥ)査読無

2013, 25:178-183

〔学会発表〕なし

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅原 準一(SUGAWARA, JUNICHI)

東北大学・東北メディカル・メガバンク
機構・教授

研究者番号:60280880

(2)研究分担者

岡江 寛明(OKAE, HIROAKI)

東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号:10582695

樋浦 仁(HIURA, HITOSHI)

東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号:70451523

有馬 隆博(ARIMA, TAKAHIRO)

東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号:80253532