

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462562

研究課題名(和文) ヒト栄養膜幹細胞分化制御シグナルの解明

研究課題名(英文) The mechanism of signal for regulating differentiation in human trophoblast stem cells

研究代表者

高尾 知佳 (TAKAO, TOMOKA)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40612429

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)：本研究ではヒト絨毛細胞株HTR-8/SVneo細胞を用いて各細胞系列における新規分化制御遺伝子の解析を行った。HTR-8/SVneo細胞より栄養膜幹細胞群、合胞体栄養膜細胞そして絨毛外栄養膜細胞へ、各々の機能を持ち備えている細胞を単離した。さらに各細胞で高発現する遺伝子をマイクロアレイ解析の結果より選択し、栄養膜幹細胞群へ遺伝子導入を行った。結果として、各分化細胞特有の遺伝子マーカー(HLAGやHCGB)の発現上昇が認められ、これらの遺伝子が栄養膜幹細胞群の分化を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the new gene for regulating the differentiation of human trophoblast lineage using HTR-8/SVneo cells. We isolated the 3 trophoblast lineages including each functions; human trophoblast stem/precursor(hTS) cells, syncytiotrophoblast(ST) and extravillous trophoblast(EVT) from HTR-8/SVneo. DNA microarray analysis showed that IFIT2(interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2) was up-regulated in ST cells or TRIB3(tribbles pseudokinase 3) was up-regulated in EVT cells. We transfected its into hTS cells. Upregulation of each gene expression was increased trophoblast differentiated cell markers such as HLAG or HCGB.

研究分野：分子生物学

キーワード：分化制御 胎盤 栄養膜幹細胞

1. 研究開始当初の背景

以前よりヒト栄養膜幹細胞の単離は多く研究者により試みが行われていたが成功には至っていなかった。我々はすでに報告されているマウスの栄養膜幹細胞の単離方法 (Oda, M et al. 2006) で単離を試みたが、同様の方法ではヒト栄養膜幹細胞の単離・同定は出来なかった。そこで組織幹細胞の同定で使用されている DNA 結合色素 Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞 (side population cells, 以下 SP 細胞) を単離する方法を用いて、正常ヒト初期絨毛細胞、ヒト絨毛細胞株 (HTR-8/SVneo) を用いて SP 細胞の検出を試み、初期絨毛細胞と HTR-8/SVneo 細胞に SP 細胞が存在する事を見出した。このことから HTR-8/SVneo 細胞株が多彩な細胞集団から構成される細胞株であり、多分化能を持つ幹細胞を含んでいる可能性が考えられた。

SP 細胞は組織幹細胞の定義である、自己複製能、多分化能の保有、長期増殖能を有していた。さらに SP 細胞と非 SP 細胞 (以下 NSP 細胞) を用いた DNA マイクロアレイ解析により絨毛幹細胞のマーカークと考えられる膜蛋白質受容体 IL7R と IL1R2 を同定した。HTR-8/SVneo-SP 細胞においては約 85%、初期絨毛 SP 細胞においては 100% IL7R 及び IL1R2 両陽性であることを見出し、IL7R/IL1R2 両陽性細胞が SP 細胞と同等の幹細胞能力を持つ事を報告した。

ヒト栄養膜幹細胞の同定は成熟細胞である合胞体栄養膜細胞や絨毛外栄養膜細胞への分化・増殖制御機構を知る上で基盤となり、胎盤絨毛の生物学的意義を知る上で重要な研究である。さらに栄養膜幹細胞から合胞体栄養膜細胞、絨毛外栄養膜細胞への分化に関する分子メカニズムの解明はこれまでに治療法がなかった胎盤機能不全や妊娠高血圧症候群 (PIH) に対する分子標的治療開発の大きな誘因となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究はヒト栄養膜細胞のまだ解明されていない栄養膜幹細胞から合胞体栄養膜細胞、絨毛外栄養膜細胞への分化の分子機構を明らかにし、分化制御因子を利用した治療薬開発の臨床応用を展開する為の基盤研究を行う。

3. 研究の方法

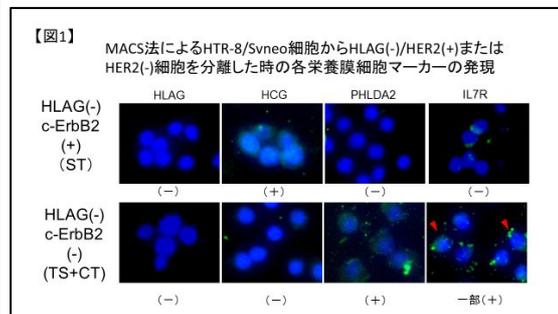
A) 不死化ヒト絨毛細胞 HTR-8/SVneo 細胞よりヒト栄養膜幹細胞、合胞体栄養膜細胞及び絨毛外細胞性栄養膜細胞の 3 系列の細胞を各細胞特異的に発現する抗体 (絨毛外栄養膜細胞: HLA-G、合胞体栄養膜細胞: HER2+/HLAG-) を用いて BD MACS 及び Aria3 により単離した。これらが各々の機能を持ち得るかを HCG 分泌能や浸潤能を用いて解析を行った。

B) 各種ヒト栄養膜細胞系列の RNA を抽出後、各種細胞系列間 (栄養膜幹細胞 絨毛外栄養膜細胞、- 合胞体栄養膜細胞) で DNA マイクロアレイ解析を行った。

C) 各種ヒト栄養膜細胞系列間での DNA マイクロアレイ解析の結果から、それぞれの細胞間で特異的に発現する分化制御候補遺伝子を選択し、Aria3 法で単離した栄養膜幹細胞に p3xFLAG8.1CMV 発現ベクターを用いて未分化条件下で発現誘導を行い、栄養膜幹細胞の表現型の変化をマーカー遺伝子を用いたリアルタイム RT-PCR、ウエスタンブロット法を用いて解析を行った。また各種分化細胞において CRISPR-Cas9 を用いて遺伝子の発現抑制を誘導し、その時の個々の栄養膜細胞の表現型変化をマーカー遺伝子を用いたリアルタイム RT-PCR、特異的抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

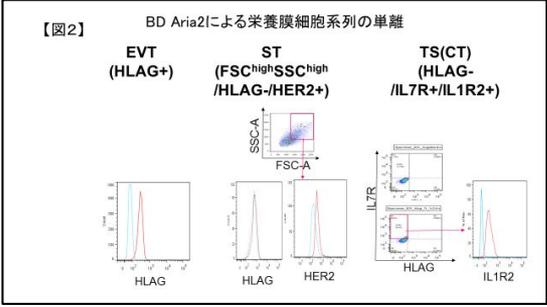
ヒト栄養膜幹細胞から個々の栄養膜細胞系列分化に特異的な発現遺伝子を検索するために、HTR-8/SVneo 細胞より、栄養膜幹細胞集団 (以下 TS 細胞)、合胞体栄養膜細胞 (以下 ST 細胞)、絨毛外栄養膜細胞 (以下 EVT 細胞) を単離した。ST 細胞の表面マーカーとして EVT 細胞には発現するが細胞性栄養膜細胞 (以下 CT 細胞) には発現しないという報告より HER2 を使用した。まず HTR-8/SVneo 細胞より HLAG(-) 細胞を MACS 法により分離し、その後 HER2 陽性または陰性細胞を単離し、栄養膜細胞マーカーにより免疫染色で確認した。HLAG 陰性 HER2 陽性細胞は ST 細胞のマーカーである HCG が発現しており、陰性細胞には発現していなかった。HLAG 陰性 HER2 陽性細胞にはその他の栄養膜細胞マーカーは発現していなかったが、HER2 陰性細胞では CT 細胞マーカーである PHLDA2 や TS 細胞マーカーである IL7R の発現を一部認めた (図 1)。



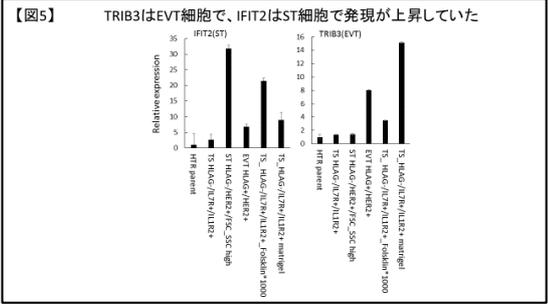
HTR-8/SVneo 細胞より、IL-7R(+)/IL1R2(+)/HLAG(-)細胞が TS 細胞、FSC/SSC high/HLAG(-)/HER2(+)+細胞が ST 細胞、HLAG(+)+細胞が EVT 細胞として単離した (図 2 及び表 1)。

【表1】
MACS法によるHTR-8/Svneo細胞から各マーカーで単離した時の細胞分類及び各栄養膜細胞マーカーの発現有無

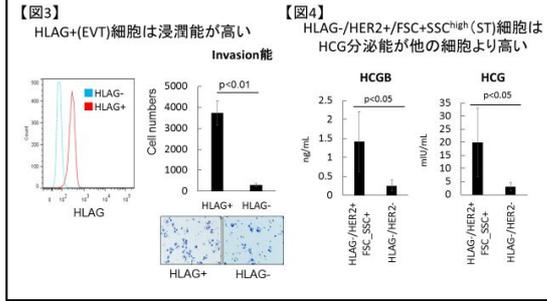
マーカー	細胞分類	HLAG	HCGb	PHLDA2	IL7R
HLAG(+)	EVT	(+)	一部(+)	(-)	(-)
HLAG(-)	CT,ST, TS	(-)	一部(+)	一部(+)	一部(+)
HLAG(-) c-ErbB2(+)	ST	(-)	(+)	(-)	(-)
HLAG(-) IL7R/IL1R2(+)	TS	(-)	(-)	(+)	(+)



次に IL-7R(+)/IL1R2(+)/HLAG(-)細胞を単離し、これらを ST 細胞分化誘導方法として従来より用いられている Folskolin 誘導法にて、また EVT 細胞誘導法として用いられると考えられたマトリゲルコート培養法を用いて 48 時間培養を行った。Folskolin 誘導により IFIT2 が、マトリゲルコート培養法では TRIB3 の mRNA 発現が上昇することが明らかとなった(図 5)。

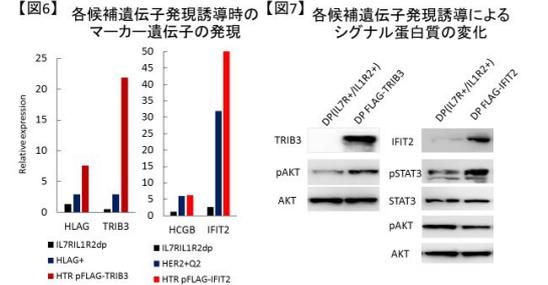


FSC/SSC high/HLAG(-)/HER2(+)細胞は、HLAG(-)/HER2(-)細胞と比べて HCG 分泌能が高いことが明らかとなり、ST 細胞の能力を持っていることを確認した。HLAG(+)細胞はHLAG(-)細胞と比べて浸潤能力が高いことから、EVT 細胞能力を持っていることが確認できた。(図 3、4)



次に TRIB3 を IL7R/IL1R2 細胞に遺伝子導入すると HLAG の mRNA レベルの発現が上昇しており(図 6)、さらに pAkt の発現上昇が認められ(図 7)、このことは既存の浸潤シグナル (MMP 転写活性を上昇させる)を up-regulation する結果となった。次に IFIT2 を IL7R/IL1R2 細胞に遺伝子導入すると HCGB の mRNA レベルでの発現上昇が認められた(図 6)。さらに、pSTAT3(Tyr705)の上昇と AKT のリン酸化抑制が認められた(図 7)。STAT3 のリン酸化については Ser727 のリン酸化上昇に伴い浸潤能の向上が報告されているが、Tyr705 についてはまだ報告がないため現在解析中である。また AKT のリン酸化は既報で BeWo 細胞の fusion 誘導時に抑制される報告もあり、IFIT2 が AKT シグナルを介して fusion を誘導することが示唆された。

次にこれらの細胞を用いて DNA マイクロアレイ法を行った。その中から ST 細胞または EVT 細胞分化誘導候補遺伝子は何個か挙がったが、有力な転写因子の候補は認められなかった。そこでその周辺遺伝子群で検索を行った。既に報告のある遺伝子に関しては除外し、一方、胎盤や栄養膜細胞に関する論文報告がない遺伝子群も多数存在したが、その中でも HTR-8/SVneo 細胞で mRNA 及び蛋白質レベルで発現確認のできるものが存在した。一部の候補群ではヒト絨毛組織において一部の EVT や ST 細胞において陽性を認めた。そこで分化誘導候補遺伝子群の中から、EVT 細胞分化候補遺伝子として TRIB3 (tribbles pseudokinase 3) ST 細胞分化候補遺伝子として IFIT2 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2) に着目することとした。



ノックアウト実験について IFIT2 は ST 細胞における発現が落ちず、TRIB3 は EVT 細胞においてクローンが取れなかったことから、ノックダウンの系として用いた。しかし著しい結果は認められなかった。現在、他の KD プラスミドを用いて解析を行っている。また、その他の候補遺伝子についても解析を行っている。分化制御候補遺伝子に関連するインヒビターによる分化制御については現在解析中である。

これまで、これらの遺伝子は胎盤や栄養膜

細胞における報告はほとんどなかったことから、新たな分化制御機構を見出す一助となると期待できる。

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4件)

1. Kazuo Asanoma, Ge Liu, Takako Yamane, Yoko Miyanari, Tomoka Takao, Hiroshi Yagi, Tatsuhiro Ohgami, Akimasa Ichinoe, Kenzo Sonoda, Norio Wake, and Kiyoko Kato. Regulation Mechanism of TWIST1 Transcription by BHLHE40 and BHLHE41 in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*,35(24) 4096-4109, 2015

2. Aijima R, Wang B, Takao T, Mihara H, Kashio M, Ohsaki Y, Zhang JQ, Mizuno A, Suzuki M, Yamashita Y, Masuko S, Goto M, Tominaga M, Kido MA. The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. *The FASEB Journal* 29(1) 182-92, 2015

3. Liu G, Asanoma K, Takao T, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Kato K, Wake N. Aryl hydrocarbon receptor SNP -130 C/T associates with dioxins susceptibility through regulating its receptor activity and downstream effectors including interleukin 24. *Toxicol Lett.* 232(2):384-92, 2015

4. Wake N, Takao T, Asanoma K, Kato H. Establishment of a new diagnostic method for hydropic villi by using TSSC3 antibody. *J Obstet Gynaecol Res.*39(7), 1230-1235, 2013

〔学会発表〕(計4件)

ヒト子宮内膜症モデル細胞における Ad4BP/SF-1 の新たな役割
日本内分泌学会第32回内分泌代謝学サマーマナー、H26.7.10-12, 山梨県

ヒト子宮内膜症モデル細胞における Ad4BP/SF-1 の新たな役割
第19回日本生殖内分泌学会学術集会 H27.1.10, 大阪府

ヒト子宮内膜症モデル細胞における Ad4BPSF1 の新たな役割
第36回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会, H27.1.24-25, 東京都

ヒト子宮内膜症モデル細胞における Ad4BP/SF-1 の新たな役割
第88回日本内分泌学会学術集会, H27.4.23-25, 東京都

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高尾知佳 (TAKAO TOMOKA)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号: 40612429

(2) 研究分担者

和氣徳夫 (WAKE NORIO)

九州大学・環境発達医学研究センター・

特任教授

研究者番号: 60091584