

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15702

研究課題名(和文)新規の幹細胞マーカー laeverin と hTERT による絨毛由来胎児幹細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of chorionic villi-derived embryo stem cells by novel stem cell markers, laeberin and hTERT

研究代表者

藤原 浩 (Hiroshi, Fujiwara)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30252456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて臍帯血および初期絨毛組織より laeverin 陽性細胞が効率に分離できるようになり、laeverin 陽性細胞における遺伝子や蛋白発現の解析が可能となった。また初期絨毛組織における laeverin 陽性細胞の正確な局在が示された。これらの知見は再生医学の分野での細胞分化誘導機構の解析の進展に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：By this project, laeverin-positive cells were successfully isolated from umbilical cord blood and chorionic villous tissues. Consequently, we have become able to analyze their gene and protein expression profiles. This study also demonstrated the precise localization of laeverin-positive cells in the human chorionic villous tissues in the early pregnancy. We hope that these findings will contribute to analyzing cell differentiation mechanisms in the field of regenerative or reproductive medicine.

研究分野：産婦人科学

キーワード：laeverin 臍帯血 初期絨毛 hTERT

1. 研究開始当初の背景

ヒトの発生過程ではその初期より血液循環系は確立されており、この系を介した各臓器への遠隔的な細胞の移動は理論上可能であり、血球・血管系のみならず様々な組織の発生に関わる幹細胞が循環していると推察され、臍帯血から分離した幹細胞の再生医療への応用が試みられている。このような背景のもと本研究申請者らは以前よりヒト胎盤形成機構の解明をテーマに研究を推進して来たが (Sato *et al.*, *Development*, 2003; *Blood*, 2005; Horie *et al.*, *Hum Reprod*, 2012)、その研究過程でこれらの幹細胞が広く絨毛組織内でも循環していること、さらにヒト発生において少なくとも血球と血管新生は胎芽本体よりも早い時期から初期絨毛間質内で開始されていることに着目し、「出産時の新生児の循環系には絨毛由来の幹細胞も存在し、発生・発達過程での臓器構築に役割を果たすのみならず、成人に至った後も臓器の修復・再生に貢献している」のではないかと、この新しい概念を発想するに至った。

2. 研究の目的

今回の検討で、臍帯血中に本研究申請者らが遺伝子構造を決定した laeverin 蛋白を発現する Oct4 陽性の細胞、さらに human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 活性を有する細胞群が見いだされた。そこで hTERT 発現を幹細胞の機能マーカーとして応用し、laeverin 陽性の新規の胎児循環幹細胞を同定してその機能解析を行ない、再生医学の分野に産婦人科から新たな情報発信をすることを目指して本研究を挑戦的萌芽として申請した。

3. 研究の方法

本研究は代表者の藤原が laeverin 発現細胞の解析、分担者の高倉が hTERT の発現細胞の解析、荒木が遺伝子・蛋白発現の解析、服部がリコンビナント laeverin の作成、河崎が幹細胞の分化誘導実験、大黒が laeverin 遺伝子改変マウスの作成を担当し、平成 28 年度の期間内に、1) 臍帯血および絨毛組織からの laeverin および hTERT 活性発現細胞の分離と解析、2) 絨毛組織における発現細胞と niche の局在部位の解析、3) 分離した発現細胞の発現遺伝子および蛋白群の探索、4) 発現細胞の多分化能の確認、5) laeverin の遺伝子改変マウスの作成と解析、以上 5 項目を遂行して laeverin および hTERT 活性を発現する新しい胎児血中の循環幹細胞に関する有効な情報を得る。なお研究協力者として大学院生の松本、飯塚、鏡が実験の遂行に加わる。

4. 研究成果

本研究の結果、臍帯血および初期絨毛組織からの浮遊細胞において laeverin 陽性細胞を分離することができ、laeverin 陽性細胞の発現遺伝子や蛋白群を分析することが可能となった。また laeverin 陽性細胞の初期絨毛内における局在が明らかとなり、さらにヒト laeverin 遺伝子過剰発現マウスの作出が開始された。hTERT 活性を有する細胞群についてはさらなる解析が必要と思われた。

これらの成果は ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医学における分化誘導機構の解析に応用できることが期待される。

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 17 件)

1. Suginami K, Sato Y, Horie A, Matsumoto H, Tani H, Mizumoto Y, Ono M, Matsuoka A, Kyo S, Araki Y, Konishi I, Fujiwara H. Platelet-derived microparticles and soluble factors differentially regulate human endometrial epithelial cell movement. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Feb 7. doi: 10.1111/aji.12641. [Epub ahead of print] 査読有

2. Matsuoka A, Sasaki H, Sugimori C, Hirabuki S, Hoshiba T, Fujiwara H. Acquired hemophilia A manifesting as plasma transfusion-uncontrolled severe bleeding 2 weeks after chorioamnionitis-induced abortion. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017 Feb 2. doi: 10.1111/jog.13270. [Epub ahead of print] 査読有

3. Bono Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Iwadare J, Obata T, Fujiwara H. FDG-PET-positive ovarian thecoma with GLUT5 expression: Five cases. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017 Mar;43(3):599-603. 査読有

4. Suginami K, Sato Y, Horie A, Matsumoto H, Kyo S, Araki Y, Konishi I, Fujiwara H. Platelets are a possible regulator of human endometrial re-epithelialization during menstruation. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Jan;77(1). 査読有

5. Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Suginami K, Tani H, Hattori A, Araki Y, Kagami K, Konishi I, Fujiwara H. CD9 suppresses human extravillous trophoblast invasion. *Placenta*. 2016 Nov;47:105-112. doi: 10.1016/j.placenta.2016.09.014. 査読有

6. Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Matsumoto T, Takakura M, Fujiwara H. Synchronous endometrioid adenocarcinomas in the uterine cervix and corpus. *J Obstet Gynaecol Res.* 2016 Oct;42(10):1390-1394. doi: 10.1111/jog.13049. 査読有

7. Yoshitake H, Oda R, Yanagida M, Kawasaki Y, Sakuraba M, Takamori K, Hasegawa A, Fujiwara H, Araki Y. Identification of an anti-sperm auto-monoclonal antibody (Ts4)-recognized molecule in the mouse sperm acrosomal region and its inhibitory effect on fertilization in vitro. *J Reprod Immunol.* 2016 Jun;115:6-13. doi: 10.1016/j.jri.2016.04.001. 査読有

8. Kagami K, Yamazaki R, Minami T, Okumura N, Morishita E, Fujiwara H. Familial discrepancy of clinical outcomes associated with fibrinogen D α 2: A case of huge genital hematoma after episiotomy. *J Obstet Gynaecol Res.* 2016 Jun;42(6):722-725. doi: 10.1111/jog.12972. 査読有

9. Ghosh H., Auguadri L., Battaglia S., Simone Thirouin Z., Zemoura K., Messner S., Acuña M. A., Wildner H., Yévenes G. E., Dieter A., Kawasaki H., Hottiger M. O., Zeilhofer H. U., Fritschy J.-M. and Tyagarajan S. K., Several posttranslational modifications act in concert to regulate gephyrin scaffolding and GABAergic transmission, *Nature Communications*, 7, 13365, 2016 査読有

10. Toda T., Shinmyo Y., Dinh D. T. A., Masuda K. and Kawasaki H., An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals, *Scientific Reports*, 6, 29578, 2016 査読有

11. Hoshiba Y., Toda T., Ebisu H., Wakimoto M., Yanagi S. and Kawasaki H., Sox11 balances dendritic morphogenesis with neuronal migration in the developing cerebral cortex, *Journal of Neuroscience*, 36, 5775-5784, 2016 査読有

12. Endo S., Yoshitake H., Tsukamoto H., Matsuura H., Kato K., Sakuraba M., Takamori K., Fujiwara H., Takeda S., Araki Y. TEX101, a glycoprotein essential for sperm fertility, is required for stable expression of Ly6k on testicular germ cells. *Sci.Rep.* 6: 23616, 2016 査読有

13. Hamamura K., Nonaka D., Ishikawa H., Banzai M., Yoshitake H., Yanagida M., Nojima M., Yoshida K., Takamori K., Asada K., Lee L-J, Tanaka K., Takeda S., Araki Y. Simple quantitation for potential serum disease biomarker peptides, primarily identified by a peptidomics approach in the serum with hypertensive disorders of pregnancy. *Ann.Clin.Biochem.* 53: 85-96, 2016 査読有

14. Iizuka T, Wakae K, Nakamura M, Kitamura K, Ono M, Fujiwara H, Muramatsu M. APOBEC3G is increasingly expressed on the human uterine cervical intraepithelial neoplasia along with disease progression. *Am J Reprod Immunol.* in press, 2017 査読有

15. Imakawa K, Bai R, Fujiwara H, Ideta A, Aoyagi Y, Kusama K. Continuous model of conceptus implantation to the maternal endometrium. *J Endocrinol.* 233:R53-R65, 2017 Review. 査読有

16. Sumita K, Lo YH, Takeuchi K, Senda M, Kofuji S, Ikeda Y, Terakawa J, Sasaki M, Yoshino H, Majd N, Zheng Y, Kahoud ER, Yokota T, Emerling BM, Asara JM, Ishida T, Locasale JW, Daikoku T, Anastasiou D, Senda T, Sasaki AT. The lipid kinase PI5P4K is an intracellular GTP sensor for metabolism and tumorigenesis. *Mol Cell.* 61. 187-198, 2016 査読有

17. Fujiwara H, Araki Y, Imakawa K, Saito S, Daikoku T, Shigeta M, Kanzaki H, Mori T. Dual Positive Regulation of Embryo Implantation by Endocrine and Immune Systems - Step-by-Step Maternal Recognition of the Developing Embryo. *Am J Reprod Immunol.* 75:281-9, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 藤原 浩
第 29 回長野県周産期研究会 2016.9.24
ホテルニュー松本(長野県松本市)
「ヒト胎盤の形成機構 妊娠初期に何が起
こっているのか」(特別講演)
2. 藤原 浩
平成 28 年度第 2 回滋賀県産科婦人科医
会学術講演会 2016.9.3 大津プリンスホテル

(滋賀県大津市)
「後腹膜アプローチにおける腫瘍学と生殖医学の相違点 生殖機能の再建を目指して」(特別講演)

3. 藤原 浩
第 52 回中国四国生殖医学会学術講演会
2016.8.27 岡山国際交流センター(岡山県岡山市)
「胚着床機能を再考察する 新しい着床誘導エッセツの提言」(特別講演)
4. 藤原 浩
第 272 回広島市臨床産婦人科医会研修会
2016.6.16 広島医師会館(広島県広島市)
「腫瘍と生殖医学における手術アプローチ法の相違点 生殖機能の再建を目指して」(特別講演)
5. 藤原 浩
第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会
2016.4.23 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
「乳癌患者に対する治療による卵巣過剰刺激作用」(教育講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 浩(FUJIWARA, Hiroshi) 金沢大学・
医学系・教授
研究者番号: 30252456

(2) 研究分担者

高倉 正博(TAKAKURA, Masahiro) 金沢
大学・附属病院・准教授
研究者番号: 20313661

荒木 慶彦(ARAKI, Yoshihiko) 順天堂
大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70250933

服部 明(HATTORI, Akira) 京都大学・
薬学研究科・准教授
研究者番号: 50300893

河崎 洋志(KAWASAKI, Hiroshi) 金沢大
学・脳・肝臓・フェース研究センター・教授
研究者番号: 50303904

大黒 多希子(DAIKOKU, Takiko) 金沢大

学・学際科学実験センター・教授
研究者番号: 30767249