

令和 4 年 4 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18660

研究課題名（和文）全奇胎細胞モデルの作成と悪性転化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Creation of all-eccentric cell models and elucidation of malignant conversion mechanism

研究代表者

北村 茜 (Kitamura, Akane)

東北大学・医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：50736402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：全胞状奇胎（全奇胎）の疾患TSモデル細胞を作成し、全奇胎細胞の細胞特性、分化能、増殖能について明らかにした。また、全奇胎の病態に特徴的なインプリント遺伝子p57KIP2の機能について、その強制発現とヒトTS細胞へのゲノム編集技術を用い、P57kip2遺伝子をノックアウトし、細胞密度に応じた細胞増殖の停止機能について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、晩婚化と妊娠年齢の上昇により異常妊娠の割合が上昇傾向にある。異常妊娠のうち、全奇胎は正常胎盤絨毛に比し、高率に絨毛癌化を伴うため、他の形態的類似性を示す疾患（部分奇胎、顕微鏡的奇胎）との鑑別を要する。学術的には、未分化状態を保持する全奇胎の疾患モデル細胞を作成し、細胞悪性転化のメカニズムとゲノムインプリンティング消失の病態メカニズムを解明することを目的とし、全奇胎の疾患モデル細胞を作成した。さらにその細胞特性と分子特性について、遺伝子強制発現やゲノム編集技術による遺伝子欠失により解析した。本研究内容はPNAS誌に掲載された。

研究成果の概要（英文）：Complete hydatidiform mole (CHM) is androgenetic in origin and characterized by enhanced trophoblastic proliferation. CHMs are often followed to malignant neoplasms including choriocarcinoma. Aberrant genomic imprinting may be responsible for trophoblast hypertrophy in CHMs, but the mechanisms are still elusive. We recently developed human trophoblast stem (TS) cells. In this study, we apply this system to CHMs for a better understanding of their molecular pathology. CHM-derived TS cells, designated as TS mole, are morphologically similar to TS cells. Interestingly, TS mole have a growth advantage over TS cells only after confluence. We found that p57KIP2, a maternally expressed gene encoding a cyclin-dependent kinase inhibitor, is strongly induced by increased cell density in TS cells, but not in TS mole. Knockout and over expression studies suggest that loss of p57KIP2 expression would be the major cause of the reduced sensitivity to contact inhibition in CHMs.

研究分野：分子生物学

キーワード：全胞状奇胎 雄核発生 ゲノムインプリンティング 悪性転化

1. 研究開始当初の背景

我が国では、晩婚化と妊娠年齢の上昇により異常妊娠の割合が上昇傾向にある。異常妊娠のうち、全胎状奇胎 (Complete hydatidiform mole、以下、全奇胎と略す) は正常胎盤絨毛に比し、高率に絨毛癌化を伴うため、他の形態的類似性を示す疾患 (部分奇胎、顕微鏡的奇胎) との鑑別を要する。全奇胎は、雄核発生 (1 精子あるいは 2 精子受精) を原因とし、1) 多数の対立遺伝子間でのホモ接合の形成 (ヘテロ接合性の消失: LOH) 2) 父由来遺伝子の選択的継承 (ゲノムインプリンティングの消失: LOI) の 2 点を遺伝的特徴とする。また、高率に続発性腫瘍 (侵入奇胎、絨毛癌) へ進展する (図 1)。そのため、胎盤絨毛の癌化過程を研究する上で貴重な臨床材料となる。また、父由来ゲノムの選択的継承は、ヒト胎盤でのゲノムインプリンティングの役割を明らかにする最良のモデルとなる。しかし、我が国では超音波診断装置の進歩により、早期発見でき、確定診断前に子宮内容除去術や化学療法が行われることが多く、全奇胎の摘出検体は稀有となっている。

2. 研究の目的

全奇胎は、胎盤の絨毛栄養膜細胞の異常増殖を主な特徴とする疾患である。全奇胎のおよそ 15-20% は、侵入奇胎や絨毛癌などの続発性変化を示すことが知られており、臨床上的問題になっている。また、全奇胎は雄核発生により生じることから、精子由来ゲノムの選択的継承によるゲノムインプリンティングの消失が、本疾患の発症に大きく寄与する。しかし、どのインプリント遺伝子が、どのようなメカニズムで全奇胎の病態形成に関与するのかは明らかになっていない。本研究では、全奇胎由来幹細胞 (TS^{mole}) 細胞を樹立し、分子細胞学的な解析を行うことにより、全奇胎の病態メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

全奇胎の術前診断を受けた患者から、同意を得た上で、手術後の掻出された全奇胎組織の一部を収集した。全奇胎組織より栄養膜細胞を精製し、TS^{mole} 細胞を樹立した (図 1)。対照群として、両親由来のゲノムを持つ正常妊娠由来の初期絨毛より TS 細胞を樹立した。次に、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析 (図 2) と DNA メチル化解析を行った。さらに、TS^{mole} 細胞と TS 細胞の増殖試験 (図 3) とフローサイトメトリー法による細胞周期の解析を行った。これらの結果

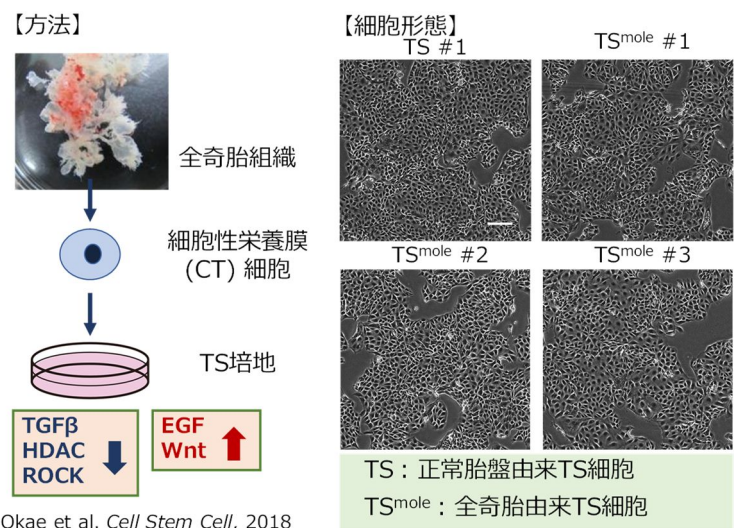


図 1 全奇胎組織由来細胞株 (TS^{mole} 細胞) の樹立

当研究室で確立したヒト TS 細胞の培養プロトコルに従い、全奇胎組織より TS^{mole} 株を樹立することに成功した (Takahashi et al. PNAS, 2019.)

を基に、TS^{mole} 細胞の増殖異常に関与する可能性のあるインプリント遺伝子を選別し、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入実験と CRISPR-Cas9 技術を用いた遺伝子ノックアウト実験を行った。

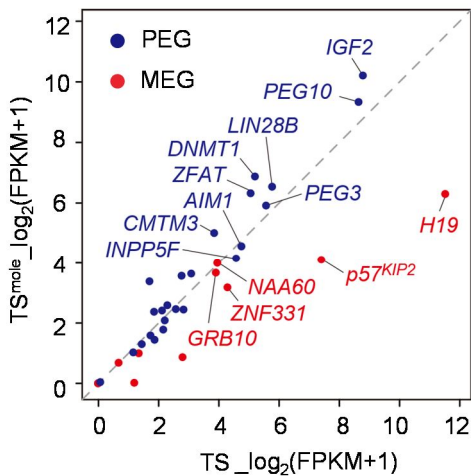


図2 ヒトTS細胞とTS^{mole}細胞の遺伝子発現の比較

TS細胞とTS^{mole}細胞のインプリント遺伝子の発現量。TS細胞とTS^{mole}細胞、それぞれ3株の遺伝子発現量の平均値を比較した。青い点はPEG(父性発現遺伝子)、赤い点はMEG(母性発現遺伝子)を示す。TS細胞でFPKM値が10以上あったものについて、遺伝子名を記した。点線は発現変化量1(遺伝子発現変動なし)を示す。

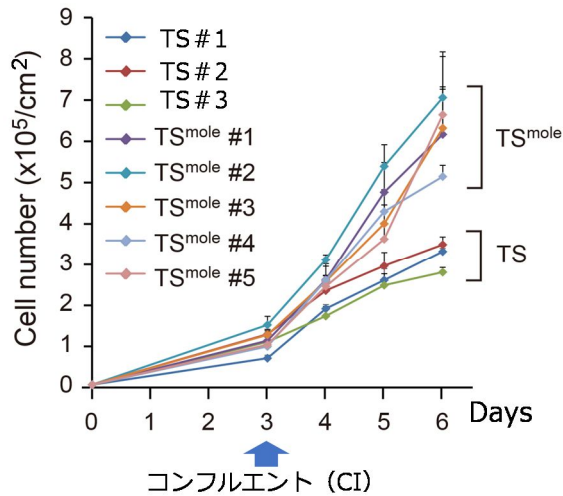


図3 高密度細胞下のTS^{mole}細胞の増殖能

高密度細胞下の増殖試験。TS細胞とTS^{mole}細胞をそれぞれ 1×10^4 cells/cm²の密度で播種し、6日目まで継代を行わず培養した際の増殖曲線を示す。値は平均値+標準偏差を示す。

4. 研究成果

当研究室で確立したヒト胎盤幹(TS)細胞の培養プロトコルに従い、全奇胎組織よりTS^{mole}細胞を5株樹立した。TS細胞とTS^{mole}細胞で発現する遺伝子の大多数は類似していたが、インプリント遺伝子の発現は大きく異なっていた。父性発現を示すインプリント遺伝子の発現は増加し、母性発現を示すインプリント遺伝子の発現は低下する傾向にあった。また、インプリント遺伝子の発現制御に関わるアレル特異的メチル化

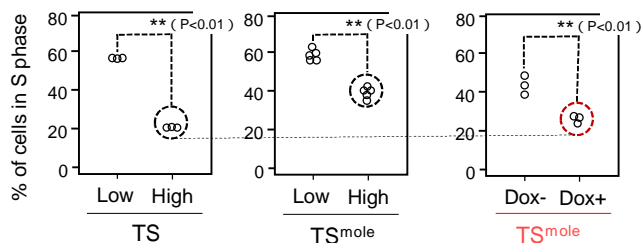


図4 TS^{mole}細胞にp57^{KIP2}を強制発現

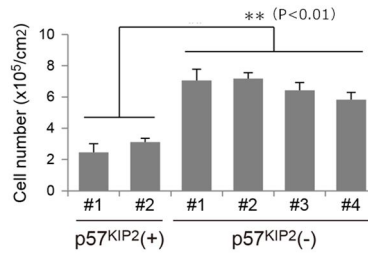
p57^{KIP2}ノックアウトクローンの細胞周期解析。p57^{KIP2}(+)クローン(n=2)と、p57^{KIP2}(-)クローン(n=4)について解析した。有意差検定はBonferroni/Dunnの多重比較検定を行った。*はp<0.05、**はp<0.01を示す。p57^{KIP2}の発現と細胞周期の関係。Dox(-)群(n=3)、Dox(+)群(n=3)についてS期細胞の割合について解析した。有意差検定はStudent t検定を行った。**はP<0.01を示す。

領域は、父親由来のメチル化パターンを示した。次に、細胞増殖試験を行い、TS^{mole}細胞は、接触阻害(CI: Contact inhibition)による細胞周期停止に対し抵抗性を示すことを見出した(図3)。興味深いことに、TS細胞では、母性発現を示すインプリント遺伝子であるp57^{KIP2}の発現が細胞密度依存的に上昇したが、TS^{mole}細胞では、p57^{KIP2}の発現はほとんど認められなかった。また、TS^{mole}細胞においてp57^{KIP2}を強制発現させ高密度で培養した場合、S期細胞の割合が $42.0 \pm 4.0\%$ から $28.1 \pm 1.5\%$ へと有意に低下した(図4)。p57^{KIP2}をノックアウトしたTS細胞はCIによる細胞周期停止に対して抵抗性を示すことから、インプリント遺伝子p57^{KIP2}が、TS^{mole}細胞の増殖異常に関与することが明らかとなった(図5)。

本研究では、全奇胎に由来するTS^{mole}株を樹立し、TS^{mole}株がCIによる細胞周期停止に対して抵抗性を示すことを示した。さらに、その原因遺伝子としてインプリント遺伝子

p57^{KIP2} 遺伝子を同定し、その役割について明らかにした。すなわち、細胞密度に依存した p57^{KIP2} 遺伝子の発現上昇は正常胎盤においても観察されており、生体内でも p57^{KIP2} 遺伝子が栄養膜細胞の増殖制御に重要な役割を担っていると推測された。また、p57^{KIP2} 遺伝子の発現抑制は多くのヒトの腫瘍においても観察されることから、CI による p57^{KIP2} 遺伝子の発現制御は、様々な細胞の腫瘍化に関与している可能性があるため、今後のその検証も必要と考える。

A. 高細胞密度増殖試験



B. 細胞周期解析

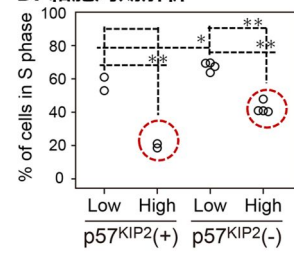


図5 p57^{KIP2} のゲノム編集(ノックアウト)TS細胞を用いた細胞増殖能

A. 高細胞密度増殖試験：p57^{KIP2} ノックアウトクローンの細胞増殖能解析。p57^{KIP2}(+) クローン2株とp57^{KIP2}(-) クローン4株はそれぞれ 1×10^4 cells/cm² の密度で播種し、5日目まで継代を行わず培養し、細胞数を数えた。有意差検定は、Student t 検定を行った。**は $p < 0.01$ を示す。B. 細胞周期解析：p57^{KIP2} ノックアウトクローンの染色体倍数性解析。p57^{KIP2}(+) クローン2株とp57^{KIP2}(-) クローン4株の染色体数 $>4n$ の細胞の割合を比較した。有意差検定は Student t 検定を行った。NS は有意差なしを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hattori H, Kitamura A, Takahashi F, Kobayashi N, Sato A, Miyauchi N, Nishigori H, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Kuriyama S, Metoki H, Yaegashi N, Nakai K, Arima T; Japan Environment & Children Study Group.	4. 巻 17
2. 論文標題 The risk of secondary sex ratio imbalance and increased monozygotic twinning after blastocyst transfer: data from the Japan Environment and Children's Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12958-019-0471-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Sota, Okae Hiroaki, Kobayashi Norio, Kitamura Akane, Kumada Kanako, Yaegashi Nobuo, Arima Takahiro	4. 巻 116
2. 論文標題 Loss of p57KIP2 expression confers resistance to contact inhibition in human androgenetic trophoblast stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 26606 ~ 26613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1916019116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Hiromitsu, Hiura Hitoshi, Kitamura Akane, Miyauchi Naoko, Kobayashi Norio, Takahashi Souta, Okae Hiroaki, Kyono Koichi, Kagami Masayo, Ogata Tsutomu, Arima Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of four imprinting disorders and ART	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0623-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大池 輝, 小林 枝里, 小林 記緒, 柴田 峻, 岡江 寛明, 北村 茜, 宮内 尚子, 有馬 隆博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館 / ニューサイエンス社	5. 総ページ数 5
3. 書名 ヒトTS細胞を用いた胎盤疾患モデルの構築	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------