

博士論文 (要約)

マウス栄養膜幹細胞の特定のサブタイプ分化に関わる因子の探索と
その分子基盤に関する研究

西谷健汰

目次

要旨	p1-5
緒言	p6-10 (図 I : p9)
第一章 EGF/Egfr シグナルが mTSC の分化に果たす機能の解析	
序論	p13-15 (図 1 - 1 : p15)
結果	p16-42 (図 1 - 2 ~ 7 : p25-42)
考察	p43-49 (図 1 - 8 : p49)
第二章 mTSC の分化運命を制御する低分子量化合物の同定	
序論	p51-52 (図 2 - 1 : p52)
結果	p53-78 (図 2 - 2 ~ 11, 表 2 - 1, 2 : p60-78)
考察	p79-83
第三章 mTSC の分化運命を制御する化合物が引き起こす遺伝子発現変化の網羅的解析	
序論	p85-87
結果	p88-104 (図 3 - 1 ~ 5, 表 3 - 1 ~ 3 : p93-104)
考察	p105-114 (図 3 - 6 : p114)
総合討論	p116-120
材料と方法	p122-150 (表 I, II: p148-150)
参考文献	p152-173
謝辞	p174

要旨

緒言

胎盤は、栄養やガス交換、血管新生の誘引やホルモン分泌を担う、正常な妊娠・出産に必要な臓器である。胎盤の異常が妊娠期の胎子発生異常につながる事が報告されており、例えばマウスでは、胚性致死となる遺伝子変異の多くで胎盤の形態異常が報告されている。またヒトにおいても、子癩前症や不育症などの妊娠期疾患の原因の一つとして、胎盤や、胎盤を構成する栄養膜細胞の機能異常が考えられている。層状構造を示すヒトやげっ歯類の胎盤において、胎盤異常の主要な表現型として、特定の栄養膜細胞サブタイプ層の減少あるいは過形成が挙げられる。すなわち、特定の栄養膜細胞種が、しかるべき位置に、適切な量、配置されることが、胎盤の正常な機能発揮に不可欠といえるが、栄養膜細胞の分化運命決定機構の詳細はいまだ明らかにされていない。

マウス栄養膜幹細胞 (mouse trophoblast stem cell, mTSC) は、*in vitro* で FGF シグナル依存的に未分化状態を維持可能な、栄養膜細胞系譜の幹細胞である。未分化維持因子を除くことで、容易に栄養膜細胞分化が誘導されることから、mTSC は栄養膜細胞分化メカニズムの解析に有用なツールとなる。本研究では、栄養膜系譜の幹細胞が特定の細胞種へ分化する分子メカニズムの解明を目標に、mTSC を用いて栄養膜細胞において直接的に作用する分化運命決定因子の探索を試み、運命決定に関わる分子基盤を解析した。

第一章

学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

第二章

学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

第三章

学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

総合討論

学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

緒言

緒言

胎盤は、胎子への栄養分の供給やガス交換、ホルモン分泌や血管新生の誘引作用など妊娠期の様々な機能を担う、正常な妊娠、出産に不可欠な臓器である。そのため、胎盤の構造や機能の異常は、胎子の発育遅滞や死産を引き起こす (Grigsby, 2016; Perez-Garcia *et al.*, 2018)。マウスにおいて、胚性致死の遺伝子変異の多くで、胎盤の異常が見つかっており、とりわけ胚発生初期（胚性 9.5 日）に致死となる大半の場合で、胎盤形成の異常が報告されている (Perez-Garcia *et al.*, 2018)。ヒトにおいても、子癩前症や不育症といった妊娠期疾患の原因の一つに胎盤の異常が挙げられている (Huppertz, 2018)。層状構造を示すヒトやげっ歯類の胎盤において、胎盤異常の主要な表現型の一つに、特定の栄養膜細胞層の減少や肥大が挙げられる (Perez-Garcia *et al.*, 2018)。このことから、特定の栄養膜細胞サブタイプがしかるべき位置に適切な量、配置されることが胎盤の正常な機能発揮に不可欠といえる。

マウスの胎盤は大きく分けて、3 種類の栄養膜細胞サブタイプに区別される (John and Hemberger, 2012) (図 I-A)。母体由来脱落膜の境界に位置し、endoreduplication によって巨核化した栄養膜巨細胞 (trophoblast giant cell, TGC) はホルモン産生能と浸潤能を有した細胞で、母体脱落膜に浸潤し血管新生作用を担う (Hu and Cross, 2010)。三層構造の中間層には、スポンジ状の構造を示す海綿状栄養膜細胞 (spongiotrophoblast cell, SpT) が局在する。海綿状栄養膜細胞の機能はいまだ明確にされていないが、様々な遺伝子欠損により SpT 層の減少が見られ、胎子の発育遅滞や胚性致死になることから (Tanaka *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2017)、SpT 層の正常な形成が胎盤の機能発揮に欠かせないことが示唆されている。胎子側のもっとも近傍に位置する迷路部栄養膜細胞 (labyrinthine trophoblast cell, LaT) は、胎子血管を鞘状に包み込み栄養分やガスの交換を担う。また LaT は、ウイルス由来の細胞融合誘導遺伝子 Syncytin を発現し、細胞融合によって多核化した合胞体を形成する (Cross *et al.*, 2006)。これら 3 種類の栄養膜細胞に加え、SpT 層に点在しグリコーゲンを貯蔵するグリコーゲン細胞 (glycogen cell, Gly) や、SpT 層および LaT 層に局在し母体血の流路を形成する TGC サブタイプも報告されている (Coan *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2007; Hu and Cross, 2010) (図 I-B)。以上のようにマウス胎盤において、機能や核相が異なる栄養膜細胞サブタイプが特定の層構造を形成している。

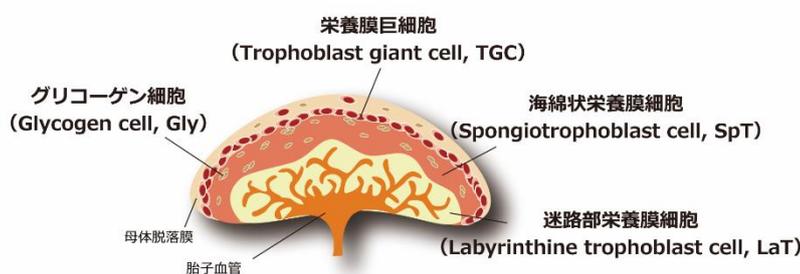
マウス栄養膜幹細胞 (mouse trophoblast stem cell, mTSC) は胚盤胞の栄養芽層より樹立された、栄養膜細胞系譜の幹細胞である (Tanaka *et al.*, 1998)。キメラ作製実験において、mTSC が胎盤全体に寄与することから、mTSC が胎盤を構成するすべての栄養膜細胞サブタイプへの分化能を有することが証明されている (Tanaka *et al.*, 1998)。mTSC は、*in vitro* において、FGF シグナル依存的に高い増殖能と未分化状態を維持することができ、また FGF を含む未分化維持因子の除去によって容易に自発分化を誘発できることから、胎盤を形成する各種栄養膜細胞への分化に関わる分子基盤を研究する上で非常に有用なツールとなる。未分化維持因子を除去後、mTSC は各種栄養膜細胞サブタイプのマーカー遺伝子を発現するため、*in vitro* においても種々の栄養膜細胞への分化能を維持していることが示唆されている。しかし、*in vivo* のように特定の栄養膜細胞種が適切に空間配置されるのではなく、各種サブタイプが混在した状態で出現する。また大半の mTSC が、巨核化した TGC 様の細胞へと分化することから (Hayakawa *et al.*, 2018)、*in vitro* において、正常な胎盤形成に不可欠である栄養膜細胞サブタイプの適切な量的、空間的配置は再現されていない。

In vivo と *in vitro* で、mTSC の分化誘導後にみられる形態的違いの大きな原因の一つとして、細胞がさらされる環境の違いが挙げられることは自明である。*In vivo* において、栄養芽層が内部細胞塊由来の FGF に依存して未分化状態を維持するように (Leunda-Casi *et al.*, 2001)、細胞がさらされる外部由来因子の有無が、分化運命決定に関与する可能性が考えられる。また着床、脱落膜形成、血管新生による酸素分圧および栄養環境の変化など、胚発生過程において、栄養膜系譜の幹細胞がさらされる細胞外環境は目まぐるしく移り変わり、接着刺激や酸素分圧ストレスなど様々な刺激にさらされる (Sharma *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2015)。以上のことから、「細胞外由来の因子が、栄養膜幹細胞の特定の栄養膜細胞種への分化を促進および抑制する調節因子になるのではないか」と考えた。そこで本研究では、特定の栄養膜細胞サブタイプへの分化運命決定に関わる分子基盤の解明を目的に、栄養膜系譜の幹細胞の特定の栄養膜細胞種への分化を制御する因子の探索とその因子が作用する分子基盤に関する解析を行った。本研究において、栄養膜系譜の幹細胞のモデルとなる mTSC を用いることで、*in vivo* 解析では見出すことが困難である、栄養膜幹細胞の分化運命決定に直接的に影響を及ぼす因子を明らかにし、胎盤形成を理解することを目標とした。

第一章では、遺伝子欠損や変異体マウスの表現型解析から、栄養膜細胞分化への関与が示唆される EGF/Egfr シグナルが、mTSC の分化に果たす機能の解析を行った。第二章では、

栄養膜細胞分化に関与する新たな因子の同定を目的に、低分子量化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、mTSC の分化運命を特定の細胞種へ促進および抑制する化合物を探索した。第三章では、第二章で同定された化合物によって引き起こされる遺伝子発現の変化を、トランスクリプトーム解析によって明らかにし、また第一章で示された栄養膜細胞分化を支持するシグナル経路との関連を解析した。

(A)



(B)

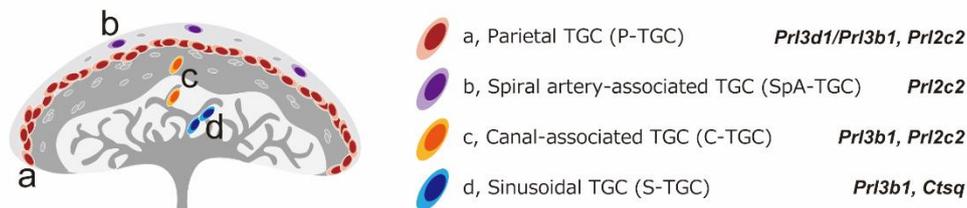


図1 マウス胎盤の模式図および栄養膜巨細胞サブタイプの分類

(A) マウス胎盤の模式図。胎盤を構成する栄養膜細胞は TGC、SpT、LaT の 3 種類に大別され、SpT 層および母体脱落膜中に Gly が点在する。(B) 栄養膜巨細胞サブタイプの分類。イタリック体で示した遺伝子名が、各サブタイプで発現するマーカー遺伝子である。胚発生において、出現場所、出現時期および発現する遺伝子パターンから、4 種類の TGC に区別することができる。母体脱落膜との境界に位置する P-TGC は胚性 4.5 日ごろに出現する Primary P-TGC と胚性 6.5 日以降に出現する Secondary P-TGC にさらに区別される。SpA-TGC は脱落膜中の母体血管に沿うように局在し、母体血管のリモデリングを担う。C-TGC は SpT および LaT 層に局在し、胎盤内を通る母体血液の流路を形成する。S-TGC は LaT 層に局在し、胎児血管を包み込む。

略語一覽

mTSC, mouse trophoblast stem cell

TGC, trophoblast giant cell

SpT, spongiotrophoblast cell

LaT, labyrinthine trophoblast cell

Gly, glycogen cell

Egfr, epidermal growth factor receptor

EGF, epidermal growth factor

TGF- α , transforming growth factor alpha

HB-EGF, heparin binding epidermal growth factor like growth factor

PL-1, placental lactogen 1

gRNA, guide RNA

NMD, nonsense-mediated RNA decay

NLS, nuclear localization signal

YKDI, Tyrosine kinase domain inactive

SMC, small molecular compound

RA, retinoic acid

OLDA, N-Oleoyldopamine

TPM, transcripts per kilobase million

GSEA, gene set enrichment analysis

DEG, differentially expressed gene

GO, gene ontology

TSS, transcriptional start site

第一章

EGF/Egfr シグナルが mTSC の

分化に果たす機能の解析

序論

Epidermal growth factor receptor (Egfr)はチロシンキナーゼ型受容体の一種であり、リガンド結合部位である細胞外ドメインと、チロシンキナーゼドメインおよび自己リン酸化部位を含む細胞内ドメインとに区別される膜貫通型受容体である (図 1 - 1 A) (Citri and Yarden, 2006; Normanno *et al.*, 2006; Martin-Fernandez *et al.*, 2019)。リガンド結合部位にリガンドが結合すると、細胞外ドメインの立体構造が変化し、二量体形成部位が露出する。その結果、Egfr およびその他の ErbB ファミリータンパク質とホモあるいはヘテロダイマーを形成し、リン酸化および自己リン酸化を介して、下流へと細胞内シグナルを伝達する (Normanno *et al.*, 2006; Wee and Wang, 2017)。Egfr に結合するリガンドは複数種類同定されており、最も親和性の高い Epidermal growth factor (EGF)に加えて、Transforming growth factor α (TGF- α)や Heparin binding EGF like growth factor (HBEGF)などが Egfr を活性化し下流のシグナル伝達を担うリガンド分子として報告されている (Jones *et al.*, 1999; Wee and Wang, 2017)。EGF/Egfr シグナルは PI3/AKT や JAK/STAT など様々な細胞内シグナルの上流に位置することから、生存、増殖、分化など、広くその細胞機能に影響することが知られている (図 1 - 1 B) (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Jutten and Rouschop, 2014; Barberán *et al.*, 2016)。

EGF/Egfr シグナルが、栄養膜細胞の機能や分化に影響することも、ヒトやげっ歯類を用いた実験から示されている (Maruo *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 2000; Johnstone *et al.*, 2005)。ラットの栄養膜幹細胞 Rcho-1 やヒト胎盤初代培養細胞に EGF を添加すると、TGC の特徴である浸潤能や胎盤性ホルモン Placental Lactogen 1 (PL-1)の産生量が亢進する (Peter *et al.*, 2000; Johnstone *et al.*, 2005)。一方、近年樹立されたヒト栄養膜幹細胞において、未分化維持や特定の栄養膜細胞種への分化に、EGF が必要であることも示されている (Okae *et al.*, 2018)。マウスにおいては、Egfr の knockout (KO)や変異体マウスの表現型解析から栄養膜細胞分化への EGF/Egfr シグナルの関与が強く示唆されている。Egfr KO マウスの表現型は系統依存的に異なる様相を示すが、多くの系統において胎盤の SpT 層の減少が報告されている (Threadgill *et al.*, 1995)。また Egfr のキナーゼドメイン非活性化型変異体マウスにおいても、Egfr KO マウス同様に SpT 層の減少がみられ、反対に、Egfr のキナーゼドメイン恒常活性化型変異体マウスでは SpT 層の増加がみられる (Dackor *et al.*, 2009a; Dackor *et al.*, 2009b)。EGF KO マウスの胎盤では胎盤機能や形態の異常は報

告されていないが、HB-EGF KO マウスでは胎盤の SpT 層が減少することも明らかとされている (Luetteke *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2019)。これらの知見から、Egfr を介するシグナルが SpT 分化に関与することが強く示唆され、また、リガンド間の代償作用やリガンド種特異的な作用などの可能性も考えられる。しかし、表現型解析に用いられたいずれの KO マウスも全身性の遺伝子欠損であるため、栄養膜細胞で Egfr を介するシグナルが自律的に機能しているかどうかは不明である。また、mTSC などの *in vitro* の系を用い Egfr や EGF の SpT 分化への作用を明らかにした報告は存在しない。

以降、学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

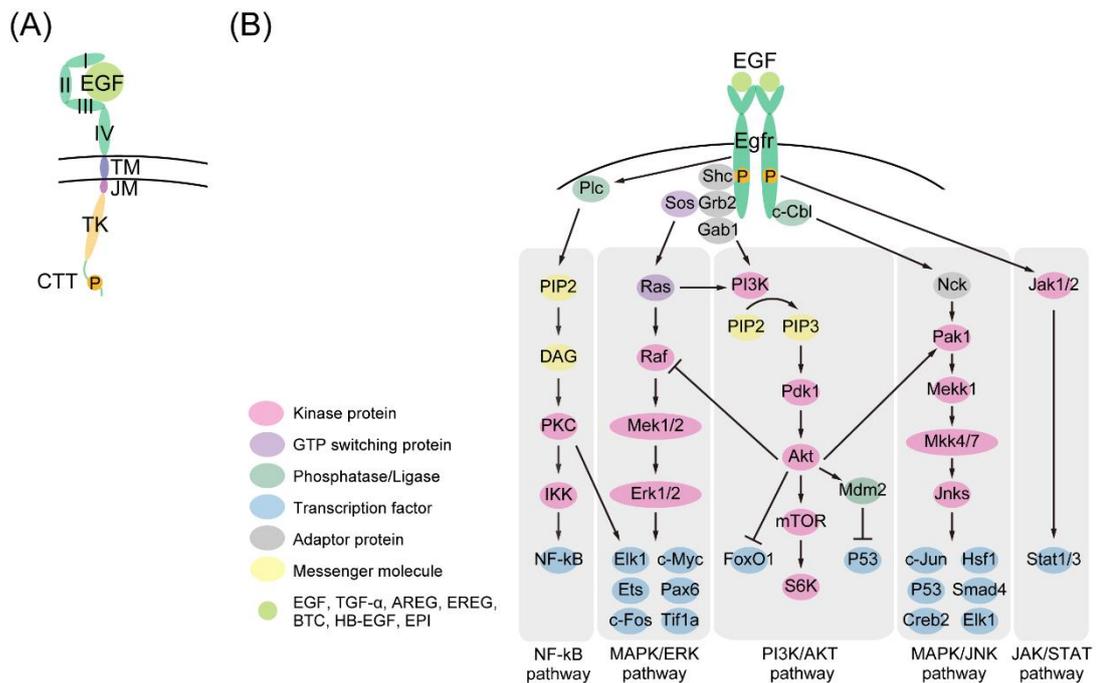


図 1 - 1 Egfr の構造と EGF/Egfr シグナル

(A) Egfr の模式図。4 つの細胞外ドメイン (I, II, III, IV) と膜貫通ドメイン

(transmembrane domain, TM) および膜近傍ドメイン (juxtamembrane domain, JM) と細胞内ドメインに分かれる。細胞内ドメインはさらに、チロシンキナーゼ部位 (tyrosine kinase domain, TK) と C 末端テール (C-terminal tail, CTT) に区別される。細胞外ドメイン I および III 領域に EGF などのリガンドが結合すると、細胞外ドメインの立体構造が変化し、ドメイン II が露出する。露出したドメイン II は、同じくリガンド刺激によって立体構造が変化した Egfr および ErbB ファミリーとダイマーを形成する。ダイマー形成後、細胞質側のチロシンキナーゼ部位が活性化し、CTT 領域の自己リン酸化および相互リン酸化

(Phosphorylation, P) が起こり、下流のシグナルが活性化する。(B) EGF/Egfr シグナルの模式図。複数種のリガンドが同定されており、各種リガンド刺激によって、下流の MAPK 経路や PI3/AKT 経路が活性化する。EGF, epidermal growth factor; TGF-α, transforming growth factor alpha; AREG, amphiregulin; EREG, epiregulin; BTC, betacellulin; HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; EPI, Epigen.

第二章

mTSC の分化運命を制御する

低分子量化合物の同定

序論

特定の低分子量化合物の添加によって、幹細胞の性質が変化することが **mouse embryonic stem cell (mESC)** の **naïve/prime** の状態変化の実験などから証明されている (Silva *et al.*, 2008)。また近年、mESC に 4 種類の化合物 (**human LIF, GSK inhibitor, M2-musculin receptor antagonist, minocycline hydrochloride**) を添加することで、キメラ作製実験において、本来胚体組織にしか分化することができない mESC が、胚体組織および胚体外組織の両方に寄与できる、**extended pluripotent stem cell (EPSC)** へと転換されることも報告されている (Yang *et al.*, 2017)。これらの知見は、低分子量化合物が幹細胞の分化能に影響を及ぼすことを示している。

mTSC においても、分化方向に影響を及ぼす低分子量化合物が数種類報告されている。分化誘導過程の **Retinoic acid** 添加および **Estrogen receptor related receptor beta (Errb)** の化学合成リガンド添加は、mTSC の TGC への分化を促進させる (Yan *et al.*, 2001; Tremblay *et al.*, 2001)。また **Glycogen synthase kinase 3 (Gsk3)** 阻害剤の添加によって、LaT サブタイプの **Syncytiotrophoblast II** への分化が促進されることも明らかとなっている (Zhu *et al.*, 2017)。これらの知見と、*in vivo* 実験の組み合わせから、**Retinoic acid** や **Estrogen** をリガンドとした核移行型ステロイド受容体の機能や、**WNT** シグナルが TGC および LaT への分化に関与すると考えられている (Wendling *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001; Sonderegger *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2017)。

以上の知見のように、mTSC の分化運命に影響を及ぼす低分子量化合物が同定されれば、その作用点や薬理活性から、生体内において特定の栄養膜細胞種への分化に関わる新たな因子を見つけ出す手掛かりとなる。栄養膜細胞分化に関わる新たな因子が同定されれば、正常な胎盤形成を支える未知の分子メカニズムの解明につながる事が期待される。そこで、第二章では、特定の栄養膜細胞種への分化に関わる分子基盤の解明を最終目標とし、第一章とは異なるアプローチとして、mTSC の分化運命を変化させる、新たな低分子量化合物の探索を行った。

以降、学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

第三章

mTSC の分化運命を制御する化合物が
引き起こす遺伝子発現変化の網羅的解析

序論

以降、学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

総合討論

総合討論

以降、学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

材料と方法

材料

試薬類については、特に記載がない場合は和光純薬工業株式会社より購入した。プライマーおよび合成オリゴについては、**Sigma-Aldrich Japan**、**FASMAC** および **Eurofins Genomics** より購入した。各プライマーおよび合成オリゴの塩基配列については、表 I にまとめた。抗体については、購入先と製品情報、希釈濃度などを表 II にまとめた。

方法

以降、学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

参考文献

参考文献

以降、学術論文として発表予定のため、要約中において内容を割愛する。

謝辞

本研究を進めるにあたり、父のように常に温かく見守り、惜しめない助言と指導を下された、指導教員の田中智教授に心より感謝申し上げます。

兄のように身近に立って、親身になって研究や進路の相談にのり助言を下された、早川晃司前特任助教に心より感謝申し上げます。

研究や進路、体調のことなど、母のように様々なことにお心遣いを下された、廣澤瑞子前助教に深く感謝申し上げます。

ミーティングやマンスリーレポートのたびに、的確なご助言をくださり、本研究をまとめるうえでご指導下された、片岡直行准教授に深く感謝申し上げます。

マイクロプレートリーダーをお貸しくださった応用免疫学研究室 後藤康之准教授、抗体をお分けくださった動物細胞制御学研究室 高橋伸一郎教授、研究計画およびデータ解釈を議論してくださった放射線動物科学研究室 村田幸久准教授、qPCR 解析に用いる 96 well プレートおよびプレートシールをお分けくださった獣医生理学研究室 山内啓太郎准教授をはじめとする、本研究を進めるうえで熱心な手助けをしてくださった応用動物科学専攻の先生方に深く感謝申し上げます。

低分子量化合物ライブラリーを無償で提供してくださった、小島宏建博士をはじめとする東京大学総長室管轄下 創薬機構の諸先生方に深く感謝申し上げます。

RNA-seq 解析の共同研究者である、東京農業大学動物発生工学研究室 小川英彦教授並びに生物資源ゲノム解析センター 田中啓介嘱託助教に深く感謝申し上げます。

本研究のために犠牲となったマウスに、深く感謝申し上げます。

快適な研究室生活を過ごさせてくださった、細胞生化学研究室の室員の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、今日まで私を信じ、温かく見守り、自由に研究生活を送らせてくれた両親に心より感謝申し上げます。