

## 審査の結果の要旨

氏名 孫 帥

マウス胎盤の内部には血洞が形成され、そこに流入した母体血が酸素や栄養分を胎子に供給する。マウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) は胎盤を構成する栄養膜細胞の分化制御機構を研究するツールとして用いられてきたが、従来の平面 (2D) 培養では血洞のような三次元構造の形成は再現されず、その形成機構の解明には利用されてこなかった。また、血清を含む従来の培養条件では、血清に含まれる因子の影響の程度が未知であるため、胎盤発生を制御する外因性シグナルを解析し評価するための無血清培養条件の確立が求められていた。3章からなる本論文では、血清代替品 (KSR) を用いた無血清培養条件 (KSR+FHABY 条件; FHABY は添加した因子の頭文字) と、それを応用した浮遊 (3D) 培養法が確立され、その血洞構造形成機構の解析への有用性が検討された。

第一章では、KSR+FHABY 条件が TS 細胞に及ぼす影響を、遺伝子発現プロファイル、DNA メチル化プロファイル、および分化能の面から評価している。まず、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析の結果、KSR+FHABY 条件でも未分化 TS 細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルが保たれていることが明らかにされた。次に、申請者らの研究室で同定されていた、体細胞や ES 細胞に比べ TS 細胞で高くメチル化されているゲノム領域の DNA メチル化状態が調べられ、KSR+FHABY 条件でそれが維持されていることが示された。さらに、分化誘導後のマーカー遺伝子の発現解析から、各マーカー遺伝子の発現上昇が確認された。KSR+FHABY 条件で TS 細胞を接着させるためには、細胞外基質による培養器のコートが必要であったが、細胞が接着する場合には細胞外基質の種類は分化マーカー遺伝子の発現に大きな影響を及ぼさないことも明らかにされた。これらの結果から、KSR+FHABY 条件下でも、TS 細胞は栄養膜細胞の分化メカニズムを解析するツールとして有用であることが示された。

第二章では、KSR+FHABY 条件に基づく 3D 培養条件の確立を試みている。同条件下で、細胞外基質をコートしない培養器上で TS 細胞を培養すると、細胞は接着せず浮遊したまま凝集塊を形成した。それらを解離し再播種することで 3D 継代培養が可能であること、また、この条件下では単一の細胞からも細胞塊が形成されることがまず見出された。この 3D 培養条件下でも、TS 細胞は 2D 培養条件と同等の増殖速度を維持しており、未分化マーカー遺伝子の発現も保たれていた。TS 細胞塊を分化誘導したところ、内部に血洞様の空洞構造の形成が確認された。栄養膜細胞種の 1 つである栄養膜巨細胞 (TGC) にはいくつかのサブタイプが存在し、そ

れらが *in vivo* における血洞形成に関与する可能性が提唱されている。空洞を形成した細胞塊におけるこれらの TGC のマーカー遺伝子の発現を確認したところ、血洞周囲に分布する secondary TGC の分化マーカー遺伝子の発現が、2D 培養に比べ有意に高いことが明らかとなった。すなわち、これらの TGC の分化が促進された可能性が高い。以上、マウス TS 細胞の 3D 無血清培養条件が確立され、それが、胎盤における三次元構造、特に血洞の形成機構の解析に有用である可能性が示された。

第三章では、3D 培養条件で形成された血洞様構造に注目した解析から、3D 培養の有用性を検証している。Notch シグナルは胎盤形成にも重要で、*Notch2* ノックアウト(KO)マウスでは胎盤の異常が主な原因で胎生 11.5 日までに胎子が死亡する。この胎盤では、血洞の形成不全と一部の secondary TGC の減少が報告されている。そこで、3D 培養 TS 細胞塊の分化誘導時に、Notch シグナル阻害剤としてよく用いられる  $\gamma$  セクレターゼの阻害剤である DAPT を添加し、その影響が調べられた。分化 TS 細胞塊における血洞様構造を解析した結果、DAPT 添加群ではその形成が低下すること、および、胎盤の血洞周囲に分布する secondary TGC のマーカー遺伝子の発現量が顕著に低下することが示された。これらの結果は *Notch2* KO 胎盤の表現型をよく再現しており、本研究で確立した 3D 培養条件が、マウス胎盤における血洞形成機構を解析するモデルとして使用できる可能性が示された。

以上、マウス TS 細胞の培養法に、血清成分に左右されない新たな選択肢が提供された。3D 培養条件を使用し、TS 細胞を培養および分化誘導することで、*in vitro* においても胎盤の血洞形成を再現することができた可能性が高く、またそれに関与する栄養膜細胞の遺伝子発現の変化を確認することも可能になった。この系を用いることで、今後、胎盤における血洞形成メカニズムのさらなる解明や、これまで見逃されている可能性のある、胎盤形成における遺伝子機能の解明が進むことが期待される。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。