

博士論文（要約）

マウス栄養膜幹細胞の 3D 培養条件の確立
およびその胎盤発生のモデルとしての検証

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用動物科学専攻 細胞生化学研究室

孫帥

指導教員 田中智

緒言

胎盤は胎子と母体の間で栄養、ガスなどを交換する器官であり、マウス胎盤内部では血洞 (blood sinuses) 構造が形成され、母体の血液が流れている。マウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) は胚盤胞の栄養外胚葉から樹立された幹細胞株で、胎盤発生のメカニズムを解明する強力なツールとして用いられている。しかし、従来の TS 細胞の培養はほとんどの場合平面 (2D) でおこなわれるため、胎盤における立体構造の形成過程は再現されない。また、従来の培養条件では、血清に残存する増殖因子やホルモンなどの影響の程度が未知である。胎盤の発生を制御するシグナルを正確に解析し評価するためには、血清を用いない培養条件の確立が理想的である。

私は修士論文研究において、マウス TS 細胞の無血清培養条件を確立することを目的にし、従来の培養条件に含まれるウシ胎子血清 (FBS) を KnockOut Serum Replacement (KSR) で代替し、fibronectin コートしたディッシュ上で培養する条件を確立した。KSR+FHABY 条件と命名したこの無血清培養条件では、従来用いられる未分化維持因子に加え、レチノイン酸受容体逆作動薬の BMS493 および ROCK 阻害剤 Y-27632 の添加によって血清条件と同等の増殖速度が達成される。そこで本論文では、マウス TS 細胞の無血清 3D 培養系を確立することを第一の目的とした研究を行った。さらにその 3D 培養系が、マウス胎盤における立体構造形成の制御機構を解析するためのモデル系として有用であることを示すことを第二の目的とした解析を行った。

第一章

第一章においては、KSR+FHABY 条件が TS 細胞の性状に及ぼす影響を、TS 細胞の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することとした。そこでまず、KSR+FHABY 条件で維持した TS 細胞 (KSR+FHABY TSC) を RNA-seq に供し、得られたデータを基にクラスタリング解析を行なった結果、KSR+FHABY TSC は血清条件で維持した TS 細胞や、データベース上に他研究者によって RNA-seq デー

タが公開されている TS 細胞とクラスターを形成し、TS 細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを保っていることがわかった。次に、当研究室で同定されている、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 メチル化状態を調べると、KSR+FHABY TSC においても同様のメチル化状態を維持していることが示された。さらに、2 ラインの TS 細胞株を用い、各種栄養膜細胞種への分化能をマーカー遺伝子の発現解析によって評価した。その結果、いずれのラインにおいても全マーカー遺伝子の発現上昇が確認され、KSR+FHABY TSC においても各種栄養膜細胞への分化能が維持されていることが明らかになった。KSR+FHABY 条件で TS 細胞を接着させるためにはディッシュの fibronectin コートが必要である。他の細胞外基質 (ECM) が KSR+FHABY TSC の分化に影響するか解析したところ、少なくとも laminin や collagen I, IV 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が明らかになった。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

第二章では KSR+FHABY 条件に基づく 3D 培養条件の確立を目指した。修士論文研究において、BMS493 および Y-27632 を添加していない無血清培養条件 (KSR+FHA 条件) 下では TS 細胞が通常の細胞培養ディッシュに接着しないまま、少なくとも 24 時間生存していることを見出していた。そこで、KSR+FHABY 条件における TS 細胞の増殖と生存に細胞外基質 (ECM) が必要ではない可能性を予想し、KSR+FHABY 条件を用いて、ペトリディッシュ上で TS 細胞を培養した。その結果、接着せず浮遊したままの TS 細胞は、凝集、もしくはシングルセルの増殖によって細胞塊を形成し、継代培養ができることが明らかになった。この 3D 培養条件でも 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。他の細胞種を用いた解析では、細胞塊が大きいほど組織の立体構造を模した分化を誘導しやすいが、直径が 500 μm を超えると内部でアポトーシスが起これると報告されている。そこで TS 細胞塊を直径約 500 μm まで育て (8 日間)、それら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。分化栄養膜細胞種の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深く関与すると考えられている。そこで、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 qPCR で確認したところ、特に血洞に付随する TGC サブタイプへの分化が促進されたことが示唆された。以上本章では、マウス TS 細胞の 3D 無血清培養条件の確立に成功した。またこの系は、胎盤における立体構造、特に血洞の形成機構の解析に有用であると考えられた。

第三章

第三章では、第二章で確立した 3D 培養条件を用いて血洞様構造に注目した解析を行い、胎盤立体構造の発生プロセスの解析への 3D 培養条件の有用性を検証した。Notch シグナルはほ乳類の胚発生などにおいて重要な役割を果たしている。Notch シグナルでは、隣接する細胞膜上の受容体とリガンド間の相互作用によってシグナル伝達を行うことが知られており、ほ乳類ではこれまで NOTCH 1～4 の 4 種類の Notch 受容体パラログが同定されている。Notch 受容体は一回膜貫通型タンパク質であり、リガンドと結合すると細胞内ドメインが遊離して核内に移行し、転写因子として作用する。細胞内ドメインの切り離しを阻害する DAPT などの試薬が、Notch シグナルを阻害する研究でよく使用されている。Notch 受容体の中でも、Notch1 および Notch2 のマウス胎盤における発現が報告されており、Notch2 ノックアウト（KO）マウスでは胎盤の異常が原因で胎生 11.5 日までに胎子が死亡する。また、Notch2 KO マウスの胎盤では血洞の形成に関わると思われる TGC サブタイプの減少も報告されている。そこで、本章では Notch シグナルと胎盤の血洞形成の関係に注目し、3D 培養 TS 細胞塊の分化誘導時に DAPT を添加し、TS 細胞塊における血洞様構造の形成に与える影響を調べた。DAPT 添加による Notch シグナルの阻害を、Notch シグナルの活性化により転写が促進される Hes1 遺伝子の発現量の減少でまず確認し、続いて 8 日間分化誘導した TS 細胞塊の切片を作製し、血洞様構造の形成を確認した。その結果、DAPT 添加群では血洞様構造の形成が低下することが明らかになった。また、栄養膜細胞の分化マーカー遺伝子の発現を qPCR で調べたところ、血洞に付随する TGC サブタイプのマーカー遺伝子の発現量が顕著に減少し、血洞形成に関わると思われる TGC サブタ

イプへの分化が抑制されたことが示された。この結果から、分化誘導された TS 細胞塊における血洞様構造の形成は、マウス胎盤における血洞形成を解析するモデルとして使用できる可能性を示した。

総括

本研究ではまず KSR+FHABY 条件における TS 細胞の安定な培養および分化誘導ができることを証明した。さらに KSR+FHABY 条件を用いた TS 細胞の 3D 培養条件を確立し、3D 条件が胎盤血洞の形成機構の解析へ使用できることを検証した。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。マウス胎盤における血洞形成のメカニズム、およびそれを制御するシグナルに関する研究はまだ貧しい。また、KO マウスが胚性致死となる遺伝子には、胎子側での機能が研究され、胎盤側の異常の有無も不明なものが多く存在している。本研究で確立した無血清 3D 培養条件は、これらの課題にアプローチするための有力な *in vitro* のツールとなる。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、KO マウスで見逃されている可能性のある各種遺伝子の胎盤形成における機能の解明が進むことが期待される。