

20	ヒト胎盤細胞への運命決定機構の解明	有馬 隆博
----	-------------------	-------

【目的】 桑実胚期に受精後最初の分化が起こり、内部細胞塊 (ICM) と栄養外胚葉 (TE) からなる胚盤胞が形成される。ICM からは多能性幹細胞である胎児性幹細胞 (ES 細胞) が、TE からは胎盤への分化能を持つ胎盤トロフォブラスト幹細胞 (TS 細胞) が樹立される。マウスの ES、TS 細胞の未分化維持と細胞運命決定には、それぞれ OCT3/4 と CDX2 が必須である事が知られているが、将来胎盤となるヒト胚体外細胞系譜への細胞運命決定機構は、ほとんど明らかではない。本研究では、ヒト線維芽細胞、人工多能性幹 (iPS) 細胞に複数の転写因子を導入し、人工 TS 細胞 (iTTS) を作製し、ヒト胚体外細胞への運命がどのような仕組みで決定されているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】 1. ヒトトロフォブラスト細胞への分化を誘導する因子の探索：ヒト iTTS 細胞の誘導に必要な因子の探索は、文献情報や遺伝子の発現データなどをもとに、20 種類の候補因子に絞り込んだ。2. 体細胞への遺伝子導入：サイレンシングが起こりにくい EF1 α プロモーターをもつ pLVSIN-EF1 α ベクターを用い 20 種類のウイルス液を作製し、ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) とヒト iPS 細胞 (理研、BRC より譲渡) に遺伝子導入を行い、TS 細胞の培養条件で継代を繰り返した。

【結果】 1. ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) への遺伝子導入

- 1) 導入遺伝子の発現解析：リアルタイム PCR を用いて 20 種類の導入遺伝子の発現解析を行った。15 因子については、概ね TS 細胞と同等かそれ以上のレベルまで発現量が上昇していた。また、導入遺伝子の発現量は培養を経ても維持されていることを確認した。Day17 の細胞では、GATA3 の発現をタンパク質レベルで確認した。
- 2) 細胞培養と形態観察：TS 細胞は上皮系の細胞で、細胞同士が密に接着し、明瞭なコロニーを形成する。20 因子を導入した NHDF を TS 細胞の培養条件で継代を続けたところ、Day11 には NHDF に比べて明らかに小型の TS 様細胞が出現した。この細胞は増殖能が強く、大きなコロニーを形成した。
- 3) 栄養膜細胞マーカーの発現解析：栄養膜細胞に特異的に発現する未分化マーカー (TP63、GATA3、TEAD4) と分化マーカーヒト絨毛性ゴナドトロピン (CGB) の発現を確認した。

2. ヒト iTTS 細胞への遺伝子導入

GATA3、GATA2、TFAP2A のレンチウイルスをヒト iPS 細胞に 1 遺伝子ずつ導入し、TS 細胞培養条件下で継代培養した。その結果、いずれの遺伝子を導入した細胞も、20 継代以上未分化状態を維持する TS 様細胞を樹立することができた。また、これらの細胞の遺伝子発現パターンは、正常ヒト TS 細胞の遺伝子発現パターンに極めて類似した結果であった。

ヒト iPS 由来 TS 様細胞

