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（iTS）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 iTS 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 EF1αプロモーターをもつ pLVSIN-EF1α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。

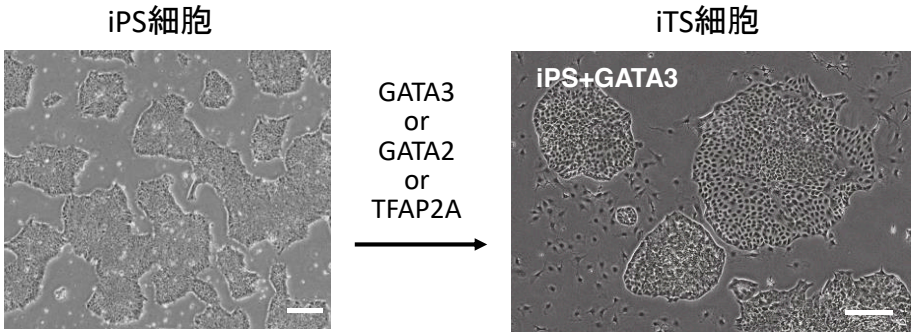
2）細胞培養と形態観察：TS 細胞は上皮系の細胞で、細胞同士が密に接着し、明瞭なコロニーを形成する。20 因子を導入した NHDF を TS 細胞の培養条件で継代を続けたところ、Day11 には NHDF に比べて明らかに小型の TS 様細胞が出現した。この細胞は増殖能が強く、大きなコロニーを形成した。

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 iTS 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



20. ヒト胎盤細胞への運命決定機構の解明

有馬　隆博

東北大学 大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

Key words：ヒト胎盤幹（TS）細胞，細胞系譜，人工栄養膜幹（iTS）細胞，人工多能性幹（iPS）細胞

緒　言

哺乳類では、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。ICM と TE は同じゲノム配列を持つにも関わらず、全く異なる発生運命を辿る。これには、転写因子のネットワークとエピジェネティックな修飾機構が関与すると考えられている。最近我々は、ヒト胚盤胞から TS 細胞を樹立することに世界で初めて成功した［1］。この細胞は、培養液に数種類の小分子化合物と増殖因子を添加することにより、安定に長期間（80 継代以上）未分化状態を維持する自己複製能を示す。また、培養条件を変えるとホルモン分泌や栄養・ガス交換を担う合胞体栄養膜（ST）細胞や子宮内膜への浸潤能を有する絨毛外栄養膜（EVT）細胞へと分化する多分化能を示す。これまでヒト胚体外細胞（将来胎盤となる）の運命決定が、どのような仕組みで行われているのかほとんど明らかになっていない。本研究では、ヒト TS 細胞の培養条件と遺伝子情報を活用し、体細胞に遺伝子を導入したヒト人工栄養膜幹（iTS）細胞を作製し、ヒト胎盤形成に必須の転写因子を明らかにすることを目的とした。

方法および結果

1. ヒトトロフォブラストへの分化を誘導する因子の探索

ヒト iTS 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行い、20 種類の候補因子を絞り込んだ。GATA3、TFAP2C はマウス iTS 細胞の誘導に必須であり、ヒトでも栄養膜細胞での重要性が示唆されている［2］。MYC は、マウス iTS 細胞の誘導効率を高める［3］。ELF5 は、マウス ES 細胞を TS 細胞へと分化転換させる能力を持つ［4］。TEAD4 もマウスにおいて ES 細胞から TS 細胞へ分化転換させる能力をもち、TE と ICM の運命決定に重要な因子である［5］。VGLL1 は TEAD4 のコアクチベーターの一種であり、ヒト胎盤において未分化な栄養膜細胞特異的に発現する［6］。TP63 は上皮幹細胞のマスターレギュレーターであり、ヒト胎盤において、未分化な栄養膜細胞特異的に発現することが示されている［7］。ZNF750 と CBX4 は、TP63 の重要なターゲットであることが報告されている［8］。GATA2、TFAP2A は、ヒト ES 細胞から栄養膜系列の細胞への分化を誘導することが報告されている［2］。加えて、皮膚繊維芽細胞（NHDF）と比べ、TS 細胞で 5 倍以上の発現量を示す 20 遺伝子を抽出し、候補遺伝子とした。

2. ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）への遺伝子導入

1）レンチウイルスを用いた遺伝子導入

初代培養細胞や幹細胞では、CMV プロモーターなどのウイルス由来のプロモーターはサイレンシングを受けやすいことが報告されている［9］。そこで、本研究ではサイレンシングが起こりにくい EF1α プロモーターをもつ pLVSIN-EF1α ベクターを用いた。作製した 20 種類のウイルス液を、60 mm ディッシュで培養している NHDF に加え、遺伝子導入を行った。Day2 で継代し、TS 細胞の培養条件で培養を続けた（図 1）。

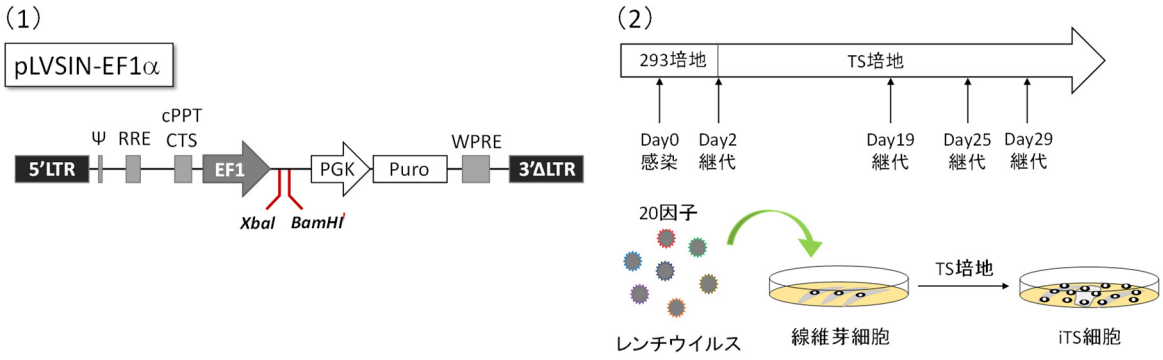


図 1. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験

(1) pLVSIN-EF1α を用いた遺伝子導入。

(2) 20 の遺伝子について、それぞれレンチウイルスを作製し、培養中の NHDF に対し全て遺伝子導入し（Day0）、TS 細胞の培養条件で継代培養した。

2）導入遺伝子の発現解析

20 因子を導入した NHDF（20F-NHDF）を回収し、リアルタイム PCR 法を用いて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の発現量を示した。しかし、残りの 5 因子（GATA2、MSX2、TFCP2L1、RNF19B、FOXO4）については発現量が TS 細胞の 1/10 以下であり、十分な発現上昇が見られなかった。Day2 と Day19 で非常に良く似た結果が得られたことから、導入遺伝子の発現量は培養を経ても維持されていると推測された。さらに、Day17 の細胞を用いて GATA3 の免疫染色を行い、タンパク質レベルでの発現を確認した（図 2）。

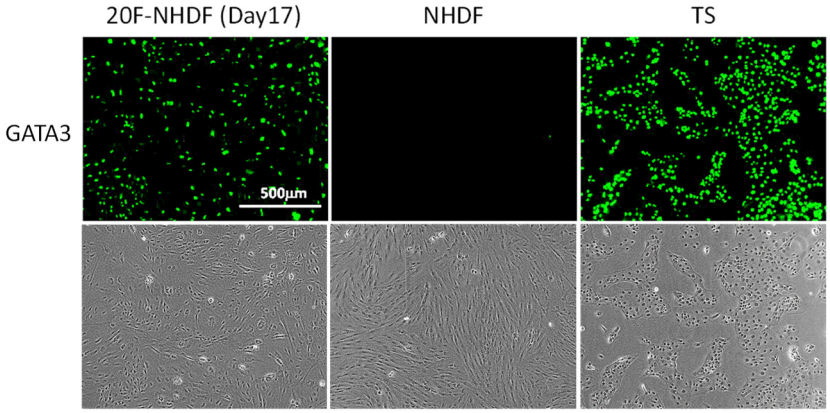


図 2. 20F-NHDF における GATA3 の発現

Day17 の 20F-NHDF、NHDF、TS 細胞を用い、GATA3 免疫染色を行った。

20F-NHDF は強陽性を示した。

3）細胞培養と形態観察

NHDF は紡錘形の形態を示し、細胞間の接着は弱い傾向であった。一方、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していた。20F-NHDF を継代して TS 細胞の培養条件で培養を続けたところ、Day11 には、NHDF に比べて小さい TS 様細胞が出現した。この細胞は増殖能が高く、大きなコロニーの形成を認めた。

4）栄養膜細胞マーカーの発現解析

栄養膜細胞の分化に特異的に発現するヒト絨毛性ゴナドトロピン（Human chorionic gonadotropin: hCG）のβサブユニット CGB の発現量を解析した。Day17 の細胞を用いて、リアルタイム PCR によって発現解析を行ったところ、CGB の発現上昇が見られた。未分化マーカー（TP63、GATA3、TEAD4）の発現も確認した。

3. ヒト人工多能性幹（iPS）細胞への遺伝子導入

次に、レンチウイルスをヒト iPS 細胞（理研、BRC より譲渡）（60 mm ディッシュ）に導入した。一度に大量のウイルスを感染させると細胞毒性を示す可能性があるため、まず前述の 20 因子を導入した。Day2 に継代し、TS 細胞の培養条件で培養を続け、その後 Day8 にも継代を行った。計 24 日間培養を行い、TS 細胞様のコロニーの形成が確認された。さらに iPS 細胞に GATA3、GATA2、TFAP2A のいずれかの遺伝子を導入するだけで 20 継代以上未分化状態を維持することのできる TS 様細胞を樹立することに成功した（図 3）。また、これらの細胞の遺伝子発現パターンは、TS 細胞に極めて類似した結果であった（図 4）。

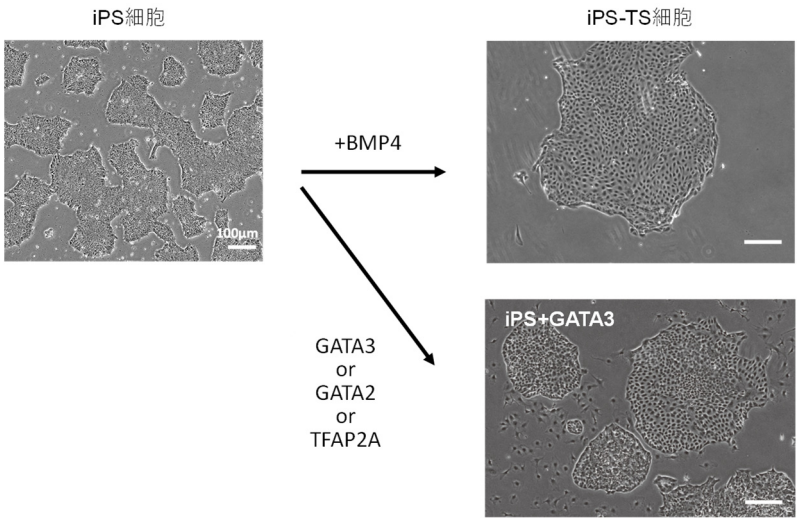


図 3. ヒト iPS 由来 TS 細胞

GATA3、GATA2、TFAP2A のいずれかの遺伝子を導入と、TS 細胞様の形態を示すコロニーの形成がみられた。

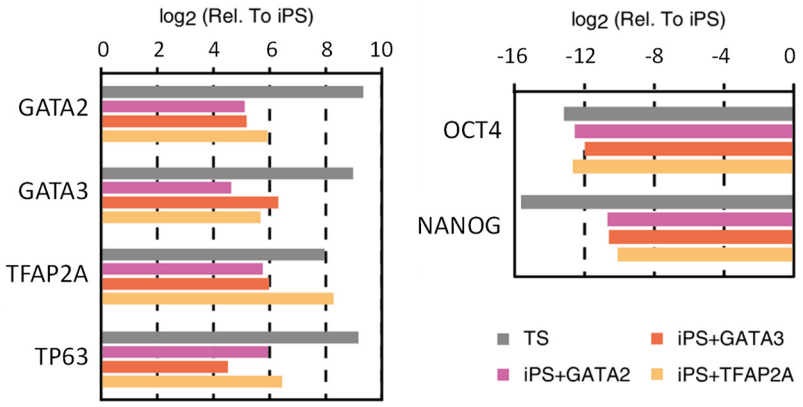


図 4. ヒト iPS 由来 TS 細胞の遺伝子発現

ヒト iPS 由来 TS 細胞の遺伝子発現は、正常 TS 細胞の遺伝子発現と極めて類似していた。iPS の発現量を log2（1）としたときの遺伝子発現の比較を示す。

考　察

哺乳類の受精卵は、最初の細胞分化を経て、内部細胞塊（ICM）と栄養外胚葉（TE）から成る胚盤胞を形成する。このうち TE は胎盤を構成する栄養膜細胞への分化能を持ち、TE を適切な条件で培養すると栄養膜幹（TS）細胞を樹立することができる。最近、TE への運命決定を制御する転写因子をマウスの線維芽細胞に導入することで、人工 TS（iTS）細胞を樹立できることが報告された。しかし、ヒトでは TE への運命決定機構は不明であり、ヒト iTS 細胞の樹立の報告もない。本研究では、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いてヒト体細胞から iTS 細胞の誘導を試みた。まず、過去文献と RNA-sequencing による遺伝子発現データを参照し、候補となる因子を絞り込み、効果的な遺伝子導入について検討した。その結果、ヒト iPS 細胞に GATA3、GATA2、TFAP2A のいずれかの遺伝子を導入し、ヒト TS 細胞に形態的および機能的に類似した iTS 細胞の樹立に成功した。この手法は東北大より国際特許として出願した（PCT 特許出願 PCT/JP2019/023725）。さらに、この細胞の特性を明らかにするため、TS 細胞との相違点を明らかにした。これらの TS 様細胞は、ヒト胎盤の発生メカニズムを探るツールとして有用であると考えられる。胎盤は、胎児への栄養や酸素などを供給するだけでなく、母体の免疫系から胎児を守る役割「免疫特権」を担っている。この iTS 細胞が有する細胞特性を活用すれば、再生医療へと応用できると期待される。例えば、がん免疫治療を行う際のリンパ球や NK 細胞などの安全かつ迅速な大量培養、ヒト TS 細胞の生理活性作用を活用した現代女性特有の心身の疾患（思春期の月経前緊張症（PMS）や更年期障害（骨粗鬆症など）、黄体機能不全症に対する治療法の開発への取り組みにも発展することが期待できると考えている。また、胎盤の構造や機能が齧歯類とヒトではかなり種差があるので、従来の実験動物を用いた既存の安全性毒性試験法では、ヒトにおける発生毒性を正確に評価できない。我々は、マイクロ流路デバイス内に形成させた潅流可能な毛細血管網とヒト TS 細胞を共培養し、幹細胞ニッチと血液胎盤関門を精密に制御することで、胎盤臓器チップを開発し、ヒト発生生殖毒性試験法として応用することを目標としている。これらの細胞や技術の開発により、新しい創薬開発や再生医療に貢献することを目指し、今後も研究を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

最後に本研究は、平成 30 年度公益財団法人上原記念生命科学財団の助成交付金により行いました。本研究を実施する機会を与えて頂きました関係者の皆様に深謝致します。

文　献

1） Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, Kabayama Y, Suyama M, Sasaki H, Arima T. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. Cell Stem Cell. 2018 Jan 4;22(1):50-63.e6. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29249463 DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.004

2） Krendl C, Shaposhnikov D, Rishko V, Ori C, Ziegenhain C, Sass S, Simon L, Müller NS, Straub T, Brooks KE, Chavez SL, Enard W, Theis FJ, Drukker M. GATA2/3-TFAP2A/C transcription factor network couples human pluripotent stem cell differentiation to trophectoderm with repression of pluripotency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Nov 7;114(45):E9579-E9588. Epub 2017 Oct 25. PMID: 29078328 DOI: 10.1073/pnas.1708341114

3） Lin CY, Lovén J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. Cell. 2012 Sep 28;151(1):56-67. PMID: 23021215 DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.026

4） Latos PA, Goncalves A, Oxley D, Mohammed H, Turro E, Hemberger M. Fgf and Esrrb integrate epigenetic and transcriptional networks that regulate self-renewal of trophoblast stem cells. Nat Commun. 2015 Jul 24;6:7776. PMID: 26206133 DOI: 10.1038/ncomms8776

5) Home P, Saha B, Ray S, Dutta D, Gunewardena S, Yoo B, Pal A, Vivian JL, Larson M, Petroff M, Gallagher PG, Schulz VP, White KL, Golos TG, Behr B, Paul S. Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 May 8;109(19):7362-7. Epub 2012 Apr 23. PMID: 22529382 DOI: 10.1073/pnas.1201595109

6) Soncin F, Khater M, To C, Pizzo D, Farah O, Wakeland A, Arul Nambi Rajan K, Nelson KK, Chang CW, Moretto-Zita M, Natale DR, Laurent LC, Parast MM. Comparative analysis of mouse and human placentae across gestation reveals species-specific regulators of placental development. Development. 2018 Jan 29;145(2). pii: dev156273. PMID: 29361559 DOI: 10.1242/dev.156273

7) Li Y, Moretto-Zita M, Leon-Garcia S, Parast MM. p63 inhibits extravillous trophoblast migration and maintains cells in a cytotrophoblast stem cell-like state. Am J Pathol. 2014 Dec;184(12):3332-43. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25307348 DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.08.006

8) Mardaryev AN, Liu B, Rapisarda V, Poterlowicz K, Malashchuk I, Rudolf J, Sharov AA, Jahoda CA, Fessing MY, Benitah SA, Xu GL, Botchkarev VA. Cbx4 maintains the epithelial lineage identity and cell proliferation in the developing stratified epithelium. J Cell Biol. 2016 Jan 4;212(1):77-89. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26711500 DOI: 10.1083/jcb.201506065

9) Liu J, Jones KL, Sumer H, Verma PJ. Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. Mol Reprod Dev. 2009 Jun;76(6):580-6. PMID: 19034957 DOI: 10.1002/mrd.20983