



Effect of a FOXO1 inhibitor on trophoblast differentiation from human pluripotent stem cells and ERV-associated gene expression

田中，恵里加

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2024-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9040号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496321>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Effect of a FOXO1 inhibitor on trophoblast differentiation from human pluripotent stem cells and ERV-associated gene expression

ヒト多能性幹細胞からの栄養膜細胞への分化と内在性レトロウイルス（ERV）関連遺伝子発現に
対する FOXO1 阻害剤の効果

（指導教員：神戸大学大学院医学研究科産科婦人科学分野 寺井 義人 特命教授）

田中 恵里加

【要旨】

背景:ヒトの胎盤発生では、受精後 5 日目の胚盤胞に栄養外胚葉(trophectoderm、以下 TE と略)が出現し、着床後は、細胞性栄養膜細胞(cytotrophoblast、以下 CT と略)、合胞体栄養膜細胞(syncytiotrophoblast、以下 ST と略)、絨毛外栄養膜細胞(extravillous trophoblast、以下 EVT と略)の 3 種類の栄養膜細胞(以下 trophoblast)へ発育する。妊娠初期の胎盤機能障害は、胎児発育遅延や妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症を引き起こすことが知られているが、これらのメカニズムは依然として不明な点が多い。この理由として、妊娠初期におけるヒト胚盤胞や trophoblast の検体が得られにくいことが一つ挙げられる。しかしながら、近年ヒト多能性幹細胞(pluripotent stem cells、以下 PSC と略)からヒト栄養膜幹細胞(trophoblast stem cells、以下 TSC と略)や trophoblast を *in vitro* で作製できたことが報告されたことにより、妊娠初期の検体が得られにくいという問題は克服され、量的制限なしに十分な TSC や trophoblast 様細胞を作製することが可能となった。このヒト PSC 技術の利点を生かして、いまだ理解されていない点の多い TE の初期発生過程、すなわち「着床前」の状態について解明することが特に重要であると我々は考えた。

マウスの胚盤胞における TE 形成においては、転写因子である Cdx2 の発現上昇が重要であることが報告されている。また、ヒトでは PSC から trophoblast への分化において、CDX2 の発現が陽性になることが知られている。CDX2/Cdx2 は TE では発現するが内部細胞塊では発現しないという点や、胎盤形成期において「着床前」にのみ発現するという点が、ヒトとマウスで類似していることから、ヒトの「着床前」の時期に焦点をあてる我々の研究においても、「CDX2」を重要な指標として用いた。Cdx2 の発現は、マウス ES 細胞における Foxo1 のノックダウンによって上昇することが報告されている。FOXO1 は FOXO サブファミリーのフ

オークヘッド転写因子であり、細胞の分化、代謝、増殖、生存など様々な細胞機能を制御している。しかし、FOXO1 がヒトの TE および trophoblast への分化に及ぼす影響については不明であった。

目的: ナイーブ型のヒト人工多能性幹細胞 (naive induced pluripotent stem cells: 以下ナイーブ型 iPS 細胞) からの TE および trophoblast への分化に対する FOXO1 阻害の効果を調べる。

方法: ヒトのプライム型 iPS 細胞からドーム状のコロニーを形成するナイーブ型 iPS 細胞を誘導し、その後、TE および trophoblast へ分化できるかを確認した。続いて、TE および trophoblast への分化における FOXO1 阻害剤の役割を明らかにするために、FOXO1 阻害剤の存在下または非存在下で、ナイーブ型 iPS 細胞から TE へ分化誘導を行った。得られた TE 細胞から、以降は FOXO1 阻害剤を用いずに、さらに trophoblast への分化誘導を行った。これらの過程で得られた細胞について、位相差顕微鏡にて細胞の形態を評価、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) と定量的 RT-PCR (RT-qPCR) にて遺伝子発現について評価、フローサイトメトリーでの TE の細胞表面マーカー遺伝子の評価、免疫クロマトグラフィーと化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) を用いてヒト絨毛性ゴナドトロピン (human Chorionic Gonadotropin、略称 hCG) の分泌の評価を行い、TE 段階での FOXO1 阻害剤の存在下および非存在下においてどのような違いがあるかを比較した。さらに RNA シーケンス解析により、ナイーブ型 iPS 細胞および上記の分化誘導細胞について、網羅的に遺伝子発現の解析を行った。

結果:我々はヒトのプライム型 iPS 細胞からナイーブ型 iPS 細胞を樹立することができた。我々が樹立したナイーブ型 iPS 細胞では、ナイーブ型 iPS 細胞に特徴的なドーム状のコロニーを形成しており、プライム型 iPS 細胞ではと比較して、ナイーブ型関連マーカーNANOG と KLF4 の発現が増加し、プライム型関連マーカーSOX1 と c-Myc の発現が減少していた。次に、ナイーブ型 iPS 細胞からの TE への分化誘導を行ったところ、qPCR により、分化した細胞が TE マーカー遺伝子である CDX2 および HAND1 を発現していることが示された。さらに、TE 様細胞を CT、ST、EVT に分化させたところ、それぞれ、CT マーカーSIGLEC6、ST マーカーCGB7、EVT マーカーHLA-G の発現上昇をみとめた。これらの結果から、ナイーブ型 iPS 細胞から、TE や trophoblast lineages (CT, ST, EVT)への分化誘導の系を新たに確立できたことを確認できた。

次に、ナイーブ型 iPS 細胞からの trophoblast への分化に対する FOXO1 阻害剤の効果を評価するために、TE までの分化誘導の3日間においてFOXO1 阻害剤を添加した。FOXO1 阻害剤の添加によってTE マーカーであるCDX2 や HAND1 の発現が上昇したが、一方で、ST マーカーである ERVW1 (Syncytin-1) や GCM1、EVT マーカーである HLA-G の発現は減少した。さらに TE 期の FOXO1 阻害剤処理によって、ST で分泌される hCG も著明に減少した。FOXO1 阻害剤の処理により、TE マーカーである CDX2 および HAND1 が増加したが、ST および EVT への分化が抑制されたことについて、詳しく知るために、さらにTE について解析を行った。フローサイトメトリー分析において FOXO1 阻害剤で処理した TE 細胞の方が、FOXO1 阻害剤で処理をしていない TE 細胞よりも、「早期 TE マーカーである TACSTD2 が陽性」かつ「後期 TE マーカーである ENPEP が陰性の細胞」(TACSTD2+

ENPEP-細胞)の割合が高かった。このことから FOXO1 阻害剤による処理は、TE の初期段階から後期段階への移行を阻害することが示唆された。さらに RNA シーケンス解析を行ったところ、FOXO1 阻害剤で処理した TE 細胞から trophoblast に分化誘導して得られた細胞は、ERVW1 (Syncytin-1)、ERVFRD-1 (Syncytin-2)、および絨毛細胞で発現が報告されている他の内在性レトロウイルス (ERV) 関連遺伝子の発現が抑制されていた。

結論: ナイーブ型 iPS 細胞からの TE への分化誘導時に FOXO1 阻害剤を投与すると、早期の TE 分化は促進されるが、ST および EVT への分化の進行は阻害される。ERV 関連遺伝子の抑制がこの過程に関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3419 号	氏 名	田中恵里加
論文題目 Title of Dissertation	ヒト多能性幹細胞からの栄養膜細胞への分化と内在性レトロウイルス (ERV) 関連遺伝子発現に対する FOXO1 阻害剤の効果 Effect of a FOXO1 inhibitor on trophoblast differentiation from human pluripotent stem cells and ERV-associated gene expression		
審査委員 Examiner	主 査 小川 玲 Chief Examiner 副 査 根本 秀樹 Vice-examiner 副 査 野津 寛之 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

ヒトの胎盤発生では胚盤胞に trophoblast (TE) が出現し、着床後は cytotrophoblast (CT)、syncytiotrophoblast (ST)、extravillous trophoblast (EVT) の3種類の栄養膜細胞へ発育する。妊娠初期の胎盤機能障害は妊娠合併症を引き起こすことが知られているが、このメカニズムは不明な点が多い。近年ヒト多能性幹細胞からのヒト栄養膜幹細胞 trophoblast stem cells や trophoblast の作製が報告され、TE の初期発生過程の解析に有用な情報を与える可能性が注目されている。また、TE の機能に重要と考えられる転写因子 CDX21 の発現に Foxo1 の機能抑制が関わる可能性も報告されている。これを踏まえ、申請者はナイーブ型のヒト人工多能性幹細胞（ナイーブ型 iPS 細胞）からの TE および trophoblast への分化に対する FOXO1 阻害の効果を検討した。

申請者はヒトのプライム型 iPS 細胞からナイーブ型 iPS 細胞を樹立した。樹立したナイーブ型 iPS 細胞では、ナイーブ型 iPS 細胞に特徴的なドーム状のコロニーを形成しており、プライム型 iPS 細胞と比較して、ナイーブ型関連マーカー NANOG と KLF4 の発現が増加し、プライム型関連マーカー SOX1 と c-Myc の発現が減少していた。ナイーブ型 iPS 細胞からの TE への分化誘導を行ったところ、qPCR により、分化した細胞が TE マーカー遺伝子である CDX2 および HAND1 を発現していることが示された。さらに、TE 様細胞を CT、ST、EVT に分化させたところ、それぞれ、CT マーカー SIGLEC6、ST マーカー CGB7、EVT マーカー HLA-G の発現上昇をみとめた。これらの結果から、ナイーブ型 iPS 細胞から、TE や trophoblast lineages (CT, ST, EVT) への分化誘導の系を新たに確立できたことが確認できた。

次に、ナイーブ型 iPS 細胞からの trophoblast への分化に対する FOXO1 阻害剤の効果を評価するために、TE までの分化誘導の3日間において FOXO1 阻害剤を添加した。FOXO1 阻害剤の添加によって TE マーカーである CDX2 や HAND1 の発現が上昇したが、一方で、ST マーカーである ERVW1 (Syncytin-1) や GCM1、EVT マーカーである HLA-G の発現は減少した。さらに TE 期の FOXO1 阻害剤処理によって、ST で分泌される hCG も著明に減少した。FOXO1 阻害剤の処理により、TE マーカーである CDX2 および HAND1 が増加したが、ST および EVT への分化が抑制されたことについて、更に詳細を明らかにするために、TE についての解析を行った。フローサイトメトリー分析において FOXO1 阻害剤で処理した TE 細胞の方が、FOXO1 阻害剤で処理をしていない TE 細胞よりも、「早期 TE マーカーである TACSTD2 が陽性」かつ「後期 TE マーカーである ENPEP が陰性の細胞」（TACSTD2+ ENPEP- 細胞）の割合が高かった。このことから FOXO1 阻害剤による処理は、TE の初期段階から後期段階への移行を阻害することが示唆された。さらに RNA シーケンス解析を行ったところ、FOXO1 阻害剤で処理した TE 細胞から trophoblast に分化誘導して得られた細胞は、ERVW1 (Syncytin-1)、ERVFRD-1 (Syncytin-2)、および絨毛細胞で発現が報告されている他の内在性レトロウイルス (ERV) 関連遺伝子の発現が抑制されていた。以上の結果から、ナイーブ型 iPS 細胞からの TE への分化誘導時に FOXO1 阻害剤を投与すると、早期の TE 分化は促進されるが、ST および EVT への分化の進行は阻害されることが明らかとなった。また、この過程には ERV 関連遺伝子の抑制が関与している可能性が示唆された。

本研究は ヒトナイーブ型 iPS 細胞から TE および trophoblast への分化過程について解析し、従来ほとんど検討が行われていなかった Foxo1 経路の意義を明らかとしたものとして、価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。