

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10657

研究課題名(和文) ヒト胎盤特異的インプリント遺伝子の網羅的探索とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Genomic imprinting in the human placenta

研究代表者

岡江 寛明 (Okae, Hiroaki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10582695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムインプリンティング機構は、哺乳類の胎盤発生に重要な役割を果たす。本研究では、ヒト胎盤におけるインプリント遺伝子の網羅的探索を行い、44の新規インプリント遺伝子を同定することに成功した。このうち少なくとも27遺伝子については、DNAメチル化による制御が強く示唆された。本研究で同定した新規インプリント遺伝子の大部分は、マウスやラバの胎盤ではインプリンティングを受けていないことから、胎盤におけるインプリンティング制御は種間で多様であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genomic imprinting is essential for normal placental development. Here we conducted a genome-wide survey of imprinted genes in the human placenta and identified 44 novel imprinted genes. At least 27 of them were likely to be regulated by DNA methylation. Most of the novel imprinted genes were not imprinted in mouse or mule placenta, suggesting that genomic imprinting in the placenta is highly variable among mammalian species.

研究分野：分子生物学、エピジェネティクス

キーワード：ゲノムインプリンティング 胎盤 次世代シーケンサー DNAメチル化 栄養膜幹(TS)細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムインプリンティングとは、一群の遺伝子が母親もしくは父親由来アレル特異的に発現する現象である。インプリント遺伝子の片親性発現は、アレル特異的 DNA メチル化により制御され、哺乳類の正常な胚発生に必須である。特に胎盤では胎児に比べて多くの遺伝子がインプリンティングを受けており、その発現異常が胎盤形成異常のみならず、胎児発育不全や過成長の原因となることが知られていた。

(2) 申請者は次世代シーケンサーを用い、マウス胎盤におけるインプリント遺伝子を網羅的に同定することに成功した。(Okada et al. Hum. Mol. Genet. 2012, 2014)。しかし、マウスの胎盤特異的インプリント遺伝子の大部分はヒト胎盤ではインプリンティングを受けておらず、ヒト胎盤におけるインプリント遺伝子の全体像は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト胎盤特異的インプリント遺伝子の網羅的探索とその制御機能の解明である。具体的には、以下の3点を明らかにする。ヒト胎盤より単離した栄養膜細胞を用いてアレル特異的な遺伝子発現解析を行い、ヒト胎盤におけるインプリント遺伝子を網羅的に同定する。アレル特異的な DNA メチル化解析を行い、同定した新規インプリント遺伝子の発現制御機構を明らかにする。

他の動物種との比較から、胎盤特異的インプリント遺伝子の進化的保存性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト胎盤特異的インプリント遺伝子の網羅的探索：

母体細胞のコンタミネーションの影響を除くため、初期胎盤(7-10週)より CD49f 陽性の栄養膜細胞を 95%以上の純度で単離した。単離した栄養膜細胞および母体血よりゲノム DNA を抽出し、エキソーム解析を行った。得られたデータを用い、アレル特異的な遺伝子発現解析に必要な塩基多型(SNP)を同定した。さらに、栄養膜細胞より RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。RNA-seq データと SNP 情報を統合し、アレル特異的な遺伝

子発現解析を行った。

(2) ヒト胎盤特異的インプリント遺伝子の制御機構の解明：

栄養膜細胞および母体血のゲノムシーケンスを行い、アレルの区別に必要な SNP を同定した。次に、栄養膜細胞より抽出したゲノム DNA を用い、バイサルファイトシーケンス(BS)解析を行った。BS データと SNP 情報を統合し、アレル特異的な DNA メチル化解析を行った。

(3) 胎盤特異的インプリント遺伝子の進化的保存性の解明：

ヒト、マウス、ラバの胎盤の RNA-seq データを比較し、胎盤特異的インプリント遺伝子の進化的保存性を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト胎盤におけるインプリント遺伝子の同定：

計 21 検体の初期胎盤より栄養膜細胞を単離し、アレル特異的な遺伝子発現解析を行った。その結果、全発現遺伝子のうち約 75% (計 9007 遺伝子)について、アレル特異的な発現データを取得することに成功した。このうち、父方アレルもしくは母方アレル特異的に発現するものは 79 遺伝子であった。79 遺伝子のうち 35 遺伝子は既知インプリント遺伝子であった。よって、44 の新規インプリント遺伝子を同定することに成功した。

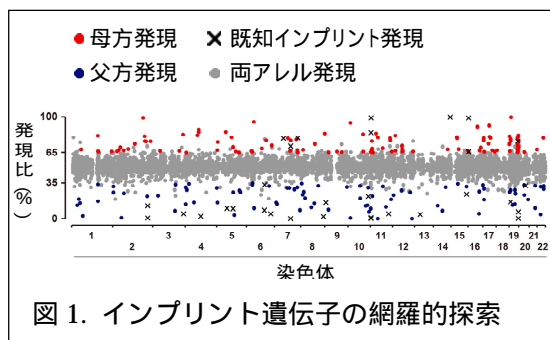
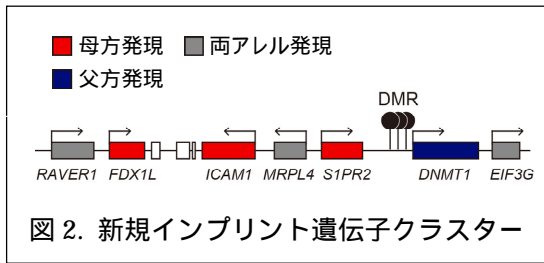


図 1. インプリント遺伝子の網羅的探索

(2) インプリント遺伝子クラスターの同定：

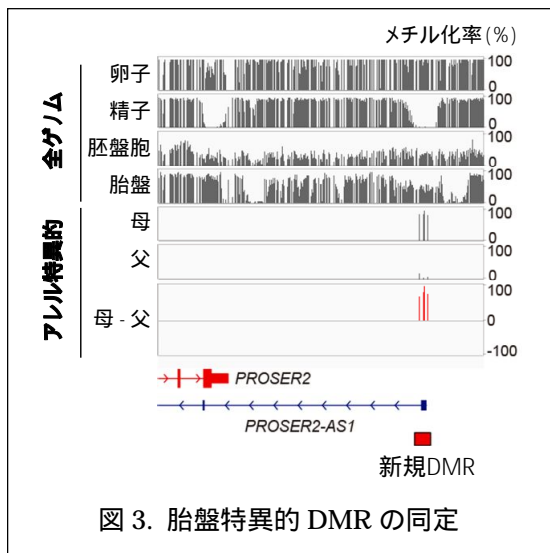
アレル特異的な遺伝子発現解析の結果、3つの新規インプリント遺伝子クラスターを同定した。いずれのクラスターも父方発現遺伝子と母方発現遺伝子の両方を含んでいた。また、このうち1つには、DNA メチル化制御に重要な DNMT1 が含まれていた(図 2)。この

知見は、胎盤が他の組織に比べて低メチル化状態にあることと一致している。



(3) ヒト胎盤におけるアレル特異的メチル化領域 (DMR) の同定：

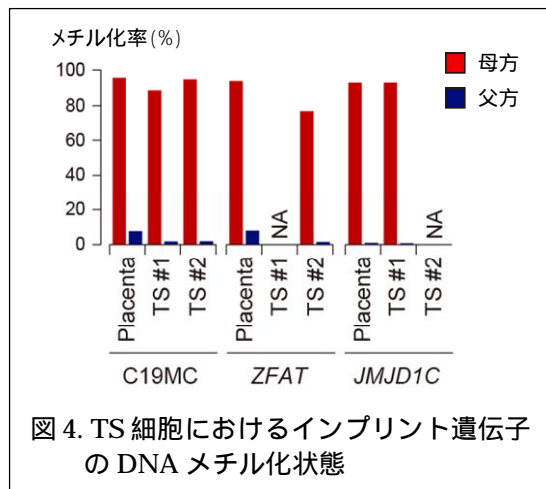
計 13 検体の胎盤を用い、アレル特異的な DNA メチル化解析を行った。その結果、母方アレル特異的にメチル化を受ける領域を 484 同定した。このうち 44 領域が既知 DMR、残り 440 領域が新規 DMR であった。一方、父方アレル特異的にメチル化を受ける領域は H19-DMR のみであった。大部分の新規 DMR は、ES 細胞や血液細胞ではインプリンティングを受けていなかった。遺伝子発現データとメチロームデータを統合することで、44 の新規インプリント遺伝子のうち少なくとも 27 遺伝子について、近傍に DMR が存在することを確認した (図 3)。これらの遺伝子のアレル特異的発現は、DNA メチル化によって制御されている可能性が高い。一方、他の 17 遺伝子については、DNA メチル化以外の制御機構の存在が示唆された。



(4) ヒト TS 細胞を用いた胎盤特異的インプリント遺伝子の解析：

申請者らが樹立に成功したヒト栄養膜幹 (TS) 細胞を用い、胎盤特異的インプリント

遺伝子の解析を行った。まず、一ヵ月以上培養を行った 2 系統の TS 細胞よりゲノム DNA を抽出し、BS 解析を行った。次に、既知の胎盤特異的インプリント遺伝子のうち、近傍に DMR を持つ 33 遺伝子に着目して DNA メチル化状態を解析した。その結果、70-80% の遺伝子が中程度のメチル化状態を維持していることを見出した。このうち 10 遺伝子については、アレルを区別するために必要な一塩基多型が存在し、うち 9 遺伝子がアレル特異的な DNA メチル化状態を維持していることを確認した (図 4)。以上より、ヒト TS 細胞は、胎盤特異的なインプリント制御機構を解析するための優れたモデルとなると考えられる。



(5) 胎盤特異的インプリント遺伝子の進化的保存性：

既存のマウスおよびラバ胎盤の RNA-seq データを用い、ヒト胎盤特異的インプリント遺伝子のオーソログ遺伝子について、アレル特異的な発現解析を行った。その結果、本研究で同定した新規インプリント遺伝子の大部分は、マウスおよびラバの胎盤ではインプリンティングを受けていないことが明らかとなった。同様に、マウスおよびラバの胎盤特異的インプリント遺伝子の大部分についても、種特異的であることを確認した。よって、胎盤におけるインプリンティング制御は、種によって大きく異なると考えられる。

(6) シーケンスデータの登録：

得られた成果を論文化するとともに (Cell Stem Cell. 2018, Am J Hum Genet. 2016)、エキソーム解析、RNA-seq 解析、BS 解析によつ

て得られた配列データは、国立遺伝学研究所 DDBJ Sequence Read Archive に登録し、公開した(ID: JGAS00000000038, JGA00000000074, JGA00000000117, JGA00000000122)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

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*. 22(1):50-63. 2018, 査読有
DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.004

Hiura H, Hattori H, Kobayashi N, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Kitamura A, Kikuchi H, Yoshida H, Arima T. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from frozen-thawed blastocyst transfer. *Clinical Epigenetics*. 9:79. 2017, 査読有
DOI: 10.1186/s13148-017-0379-6

Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. *Sci Rep*. 7:42336. 2017, 査読有
DOI: 10.1038/srep42336

Stunnenberg HG; International Human Epigenome Consortium (Arima T, Okae H), Hirst M. The International Human Epigenome Consortium: A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery. *Cell*. 167(5):1145-1149. 2016, 査読無
DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.007

Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. *PLoS One*. 23, 11. 2016, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0167127

Hamada H, Okae H, Toh H, Chiba H, Hiura H, Shirane K, Sato T, Suyama M, Yaegashi N, Sasaki H, Arima T. Allele-specific

methyome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. *Am J Hum Genet*. 99: 1045-1058. 2016, 査読有

DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.08.021

Okae H, Arima T. DNA methylation dynamics during early human development. *Journal of Mammalian Ova Research*. 33:2; 101-107. 2016, 査読有

DOI: 10.1371/journal.pgen.1004868

Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H, Sato A, John RM, Arima T. Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility. *Congenit Anom (Kyoto)*. 55(3):133-44. 2015, 査読有
DOI: 10.1111/cga.12113

[学会発表] (計 11 件)

Nehemiah S. Alvarez, Kesiuke Kozai, Damayanti Chakraborty, Khurshed Iqbal, Kaela M. Varberg, Pavla Brachova, Hiroaki Okae, Takahiro Arima, Gerald G. Schumann, Kathleen H. Burns and Michael J. Soares. KEYSTONE SYMPOSIUM 2018 「 Transposable element expression in placental development 」 2018

岡江寛明、有馬隆博、第 25 回日本胎盤学会学術集会、「ヒト胎盤栄養膜幹細胞の樹立とエピゲノム特性」 2017

Arima T, Okae H. IHEC Science Days & Annual Meeting 2017「 Derivation of Human Trophoblast Stem Cells from Blastocysts and Villous Cytotrophoblast Cells 」 2017

岡江寛明、京大医学部セミナー 「 Establishment of human trophoblast stem cells 」 2017

岡江寛明、理研エピジェネティクスセミナー 「 Establishment of trophoblast stem cells from human placenta 」 2017

樋浦仁、服部裕充、岡江寛明、千葉初音、宮内尚子、北村茜、菊地裕幸、吉田仁秋、有馬隆博、第 39 回日本分子生物学会年会 「 ヒト凍結融解胚移植胎盤における microRNA の網羅的解析 」 2016

小林記緒、岡江寛明、樋浦仁、千葉初音、白形芳樹、原健士郎、種村健太郎、有馬

隆博、第 39 回日本分子生物学会年会「繁殖期におけるマウス精子 DNA メチル化様式の変異性変化」2016

岡江寛明、有馬隆博、第 39 回日本分子生物学会年会「分化多能性を持つヒト胎盤栄養膜幹細胞の樹立」2016

Arima T, Okae H. IHEC Science Days & Annual Meeting 2016 「Incomplete reprogramming of germline DNA methylation in the human placenta」2016

杉村智史、岡江寛明、有馬隆博、第 109 回日本繁殖生物学会大会「ウシ卵胞内卵子の発生能を制御する卵丘細胞シグナルネットワーク」2016

濱田裕貴、岡江寛明、八重樫伸生、有馬隆博、第 23 回日本胎盤学会学術集会「ヒト胎盤におけるインプリント型 X 染色体不活性化」2015

〔図書〕(計 8 件)

岡江寛明、有馬隆博、ヒト栄養膜幹細胞の樹立、実験医学、羊土社、1430(1375-1378)、2018

岡江寛明、有馬隆博、ヒトにおける栄養膜幹細胞の樹立、新着論文レビュー、ライフサイエンス統合データベースセンター、2018

Hiura H, Hattori H, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Arima T. Therapeutic approaches to imprinting diseases. Epigenetics in Human Disease, Second Edition. Elsevier. in press. 2018

Miyauchi N, Kitamura A, Hiura H, Okae H, Kobayashi N, Hattori H, Takahashi S, Arima T. Epigenetic Alterations in Human Sperm. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer. 1-16. 2017

有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明、佐藤晶子、ART とエピジェネシス、生殖補助医療 (ART) -胚培養の理論と実際-、近代出版、352(293-297)、2017

濱田裕貴、岡江寛明、有馬隆博、インプリンティング疾患の解析と診断、産科と婦人科 84(1)、診断と治療社、110(64-68)、2017

有馬隆博、宮内尚子、北村茜、樋浦仁、岡江寛明、千葉初音、生殖補助医療とインプリンティング異常の予防、Pharma Medica 34(4)、メディカルレビュー社、144(47-51)、2016

岡江寛明、論文別コマンド解説 R+vioplot、次世代シーケンサーDRY 解析教本(細胞工学別冊)、学研プラス、408(317-318)、2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡江 寛明 (OKAE, Hiroaki)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10582695

(2)研究分担者

有馬 隆博 (ARIMA, Takahiro)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80253532