

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07091

研究課題名(和文)新規胎盤機能不全レスキューモデルの開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment model for placental dysfunction

研究代表者

磯谷 綾子 (ISOTANI, Ayako)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：20444523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤は、母体内で胎児を育てるために栄養交換・ガス交換を担う欠かせない臓器である。胎盤の機能不全は、流産を繰り返したり、不育症の原因になったりする。しかし、抜本的な治療方法は未だ確立されていない。

本研究において、胎盤機能不全モデルとして、ゲノム編集技術によってEts2変異マウスを作製した。新たな胎盤機能不全レスキューモデルの開発の為に、薬剤誘導型Cdx2発現ES細胞を樹立した。樹立したES細胞を8細胞期胚に注入して、胚発生と同じタイミングでCdx2を発現させたが、多くは胎盤側の細胞に分化せず、さらなる工夫が必要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎盤機能不全モデルとして新に樹立したEts2変異マウスは、先行研究の表現型と異なる表現型を示した。遺伝型を比較解析することで表現型につながるEts2の分子生物学的な役割が明らかになっていくものと考えられる。薬剤誘導型Cdx2-ES細胞は、初期胚期の短時間でCdx2だけでは胎盤の元となる栄養芽細胞への分化は不十分であったが、一部、栄養芽細胞へ分化するものも認められた。さらなる工夫により、ES細胞が胎盤機能不全レスキューモデルに適用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The placenta is an essential organ for supporting the growth of a fetus in the mother's body. Placental dysfunction causes repeated abortions and infertility. However, a method for the treatment of these conditions has not yet been established. In this study, Ets2 mutant mice were produced using genome editing technology, as a placental dysfunction model. A drug-inducible Cdx2-expressing embryonic stem (ES) cell line was established for use in the development of a new placental dysfunction treatment model. The ES cells were injected into an eight-cell embryo and made to express Cdx2 with the same timing as that of embryonic development. Although most of the ES-derived cells could not differentiate into trophoblasts, which are stem cells of the placenta, we observed that some of the Cdx2-expressed ES cells could differentiate into trophoblasts.

With further improvement, these results may provide a basis for establishing and developing a new placental dysfunction treatment model.

研究分野：実験動物学

キーワード：胎盤 不妊治療 動物モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胎盤は、母体内で胎児を育てるために栄養交換・ガス交換を担う欠かせない臓器である。胎盤組織の前駆細胞である栄養外胚葉の異常は着床障害や胎盤形成不全を引き起こし、胎盤の機能不全では、妊娠を維持できずに流産を繰り返したり、新生児死亡を引き起こす不育症の原因になったりする。

胎盤の形成・機能は基本的には栄養膜細胞に起因し、マウスを用いた遺伝子ノックアウトの解析により胎盤形成不全や機能不全を起こす遺伝子が100種類以上、知られている。

しかし、このような多要因の胎盤機能不全に対して、抜本的な治療方法は未だ確立されていない。

一方、動物実験モデルでは、いくつかの胎盤機能不全のレスキューモデルが確立されている。

最も汎用されている実験モデルは、2細胞期胚に2つの割球を融合させて1細胞にした4倍体胚が胎盤にしか分化しない性質を利用した4倍体補完法である(A Nagy et, al., PNAS, 1993)。具体的には、胎盤機能不全の表現型を示すために致死となるノックアウトマウスの胚と野生型の4倍体胚とを集合させてアグリゲーションキメラを作製すると、胎盤機能が補完され、産仔が得られる。しかし、4倍体胚を作製するために正常な受精胚が余計に必要なになる。

別の受精胚を用いない方法として、胎盤特異的遺伝子導入法が開発されている(Y Okada et, al., Nat Biotechnol, 2007)。この方法では、胚盤胞期胚の透明帯を取り除きレンチウイルスベクターで遺伝子を導入すると、栄養外胚葉のみに導入され、胎盤だけで遺伝子が発現する。

胎盤は個体の誕生には重要な臓器である一方、個体が誕生してしまえば捨てられてしまう臓器であるため、胎盤に遺伝子操作をしても胎児が遺伝子組換え体になることはない。すなわち、欠損している遺伝子を胎盤特異的に外から導入してやれば、遺伝子機能がレスキューされる。しかし、原因遺伝子が同定されていなければ使えないことや、原因遺伝子の発現局在や発現量をコントロールできず予測できないリスクを孕むため、胎盤機能不全のレスキュー手段としては限界がある。したがって、新たな胎盤機能不全のレスキューモデルの開発が求められている。

### 2. 研究の目的

他の受精胚や原因遺伝子の補完に頼らない新規の胎盤機能不全に対するレスキューモデルの構築を目指す。

(1) 新たに確立する治療モデルが、実際に胎盤機能をレスキューできるかどうかを確かめるために、既知の遺伝子欠損マウスの情報を元に、ゲノム編集技術を用いて胎盤機能不全モデルを作出する。

胎盤機能不全モデルとして、我々は、*Ets2*変異マウスに着目した。ETSドメインをコードしている第8エクソンから第10エクソンまでをNeo耐性遺伝子で置換した*Ets2*ホモ変異マウスは、胎生7.5日目までに発生が停止し胎生致死になると報告されている。さらに、胎盤機能を補完する4倍体補完法によって、*Ets2*ホモ変異胚は、産仔として誕生することができ、縮毛の表現型を示す。すなわち、*Ets2*欠損マウスは、胎盤異常により胎生致死となるが、胎盤機能を補完すると誕生し、縮毛の表現型を示す。このことから、胎盤機能がレスキューされたかどうかの判定が行いやすい。

(2) 他の受精胚や原因遺伝子の補完に頼らないために、培養細胞を用いた、胎盤機能をレスキ

ユーモデルの確立を目指した。

胎盤の元となる栄養芽細胞(TE 細胞)由来の TS 細胞という幹細胞を胚盤胞に注入して胎盤に寄与させるという報告があるが、胎盤への寄与率が低いことが課題である。一方で、着床前の初期胚で寄与率の高い ES 細胞は *Cdx2* を過剰に発現させることによって TS 細胞に分化することが知られている。そこで我々は培養細胞の胎盤への寄与率を高めるために、*Cdx2* を発現する ES 細胞を注入する方法を考えた。

### 3 . 研究の方法

#### (1) ゲノム編集技術を用いた胎盤機能不全モデルの作出と表現型解析

研究代表者は、胎盤機能不全モデルとして、CRISPR-Cas9 システムを用い新たな *Ets2* 変異マウスの樹立を試みた。先行研究に準じて、ETS ドメインを欠損させるため、フレームシフト変異と PCR による遺伝型判定の簡便化を期待し第 8 エキソンに、3 箇所の g RNA 標的部位を設計した。1 細胞期胚に設計した 3 種類の crRNAs と、tracrRNA、Cas9 蛋白質の複合体をエレクトロポレーションによって導入し、産仔を得た。胎盤機能異常と縮毛の表現型を確かめるために 4 倍体補完法を行った。

#### (2) 薬剤誘導型 *Cdx2*-ES 細胞の樹立とキメラ胚盤胞期での細胞の分布

*Cdx2* は ES 細胞で恒常的に発現させると、TS 細胞様に性質が変わり、初期胚への寄与率が低下してしまう。そこで、ES 細胞の初期胚に寄与しやすい性質を保持したまま、胚発生と同じタイミングで *Cdx2* を発現させるために、ドキシサイクリン (Dox) 依存的に誘導できる Tet-On システムを用いた ES 細胞の樹立を行った。*Cdx2* 発現誘導 ES 細胞を 8 細胞期胚に注入し Dox を添加した後に、胚盤胞期胚まで培養し、TE 細胞への分化の様子を免疫蛍光染色によって区別した。

### 4 . 研究成果

(1) *Ets2* 欠損マウスモデルの作製において、PCR で検出可能な部分欠損を持つ *Ets2* ヘテロ変異マウスを 2 ライン得ることができた。それぞれ第 8 エキソン内に 205bp と 82bp の欠損が認められ、フレームシフト変異になっていることが予想された。この 2 ラインのマウスは雄と雌であったため、これらを交配したところ、期待通りに両方のアレルに *Ets2* 変異を持つ産仔は誕生しなかった。

次に、それぞれのラインについて、野生型マウスと交配させヘテロ変異マウスの誕生を確認した。そして、ヘテロ変異マウス同士の交配より得た 8 細胞期胚を 4 倍体胚補完法により胎盤機能を補完したところ、それぞれのラインから *Ets2* ホモ変異マウスを誕生させることができた。このようにして誕生した *Ets2* ホモ変異マウスをヘテロ変異マウスと交配して得られた産仔は、全てヘテロ変異であった。したがって、我々が樹立した *Ets2* 変異は、これまでの報告と同様、胎盤機能不全の表現型をもつことが示唆された。しかしながら、誕生した *Ets2* ホモ変異マウスは、いずれのラインも予想に反して、縮毛の表現型が認められなかった(図 1)。すなわち、今回、樹立した *Ets2*

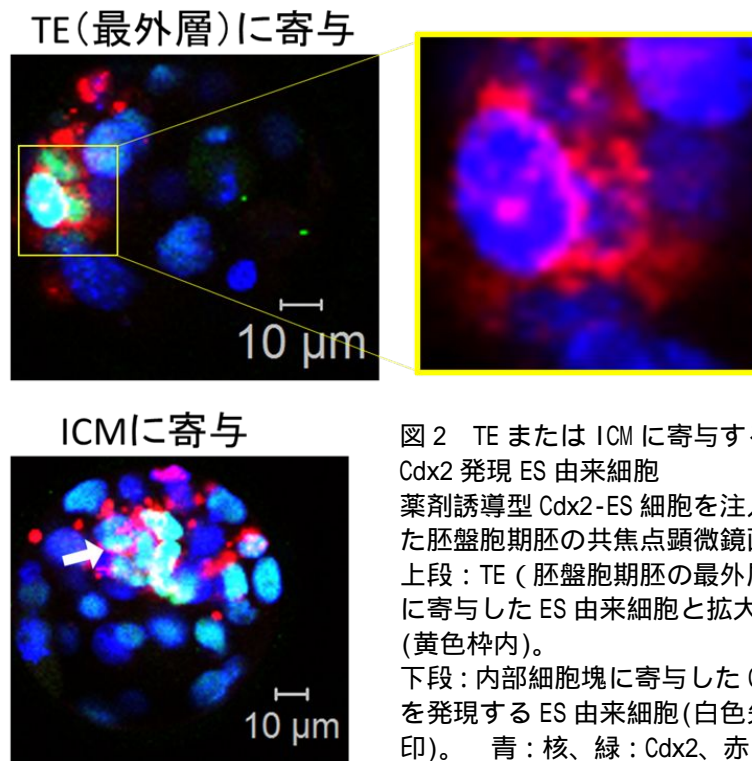


図1 4倍体補完法により誕生した新たに作製した *Ets2* 欠損マウス

ホモ変異マウスは、これまでの報告と異なる表現型を示した。詳細な解析を行ったところ、皮膚や胸腺組織では、第8エクソンがスキップしたmRNAが転写され、蛋白質が翻訳されていることが分かった。これらの事から、第8エクソン部分が欠失した変異蛋白質は、Ets2と同等の機能を持つため、新たに作製したEts2変異マウスでは、縮毛の表現型が見られなかったと考えられた(発表論文2)。

(2) 樹立したDox誘導型Cdx2発現ES細胞を8細胞期胚に注入した後、遺伝子発現を誘導し24時間後のE3.5胚盤胞で観察すると、多くのES細胞由来細胞で外来性Cdx2の発現を確かめられた。しかし、そのほとんどは内部細胞塊の領域に存在し、外部と接している栄養芽細胞の領域に位置していたものは僅かであった。そこで、Cdx2の発現を増幅させる目的で、注入24時間前より発現誘導したES細胞を用い、8細胞期に注入後同様に処理し、E3.5胚盤胞を観察した。しかしながら、栄養芽細胞への誘導の増加は認められなかった(図2)。

以上の事からCdx2を発生初期の同じタイミングで発現させても栄養芽細胞への効率的な分化誘導は不十分であったが、一部、栄養芽細胞へ分化するものも認められた。さらなる工夫により、ES細胞が胎盤機能不全レスキューモデルに適用できる可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

1. Hirata W, Tomoda T, Yuri S, Isotani A. (2022) Generation of the Y-chromosome linked red fluorescent protein transgenic mouse model and sexing at the preimplantation stage. *Exp Anim* 71:82-89. doi: 10.1538/expanim.21-0119. 責任著者。査読有
2. Kishimoto Y, Nishiura I, Hirata W, Yuri S, Yamamoto N, Ikawa M, Isotani A. (2021) A novel tissue specific alternative splicing variant mitigates phenotypes in Ets2

frame-shift mutant models. Sci Rep 11:8297. doi: 10.1038/s41598-021-87751-5. 責任著者。

査読有

3. Oura S, Miyata H, Noda T, Shimada K, Matsumura T, Morohoshi A, Isotani A, Ikawa M. (2019) Chimeric analysis with newly established EGFP/DsRed2- tagged ES cells identify HYDIN as essential for spermiogenesis in mice. Exp Anim 68: 25-34. doi: 10.1538/expanim.18-0071.

査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 岸本 裕樹、由利 俊祐、磯谷 綾子、*Ets2*変異マウスの遺伝型と表現型への影響、第66回日本実験動物学会総会、2019年
2. 岸本 裕樹、由利 俊祐、磯谷 綾子、新たに樹立した *Ets2* 変異マウスの表現型の報告、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
3. 磯谷 綾子、マウスとラットによる異種間キメラ動物の作出とその活用、第 111 回日本繁殖生物学会大会、2018 年 (招待講演)
4. Ayako Isotani、Application of a new animal model " Interspecies Chimera "、NAIST-CU-TLL Trilateral Symposium 2018、2018 年 (招待講演)(国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://bsw3.naist.jp/isotani/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

該当者なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：伊川 正人

ローマ字氏名：(IKAWA, masahito)

研究協力者氏名：由利 俊祐

ローマ字氏名：(YURI, syunsuke)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。