

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20615

研究課題名（和文）胎児浮腫の原因遺伝子と予後を関連付けるマウスモデル研究基盤の確立

研究課題名（英文）Establishment of research platform in mouse models linking the causative genes of fetal edema to prognosis

研究代表者

杉山 彰 (Sugiyama, Akira)

新潟大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10908437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：胎児浮腫は妊娠初期に認められる超音波所見であるが、多くの臨床症例で原因と予後が不明である。本研究では遺伝子突然変異マウスから胎児浮腫の原因となる候補遺伝子を見出し、候補遺伝子の一部についてノックアウトマウスを作製した。その結果、3遺伝子について胎児浮腫の原因遺伝子である可能性を見出した。各遺伝子のノックアウト胎仔において皮膚リンパ管の形態異常が認められた。さらに1遺伝子については、培養リンパ管内皮細胞において発現を抑制すると、VEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3) の遺伝子発現の低下と生細胞数の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により3遺伝子について胎児浮腫の新たな原因遺伝子である可能性が見出された。また、3遺伝子のうち1遺伝子についてはリンパ管内皮細胞の機能調節を介してリンパ管形成を制御することを明らかにした。本研究で樹立したノックアウトマウス系統について更に解析を進めることにより、リンパ管形成の制御機構や胎児浮腫の病態・予後の解明に繋がる。ノックアウトマウス解析により得られた知見は、胎児浮腫の正確な診断法を開発する上での基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Fetal edema is detected by ultrasonography in the first trimester of pregnancy. However, the causes and prognosis have been elucidated in many clinical cases. In this study, we identified candidate causative genes of fetal edema by using mutagenized mice, and generated knockout mice for some of the candidate causative genes. As a result, three genes were found as possible causative genes of fetal edema. Anomalies in dermal lymphatic vascular morphology were observed in the knockout fetuses for each gene. In addition, for one of these genes, suppression of gene expression in cultured lymphatic endothelial cells resulted in decreased gene expression of VEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3) and decreased the number of viable cells.

研究分野：脈管発生学

キーワード：浮腫 胎児 リンパ管 遺伝子改変マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト胎児浮腫は妊娠初期に約 1%の頻度で観察される超音波所見であり、約 10%の症例ではダウン症などの染色体異常との関連が指摘されている。しかしながら、残り 90%の症例ではその原因および予後は明らかにされていない。マウスにおいて、ヒト胎児の浮腫に酷似した表現型を示すことが報告されている。様々な遺伝子ノックアウトマウス胎児が浮腫を呈することが報告されており、これらの報告から、胎児浮腫と関連する異常としてリンパ管形成異常、心奇形、貧血および血管内皮バリア破綻が挙げられている。一部のリンパ管・血管関連遺伝子ではヘテロ欠損でも胎児浮腫を誘発することが確認されている。遺伝子ヘテロ欠損マウスは野生型マウスに似た表現型を示すことが多いと考えられている上に、軽度の胎児浮腫は一過性で成体では消失することが多い。このことから、胎児浮腫の原因遺伝子について見逃されている可能性が高いと考えられた。

### 2. 研究の目的

ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) は、ゲノム DNA にランダムに点突然変異を誘発する化学変異原である。我々は ENU 誘発遺伝子突然変異マウスの胎児期表現型スクリーニングを実施し、本研究開始時点までに浮腫を呈するマウス胎児を 13 個体見出していた。本研究では、これらマウス胎児のゲノム DNA 解析により検出した遺伝子変異から原因遺伝子変異を同定し、新たな胎児浮腫モデルマウス系統を樹立する。これにより胎児浮腫の原因遺伝子と予後について系統だった知見を得る研究基盤を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ENU 誘発遺伝子突然変異により浮腫を呈した 13 個体のマウス胎児について、胎児組織または胎児由来線維芽細胞から抽出したゲノム DNA サンプルのエクソーム解析を行った結果、多数の遺伝子変異が検出された。本研究では以下の(1)~(3)の解析を行い、検出された遺伝子変異の中から原因遺伝子の同定を行った。

#### (1) 胎児浮腫の原因となる候補遺伝子の探索

ゲノム DNA のエクソーム解析により検出した点突然変異について、次に示す手法で胎児浮腫に関連性が高いと予想されるものに絞り込んだ。まず、アミノ酸置換を引き起こさない変異は除外し、未成熟終止コドンを形成する変異と 1 アミノ酸置換を引き起こす変異に絞り込んだ。1 アミノ酸置換を引き起こす変異については、アミノ酸置換によるタンパク質機能への影響を予測するプログラムである PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)により、影響が大きい変異に絞り込んだ。ENU 誘発遺伝子突然変異により浮腫を呈したマウス胎児の皮膚リンパ管は健常マウスと比較して拡張や分岐数の減少などの形態異常が観察されていた。そこで、single cell RNA シークエンスのデータベースである Single Cell Expression Atlas によりリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell: LEC) で発現が認められる遺伝子に絞り込んだ。また、13 個体のうち 1 個体については、遺伝子マッピングを実施して原因遺伝子変異の存在する染色体領域を予測していた。予測される染色体領域内の遺伝子変異に絞り込んだ。これらの手法により絞り込んだものを候補遺伝子とした。

#### (2) 候補遺伝子のノックアウトマウス作製と胎児期表現型解析

(1)で見出した候補遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトマウスを作製した。Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体の受精卵への導入は GONAD (genome-editing via oviductal nucleic acids delivery) 法により実施した。GONAD 法は自然交配させた雌マウスの卵管内に CRISPR/Cas9 試薬を注入し、その卵管内でエレクトロポレーションを実施する効率的な遺伝子改変マウス作製技術である。GONAD 法実施後、妊娠 15 日目に胎児を摘出して浮腫の有無を解析した。皮膚フラットマウント標本の免疫組織化学染色によりリンパ管および血管の形態を観察した。浮腫が認められた場合、その候補遺伝子のノックアウトマウスの系統を樹立した。一部の候補遺伝子については、系統樹立後にヘテロ欠損およびホモ欠損マウス胎児の皮膚フラットマウント標本の免疫組織化学染色により、LEC 特異的マーカーである VEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3) および LYVE1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) の発現を比較検討した。

#### (3) 候補遺伝子発現抑制 LEC の機能解析

(2)で胎児浮腫およびリンパ管形成異常との関連を見出した候補遺伝子について、培養ヒト皮膚 LEC (human dermal LEC: HDLEC) に siRNA (small interfering RNA) を処置し発現を抑制し

た。候補遺伝子の各 LEC 特異的マーカー遺伝子の発現量を real time PCR 法で測定した。生細胞数を位相差顕微鏡による観察と吸光度測定による細胞カウント法により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胎児浮腫の原因となる候補遺伝子の探索

エクソーム解析で検出した遺伝子変異について、最終的にマウス胎仔 1 個体あたり 10~30 遺伝子まで絞り込み、これらを候補遺伝子とした。

##### (2) 候補遺伝子のノックアウトマウス作製と胎仔表現型解析

候補遺伝子のうち 10 遺伝子についてノックアウトマウスを作製した。7 遺伝子についてはヘテロ欠損およびホモ欠損マウス胎仔の両方で浮腫は認められず、皮膚リンパ管および血管の形態は野生型と比較して変化は認められなかった。一方、2 遺伝子についてはヘテロ欠損胎仔で浮腫が認められ（以下、遺伝子 A、B とする）、さらに 1 遺伝子についてはホモ欠損胎仔で浮腫が認められた（以下、遺伝子 C とする）。また、浮腫を呈した胎仔の皮膚リンパ管は、野生型と比較して拡張や分岐数の減少といった形態異常が認められた。遺伝子 A、B、C は胎児浮腫の原因遺伝子の可能性が示されたため、ノックアウトマウスの系統を樹立した。

さらに遺伝子 A のヘテロ欠損およびホモ欠損マウス胎仔の皮膚リンパ管において、LYVE1 発現量は野生型と比較して変化は認められなかったが、VEGFR3 発現量が低下する傾向が認められた。

##### (3) 候補遺伝子発現抑制 LEC の機能解析

HDLEC に遺伝子 A の siRNA を処置した結果、48 時間後に遺伝子 A と VEGFR3 遺伝子の発現が有意に低下していた。一方、VEGFR3 発現を誘導する転写因子 Prox1 (prospero-related homeobox 1) の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった。また、VEGFR3 遺伝子以外の Prox1 の標的遺伝子である LYVE1、podoplanin、neuropilin2 の遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、遺伝子 A の発現抑制による VEGFR3 遺伝子発現低下は Prox1 を介さない経路で誘導されることが示唆された。

さらに、遺伝子 A の siRNA 処置 48 時間後と 72 時間後において有意な生細胞数の減少が認められた。特に 72 時間後では多数の死細胞が観察された。VEGFR3 は LEC の生存に中心的な役割を果たすことが知られている。遺伝子 A の発現抑制による VEGFR3 発現低下が LEC の生存能力の低下を誘導することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiyama Akira, Hirashima Masanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Fetal nuchal edema and developmental anomalies caused by gene mutations in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 949013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.949013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sugiyama Akira, Liu Xinyi, Shiiya Tomohiro, Yoshimatsu Yasuhiro, Hirashima Masanori
2. 発表標題 胎児項部浮腫に関する包括的なマウスモデル研究
3. 学会等名 第8回血管生物医学会 若手研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sugiyama Akira, Liu Xinyi, Shiiya Tomohiro, Yoshimatsu Yasuhiro, Hirashima Masanori
2. 発表標題 マウスモデルを用いた胎児項部浮腫とリンパ管形成異常に関わる新規原因遺伝子の探索
3. 学会等名 第47回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------