

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592454

研究課題名(和文) 不育症克服を目指した新規胎盤関連因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) A search and functional analysis of novel placenta-related genes to overcome recurrent miscarriage.

研究代表者

森岡 裕香 (MORIOKA, YUKA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：00360264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、独自の細胞材料とマイクロアレイを組み合わせた網羅的解析から新規胎盤関連候補遺伝子を探索し、続いて、得られた候補遺伝子のマウス個体レベルでの機能解析を行った。その結果、過剰発現により胎盤形成不全や胎仔発育不全を呈する遺伝子、ならびに、発現欠損により、胎盤肥大や分娩異常、新生仔貧血や新生仔期高死亡率など、出産前後の母仔に複数の異常を呈する遺伝子、を見出すことに成功した。これらの遺伝子改変マウスは、新しい不育症モデルになり得ると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for novel placenta-related genes from the comprehensive analysis by the microarray using our original cultured cells followed by functional analysis. We obtained eight candidate genes, and two of those showed following interesting phenotypes in mice. The placenta-specific overexpression of candidate gene A caused placental disorder and intrauterine growth retardation. The candidate gene B deficient mice showed multiple abnormalities, placental overgrowth, abnormal delivery and neonatal anemia in the perinatal period. It is expected that these mice are useful as a new recurrent miscarriage model.

研究分野：発生工学・遺伝子工学・生殖生理学

キーワード：胎盤異常 不育症

1. 研究開始当初の背景

晩婚化の影響も相まって約1割の夫婦が望んでも子供を得られない昨今、「不妊症」「不育症」が大きな社会問題となっている。不妊症は夫婦の何れかもしくは両者に起因する可能性があるが、生殖補助医療技術の飛躍的な進歩に伴い、受精卵を得るのは難しいことではなくなりつつある。一方不育症は、妊娠はするものの流産や死産を繰り返してしまう状態で、受精卵や胎児に染色体異常をはじめとする原因がある場合以外は母体は何らかの問題を抱えている。さまざまな要因が関与していると考えられている不育症の発症メカニズムは明らかにされておらず、有効な治療法も確立していないが、ほとんどの症例で「胎盤異常」が観察されるという事実は注目に値する。

胎盤は妊娠の維持や胎児の発生に重要な役割を担っているが、その形成機構や機能制御メカニズムには未だ不明な点が多い。これらの解明を目指した基礎研究は、不育症の原因究明や予防・診断・治療法開発のために極めて有用であるが、既知の胎盤関連遺伝子は他の目的で作製したノックアウトマウスの表現型などから偶発的に発見された例が多い。また、系統立ったスクリーニングの報告は少なく、解析は培養細胞レベルにとどまっている。

2. 研究の目的

(1) 新規胎盤関連遺伝子の *in vitro* 網羅的探索

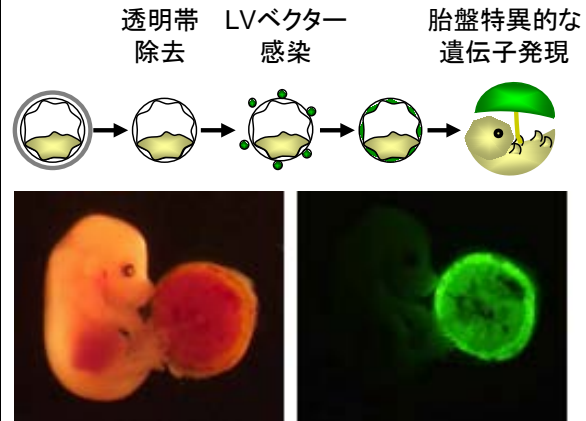
胎盤の最外層を形成し、母体と胚の境界に存在する巨大栄養膜細胞 (giant cell : GC) は、着床や胎盤形成に重要な役割を果たしていると考えられているものの、詳細な解析は進んでいない。

我々はこれまでに GC に着目した研究を遂行しており、マウス胚盤胞期胚から栄養膜幹細胞 (Trophoblast stem cell : TSC) を樹立し、一定の培養条件下で GC に分化させることに成功している。*in vitro* で分化誘導された GC は、形態的にもマーカー遺伝子の発現に関しても *in vivo* を反映しており、かつ、均一な細胞を大量調製することが可能である。そこで、この利点を生かして TSC と GC に発現する遺伝子をマイクロアレイ解析で網羅的に比較し、未知の胎盤関連遺伝子の候補を見出すことを目的とする。

(2) 新規胎盤関連候補遺伝子の *in vivo* 機能解析と不育症モデルマウスの作製

既存の遺伝子改変動物作製技術では胎盤のみならず胎児の遺伝子も同時に操作されてしまうため、胎盤に対する影響のみを個体レベルで正確に評価することはできなかった。一方で、我々は独自に「胎盤特異的な遺伝子操作技術」の開発に成功している【図1】。そこで、この技術を応用して(1)で見出した候補遺伝子を胎盤特異的に過剰発現または

発現抑制し、胎盤の構造や機能、母体や胎児の健康状態などに及ぼす影響を調べることで、生理的に重要な働きを有する遺伝子の解明を目指す。さらに、胎盤特異的な遺伝子操作マウスの表現型とヒト不育症病態との関連性を精査し、胎盤異常を反映した新しい不育症モデルマウスの確立を目指す。



【図1】胎盤特異的な遺伝子操作

(3) 不育症の原因究明と予防・診断・治療法開発

(2)で作製した不育症モデルマウスと正常妊娠マウスをマイクロアレイ解析で比較し、発症メカニズムの解明や診断マーカーの探索、予防・治療法の開発に繋がる情報の収集を試みる。さらに、得られた情報の有用性を、不育症モデルマウスを利用して検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規胎盤関連遺伝子の網羅的探索と絞り込み

独自に樹立した TSC と、そこから分化誘導した GC における遺伝子発現をマイクロアレイ解析で比較し、その結果をもとに以下の手順で胎盤関連候補遺伝子の絞り込みを行う。

① *in silico* 解析

マイクロアレイ解析で発現に差のある遺伝子を抽出し、構造や機能・発現部位などに関する情報を、公開されている最新のデータベースを利用して検索する。胎盤に発現が限局している遺伝子や、胎盤における機能が不明の遺伝子に絞り込んだ後、RT-PCR やウエスタンブロッティングにより TSC と GC における発現の差を確認する。

② *in vitro* 機能解析

①で絞り込まれた候補について、GC で過剰発現または発現抑制し、細胞の形態観察や増殖・浸潤・遊走アッセイなどの結果から *in vivo* 解析に進める遺伝子を決定する。

in vitro 機能解析では多数の候補遺伝子を対象とするため、発現抑制にはベクターではなく合成 siRNA を利用することで迅速に解析を進める。

(2) 新規胎盤関連遺伝子の in vivo 機能解析と不育症モデルマウスの作製

(1)で絞り込んだ遺伝子について、cDNA または shRNA を発現するレンチウイルス (Lentivirus : LV) ベクターを構築し、透明帯を除去したマウス胚盤胞期胚に感染させて偽妊娠マウスに移植することで胎盤特異的な遺伝子操作を行う。

過剰発現または発現抑制が与える影響を個体レベルで詳細に解析し、胎盤の構造形成や機能制御に重要な働きを有する遺伝子を明らかにするとともに、不育症モデルマウスとしての有用性を評価する。具体的には、胎盤の重量や組織切片、流産率や新生仔の体重、母体の血圧や尿蛋白などを解析する。LV ベクターの感染や、非特異的な発現制御による影響ではないことを確認するコントロールとして、緑色蛍光蛋白質 (Enhanced Green Fluorescent Protein : EGFP) や、標的の存在しない shRNA を搭載した LV ベクター感染胚を移植したマウスを正常妊娠群として比較を行う。

発現抑制に関しては、shRNA では十分な効果が得られない可能性があるため、コンディショナルノックアウトマウスの作製も並行して進め、同様の解析を試みる。我々はこれまでに、胎盤特異的に Cre を発現させることで胎盤特異的なノックアウトマウスを作製することに成功している。

(3) 不育症の原因究明ならびに予防・診断・治療法の開発

(2)で得られた不育症モデルマウスと正常妊娠マウスについて、マイクロアレイ解析で胎盤における遺伝子発現の比較を行う。(2)と同様の正常妊娠群を利用することで、LV ベクターの感染ならびに非特異的な発現制御の影響を除くとともに、6 個の胎盤をプールしたサンプルから RNA を調製することで、LV ベクターによる各遺伝子の発現強度の個体差を平均化する工夫を行う。

発現に差のあった遺伝子は、in silico 解析で絞り込んだ後に胎盤特異的な発現制御を行い、個体レベルでの解析を行う。過剰発現や発現抑制が不育症病態の発症、増悪、治療に関与するかを検証し、この情報をもとに、発症メカニズムの解明や診断マーカーの探索、予防・治療法の開発に繋げる。

4. 研究成果

(1) 新規胎盤関連遺伝子の in vitro 網羅的探索と絞り込み

マイクロアレイ解析による TSC と GC の遺伝子発現比較を 2 回繰り返す、共通して差がある遺伝子を抽出した。その中には、胎盤特異的分子として知られる Tpbpa、Tpbpb や胎盤特異的カテプシンファミリー、妊娠の維持に重要なプロラクチンファミリーなどの既知遺伝子が含まれており、スクリーニングは有効に機能していると評価できた。

本研究では GC で発現上昇している遺伝子に着目し、既知の胎盤関連遺伝子は除外しつつ、まずはデータベース解析により、胎盤に豊富に発現している遺伝子や、発現が胎盤に限局している遺伝子、胎盤における機能が未知な遺伝子などを新規胎盤関連候補遺伝子として選び出した。続いて RT-PCR 解析を行い、GC において実際に高発現している 8 つの遺伝子を見出した。この 8 つの遺伝子は、マウス胎盤組織においても高発現していることが確認され、また、胎盤以外の主要組織における発現についても調べたところ、ほぼ胎盤のみでしか発現が検出されない遺伝子が 4 つ存在した。タンパクレベルでの発現も確認するためにウエスタンブロッティングを行う予定であったが、8 つの遺伝子はいずれも抗マウス抗体が市販されておらず、解析出来なかった。次に、候補遺伝子を GC で過剰発現または発現抑制した際の機能解析を試みたが、細胞に傷害を与えずに高い遺伝子導入を達成することが極めて難しく、十分な評価は行えなかった。

以上の結果を踏まえ、RT-PCR 解析で絞り込んだ 8 つの候補遺伝子全てを in vivo 解析に進めることとした。

(2) 新規胎盤関連候補遺伝子の in vivo 機能解析

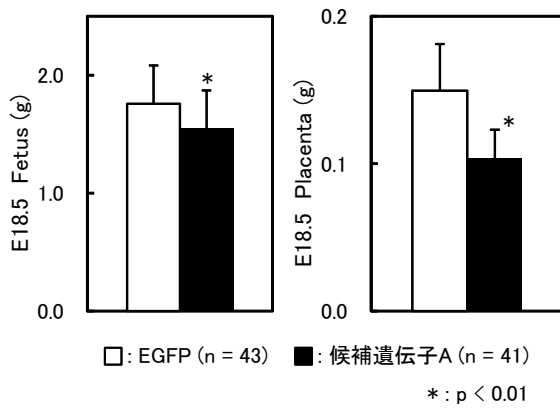
① 胎盤特異的な過剰発現ならびに発現抑制

(1)で決定した 8 つの新規胎盤関連候補遺伝子の cDNA を発現する LV ベクターを構築し、透明帯を除去したマウス胚盤胞期胚に感染させて偽妊娠マウスに移植することで、胎盤特異的な過剰発現を行った。

原因は不明であるが、3 つの候補遺伝子については、マウス初期胚への遺伝子導入に十分な高力価の LV ベクターを得ることができず、過剰発現実験は行えなかった。

残りの 5 つの候補遺伝子について、移植後胎生 13.5 日目に解剖して生存している胚の数をコントロール群と比較したところ、若干の増加や減少の傾向はあるものの、有意な差は認められなかった。そこで、さらに詳細な解析を行ったところ、1 つの候補遺伝子 A については、胎生 18.5 日目の胎仔ならびに胎盤重量の有意な低下が確認され【図 2】、胎盤組織切片を作製して観察したところ、海綿状栄養芽細胞層が減少していることが明らかとなった。母体への影響については解析を継続中である。

一方で、shRNA 発現 LV ベクターを利用して胎盤特異的な発現抑制を試み、上記と同様の解析を行ったところ、どの遺伝子も明らかな表現型を示さなかった。抗体が存在しないため検証は行えなかったが、in vivo における発現抑制効果が十分でないことが原因で、正確な評価が行えていない可能性が高いと考えられた。そこで、ノックアウトマウスを作製することで確実な発現欠損を達成し、解析を行うこととした。

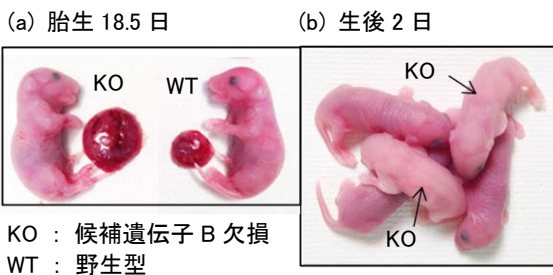


【図2】胎盤特異的な過剰発現による胎仔胎盤重量変化

② ノックアウトマウスの作製と解析

8つの候補遺伝子全てについて、ノックアウトマウスの作製を行った。短期間で完成させるために、3つの遺伝子については組換えES細胞を、5つの遺伝子についてはターゲティングベクターを、The International Mouse Phenotyping Consortiumから購入した。

これまでに5つの遺伝子についてノックアウトマウスが完成しており、妊娠中の雌マウスを中心に解析を行ったところ、興味深い表現型を示す遺伝子B欠損マウスを見出した。遺伝子Bは妊娠後期のマウス胎盤で特異的に発現上昇しており、遺伝子B欠損マウスでは出産前後の母仔に複数の異常が観察された。具体的には、胎生18.5日目の胎盤が野生型の2倍以上にまで肥大し【図3(a)】、遺伝子B欠損雌雄を交配した雌マウスの多くは、時期が来ても分娩出来ずに死亡した。また、遺伝子B欠損新生仔は体色が明らかに白い貧血様の外観を呈し【図3(b)】、その多くは数日以内に死亡するか、著しい成育不全により離乳前に死亡した。



【図3】候補遺伝子B欠損マウスの表現型

胎盤肥大や分娩不全、新生仔貧血や新生仔期高死亡率といった、個々の表現型を呈するノックアウトマウスはこれまでも報告されているが、全てを同時に引き起こすマウスは前例がない。複数の周産期障害を引き起こす遺伝子B欠損マウスは、個々の異常についてはもちろんのこと、それぞれがどのように他の異常と関わっているかについて個体レベルで解析できる、全く新しい不育症モデルになり得ると期待できる。

(3) 不育症の原因究明ならびに予防・診断・治療法の開発

胎生18.5日目の遺伝子B欠損胎盤と野生型胎盤における遺伝子発現をマイクロアレイ解析で比較したところ、鉄輸送に関わる遺伝子群が変動している結果が得られた。現在は、同様の解析を繰り返して再現性を確認するとともに、分子メカニズムや新生仔貧血との関わりについての研究を遂行している。

5. 主な発表論文等 該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡 裕香 (MORIOKA YUKA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：00360264