

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860259

研究課題名(和文)胎盤の発生分化におけるエピジェネティック制御機構の解析

研究課題名(英文)Epigenetic regulation of trophoblast lineage development

研究代表者

富川 順子(TOMIKAWA, Junko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80534990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：発生の最も初期に分たれる胎児側細胞系譜と胎盤側細胞系譜について、それぞれのモデルとなる胚性幹(ES)細胞と栄養膜幹(TS)細胞からエピゲノム情報を取得し、それぞれの細胞系列分化の評価系となりうるゲノム領域(シスエレメント)を網羅化した。特に胎盤側の発生に関わる機能的ゲノム領域の新規同定を試み、胚体外系列の発生に必須でありその起点とも考えられているTead4遺伝子のエンハンサー配列の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Division of embryonic and extraembryonic (trophoblast) cell lineages is the first differentiation event during early development. We generated genome-wide maps of epigenetic information in embryonic stem (ES) and trophoblast stem (TS) cells. From combined analysis with formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) and chromosome conformation capture (3C) techniques, we succeeded identification of enhancers of the Tead4 gene that is required for specification of trophoctoderm in pre-implantation mammalian embryos.

研究分野：分子生物学

キーワード：胎盤 エピゲノム クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

今や、夫婦 10 組に 1 組の割合で不妊症は発生するといわれている。出産年齢の高齢化が進む現代の先進諸国共通の課題として、正常妊娠の成立、管理は重要性を増しており、その破綻を招く周産期異常の病因・病態の解明と診断法、治療法の確立は急務である。

妊娠の成立にはエピジェネティック機構が関わっており、特に胎児、胎盤の発生、発育異常と関連することがこれまで多数示唆されてきた。例えば、DNA メチル化を主としたクロマチン修飾の差により親（父方/母方）由来の染色体を区別するほ乳類遺伝子のインプリンティングが異常になると、先天奇形症候群等の子宮内胎児発育遅延あるいはその逆に胎児の過成長が主症状として観察される (Bonthon *et al.*, *Nature*, 2002)。同様に、エピジェネティックな遺伝子制御機構に異常をきたしたモデルマウスは、胎仔の発育異常のみならず、胎盤の発生異常をきたし致死となる (Arima *et al.*, *Dev Biol*, 2006; Ono *et al.*, *Nat Genet*, 2006)。これらの知見は、種々のエピジェネティック機構が、胎児と胎盤の正常な発生や発育に極めて重要な生理機構であることを示している

2. 研究の目的

本研究計画では、胎仔側を構成する胚性幹 (Embryonic Stem: ES) 細胞および胎盤側を構成する栄養膜幹 (Trophoblast Stem: TS) 細胞におけるエピジェネティック変化を次世代シーケンサー等を用いた網羅的解析によって比較・検討することで、胎仔側、胎盤側それぞれの細胞分化の評価系となりうるエピジェネティック状態を示す領域を探索、網羅化する。特に分子生物学的知見の乏しい胎盤の発生・分化に着目し、周産期疾患の診断に資するバイオマーカーの探索を目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画では、マウス未分化 ES 細胞、マウス未分化 TS 細胞を用い、(1) 発生の最も初期の分化過程に特化したエピジェネティックプロファイルの作成、(2) 胎盤細胞の発生過程に特徴的なエピジェネティックパターンを持つ領域の同定・選択、(3) 遺伝子操作技術を活用した各ゲノム領域 (エピゲノム情報) の生理機能解析、の大別して 3 つの項目を進めていく。ゲノムワイドなエピゲノム変化を詳細に網羅するため、項目(1)では次世代シーケンシング技術を用いる。項目(2)では、(1)で得た諸情報をバイオインフォマテックな解析により統合し、個別解析可能な規模の解析対象領域リストを作成する。項目(3)では、(2)で同定、選出したゲノム領域を欠損した細胞株、マウス個体を作製し、組織学的、生化学的、細胞生物学的手法等を用いて生体内における機能を解析する。

4. 研究成果

(1) 発生の最も初期の分化過程に特化したエピジェネティックプロファイルの作成

ES 細胞および TS 細胞それぞれのエピゲノム情報として、ChIP-seq 法によりヒストン修飾状況を、FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements)-seq 法によりオープンクロマチン領域の網羅を、3C (Chromosome conformation capture) assay 法によりゲノム DNA のインタラクション状況に関する情報を取得した。ES-TS 間の比較から、多数の異なる遺伝子座凝集状態が観察され、これらは局所的なクロマチン構造のみならず、大小さまざまなドメイン形成を介して染色体の大部分が異なった空間構造をとっていることが示唆された。特に TS では、転写制御領域と考えられているオープンクロマチン領域が非プロモーター領域を中心に ES の 2 倍近く分布しており、それらを挟むように H3K4 モノメチル化修飾の特徴的な二峰性

ピークが観察されたことから、TS 特異的に検出されたオープンクロマチン領域の多くが近位あるいは遠位エンハンサーとして機能することが示唆された。

(2) 胎盤細胞の発生過程に特徴的なエピジェネティックパターンを持つ領域の同定・選択

(1)において、FAIRE-seqにより網羅したオープンクロマチン領域のなかから、胚体外系列の発生に必須でありその起点とも考えられている *Tead4* 遺伝子のプロモーター領域とインタラクションするゲノム領域を 3C assay との重ね合わせ解析から同定、抽出した。さらにその中から、in vitro プロモーターアッセイにより *Tead4* エンハンサーとして機能する領域を、プロモーターと同一染色体上および異なる染色体上に複数領域同定した。これらは ES 細胞においてはエンハンサー活性を示さなかったことから、TS 細胞すなわち胎盤細胞特異的なエンハンサーであることが示唆された。

(3) 遺伝子操作技術を活用した各ゲノム領域の生理機能解析

ゲノム編集技術を用いて、(2)で同定した胎盤特異的と考えられる *Tead4* エンハンサー領域を欠損したマウスを作製した。定量的 RT-PCR により、初期発生段階での *Tead4* 発現への影響を確認するとともに初期発生への影響、特に胎盤形成への影響を中心として表現型解析を進めている。

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)

1. Uenoyama Y, Tomikawa J, Inoue N, Goto T, Minabe S, Ieda N, Nakamura S, Watanabe Y, Ikegami K, Matsuda F, Ohkura S, Maeda KI, Tsukamura H. Molecular and Epigenetic Mechanism Regulating Hypothalamic Kiss1 Gene Expression in Mammals. *Neuroendocrinology*. 2016; doi: 10.1159/000445207
2. Ichida Y, Utsunomiya Y, Tomikawa J, Nakabayashi K, Sato T, Onodera M. Long time-course monitoring of ZFP809-mediated gene silencing in transgene expression driven by promoters containing MLV-derived PBS. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015; 80: 114-20
doi: 10.1080/09168451.2015.1072461.
3. Yoshida W, Tomikawa J, Inaki M, Kimura H, Onodera M, Hata K, Nakabayashi K. An insulator element located at the cyclin B1 interacting protein 1 gene locus is highly conserved among mammalian species. *PLoS One*. 2015; 10: e0131204
doi: 10.1371/journal.pone.0131204
4. Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C, Minabe S, Tomikawa J, Goto T, Ieda N, Inoue N, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Maeda KI, Tsukamura H. Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of luteinising hormone release in Kiss1 knockout rats. *J Neuroendocrinol*. 2015; 27: 187-97. doi: 10.1111/jne.12257.
5. Miyata T, Sonoda K, Tomikawa J, Tayama C, Okamura K, Maehara K, Kobayashi H, Wake N, Kato K, Hata K, Nakabayashi K. Genomic, Epigenomic, and Transcriptomic Profiling towards Identifying Omics Features and Specific Biomarkers That Distinguish Uterine Leiomyosarcoma and Leiomyoma at Molecular Levels. *Sarcoma*. 2015; 2015: 412068.
doi: 10.1155/2015/412068.
6. Goto T, Tomikawa J, Ikegami K, Minabe S, Abe H, Fukanuma T, Imamura T, Takase K,

Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Maeda K, Tsukamura H, Uenoyama Y. Identification of hypothalamic arcuate nucleus-specific enhancer region of Kiss1 gene in mice. Mol Endocrinol. 2015; 29: 121-9. doi: 10.1210/me.2014-1289.

7. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. Nat Commun. 2014; 5: 5464. doi: 10.1038/ncomms6464.
8. Ieda N, Uenoyama Y, Tajima Y, Nakata T, Kano M, Naniwa Y, Watanabe Y, Minabe S, Tomikawa J, Inoue N, Matsuda F, Ohkura S, Maeda K, Tsukamura H. KISS1 gene expression in the developing brain of female pigs in pre- and peripubertal periods. J Reprod Dev. 2014; 60: 312-6

〔学会発表〕(計 3件)

1. Junko Tomikawa, Kohji Okamura, Keiko Hayashi, Hidenori Akutsu, Satoshi Tanaka, Kenichiro Hata, Kazuhiko Nakabayashi. Exploring the cell line-specific enhancers based on chromatin conformation. 第38回日本分子生物学会年会. 2015年12月1日～4日神戸ポートアイランド
2. 富川順子、前原一満、岡村浩司、林恵子、阿久津英憲、田中智、大川恭行、秦健一郎、中林一彦. Hi-C法による細胞種特異的なクロマチン高次構造解析. 第8回エピジェネティクス研究会年会. 2014年5月26日～27日. 東京大学 伊藤国際学術研究センター
3. 富川順子、岡村浩司、林恵子、阿久津英憲、田中智、秦健一郎、中林一彦. マウス初期発生過程における細胞種特異的なクロマチン高次構造の解析. 第37回日本

分子生物学会年会. 2014年11月25日～27日. パシフィコ横浜

〔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〕

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

富川順子 (TOMIKAWA Junko)

国立成育医療研究センター研究所・研究員

研究者番号: 80534990

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし