

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670734

研究課題名(和文)胎盤の転写後調節機構と胎児発育との関連解析

研究課題名(英文)Epitranscriptome in placentas of AGA and SGA babies

研究代表者

秦 健一郎 (HATA, KENCHIRO)

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・その他

研究者番号：60360335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤の転写後調節を検証するために、転写後修飾を受けたmRNAの網羅的配列解析系の条件検討を行い、胎盤の解析に至適な条件を決定した。これらの解析系を利用し、正常胎盤におけるエピトランスクリプトーム標準参照データの取得を進め、さらに異常胎盤の解析を進めた。いくつかの疾患特異的エピトランスクリプトーム異常候補が見出されており、今後さらに症例を積み重ねてこれらの差異の病理的意義を解析する。

研究成果の概要(英文)：To clarify epitranscriptome in placentas, first we confirm experimental conditions for immunoprecipitation of modified transcriptions. With these obtained adequate conditions, we proceed to analyze normal and abnormal placentas. Several case-specific abnormally modified transcriptions were detected and we are confirming the candidates and seeking other possible abnormally modified transcriptions.

研究分野：産婦人科学

キーワード：エピジェネティクス

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成28年6月22日現在

1. 研究開始当初の背景

レプチンおよびその下流の *FTO* 遺伝子 (Fat mass and obesity-associated gene) は、モデルマウスやヒト症例の解析から、妊娠や胎児発育・妊娠合併症に関連する事が示されている (Bassols et al. *Int J Obes* 2010, Klemetti et al. *J Preg* 2011)。肥満関連因子として同定された *FTO* 遺伝子は、メチル化 mRNA (m^6A 修飾) の脱メチル化酵素であることが最近示された (Jia et al. *Nat Chem Biol* 2011)。 m^6A 修飾は、RNA 安定性・スプライシング・miRNA 調節・エピジェネティック修飾などを介して転写後調節機構として働く。網羅的解析 (エピトランスクリプトーム) も報告され (Meyer et al. *Cell* 2012, Dominissini et al. *Nature* 2012)、今後は様々な臓器や疾患を対象にしたエピトランスクリプトーム解析の応用が待たれる。

エピジェネティックな機構は、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC: International Human Epigenome Consortium) などの大きな国際協力プロジェクトが複数立ち上がり、精力的に標準エピゲノム情報の整備が進められているが、残念ながらエピトランスクリプトームは、IHEC の共通プロトコールに取り込まれておらず、系統的解析は進められていない。一方前述の Bassols らの報告では、胎盤での発現量と出生体重は逆相関しており、胎盤における m^6A 修飾の脱メチル化による転写後調節は胎児発育に促進的に働くと考えられ、新たな分子メカニズムの知見が期待される。*FTO* 遺伝子が胎児発育と関連している分子メカニズムは不明である。本研究から、

このパスウェイの直接の標的 (m^6A 修飾あるいは脱 m^6A 修飾される mRNA) が明らかになり、胎児発育の鍵となる主要因子候補を網羅的に同定できる。また、胎盤における特殊な遺伝子発現制御機構の解明が期待される。一般的に胎盤は、エピジェネティックな抑制が緩やかで、内在性レトロウイルスのような配列も転写されやすい状況にあることが知られている。通常このような配列の活性化は細胞機能にとって有益ではなく、エピジェネティックな機構で強固に抑制されているが、胎盤では何らかの代償機構が存在し、これらの配列の転写後調節による抑制が働いていると予測される。

代謝調節にかかわるレプチンや、その下流の肥満因子として知られる *FTO* 遺伝子 (Fat mass and obesity-associated gene) は胎盤で発現しているが、これらの遺伝子欠損マウスは様々な生殖発生異常を呈し、ヒトでも胎児発育や合併症妊娠との関連が示唆されている。最近、上記の *FTO* 遺伝子が mRNA のメチル化 (methyl-6-Adenosine 修飾: 以下、 m^6A 修飾と省略) の脱メチル化酵素であることが示された。 m^6A 修飾は、RNA 安定性やエピジェネティック修飾などを介し、転写後調節機構として働く。*FTO* 遺伝子の胎盤での発現量と出生体重は逆相関することから、 m^6A 修飾の脱メチル化による転写後調節は、胎児発育に促進的に働くと考えられる。 m^6A 修飾状態は臓器毎に異なるため、疾患標的臓器毎に解析が必要である。最近、mRNA の m^6A 修飾を網羅的に同定したエピトランスクリプトームが報告され、組織や発生段階特異的な転写後調節機構の解明に有用であることが示され

た。本研究は、胎盤 mRNA のメチル化(m6A 修飾)プロファイルを明らかにし、胎児発育と相関する m6A 修飾を同定することを目的とする。発現量のみを解析する従来の遺伝子発現スクリーニングに加え、RNA のメチル化による転写後調節状態を考慮することで、胎児発育に関連する新たな分子メカニズムの同定が期待される。

3 . 研究の方法

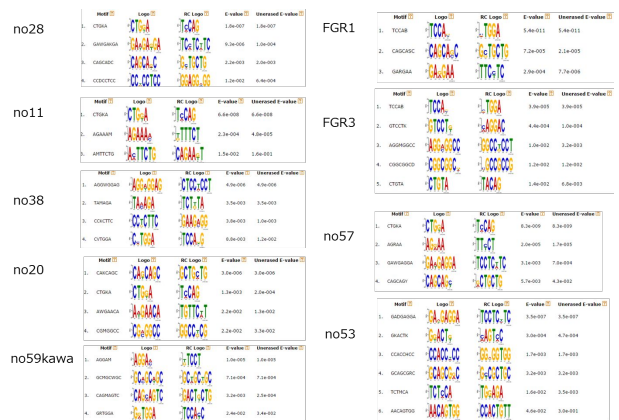
ヒト胎盤より total RNA を回収し、m⁶A mRNA 特異的抗体を用いた免疫沈降法でメチル化された mRNA を濃縮回収し、網羅的に次世代シーケンサーで配列解析 (MeRIP-Seq) を行い、m⁶A 修飾 RNA のプロファイルを取得する。一般的な妊娠経過の臨床情報や出生体重情報を加味し、胎児発育と相関する m⁶A 修飾 RNA の変化を同定する。

4 . 研究成果

培養細胞を用いて既報のデータを追試し、抗体量、抗体反応時間、buffer 量、IP 後の elution 方法を検討した。既報データと比較し、再現性を確認した後に、正常胎盤を用いた解析を開始した。妊娠経過に特段の異常を認めなかった反復帝王切開症例で、娩出胎盤を直ちに回収し、mRNA を精製した。

抗 m6A 抗体を用い、免疫沈降された mRNA の網羅的配列解析結果をマッピングしたところ、観察されるシグナルピークの上位および下位各 1,000 領域の annotation を行ったところ、既報の分布と同様の結果が得られた。そこで更に検体数を増やして同一手法で解析を進めた。

motif 解析を MEME から DREME に変更し、より短い motif の解釈の焦点を当てた。我々の解析結果でも、概ね既報と同様の motif が検出されている。(下図参照)



また、ピークとして検出された中で上位 1000 のものを選ぶと、その 8 割前後は CDS 及び 3' UTR に集積していた。

現在、正常胎盤と異常胎盤で差異を認めるシグナルピークを検索しており、約 70 個の遺伝子が抽出されている。これらの多くは、Gene Ontology 解析で RNA 代謝や splicing、あるいは transcriptome に関連するものが多く認められた。

解析手技及び手法は十分確立できたと考えられ、今後は正常分娩例で標準エピソードトランスクリプトーム情報をさらに整備すると共に、産科的異常症例の収集と解析を進める。

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 1 件)

Nohara K, Okamura K, Suzuki T, Murai H, Ito T, Shinjo K, Takumi S, Michikawa T, Kondo Y, Hata K : Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring. J Appl Toxicol. 2016;36:105-112

〔学会発表〕(計 1 件)

秦健一郎 : 「生殖と発生異常にかかわるエピゲノム変化と環境の影響」 第 85 回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 健一郎 (Kenichiro Hata)
国立成育医療研究センター研究所・周産期
病態研究部・部長
研究者番号：60360335

(2) 研究分担者

なし