

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15607

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群モデル動物の開発と発症メカニズム解明

研究課題名(英文) Screening of genes important for placentation using CRISPR/Cas9 and placenta specific gene manipulation system

研究代表者

伊川 正人 (ikawa, masahito)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20304066

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)：胎盤の機能や形成機構に関する研究は、不妊・不育や、流産の原因解明などの観点から社会的要求性が高い。本研究では、最新のCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、ヒト産科疾患の新規要因を高効率で同定する系を構築し、胎盤機能に關与する新規1遺伝子を同定した。またレンチウイルスベクターを用いた胎盤特異的遺伝子操作による機能解析を駆使して、Placl遺伝子およびElf5遺伝子が胎盤形成に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Placentation is a critical event for both maternal and fetal life. In the present study, we utilized CRISPR/Cas9 system and lentiviral vector mediated placenta specific transgenic system to identify the genes important for placentation and decipher their roles. By injecting sgRNA/Cas9 expressing plasmids, we have knocked out 6 placenta specific genes and identified 1 gene critical for embryonic development. On the other hand, we overexpressed Placl and Elf5 in placenta specifically and found these genes play critical roles during placentation and fetal development.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集 レンチウイルス 実験動物 遺伝子改変

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎盤研究の難しさ

哺乳動物の胎盤は、胚発生において最初に形成される臓器であり、栄養供給、ガス交換を介して母体と相互作用することで、妊娠の維持や胎児の発生を進める重要な役割を担っている。胎盤機能に異常をきたすと、胎子の発育不良をきたすだけでなく、母体の予後に大きな影響を及ぼすことが知られている。その中でも特に、妊婦の約 5~10%に認められる妊娠高血圧症候群は、母体に高血圧、尿蛋白などが現れる病気であり、母体・胎子に様々な障害をもたらす。妊娠高血圧症候群の患者の胎盤では、トロホプラスト細胞の浸潤過程が異常であることが多く、子宮らせん動脈の拡張が不十分なために、高血圧・発育不全などの病態を呈することがわかってきているが、胎盤の複雑な構造・細胞間相互作用を試験管内で再現することが難しいため、その根本原因や発症メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

(2) 新規遺伝子改変技術の登場

近年のジーンターゲットング法を用いた遺伝子組換え技術を受けて、特定の遺伝子を欠損させたノックアウト (KO) マウスを作製・解析することにより、個体レベルでの遺伝子機能解析が進み、胎盤機能に関わる重要な遺伝子が数多く報告されてきた (Rossant J et al, Nat Rev Genet. 2001)。しかし従来の KO マウス作製には胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた方法が主流であったが、ターゲティングベクターの構築やキメラマウス作製などの高度な技術や多大な労力・時間・費用が掛かるという多くの問題点がある。

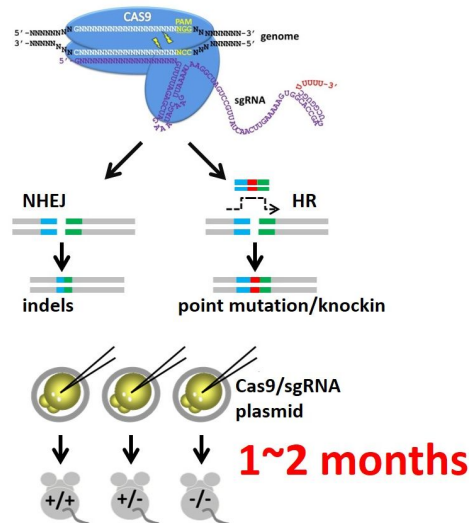
2. 研究の目的

(1) 胎盤機能関連遺伝子のスクリーニング

本研究では、最近注目を集めている「CRISPR/Cas9 システム」【図 1】を用いて任意のゲノム配列を編集する技術により、短期間で効率良く KO マウスを作製・表現型解析をし、産科疾患に関連する候補遺伝子のスクリーニングを行うことを 1 つ目の目的とした。

(2) 次に、この技術を用いることで、ヒトの疾病型変異をマウスに導入することで疾患モデルマウスの作製ができるため、最終的には治療のための薬剤スクリーニングや、遺伝子治療法の開発を目指し、ヒト産科疾患の胎盤異常に至るメカニズムについて迫ることを目的とした。

CRISPR/CAS9 method



【図 1】 CRISPR/Cas9 システム

目的遺伝子内の 20 塩基と PAM 配列 (NGG) を sgRNA により認識し、CAS9 酵素により切断することで Indel を生じ遺伝子を破壊する。相同組換え効率を上昇させることも知られている。受精卵に Cas9/sgRNA 発現プラスミドを注入するだけで、1~2 ヶ月で遺伝子破壊マウスが作製できる。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムによる胎盤機能関連遺伝子の KO マウスの作製

候補因子の選別

NCBI における EST (Expressed Sequence Tag) プロファイルで胎盤に強く発現する遺伝子を選定するだけでなく、妊娠高血圧症患者で点変異が報告されている遺伝子がリストアップされている PESNPdb (Pre-eclampsia SNP database) から候補遺伝子を挙げた。

sgRNA 設計と活性測定

遺伝子の蛋白質コード領域内の PAM (NGG) 配列を検索し、すぐ上流 20 塩基を sgRNA 配列とした。Bowtie ソフトにより sgRNA の 3'側 13 塩基と PAM 配列が一致する遺伝子座をオフターゲット候補とし、その数が少ないものを選別した。次に pX330 の BbsI サイトに sgRNA 配列 20 塩基を導入し、我々の開発した核内 DNA 切断アッセイ系により切断効率の良い物を選択した。

sgRNA/Cas9 発現プラスミドの受精卵注入

活性の高かった pX330 プラスミドを 5ng/ul の濃度で B6D2F1 系統の受精卵の前核に注入し、偽妊娠マウスに移植した。得られた産仔の尻尾からゲノム DNA を抽出し、標的領域の PCR とシーケンスによ

り遺伝子破壊を確認した。

#### KO マウスの表現型解析

得られた KO マウスについて、野生型 B6D2F1 マウスと交配させて、変異遺伝子が次世代に伝わるのを確認し、さらに交配でホモ欠損個体を得た。さらにホモ欠損個体の交配により妊孕性および胎児・胎盤重量を測定した。

#### (2) 胎盤特異的遺伝子導入による機能解析 レンチウイルス (LV) ベクターの構築

胎盤で過剰発現させたい遺伝子(Plac1, Elf5)について、タンパク質コード領域を PCR 増幅して、普遍的に強力に発現する CAG プロモーターを有する pLV-CAG レンチウイルスベクタープラスミドに挿入した。定法に従い、HEK293T 細胞を用いて、LV ベクターを調整し、超遠心により濃縮した。

#### 胎盤特異的遺伝子導入と解析

野生型 B6D2F1 もしくは Plac1 KO マウスから得られた胚盤胞に、既報に従い LV ベクターを感染させ、偽妊娠マウスの子宮に移植した (Okada et al., Nat Biotechnol. 2007)。胎令を追って、胎児、胎盤を回収し、重量測定および組織学的解析を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) CRISPR/Cas9 システムによる胎盤機能関連遺伝子の KO マウス作製

EST プロファイルおよび、タンパク質ドメイン検索により、胎盤機能に関連する候補 6 遺伝子を選別した。

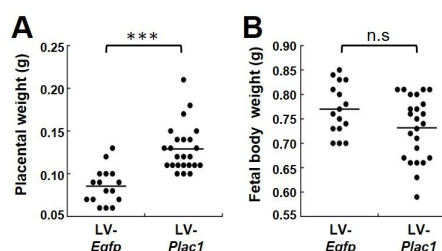
各遺伝子について切断活性を有する sgRNA を 2 つずつ設計し、pX330 プラスミドを構築した。

pX330 プラスミドを受精卵の前核に注入することで、6 遺伝子すべてについて KO マウスを作製することに成功した。

6 遺伝子の KO マウス系統について、ホモ欠損個体を得て交配試験を行ったところ、5 遺伝子については野生型コントロールと有意な差が見られなかった。残る 1 遺伝子については、ホモ欠損雌マウスから得られる産仔が軽いことが明らかとなった。

##### (2) 胎盤特異的遺伝子導入による機能解析 Plac1 および Elf5 について、高濃度の LV ベクターを作製することが出来た。

Plac1 を発現する LV ベクターを野生型 B6D2F1 マウスの胚盤胞に感染させて胎盤特異的に Plac1 を過剰発現させたところ、妊娠 16 日目の胎児の重量に変化はないものの、胎盤の過形成が認められた【図 2】。Plac1 KO マウスの表現型と比較することで、Plac1 の発現量が正常な胎盤の形成に必要なことを明らかにし、論文発表した。



#### 【図 2】胎盤特異的 Plac1 過剰発現

Plac1 を胎盤特異的に発現させると、胎盤 (A) 重量が増加するのに対し、胎児 (B) は変化しなかった。

Originally published in Muto et al., Biol Reprod 2016 [1].

Elf5 を過剰発現する LV ベクターを野生型 B6D2F1 マウスの胚盤胞に感染させて胎盤特異的に ELF5 を過剰発現させたところ、妊娠の中期に胎盤発生異常をきたし、胚性致死となることを見出した。その後の解析から、栄養膜幹 (TS) 細胞では ELF5 が EOMES と TFAP2C をリクルートして TS 細胞の未分化状態を維持するのに対し、ELF5 と TFAP2C の相互作用が増えてくると分化系の転写活性が上昇することを見出した。これらは英国の Hemberger 博士らとの共同研究成果として論文報告した [2]。

#### 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 2 件)

Muto M, Fujihara Y, Tobita T, Kiyozumi D, Ikawa M. Lentiviral Vector Mediated Complementation Restored Fetal Viability but Not Placental hyperplasia in Plac1-Deficient Mice. Biol Reprod. 2016 Jan;94(1):6. 査読有  
doi: 10.1095/biolreprod.115.133454  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586843>

Latos PA, Sienerth AR, Murray A,

Senner CE, Muto M, Ikawa M, Oxley D, Burge S, Cox BJ, Hemberger M. Elf5-centered transcription factor hub controls trophoblast stem cell self-renewal and differentiation through stoichiometry-sensitive shifts in target gene networks. *Genes Dev.* 2015 Dec 1;29(23):2435-48. 査読有  
doi: 10.1101/gad.268821.115  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26584622>

〔学会発表〕(計2件)

Masahito Ikawa. CRISPR/Cas-Mediated Genome Editing in Mice and Its Application for the Study of Reproduction. SSR 2015 Annual Meeting. 2015.06.21. Puerto Rico Convention Center (Puerto Rico, USA)

伊川 正人. 遺伝子改変動物が導く受精メカニズムの新論争. 第60回日本生殖医学会学術講演会・IFFS / JSRM International Meeting 2015. 2015.04.27. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, Masahito)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号: 20304066