

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16017

研究課題名（和文）ヒストンのメチル化依存的インプリント遺伝子の発現制御による体細胞核移植法の改善

研究課題名（英文）Improvement of somatic cell nuclear transfer technology by regulation of histone methylation-dependent imprinted gene expression

研究代表者

三浦 健人 (Miura, Kento)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：70802742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：いくつかのインプリント遺伝子は体細胞クローンマウス胚において両側アレル性の発現を示す。本研究は「インプリント遺伝子の発現異常」と「体細胞クローンで見られる胎盤異常（重量増加）」の関連解明を目的とする。インプリント遺伝子であるSmoc1またはJade1ノックアウト（KO）マウスは胎盤の顕著な異常は示さなかった。母側アレル特異的にJade1を欠損させたマウス体細胞をドナーとした体細胞クローンは、野生型クローンと比較して、胎盤は重量が減少し改善傾向を示した。体細胞クローンマウス胚におけるJade1の両側アレル性の発現が、体細胞クローンの胎盤異常の原因である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は下記成果をもたらす。胎盤形成を制御するインプリント遺伝子の分子基盤の理解。インプリント遺伝子の発現量・発現アレルとその機能との関連を明らかにすることで、ゲノムインプリントが関わる生命現象全般に共通する有益な知見を提供。H3K27me3依存的なゲノムインプリントの生物学的意義の解明。インプリント遺伝子の発現制御を利用したクローン作出効率の上昇に関する知見と技術の提供。胎盤異常の改善を通じてクローン産生効率を上昇させることで、医学・畜産学・実験動物学分野の発展へ寄与。インプリント遺伝子が関与する他の生命現象の研究でも応用可能な、インプリント遺伝子の制御技術開発へ貢献。

研究成果の概要（英文）：Some imprinted genes including Smoc1 or Jade1 (Phf17) show bilateral allelic expression in mouse embryos generated by somatic cell nuclear transfer (SCNT). This study aims to elucidate the relationship between "abnormal expression of imprinted genes" and "placental abnormalities (overweight) observed in SCNT". Smoc1- or Jade1-knockout (KO) mice do not show significant placental abnormalities. SCNT mice generated by utilizing somatic cells lacking Jade1 in maternal allele as donor showed improved placentas with reduced weight compared to wild-type SCNT mice. This study suggests that bilateral allelic expression of Jade1 may be the cause of placental abnormalities in SCNT mice.

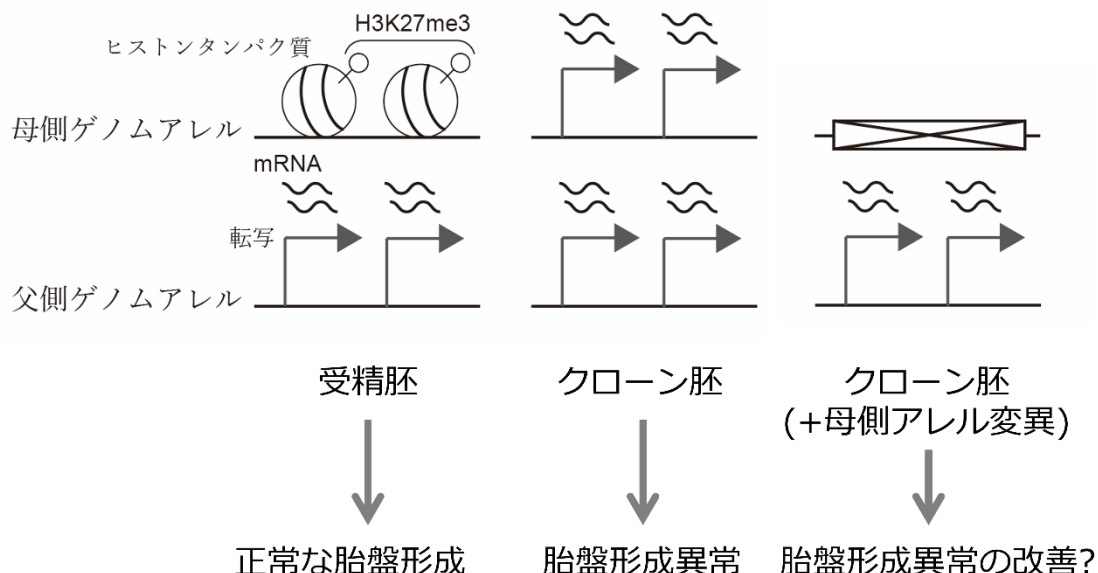
研究分野：発生工学

キーワード：胎盤 ゲノム編集 発生工学 マウス インプリント遺伝子 CRISPR/Cas9 体細胞クローン

### 1. 研究開始当初の背景

体細胞核移植クローン技術は、体細胞から個体の作出を可能にする唯一の技術であり、医薬や畜産分野への応用が期待されている。しかし、クローン動物は低出生率 (5%以下) や胎盤異常 (過形成、組織構造の乱れなど) を示すことから (Nat Genet. 1999;22(2):127-8)、クローン技術の実用化には至っていない。胎盤異常を示すクローン動物は、正常な胎盤形成を理解するモデルとしても有用である。クローンの胎盤異常の発生機序の解明は、クローンの作出効率の上昇や、胎盤形成の制御機構の理解にもつながる重要な課題であるが、クローンが胎盤異常を示す原因の多くは未解明である。

父親または母親のどちらか一方に由来するゲノムアレルからのみ発現するインプリント遺伝子の大半は、胎盤で発現や機能することが報告されている (Placenta. 2005;26 Suppl A:S10-20)。ほとんどのインプリント遺伝子は、DNA のメチル化により片側アレル性発現が制御されている。近年、母側アレル特異的なヒストン H3 の Lys27 のメチル化 (H3K27me3) の抑制的な修飾により、父側アレル特異的に発現するインプリント遺伝子が報告された (Nature. 2017;547(7664):419-424)。クローンマウス胚では、これらの H3K27me3 依存的インプリント遺伝子は、母側アレルのヒストンのメチル化修飾が失われているために、両側アレル性の発現を示す (Cell Stem Cell. 2018;23(3):343-354, e5)。このことから、「体細胞クローンの胎盤異常」と「H3K27me3 依存的なインプリント遺伝子の発現異常」との関連が疑われる。しかしながら、これらのインプリント遺伝子の「正常な胎盤発生における機能」や「体細胞クローンの胎盤異常との関連」は不明である。



### 2. 研究の目的

本研究は、「H3K27me3 依存的なインプリント遺伝子の発現異常」と「体細胞クローンで見られる胎盤異常」の関連を明らかにし、それらの遺伝子の発現を正常化することで、クローンの胎盤異常を改善することを目的として行われる。具体的には、下記の目標を掲げた。

1. 標的遺伝子をノックアウトしたマウスを作出し、その胎盤表現型を解析
2. 作出したノックアウトマウス系統を利用し、クローン胚でのインプリント遺伝子の発現を正常胚に近づけることで、胎盤異常が改善するか検討した。

### 3. 研究の方法

1. H3K27me3 依存的なインプリント遺伝子のノックアウトマウス系統を CRISPR-Cas9 システムを用いて樹立した。それらのノックアウトマウス胎盤の表現型を解析した。
2. 標的インプリント遺伝子のノックアウトマウス系統を用いて、母側アレル特異的に標的遺伝子を欠損させたマウスを作出した。母側アレル特異的に遺伝子欠損したマウスの体細胞をドナーとして、体細胞クローンマウスを作出した。作出した体細胞クローンマウス胎盤の表現型を解析した。

#### 4. 研究成果

1. 標的遺伝子の1つである Slc38a4 のノックアウトマウスを用いて、Slc38a4 が胎盤・胎児の発生に必須のアミノ酸トランスポーターであることを明らかにした (Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(42):21047-21053)。
2. 標的インプリント遺伝子のうち、Smoc1 および Jade1/Phf17 の胎盤における機能解析を進めた。Smoc1 あるいは Phf17 をノックアウトしたマウス系統を CRISPR/Cas9 システムを用いて各々樹立し、出生率や胎盤表現型を解析した。Smoc1 のノックアウトマウスについては、既報の結果と同様に出生率の低下が認められた (Am J Hum Genet. 2011;88(1):30-41)。Jade1/Phf17 ノックアウトマウスにおいても出生率の低下が認められた。Smoc1、Jade1/Phf17 のいずれの KO マウスの胎盤も顕著な組織学的な異常は認められなかった。以上より、Smoc1 および Jade1/Phf17 は胎盤形成に必須の遺伝子ではない可能性が示唆された。
3. 上述の解析で用いたノックアウトマウス系統を用いて、H3K27me3 依存的なインプリントが失われた際に起こる胎盤形成と胚発生異常の原因遺伝子を探索した。結果として、胎盤形成の原因遺伝子として Slc38a4 同定した (Genes Dev. 2022;36(7-8):483-494)。
4. 上述の解析から、本研究の標的遺伝子の多くが、全身でノックアウトすると個体が致死となる遺伝子 (致死遺伝子) であると予想された。致死遺伝子の解析を効率的に行うために、目的の組織だけが遺伝子変異を有するキメラマウスを簡便に作出する方法を開発した (Biol Reprod. 2021;104(1):223-233.)。
5. 標的インプリント遺伝子のうち、Sfmbt2、Gab1、Slc38a4、Smoc1 あるいは Jade1/Phf17 がノックアウトされたマウス系統を用いて、母側アレル特異的に標的遺伝子を欠損させたマウスを作出した。母側アレル特異的に遺伝子欠損させたマウスの体細胞をドナーとして、体細胞クローンマウスを作出した。Sfmbt2、Gab1、Slc38a4 あるいは Smoc1 を各々欠損させたクローンマウスでは、野生型クローンマウスと比較して胎盤重量に差はなく、胎盤異常は改善しなかった (Nat Commun. 2020;11(1):2150)。Jade1/Phf17 欠損クローンマウス胎盤は重量が減少し、改善傾向が見られた。以上より、体細胞クローンマウス胚において、Jade1/Phf17 が母側アレルから異所的に発現することが、クローンマウスの胎盤異常の原因である可能性が示唆された。
6. クローンマウス作出技術改良のためのアプローチとして、過去にクローンマウス作出が成功していない胎盤系細胞をドナー細胞として用いた核移植を試みた。ChIP-seq 解析により胎盤系細胞に安定化された H3K9me3 のドメイン構造が存在することを明らかにした。酵素処理により H3K9me3 を取り除いた胎盤系細胞をドナーとして用いることで、胎盤系細胞由来のクローンマウス作出に成功した (Genes Dev. 2022;36(1-2):84-102.)。

#### <引用文献>

1. Nat Genet. 1999 Jun;22(2):127-8. doi: 10.1038/9632.
2. Placenta. 2005 Apr;26 Suppl A:S10-20. doi: 10.1016/j.placenta.2004.12.009.
3. Nature. 2017 Jul 27;547(7664):419-424. doi: 10.1038/nature23262.
4. Cell Stem Cell. 2018 Sep 6;23(3):343-354. e5. doi: 10.1016/j.stem.2018.06.008.
5. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Oct 15;116(42):21047-21053. doi: 10.1073/pnas.1907884116.
6. Am J Hum Genet. 2011 Jan 7;88(1):30-41. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.11.012.
7. Genes Dev. 2022 Apr 1;36(7-8):483-494. doi: 10.1101/gad.349390.122.
8. Biol Reprod. 2021 Jan 4;104(1):223-233. doi: 10.1093/biolre/iaaa176.
9. Nat Commun. 2020 May 1;11(1):2150. doi: 10.1038/s41467-020-16044-8.
10. Genes Dev. 2022 Jan 1;36(1-2):84-102. doi: 10.1101/gad.348782.121.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hada Masashi, Miura Hisashi, Tanigawa Akie, Matoba Shogo, Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Hirose Michiko, Watanabe Naomi, Nakato Ryuichiro, Fujiki Katsunori, Hasegawa Ayumi, Sakashita Akihiko, Okae Hiroaki, Miura Kento, Shikata Daiki, Arima Takahiro, Shirahige Katsuhiko, Hiratani Ichiro, Ogura Atsuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Highly rigid H3.1/H3.2/H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 84 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.348782.121	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 -

1. 著者名 Miura Kento, Ogura Atsuo, Kobatake Kohei, Honda Hiroaki, Kaminuma Osamu	4. 巻 62
2. 論文標題 Progress of genome editing technology and developmental biology useful for radiation research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 i53 ~ i63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa127	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 -

1. 著者名 Miura Kento, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Ogura Atsuo	4. 巻 104
2. 論文標題 Generation of chimeric mice with spermatozoa fully derived from embryonic stem cells using a triple-target CRISPR method for Nanos3 <sup>+</sup>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 223 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa176	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 -

1. 著者名 Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Kamimura Satoshi, Inoue Hiroki, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Honda Arata, Miura Kento, Hada Masashi, Hasegawa Ayumi, Watanabe Naomi, Dodo Yukiko, Mochida Keiji, Ogura Atsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfmbt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16044-8	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 -

1. 著者名 Matoba Shogo, Nakamuta Shoko, Miura Kento, Hirose Michiko, Shiura Hirotsuke, Kohda Takashi, Nakamuta Nobuaki, Ogura Atsuo	4. 巻 116
2. 論文標題 Paternal knockout of Slc38a4/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 21047 ~ 21053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1907884116	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 -

1. 著者名 Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Kamimura Satoshi, Inoue Hiroki, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Honda Arata, Miura Kento, Hada Masashi, Hasegawa Ayumi, Watanabe Naomi, Dodo Yukiko, Mochida Keiji, Ogura Atsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfbmt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16044-8	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 -

1. 著者名 Matoba Shogo, Kozuka Chisayo, Miura Kento, Inoue Kimiko, Kumon Mami, Hayashi Ryoya, Ohhata Tatsuya, Ogura Atsuo, Inoue Azusa	4. 巻 36
2. 論文標題 Noncanonical imprinting sustains embryonic development and restrains placental overgrowth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 483-494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.349390.122	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 三浦 健人, 的場 章悟, 廣瀬 美智子, 小倉 淳郎
2. 発表標題 Nanos3を標的としたtriple-target CRISPR法を用いてES細胞由来の精子のみを持つキメラマウスを作出する
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 持田 慶司, 廣瀬 美智子, 長谷川 歩未, 三浦 健人, 渡邊 奈穂美, 井上 貴美子, 水野 沙織, 吉木 淳, 小倉 淳郎
2. 発表標題 野生由来異種マウスを用いたES細胞の樹立とキメラマウスの作出
3. 学会等名 日本繁殖生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 的場章悟, 中牟田祥子, 三浦健人, 廣瀬美智子, 中牟田信明, 小倉淳郎
2. 発表標題 胎盤に発現するアミノ酸トランスポーター遺伝子Slc38a4のノックアウトマウス胚は胎盤低形成および胎児発育不全を示す
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 持田慶司, 廣瀬美智子, 長谷川歩未, 三浦健人, 井上貴美子, 水野沙織, 吉木淳, 小倉淳郎
2. 発表標題 野生由来亜種および異種マウスからのES細胞株樹立の取り組み
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上貴美子, 越後貴成美, 上村悟氏, 的場章悟, 廣瀬美智子, 本多新, 三浦健人, 羽田政司, 百々由希子, 長谷川歩未, 持田慶司, 小倉淳郎
2. 発表標題 胎盤特異的インプリント遺伝子Sfmbt2内のマイクロRNAクラスターのインプリント消失は体細胞クローンマウスの胎盤異常を引き起こす
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦健人, 的場章悟, 廣瀬美智子, 本多新, 本多新, 小倉淳郎
2. 発表標題 Triple CRISPR技術を用いた胚盤胞置換法の試み
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 的場章悟, 三浦健人, 尾崎藍, 小倉淳郎, 田村勝
2. 発表標題 マウスY染色体上遺伝子ノックアウトによる性スペクトラム表現型への影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimiko Inoue, Kento Miura, Yukiko Dodo, Atsuo Ogura
2. 発表標題 Elucidation of imprinted genes responsible for hyperplasia in somatic cell nuclear transferred placentas
3. 学会等名 2022 ICAR/Interbull Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上貴美子, 三浦健人, 百々由起子, 小倉淳郎
2. 発表標題 マウス胎盤特異的インプリント遺伝子の発現異常が体細胞クローン胎盤に与える影響について
3. 学会等名 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kimiko Inoue, Kento Miura, Yukiko Dodo, Atsuo Ogura
2. 発表標題 Elucidation of imprinted genes responsible for hyperplasia in somatic cell nuclear transferred placentas
3. 学会等名 19th International Congress on Animal Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kimiko Inoue, Kento Miura, Yukiko Dodo, Atsuo Ogura
2. 発表標題 Elucidation of imprinted genes responsible for hyperplasia in somatic cell nuclear transferred (SCNT) placentas
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>広島大学 原爆放射線医科学研究所 疾患モデル解析研究分野  <a href="https://shikkan-model.hiroshima-u.ac.jp/index.html">https://shikkan-model.hiroshima-u.ac.jp/index.html</a></p> <p>理化学研究所 バイオリソース研究センター 遺伝工学基盤技術室  <a href="https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html">https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html</a></p> <p>1世代でES細胞由来の精子のみを持つキメラマウスを作出  <a href="https://mus.brc.riken.jp/ja/current_tech/oct_2020">https://mus.brc.riken.jp/ja/current_tech/oct_2020</a></p> <p>Conditional surrender in one generation  <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33057575/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33057575/</a></p> <p>体細胞クローンマウスの胎盤異常の原因を解明 - 胎盤の正常な形成に必要な刷り込み型マイクロRNA -  <a href="https://www.riken.jp/press/2020/20200501_2/index.html">https://www.riken.jp/press/2020/20200501_2/index.html</a></p> <p>胎盤・胎児の発生に重要なアミノ酸トランスポーターを同定  <a href="https://www.riken.jp/press/2019/20191008_3/index.html">https://www.riken.jp/press/2019/20191008_3/index.html</a></p> <p>母親ゲノムの記憶が胎児を育む - 胎盤と胚発生に重要な刷り込み遺伝子を同定 -  <a href="https://www.riken.jp/press/2022/20220428_1/index.html">https://www.riken.jp/press/2022/20220428_1/index.html</a></p>
--

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
---------	---------