

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591830

研究課題名（和文） 胎盤の細胞融合における Mfsd2 遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Mfsd2 gene in cell-cell fusion in placenta

研究代表者

盛武 浩 (MORITAKE HIROSHI)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：40336300

研究成果の概要（和文）：胎盤の細胞融合を担う Syncytin 遺伝子の受容体である Mfsd2 遺伝子のノックアウトマウス(KO)を作成した。KO マウスの体重は小さく、その後の発育も不良であった。しかし、胎生期 18.5 と 12.5 日に KO 胎仔と胎盤の病理学的検討を行ったが異常なく、更に CD31 と Ki67 の免疫染色でも明らかな異常は認めなかった。また、胎仔線維芽細胞を用いてアレイ解析も行ったが、胎盤形成、血管新生、細胞周期、アポトーシスなどに関与する既知の重要遺伝子群に有意な発現差を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We made knock out (KO) mice with complete disruption of the *Mfsd2* gene, which encodes the receptor for the syncytin gene. The weight of KO mice was low, and the growth rate was poor compared with wild type (WT) mice. We performed the pathological comparison of the embryo and placenta on embryonic 18.5 and 12.5 days. There was no difference between KO and WT mice in pathological studies including immunostaining of CD31 and Ki67. Additionally, we used cDNA microarray analysis to compare gene expression profiles between WT and KO mouse embryonic fibroblasts, however, there was no major difference among placenta formation, angiogenesis, cell cycle, or apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎盤は、母体・胎児間での栄養やガス交換などを行う臓器で、胎生に必須なものである。哺乳類の胎盤は、独自に進化したもので、その機能と形成機能を解明することは、哺乳類の発生と進化を理解する上でも非常に重

要である。

(2) ヒトゲノムのうち約半数はレトロウイルスの遺伝子に由来しているが、これらの DNA は、当初「ゲノム中のゴミ」と考えられていた。近年、これらのレトロトランスポゾンに

由来するいくつかの遺伝子が、哺乳類の中でも真獣類のみに保存され胎盤の母子間相互作用部位で必要不可欠なものとして、KO マウスを用いた実験系から明らかになってきた。

(3) 具体的には *Peg10* (paternally expressed 10) や *Peg11* (paternally expressed 11) が広く知られている。

① *Peg10* は父親性発現を示すインプリンティング遺伝子であるが、ロックアウト (KO) マウスは、その変異が父親から由来する場合にのみ初期胚致死の表現型が現れる。その原因は、胎盤形成が正常に起こらないためであり、形態学的には胎仔期 9.5 日目の段階で停止している。この時期以降の胎仔の成長には胎盤からの栄養補給が必須であるために、胎仔の成長も止まっている。しかし、正常胎盤を 4 倍体キメラ法で供給することにより、*Peg10* KO マウスが正常にうまれることから、初期胚致死の原因は胎盤形成不全にあることが証明されている (Ono et al. 2006 Nat Genet)。

② *Peg11* も同様に父親由来のアレルのみから発現する父性発現インプリンティング遺伝子である。KO マウスは、その変異が父親から由来する場合には、約半数は胎生 15.5-16.5 日目に致死となる。胎生致死を逃れた胎仔も胎生 15.5 日目以降に成長不良が認められ、出生時には約 20% の体重低下を示す。病理学的に胎盤迷路層に異常がみられ、トロホブラスト細胞が血管内皮細胞を貪食して変性し、毛細血管を詰まらせている所見が認められている。これにより栄養交換効率の低下を招き、胎生後期致死と成長不良の原因であると想定されている。一方、変異が母親から由来する場合には、本遺伝子の過剰発現マウスとなるが、胎盤は 150% の過成長を示す。病理学的には胎仔性毛細血管が拡張し、周辺のトロホブラスト細胞が栄養飢餓状態の所見が認められ、この原因により新生仔期致死となる (Sekiya et al. 2008 Nat Genet)。

(4) これらレトロトランスポゾン由来遺伝子である *Peg10* および *Peg11* の KO マウスの解析から得られた知見は、胎盤形成におけるレトロトランスポゾン遺伝子の重要性を認識させる。真獣類ではゲノムの半分近くをレトロトランスポゾン由来の配列が占めているが、同じレトロトランスポゾンで胎盤のみに特異的に発現している *Syncytin-2* の受容体として *Mfsd2* (*Major facilitator superfamily domain containing 2*) 遺伝子が同定された (Esnault et al. 2008 PNAS)。 *Syncytin* には、*Syncytin-1* と *Syncytin-2* の 2 つのホモログの存在が知られているが、いずれも胎盤特異的な発現を示し、中でも特に

syncytiotrophoblast (栄養膜合体層、合体性栄養細胞層) という母児間の物質交換のみならず母体の免疫系からの防衛戦にもなる細胞群に強い発現パターンを示す遺伝子である。培養細胞に *Syncytin* を強制発現させることにより、本遺伝子には細胞融合を促す機能があることが知られている。細胞が融合すると体積は大きくなるが、表面積は体積ほど大きくはならないため、細胞膜に余裕ができ、この余剰の細胞膜があることが、胎児と母体との間の物質交換を担う細胞表面の面積を大きくする事に寄与しているが明らかになった (Mi et al. 2000 Nature)。

2. 研究の目的

(1) これらレトロトランスポゾン由来遺伝子である *Peg10* および *Peg11* の KO マウスの解析から得られた知見は、胎盤形成におけるレトロトランスポゾン遺伝子の重要性を認識させる。真獣類ではゲノムの半分近くをレトロトランスポゾン由来の配列が占めているが、同じレトロトランスポゾンで胎盤のみに特異的に発現している *Syncytin-2* の受容体として *Mfsd2* (*Major facilitator superfamily domain containing 2*) 遺伝子が同定された (Esnault et al. 2008 PNAS)。

(2) *Syncytin* には、*Syncytin-1* と *Syncytin-2* の 2 つのホモログの存在が知られているが、いずれも胎盤特異的な発現を示し、中でも特に *syncytiotrophoblast* (栄養膜合体層、合体性栄養細胞層) という母児間の物質交換のみならず母体の免疫系からの防衛戦にもなる細胞群に強い発現パターンを示す遺伝子である。培養細胞に *Syncytin* を強制発現させることにより、本遺伝子には細胞融合を促す機能があることが知られている。細胞が融合すると体積は大きくなるが、表面積は体積ほど大きくはならないため、細胞膜に余裕ができ、この余剰の細胞膜があることが、胎児と母体との間の物質交換を担う細胞表面の面積を大きくする事に寄与しているが明らかになった (Mi et al. 2000 Nature)。

(3) この胎盤の *syncytiotrophoblast* の細胞融合反応に重要な働きを有している *Syncytin-2* の特異的受容体として 2008 年に同定された *Mfsd2* 遺伝子は、ヒトでは 1 番染色体の長腕、マウスでは 4 番染色体長腕に存在する膜貫通型蛋白で、受動輸送体ファミリーである *Major facilitator superfamily* に属する。その構造からは、糖の受動輸送に関与していることが想定されているが、その生理学的機能に関する報告は未だなされていなかった。Esnault らは、*Mfsd2* 遺伝子を *Syncytin-2* の特異的受容体として報告したのみならず、細胞株を用いた実験で *Mfsd2* 遺伝子を過剰発現させること

により、細胞融合を促進することを証明している。このことは*Mfsd2*が*Syncytin-2*と共同で胎盤形成に重要な一役を担っていることを示唆している。

(4)ヒト*Syncytin-1*遺伝子のホモログである*Syncytin-A*のKOマウスが作成され、syncytiotrophoblastの細胞融合反応に異常を来し、胎性11.5~13.5日に胎性致死を示すことが報告されている(Dupressoir et al. 2009 PNAS)。

(5)*Mfsd2*遺伝子も胎盤形成に重要な働きを有している可能性が極めて高いと考えられる。そこで、我々は*Mfsd2*遺伝子の胎盤形成における機能解析を行うために、*Mfsd2* KOマウスを作成した。本研究は当院動物実験申請番号2008-506として承認されている。

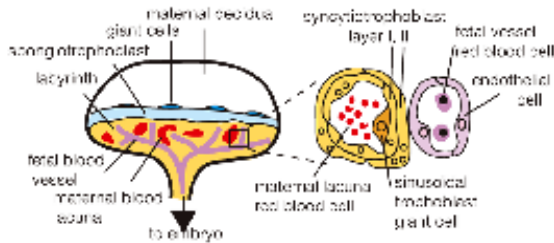
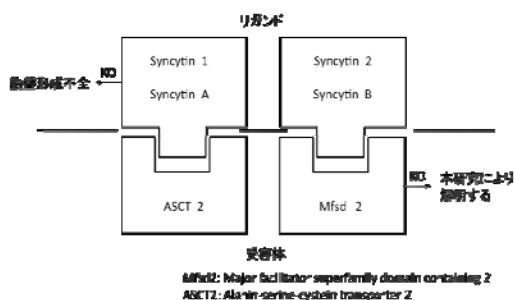


図 胎盤の解剖学的形態

胎盤は母体由来の脱落膜(maternal decidua)と胎児由来の栄養膜(trophoblast)から構成される。Trophoblastはlabyrinth(迷路部), spongiotrophoblast(海綿状栄養細胞), giant cell(巨細胞)から成る。Labyrinthは母子間のガス交換、栄養補給、老廃物排泄等の役割を担う部位である。その構造を拡大すると右図のように、syncytiotrophoblast(栄養膜合体)が中心的役割を担っている。



3. 研究の方法

(1) *Mfsd2* 遺伝子を含む BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クロンを購入し、米国 NCI の Copeland から retrieve vector をはじめとしたコンストラクトに必要な 3 種類のバックボーンベクターの供与を受け、彼らの recombinering の手法に準じてターゲティングベクターを作成し、ジーンターゲテ

ィングを行った (Copeland et al. 2001 Nat Rev Genet)。 *Mfsd2* は 14 個のエクソンからなるが、イントロン 1 とエクソン 14 の 3' 下流域に loxP を挿入し、Cre リコンビナーゼ存在下でエクソン 2 から以降を全て欠失させる方法である。これにより、膜貫通型蛋白である本遺伝子の全ての膜貫通ドメインを欠失させることができる。

(2) ES 細胞は Specialty Media 社より 129 マウス由来細胞を購入し、エレクトロポレーションにより遺伝子導入を行い、サザンブロット法により相同組み替え細胞を得た後、C57BL/6 マウスにマイクロインジェクションでキメラマウスを作成した。以降、Germ line transmission を確認し、サザンブロット法によりターゲティングの成功も確認した。

(3) 雄雌ヘテロマウスの交配により、胎性期 18.5 と 12.5 日目の妊娠マウスから、胎仔および胎盤をそれぞれ識別した状態で摘出し遺伝子型を決定した上で、KO 胎仔と胎盤の病理学的検討を行った。特に syncytiotrophoblast layer を中心に検討する。

(4) 胎性期 18.5 ならびに 12.5 日目に合胞栄養芽層の血管形成や細胞増殖を確認するために、CD31 と Ki67 の免疫染色を施行した。

(5) 受動輸送体遺伝子の 1 つで何らかの糖輸送に関与していることが知られているために、*Mfsd2* 遺伝子 KO 胎仔線維芽細胞を用いてアレイ解析を行った

(5) *Mfsd2* 遺伝子の胎盤以外の組織での発現を解析するために、大脳、小脳、心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、卵巣、精巣、骨格筋、リンパ節、骨髄、胃、小腸、大腸の各臓器から Total RNA を抽出して、*Mfsd2* 遺伝子のプローブを用いてノーザンブロット法で発現解析を行った。

(6) *Mfsd2* 遺伝子の細胞内局在を調べるために、*Mfsd2* 遺伝子に GFP を融合させて NIH3T3 細胞に強制発現し共焦点顕微鏡で観察した。

(7) *Mfsd2* がコードする蛋白は、その構造から糖の受動輸送に関与していることが想定され、エネルギー・糖代謝の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが予想された。よって、*Mfsd2* KO マウスの発育について評価した。

4. 研究成果

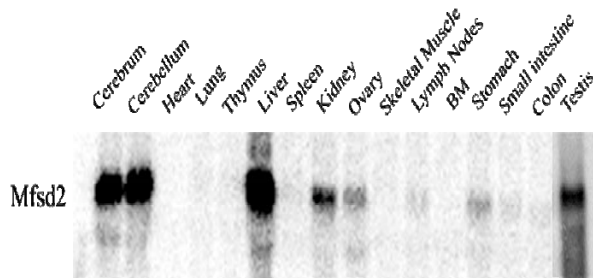
(1) 胎性期 18.5 および 12.5 日目の KO 胎仔お

よび胎盤の HE 染色表本における病理学的検討では明らかな胎盤形成不全所見は認めなかった。

(2)胎性期 18.5 および 12.5 日目の KO 胎仔および胎盤、特に合胞栄養芽層の CD31 と Ki67 免疫染色を施行したが差を認めなかった。

(3)*Mfsd2* 遺伝子 KO 胎仔線維芽細胞を用いたアレイ解析を行い、KO において *Cr11*、*Nlrp6*、*Pla2g5* 遺伝子等の優位な上昇、*Cyp11a1*、*Rhbd12*、*Slurp1*、*Rhbd12*、*Mfi2* 遺伝子の有意な低下を認めた。しかし、胎盤形成、血管新生、細胞周期、アポトーシスなどに関与する既知の重要遺伝子群に有意な発現差を認めなかった。

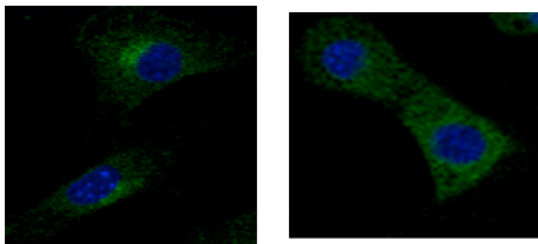
(4)大脳、小脳、肝臓、腎臓、卵巣、精巣、胃、小腸、大腸に *Mfsd2* 遺伝子の発現を認めた。



(5)*Mfsd2*-GFP 発現パターンは粗面小胞体 (ER) に存在するとされる *Hax1*-GFP と同じパターンを示し、少なくとも過剰発現系では ER に多く存在する事が証明された。

Mfsd2-GFP

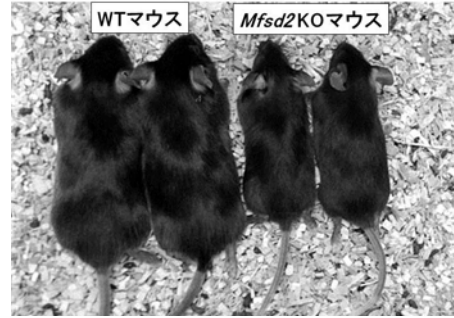
Hax1-GFP



(6)*Mfsd2* KO マウスは野生型と比較して出生体重が小さいだけでなく、成獣になっても小さく、また体脂肪率が低下していた。*Mfsd2* KO マウスの胎盤に病理学的異常所見を認めていないこと、一方、*Mfsd2* が発現している臓器はエネルギー・糖代謝の恒常性維持に重要な役割を果たす臓器であることから *Mfsd2* が胎児のエネルギー代謝、さらには出生後も

種々の臓器でエネルギー・糖代謝の恒常性維持に重要な役割を果たし、エネルギーバランスとして正に働いていることが示唆された。

**WTマウスと*Mfsd2*ノックアウト(KO)マウス
成獣個体の比較**



5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盛武 浩 (MORITAKE HIROSHI)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：40336300

(2) 研究分担者

片岡 寛章 (KATAOKA HIROAKI)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10214321