

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24613001

研究課題名(和文)胎盤特異的インプリント遺伝子Gab1の胎盤における機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a placenta-specific imprinted gene Gab1 in the placenta

研究代表者

岡江 寛明(Okae, Hiroaki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10582695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：Gab1 KOマウス、胎盤幹細胞および体細胞クローンなどを用い、胎盤特異的インプリント遺伝子Gab1の機能解析と、インプリンティング制御機構の解析を行った。その結果、Gab1の父親由来アレル特異的な発現は、新規differentially methylated region (DMR)によって制御されており、父親由来のGab1のみが胎盤発生に重要であることを明らかにした。また、クローンマウスの胎盤ではGab1 DMRが失われおり、それに伴うGab1の過剰発現が、胎盤過形成の原因の一つである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gab1 is a novel placenta-specific imprinted gene and we analyzed the function and regulatory mechanism of Gab1 using Gab1 KO mice, trophoblast stem cells and cloned mice. We found that the paternal expression of Gab1 was regulated by a novel differentially methylated region (DMR) and the imprinted expression was important for normal placental development. We also found that in cloned mouse placentas, the Gab1 DMR was lost and Gab1 was highly expressed, which may contribute to placentomegaly of cloned mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノムインプリンティング メチル化インプリント 胎盤幹(TS)細胞

1. 研究開始当初の背景

ゲノムインプリンティングとは、一部の遺伝子が母親もしくは父親由来アリル特異的に発現する現象である。ゲノムインプリンティングは、胎盤を有する哺乳類に特有な現象であり、胎盤形成にその生物学的重要性が指摘されている。

申請者らは、次世代シーケンサーを用い、胎盤特異的インプリント遺伝子の網羅的検索を行い、新規インプリント遺伝子 Gab1 を同定した (Okoe et al. Hum. Mol. Genet. 2011)。さらに、体細胞クローンマウスの胎盤において Gab1 がインプリティング異常を示し、過剰に発現していることを発見した。体細胞クローンマウスは全例で胎盤過形成を示すことが知られていることから、Gab1 のインプリンティング制御が、胎盤形成に重要な役割を担う可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規胎盤特異的インプリント遺伝子 Gab1 の、胎盤発生における機能と、その発現制御機構を解明することである。具体的には、以下の3点を明らかにする。

- (1) 胎盤の正常発生における Gab1 の機能
- (2) Gab1 の片親性発現を制御するエピジェネティックな分子機構
- (3) Gab1 のインプリンティング制御の破綻が胎盤発生に与える影響 (モデルとして、クローンマウスを使用する)

3. 研究の方法

(1) 胎盤の正常発生における Gab1 の機能解析

野生型マウス (WT)、母親由来アリルを KO したヘテロマウス (Gab1 (m/+))、父親由来アリルを KO したヘテロマウス (Gab1 (+/p)) を作製し、胎盤の組織学的解析および、遺伝子発現解析を行った。

(2) Gab1 のインプリンティング制御機構の解析

卵子、精子、着床前胚、正常胎盤、胎盤幹 (TS) 細胞等を用い、Gab1 のプロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾状態を解析した。いずれの解析も、SNPs を用いることでアリルを区別して行う。

(3) クローンマウスの胎盤における Gab1 のインプリンティング異常の解析

(2) で同定した Gab1 のエピジェネティック制御が、クローンマウス胎盤で正常に保たれているかどうかを解析した。さらに、Gab1 (+/-) 細胞を用いてクローンマウスの作製を行い、胎盤過形成がレスキューされるかどうかを検討した。

4. 研究成果

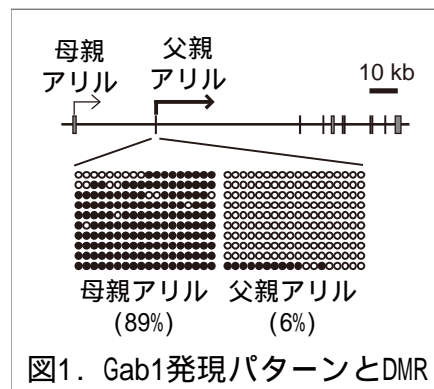
(1) 胎盤の正常発生における Gab1 の機能解析

WT、Gab1 (m/+)、Gab1 (+/p) マウスを作製し、胎生 17.5 日目に胎仔および胎盤を摘出した。胎仔および胎盤の重量を比較したところ、Gab1 (+/p) マウスにおいてのみ、胎盤重量の減少が見られた。一方、胎仔重量には大きな違いは見られなかった。よって、父親由来の Gab1 が、正常な胎盤発生に重要であると考えられる。さらに、胎盤切片の HE 染色および免疫染色を行ったところ、Gab1 (+/p) マウスの胎盤ではラビリンス層の異常が見られ、重量減少の主要な原因であることが示唆された。

(2) Gab1 のインプリンティング制御機構の解析

B6 と JF1 マウスを交配することで、DNA 多型を有する正常胎盤および TS 細胞を作製し、Gab1 の DNA メチル化およびヒストン修飾の解析を行った。その結果、母親由来アリル特異的メチル化を受ける新規 DMR (Differentially methylated region) を発見するとともに、H3K4me3 や H3K9me2 などのヒストン修飾がアリル特異的に見られることを明らかにした。さらに、卵子、精子、着床前胚における DNA メチル化解析を行い、Gab1 DMR は着床後に獲得される 2 次的な DMR であることを示した。

興味深いことに、Gab1 には 2 つのアイソフォームが存在し、一方は父親由来アリルより、もう一方はごく弱いながらも、母親由来アリルより発現していた (図 1)。父親由来アリルより発現するアイソフォームは胎盤以外の組織では発現しておらず、N 末の pleckstrin homology (PH) ドメインを欠いたタンパク質をコードしていた。よって、全長の Gab1 ではなく、PH ドメインを欠くアイソフォームが胎盤の成長を正に制御していると考えられる。



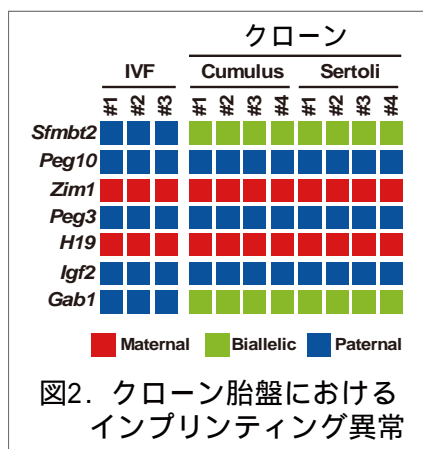
(3) クローンマウスの胎盤における Gab1 のインプリンティング異常の解析

DNA 多型を有するクローンマウスを作製し、胎盤における Gab1 のアリル特異的 DNA メチル化およびヒストン修飾状態を解析した。そ

の結果、クローンマウスではアリル特異的なエピジェネティック修飾が見られないことを明らかにした。さらに、クローン作製に使用した体細胞、着床前のクローン胚を用いてアリル特異的 DNA メチル化解析を行ったところ、Gab1 の DMR は体細胞で既に失われており、核移植によって Gab1 DMR の再確立は起こらないことを見出した。

クローンマウスにおける Gab1 の発現異常をレスキューするため、Gab1 ヘテロ K0 マウスから得られた体細胞を用いて核移植を行った。得られた胎盤の重量を測定したところ、Gab1 ヘテロ K0 マウス由来の胎盤は、通常のクローンマウスの胎盤と比べて小さいものの、正常胎盤と比べると大きかった。すなわち、Gab1 の発現量を正常化しただけでは、クローンマウスの胎盤過形成を完全にはレスキューできないことが明らかとなった。

申請者らは最近、次世代シーケンサーを用いたアリル特異的遺伝子発現解析により、Gab1 以外にもクローンマウスの胎盤で発現異常を示すインプリント遺伝子を発見した(図2)。そのため、クローンマウスにおける胎盤過形成には、Gab1 以外のインプリント遺伝子の発現異常も関与している可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられる。



## 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 9 件)

1. Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, Kikuchi H, Yoshida H, Tanaka A, Suyama M, Arima T. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. **PLOS Genetics**. 10(12): e1004868.2014. 査読有
2. Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. Imprinting methylation errors in ART. **Reproductive**

## Medicine and Biology.

13(4),193-202.2014. 査読有

3. Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. **Hum Mol Genet**. 23(4), 992-1001, 2014. 査読有
4. Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technologies. **Pediatrics international**. 55, 542-549, 2013. 査読有
5. Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of the abnormal imprinting of human induced pluripotent stem cells. **BMC Genetics**. 14, 32, 2013. 査読有
6. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. **Human Reproduction**. 27 (8), 2541-2548, 2012. 査読有
7. Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T. High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics**. 5, 8-17, 2012. 査読有
8. Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, Arima T, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. **Cell and Tissue**. 347, 457-465, 2012. 査読有
9. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of

genes with placenta-specific imprinted expression. **Hum Mol Genet.** 21(3), 548-558, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 第 11 回 ART 生涯研修コース (日本受精着床学会)「ヒト胚発生におけるエピジェネティクスの変調」有馬隆博、岡江寛明、ベルサール九段 イベントホール、東京 (3/8/2015)
2. 第 35 回不妊カウンセラー・体外受精コーディネーター養成講座「生殖医療とエピジェネティクス」有馬隆博、岡江寛明、ニッショ - ホ - ル、東京(10/4/2014)
3. 第 32 回日本受精着床学会総会・学術講演会「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスと 4 疾患」有馬隆博、岡江寛明、ハイアットリージェンシー東京、東京 (7/31/2014)
4. 第 54 回日本先天異常学会「発生期における化学物質暴露による中枢神経の異常」有馬隆博、岡江寛明、麻布大学、神奈川 (7/26/2014)
5. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会「ART と先天異常」有馬隆博、岡江寛明、江陽グランドホテル、仙台 (11/22/2013)
6. 第 58 回日本生殖医学会 学術講演会・総会「ART とゲノムインプリンティング」有馬隆博、岡江寛明、神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル、神戸 (11/16/2013) (11/15/2013-11/16/2013)
7. 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会「基礎から臨床へ、ART とエピゲノム」有馬隆博、岡江寛明、別府国際コンベンションセンター、別府(8/9/2013)
8. 第 22 回環境化学討論会「GCxGC-TOF/MS を用いたヒト血液中の有機化学物質測定: 症例対照研究への適用」有馬隆博、岡江寛明、東京農工大学府中キャンパス、東京 (7/31/2013)
9. 第 22 回環境化学討論会「IPB-39 環境由来化学物質の男性精子への影響」有馬隆博、岡江寛明、東京農工大学府中キャンパス、東京(7/31/2013-8/2/2013)
10. 第 54 回日本卵子学会「生殖領域におけるエピジェネティクス研究の最前線」有馬隆博、岡江寛明、学術総合センター2階 一橋記念講堂、東京 (5/25/2013)

11. 第 116 回日本小児科学会学術集会「生殖補助医療と小児科医療の接点」有馬隆博、岡江寛明、広島市文化交流会館、広島 (4/20/2013)
12. 日本生殖再生医学会・第 8 回学術集会「乏精子症とゲノムインプリンティング」有馬隆博、岡江寛明、シェーンバウハ・サボー、東京 (3/10/2013)
13. 第 5 回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク公開シンポジウム「Non-random loss of imprinting in cloned mice」有馬隆博、岡江寛明、京都大学医学部構内芝蘭会館、京都(11/20-21/2012)
14. 第 11 回学術集会日本不妊カウンセリング学会「生殖医療とエピジェネティクス」有馬隆博、岡江寛明、ニッショ - ホ - ル、東京 (6/8/2012)
15. 2012 セント・ルカセミナー「胎盤形成とゲノムインプリンティング」有馬隆博、岡江寛明、セント・ルカ産婦人科、大分 (6/3/2012)
16. Planet xMAP Japan 2012「男性不妊症精子のインプリント遺伝子を標的とした DNA メチル化解析」有馬隆博、岡江寛明、THE LANDMARK SQUARE TOKYO、東京 (5/16/2012)

〔図書〕(計 6 件)

1. 樋浦仁、有馬隆博、生殖補助医療とエピジェネティクス、エピジェネティクスの産業応用、株式会社シーエムシー出版 280-288 2014.
2. 千葉初音、有馬隆博、生殖補助医療とエピジェネティクス異常、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 249(1), 49-54. 2014.
3. 濱田裕貴、岡江寛明、有馬隆博、ART とエピジェネティックな異常、臨床婦人科産科 医学書院 68(1), 98-105, 2014.
4. 井原基公、有馬隆博、生殖細胞と酸化ストレス、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 247(9), 851-855, 2013.
5. 千葉初音、岡江寛明、有馬隆博、ヒト生殖補助医療 (ART) とエピジェネティクスの異常、遺伝子医学MOOK25号 178-183, 株式会社メディカルドゥ 2013. Implications of Epigenetics in ART.
6. 有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明、生殖補助医療由来の先天性ゲノムインプリンティ

ング異常症、日本生殖内分泌学会雑誌 17  
 , 54-58, 2012. ART and genome imprintin  
g. Japanese Journal of Reproductive  
Endocrinology.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：胎盤を構成する細胞への分化能を有す  
る哺乳動物の未分化前駆細胞及びその製造  
方法

発明者：有馬隆博、岡江寛明

権利者：有馬隆博、岡江寛明

種類：特許

番号：特願 2015-47236

出願年月日：2015 年 3 月 10 日

国内外の別：国内

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

岡江 寛明 (OKAE HIROAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10582695

### (2)研究分担者

有馬隆博 (ARIMA TAKAHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80253532