

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：82612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890300

研究課題名(和文) 雌雄エピゲノムの非対称性が制御する胚発生機構の解明～不育の分子メカニズムに迫る～

研究課題名(英文) Role of epigenetic asymmetry in embryo development

研究代表者

福田 篤 (Fukuda, Atsushi)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：00638091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)： 繰り返す流産などの不育症は、大部分の原因が不明である。そこで、本研究では、受精胚側における機能欠失の原因究明を探るべく、受精後に確認される雌雄ゲノムの非対称なエピゲノム修飾に注目し研究を行った。エピゲノム修飾の非対称性を消失した胚は、胚盤胞において、形態的に正常な胚でも、遺伝子発現レベルでは大きな影響があることが確認された。さらに、これらの胚では特定の条件下において、発生能に著しい影響を及ぼすことが明らかとなった。エピゲノム修飾の非対称性は、正常な発生を完遂するうえで極めて重要であることが示され、その破綻は不育症の一因となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Loss of some epigenetic asymmetries in mouse zygote does not affect development to blastocyst. However, it causes disruption of proper expression in some developmental genes at the stage. Moreover, in vivo developmental ability in the embryos with epigenetic modifier is markedly affected under a given set of conditions. These results show that maintenance of proper epigenomic asymmetry is essential for development, implying that disruption of epigenomic asymmetry might cause recurrent miscarriage.

研究分野：発生・分化

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

不育症は、着床はするものの繰り返す流産・死産によって生児が得られない状態であり、その病因の約 60% は不明である (原因不明不育症)。

これまでの不育症に対する治療アプローチは、母体側に処置を施すことで行われており、胚側に主眼を置いた研究は殆ど報告がない。

2. 研究の目的

これまでのマウスにおける体細胞クローンやノックアウト研究から、着床前期における遺伝子発現異常は着床後の発生に著しく影響することが明らかとなった。従って、胚発生最初期に生じるエピゲノム遷移とそれに連動する遺伝子を明らかにすることは、原因不明不育症の原因を着床前期に分子レベルで突き止めることにつながる。

本研究では、着床前期胚の質をエピジェネティクスの側面から調べることで、原因不明不育症における原因究明に迫る。

3. 研究の方法

マウスをモデルに、着床前期胚においてエピゲノム修飾を破綻させた胚を構築することで、遺伝子発現や個体発生能を評価する。

エピゲノム修飾破綻胚の構築には、受精卵に mRNA 及び、siRNA の導入により構築する。エピゲノム修飾の破綻評価は、免疫蛍光染色法により評価する。遺伝子発現解析においては、定量 PCR 法 (Applied Biosystems 社: TaqMan Probe) を用いる。TaqMan Probe は微量サンプルからの定量解析が可能であり、既存の定量法の中で最も優れていることが報告されている。また、包括的遺伝子発現解析には、マイクロアレイ法、次世代シーケンサーを用いる。

遺伝子発現解析においては、単一胚を対象にするが、単一細胞レベルでの解析も行う。さらに、転写産物の核内局在等を明らかにするために、3次元免疫染色- fluorescence in situ hybridization (3D-immuno-FISH) 解析を行う。

個体発生の検討では、胚盤胞まで in vitro 培養にて発生能を評価する。次に、子宮へ胚盤胞を移植することで in vivo における発生能を評価する。

分子生物学的アプローチと生殖工学的手法を駆使することで胚の発生/不育に關与する遺伝子群を網羅的に同定し、不育症の原因究明に迫る。

4. 研究成果

1) エピゲノム修飾破綻胚の構築

受精卵の 1 細胞期では、母方ゲノム特異的なヒストンタンパク質の修飾が確認される。中でも、あるヒストン修飾は、胚性幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) における多能性維持機構にも機能している。そこで、初期胚において、このヒストン修飾 (ヒストン X: 仮名) を除去した胚を作成することを試みた。ヒストン X の脱メチル化酵素である GeneX (仮名) の mRNA を in vitro で作成し、受精卵へ導入した。免疫蛍光染色解析の結果、母方ゲノム特異的なヒストン X 修飾は除去され、雌雄エピゲノム修飾の非対称性が破綻した胚が構築された。(図 1)

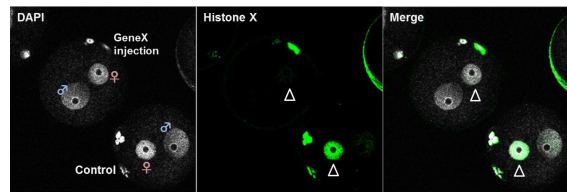


図 1. エピゲノム非対称性破綻胚の構築

2) GeneX 導入胚における体外発生能

GeneX が導入された受精卵を胚盤胞まで体外培養した結果、80% 以上の胚が胚盤胞まで到達した。形態的には、コントロール群全く区別がつかず、発生能において有意な差は生じなかった。

3) GeneX 導入胚における遺伝子発現解析

胚盤胞において、多能性関連遺伝子群における遺伝子発現解析を行った。形態的に全く正常な GeneA 導入胚では、ある遺伝子群において、コントロール群と比較し、有意に発現低下/亢進を示した。(図 2)

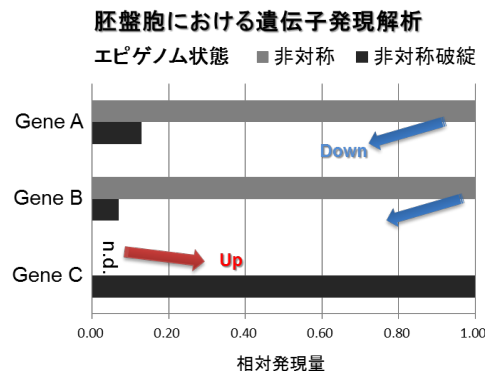


図 2. 胚盤胞における遺伝子発現解析

3D-immuno-FISH 解析により、GeneA 導入胚における、発現異常遺伝子の局在解析を行った。その結果、発現異常を示した遺伝子の一部は、栄養外胚葉系列に局在することが明らかとなった。(図 3)

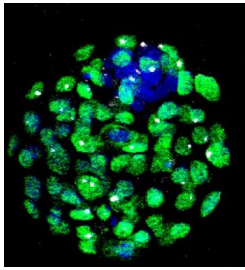
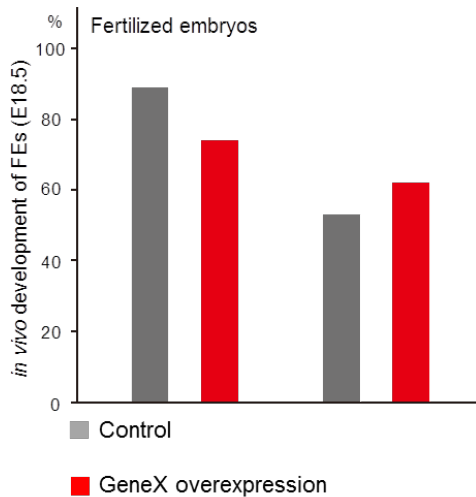


図 3. 胚盤胞における解析  
青：内部細胞塊  
緑：栄養外胚葉

#### 4) GeneA 導入胚における体内発生能

GeneA 導入胚盤胞を子宮へ移植し、体内発生能を評価した。妊娠満期で帝王切開により、産仔数を比較したところ、コントロール群との有意な差は生じなかった。(図 4)

図 4. in vivo 発生能



#### 5) GeneA 導入胚をある条件下で処理

GeneA 導入胚をある条件下で体外培養した。胚盤胞において、通常の胚と同様に胚盤胞において特定の遺伝子において発現異常が確認された。(図 5)

GeneX overexpression Control

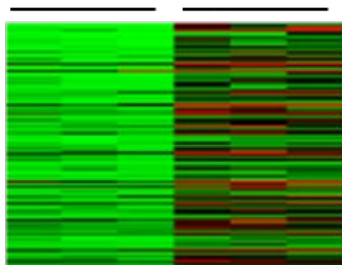


図 5. マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

#### <考察>

あるエピゲノム修飾を改変した胚では、形態的に正常な胚盤胞であるものの、特定の遺伝子群に顕著な発現異常を示すことが明らかとなった。さらに、これらの胚は特定の条件下において、その異常が顕著になることが明らかとなった(現在、論文投稿中)。これらの結果から、エピゲノム修飾の破綻が不育症における原因となることが示唆された。

#### 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)

Cao F, Fukuda A, Watanabe H, Kono T. The transcriptomic architecture of mouse Sertoli cell clone embryos reveals temporal-spatial-specific reprogramming. *Reproduction*. 2013 Mar 1;145(3):277-88. DOI : 10.1530/REP-12-0435

〔学会発表〕(計 1 件)

福田 篤, 若井拓哉, 渡辺大土, 河野友宏「母性因子 RNF12 はマウスにおける体細胞核のリプログラミングを阻害する」2012年9月6日-10日 筑波 第105回日本繁殖生物学会大会 (優秀発表)

〔図書〕(計 2 件)

クローン胚からの ES 細胞作成 阿久津英憲, 福田 篤, Dieter Egli. *実験医学*, 30(10):1621-1625. 2012

生殖細胞の分化誘導 阿久津 英憲・福田 篤, *Medical Science Digest* 2012年 6月号

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

( )

研究者番号：

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：