

## 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：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293345

研究課題名(和文)着床前期胚における「ゲノムの若返り」機構の解明

研究課題名(英文)molecular mechanisms of genomic rejuvenation during preimplantation development

## 研究代表者

浜谷 敏生 (HAMATANI, TOSHIO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60265882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：着床前期胚特異的新規遺伝子についてノックアウトマウス(KO)を作成し機能解析を行った。Kzpi(KRAB-zinc finger)のKOでは有意な産仔数の減少を認めた。Kzpi欠失ES細胞ではimprinted genesの発現異常、アレレル特異的メチル化領域(DMR)の低メチル化が認められた。Kzpiは初期胚の脱メチル化に抗しDMRメチル化を維持すると考えられたが、長期継代後は産仔数の減少もDMRメチル化の低下も消失した。Zfpi(SCAN-zf)のKOではQ-bandで多数の不完全断裂部位を認めた。Zfpi欠失ES細胞は奇形腫形成実験で三胚葉への分化を認めたが、一部で胎児性癌が形成された。

研究成果の概要(英文)：This study found novel mouse genes (e.g. Kzpi encoding KRAB zinc-finger and Zfpi encoding SCAN-zinc finger) exclusively and zygotically expressed in preimplantation embryos and ES cells. Kzpi-deficient mice showed smaller litter sizes. Interestingly, most imprinted genes were down regulated and the methylation levels of differentially methylated regions (DMRs) were decreased in homozygous ES cells. Kzpi was thus suggested to maintain DMRs against genome-wide demethylation in preimplantation embryos. However, transgenerational phenotypic attenuation of Kzpi-deficient mice was observed: normal methylation patterns of DMRs in Kzpi-deficient blastocyst and ES cells. Zfpi-deficient mice did not show any phenotype, but karyotype analysis revealed chromosomal gaps. Kzpi-deficient ES cells generated a teratoma composed of all the three-germ layer, but gave rise to embryonal carcinoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖医学

## 1. 研究開始当初の背景

着床前期胚においては、受精、ゲノム・エピゲノムの rejuvenation と胚性ゲノムの活性化 (Zygotic genome activation, ZGA) による分化全能性の獲得、コンパクトと胚盤胞腔の形成に続く内細胞塊と栄養外胚葉への分化、着床など、非常に重要な生物学的事象が観察されるが、これらを制御する分子生物学的機構については未だ解明されていないことが多い。また、少子高齢化社会となり益々重要となっている生殖医療において、卵の質的向上および着床前期胚の長期体外培養システムの改良は体外受精の最重要課題であり、着床前期胚発生メカニズムの解明が急務となっている。

一方、最近では iPS 細胞の臨床応用への期待が膨らんでいるが、その質的評価や安全性確立のためには樹立過程における多分化能獲得の分子メカニズムの解明が重要である。体細胞核移植による核の初期化でも、クローン胚の核が着床前期と同様の発生経路をたどる中で初期化・リプログラミングされ、未分化性を獲得する。これらのことから、正常対照群としての着床前期胚発生において、分化全能性獲得における遺伝子発現の動的解析が非常に重要となる。

## 2. 研究の目的

我々は、分化全能性の獲得に ZGA とそれが誘起する胚性遺伝子発現が重要であると考えた。また、これまでのマウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングから、ZGA で発現する遺伝子にはステージ特異的な発現パターンを示す遺伝子が多数存在し、その中には新規遺伝子も多く含まれていることが明らかとなった (Hamatani T et al. Dev Cell 2004)。しかし、これらの新規遺伝子のうち機能遺伝子として報告があるものは極僅かである。我々は、着床前期で機能する転写因子と予想された新規遺伝子に着目し、発現解析およびノックアウトマウスを用いた機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、*in silico* 解析において Krüppel-associated box (KRAB) あるいは SCAN ドメインに続いて C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-zinc finger ドメインがコードされるため、転写因子として予想された新規遺伝子 *Kzpi* あるいは *Zfpi* を研究対象とした。定量的逆転写 PCR や免疫染色を用いて着床前期各ステージの胚や未分化細胞での発現解析を行い、全長 cDNA をクローニングし、シーケンシングすることによって *Kzpi* あるいは *Zfpi* の全長塩基配列を解読した。機能解析のためにノックアウトマウスを作成し、着床前期胚発生の観察、受精率・胚盤胞発生率の検討、産仔数のカウント、さらに長期的な継代観察を行った。また、

*Kzpi* (あるいは *Zfpi*) 欠損胚盤胞より ES 細胞を樹立し、未分化性、多分化能、自己複製能について検討し、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、*Kzpi* 欠損 ES 細胞におけるインプリンティング遺伝子のアレル特異的 DNA メチル化領域 (DMR) のメチル化レベルについて、Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法、Bisulfite Adaptor-Tagging (PBAT) 法、*Kzpi* KO マウスの胚盤胞の DMR メチル化レベルについても Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) を用いて検討した。

## 4. 研究成果

*Kzpi* あるいは *Zfpi* いずれについても、リアルタイム定量 PCR の結果はマイクロアレイ結果と同様で、アマニチンにより受精後の転写を抑制すると 2 細胞期からの *Kzpi* あるいは *Zfpi* の発現上昇はほぼ完全に抑制されたため、卵性 RNA に由来するものではなく、受精後に新たに転写された胚性遺伝子であると考えられた。免疫染色では 2 細胞期から胚盤胞期にかけて発現を認めた。また成獣マウスでは、精巣以外の組織からは発現を認めなかった。KZPI では、胚盤胞期および ES 細胞では核への局在が確認されたが、ZFPI では、8 細胞期および ES 細胞で核に局在することが明らかとなった。

機能解析のために作成した *Kzpi* 欠損マウスは、成獣まで発生し、生殖能も維持されていた。体外受精による受精率・胚盤胞発生率は、野生型マウスの場合と比較して有意な差は認められなかった。一方、平均産仔数は *Kzpi* 欠損マウスで有意に減少し (P < 0.01)、ヘテロ接合体同士の交配ではホモ接合体の出生数が有意に減少した (P < 0.01)。低体重、早期死亡傾向、脾腫、膈閉鎖など様々な表現型が観察されたが、その表現型は同腹子でも個体差が大きかった。

次に、*Kzpi* 欠損 ES 細胞を用いて、*Kzpi* の機能と標的分子を検討した。野生型 ES 細胞に比し、増殖速度は遅い傾向を示したが長期継代は可能であり、未分化マーカー遺伝子の発現解析、胚様体および奇形腫の作製による多分化能性評価では、*Kzpi* 欠損 ES 細胞に異常は認められず、*Kzpi* は多能性幹細胞の維持に必須ではないと考えられた。

しかし、トランスクリプトーム解析では多数のインプリンティング遺伝子の発現異常を認めた。使用したマイクロアレイにおいて有意な発現シグナルが観察されたインプリンティング遺伝子 27 個のうち、*Kzpi* 欠損 ES 細胞では 18 個 (66.7%) のインプリンティング遺伝子が有意な発現変化を示していた。そこで、COBRA 解析により DNA メチル化可変領域 (DMR) のメチル化レベルを検討したところ、*Kzpi* 欠損 ES 細胞では複数の DMR が低メチル化状態であった。さらに、次世代シーケンサーを用いたメチローム解析 PBAT 法により、

全 CpG アイランド (CGI) のうち *Kzpi* 欠損細胞株で変化を認めた CGI は 1%にも満たないものの、そのうち 70%が既知・新規の DMR であることが明らかとなった。以上の結果より、*Kzpi* は胚性産物として初期胚におけるゲノムワイドな脱メチル化から、DMR 特異的なメチル化維持に寄与する可能性が示唆された。

これまで *Kzpi* 欠損マウスでは産仔数の減少以外にも、早期死亡傾向、脾腫、膻閉鎖など様々な表現型が確認されていたが、これらは DMR のメチル化レベルに影響されている可能性があると考えられた。しかし、長期継代を続けた結果、*Kzpi* 欠損マウスの産仔数減少は減弱し、表現型についても異常を認める個体が減少し、P10 以降では *Kzpi* 欠損マウスに明らかな異常は認められなくなった。また、P10 の *Kzpi* 欠損胚盤胞、あるいはそれを用いて新たに胚盤胞から樹立した *Kzpi* 欠損 ES 細胞について、RRBS 法により DMR のメチル化レベルを検討しても、野生型 ES 細胞と有意な低下は認められなくなっていた。そこで現在は、キメラの親から生まれた *Kzpi* ヘテロマウスの凍結卵を改めて融解し、再度交配を最初から行った。ホモマウスを作成し、再度産仔数や表現型を継代観察するとともに、若い世代から ES を樹立するとともに、着床前期胚や胎仔などのサンプルについても解析に十分な量を得るため、繁殖中である。

一方、*Zfpi* 欠損マウスは、成獣まで発生し、生殖能も維持されていた。着床前期胚発生や産仔数にも異常は認められず、*Zfpi* 欠損マウスの胚盤胞から ES 細胞を樹立することも可能で、*Zfpi* 欠損 ES 細胞は未分化性、多分化能性にも異常を認めなかった。しかし、核型解析を行ったところ、*Zfpi* 欠損 ES 細胞のみならず、*Zfpi* 欠損マウス (脾リンパ球) でも高頻度に chromosomal gap (break はなし) が認められることが明らかとなった。*Zfpi* 欠損 ES 細胞と野生型 ES 細胞の遺伝子発現を網羅的に比較検討したところ、有意に発現レベルの異なる遺伝子が抽出された (887 transcripts)。しかし、*Zfpi* 欠損 ES 細胞について紫外線照射後培養やマイトマイシン添加培養を行ったが、野生型 ES 細胞と比べて増殖速度に有意な差は認められなかった。さらに、chromosomal gap の生物学的意義を検討するため、*Zfpi* 欠損 ES 細胞のゲノムについて CGH アレイ解析を行った。欠失があるのか、あるいは欠失はなくクロマチン凝集障害などの可能性があるのか現在検討中である。また、*Zfpi* 欠損 ES 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して奇形腫を形成させ、三胚葉への分化を検討したところ、多分化能は維持しているものの、一部で胎児性癌を形成することが明らかとなり、それらの組織からも LASER dissection にてゲノムを回収し CGH アレイを用いて検討する予定である。

#### 〔考察〕

*Kzpi* 欠損マウスでは、産仔数の減少に加え、早期死亡傾向、脾腫、膻閉鎖などの表現型が散発的に確認されているが、これらは DMR メチル化レベルの変化によりインプリンティング遺伝子の発現異常が背景にあると考えられた (例えば、膻閉鎖には p57Kip2 [母性発現] の発現異常が寄与すると考えられる。今後は、*Kzpi* 欠損マウスから得られた各発生段階の細胞 (精子、胚盤胞、胎仔) を用いて、DMR のメチル化レベルを検討する必要がある。長期継代で *Kzpi* 欠損マウスの表現型が減弱することについてもさらなる検討が必要である。

さらに、*Zfpi* 欠損マウスにおける染色体不完全断裂 (凝縮不全) の生理的意義についても検討を進める予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

(1) Tarín JJ, García-Pérez MA, Hamatani T, Cano A. Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single meta-diseases. *Reprod Biol Endocrinol*. 査読有. 2015; 13:31. doi: 10.1186/s12958-015-0029-9.

(2) Fukuda A, Tanino M, Matoba R, Umezawa A, Akutsu H. Imbalance between the expression dosages of X-chromosome and autosomal genes in mammalian oocytes. *Sci Rep*. 査読有. 2015;5:14101. doi: 10.1038/srep14101.

(3) Fukuda A, Mitani A, Miyashita T, Umezawa A, Akutsu H. Chromatin condensation of Xist genomic loci during oogenesis in mice. *Development*. 査読有. 2015;142(23):4049-55. doi: 10.1242/dev.127308.

(4) Matsuzaki H, Okamura E, Takahashi T, Ushiki A, Nakamura T, Nakano T, Hata K, Fukamizu A, Tanimoto K. De novo DNA methylation through the 5'-segment of the H19 ICR maintains its imprint during early embryogenesis. *Development*. 査読有. 2015; 142(22):3833-44. doi: 10.1242/dev.126003.

(5) Kurihara T, Arimochi H, Bhuyan ZA, Ishifune C, Tsumura H, Ito M, Ito Y, Kitamura A, Maekawa Y, Yasutomo K. CD98 Heavy Chain Is a Potent Positive Regulator of CD4+ T Cell Proliferation and Interferon- Production In Vivo. *PLoS One*. 査読有. 2015;10(10):e0139692. doi: 10.1371/journal.pone.0139692.

(6) Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S,

Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep*. 査読有. 2014;4:4701. doi:10.1038/srep04701.

(7) Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep*. 査読有. 2014;4:4599. doi: 10.1038/srep04599.

(8) 久慈直昭, 竹本崇史, 上條慎太郎, 戸田里実, 若松修平, 菅原かな, 小川誠司, 山田満穂, 浜谷敏生, 吉村泰典. 【生殖医療の進歩と課題-安全性の検証から革新的知見まで】ARTの安全性評価 ART児の発達・長期予後. *臨床婦人科産科* 査読無. 2014;68(1):107-113.

(9) Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K. Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. 査読有. *Nat Chem Biol*. 2014;10(8):632-9. doi: 10.1038/nchembio.1552.

(10) Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun*. 査読有. 2014;5:5464. doi: 10.1038/ncomms6464.

(11) Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res*. 査読有. 2014;24(4):554-69. doi: 10.1101/gr.164913.113.

(12) Liao HF, Chen WS, Chen YH, Kao TH, Tseng YT, Lee CY, Chiu YC, Lee PL, Lin QJ, Ching YH, Hata K, Cheng WT, Tsai MH, Sasaki H, Ho HN, Wu SC, Huang YH, Yen P, Lin SP. DNMT3L promotes quiescence in postnatal spermatogonial progenitor cells.

Development. 査読有. 2014;141(12):2402-13. doi: 10.1242/dev.105130.

(13) Sakashita A, Kobayashi H, Wakai T, Sotomaru Y, Hata K, Kono T. Dynamics of genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. *Genes Cells*. 査読有. 2014;19(8):629-36. doi: 10.1111/gtc.12164.

(14) Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 査読有. 2013;11:108. doi: 10.1186/1477-7827-11-108.

(15) Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. -catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells. *PLoS One*. 査読有. 2013;8(5):e63265. doi: 10.1371/journal.pone.0063265.

(16) Yoshii N, Hamatani T, Inagaki N, Hosaka T, Inoue O, Yamada M, Machiya R, Yoshimura Y, Odawara Y. Successful implantation after reducing matrix metalloproteinase activity in the uterine cavity. *Reprod Biol Endocrinol*. 査読有. 2013;11:37. doi: 10.1186/1477-7827-11-37.

(17) Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura K, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. 査読有. *Tissue Cell*. 2013;45(6):407-13. doi:10.1016/j.tice.2013.07.003.

(18) Heyn H, Moran S, Hernando-Herraez I, Sayols S, Gomez A, Sandoval J, Monk D, Hata K, Marques-Bonet T, Wang L, Esteller M. DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res*. 査読有. 2013;23(9):1363-72. doi: 10.1101/gr.154187.112.

(19) 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 genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet*. 査読有. 2013;14:32. doi: 10.1186/1471-2156-14-32.

〔学会発表〕(計 12 件)

(1)浜谷敏生：ワークショップ 20「生殖」から読み解く哺乳類の生命現象：卵の加齢メカニズム，第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会・合同大会，ポートアイランド（兵庫県神戸市），2015 年 12 月 1-4 日

(2)浜谷敏生：子宮内膜における CD9 の臨床的意義，第 13 回 JISART シンポジウム，都市センターホテル（東京都千代田区），2015 年 6 月 7 日

(3)浜谷敏生：シンポジウム「生殖技術の新たな展開 - 遺伝子解析からの視点」：マウス着床前期胚の網羅的遺伝子発現解析から得られたもの，第 56 回日本卵子学会学術講演会，栃木県総合文化センター（栃木県宇都宮市），2015 年 5 月 30-31 日

(4)浜谷敏生：ワークショップ「高品質胚生産のための体外培養系と評価」：胚培養液のメタボローム解析 ~ 胚発生と脂肪酸代謝 ~ ，第 60 回日本生殖医学会学術講演会，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市），2015 年 4 月 27 日

(5)浜谷敏生，吉井紀子，井上治，上條慎太郎，小川誠司，菅原かな，齋藤英和，梅澤明弘，小田原靖，宮戸健二，田中守，青木大輔．CD9 欠損に因る子宮内膜上皮再生障害と着床不全．第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市），2015 年 4 月 10-12 日

(6)Ogawa S, Hamatani T, Akutsu H, Yamada M, Sugawara K, Inoue O, Yamada T, Kamijo S, Takemoto T, Toda S, Wakamatu S, Umezawa A, Kuji N, Aoki D, Yoshimura Y. Functional analysis of a novel preimplantation-specific gene Zfp371. The 30th Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Munich (Germany). June 30-July 2, 2014.

(7)浜谷敏生：ワークショップ「卵子老化に関わる因子と老化阻止の可能性」：マウス加齢卵におけるテロメアバイオロジー 第 32 回日本受精着床学会総会・学術講演会，ハイアットリージェンシー東京（東京都新宿区），2014 年 7 月 31 日

(8)上條慎太郎，浜谷敏生，小川誠司，菅原かな，山田満穂，片岡典子，井上治，山田朝子，戸田里実，若松修平，竹本崇史，吉村泰典，福田篤，阿久津英憲，梅澤明弘，秦健一郎，中林一彦，津村秀樹，久慈直昭．着床前期特異的新規遺伝子 Kzpi を欠失させ

た胚性幹細胞（ES 細胞）の機能解析 第 55 回日本卵子学会，神戸国際会議場（兵庫県神戸市），2014 年 5 月 18 日

(9)小川誠司，浜谷敏生，阿久津英憲，山田満穂，菅原かな，井上治，戸田里実，若松修平，梅澤明弘，久慈直昭，青木大輔，吉村泰典．着床前期胚において特異的に発現する新規 SCAN-zinc finger 遺伝子 Zfp371 のノックアウトマウスおよびノックアウト胚性幹細胞における機能解析．第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京国際フォーラム（東京都千代田区），2014 年 4 月 18-20 日

(10)上條慎太郎，浜谷敏生，阿久津英憲，小川誠司，菅原かな，片岡典子，山田満穂，久慈直昭，吉村泰典．着床前期特異的新規遺伝子 Kzpi を欠失させた胚性幹細胞（ES 細胞）の機能解析．第 58 回日本生殖医学会，ポートピアホテル・神戸国際会議場（兵庫県神戸市），2013 年 11 月 15-16 日

(11)小川誠司，浜谷敏生，阿久津英憲，山田満穂，奥村典子，菅原かな，井上おさむ，山田朝子，上條慎太郎，久慈直昭，吉村泰典．着床前期胚において特異的に発現する新規 SCAN-zinc finger 遺伝子 Zfp371 の解析．第 58 回日本生殖医学会，ポートピアホテル・神戸国際会議場（兵庫県神戸市），2013 年 11 月 15-16 日

(12)浜谷敏生，山田満穂，高梨和美，平山明由，阿久津英憲，福永朝子，小川誠司，菅原かな，篠田幸作，曾我朋義，久慈直昭，梅澤明弘，富田勝，吉村泰典．キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析法（CE-TOFMS）を用いたマウス着床前期胚培養液のメタボローム解析．第 54 回日本卵子学会大会，学術総合センター（東京都千代田区），2013 年 5 月 25 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

浜谷 敏生 (HAMATANI TOSHIO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60265882

(2)研究分担者

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)  
国立成育医療研究センター・生殖・細胞医  
療研究部・部長  
研究者番号：50347225

秦 健一郎 (HATA KENICHIRO)  
国立成育医療研究センター・周産期病態研  
究部・部長  
研究者番号：60360335

津村 秀樹 (TSUMURA HIDEKI)  
国立成育医療研究センター・実験動物管理  
室・室長  
研究者番号：20180052

(3)連携研究者

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)  
国立成育医療研究センター・生殖・細胞医  
療研究部・部長  
研究者番号：70213486