

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670691

研究課題名(和文)胎盤形成における胎盤特異的インプリント遺伝子のエピゲノム分子機構とヒト胎盤異常

研究課題名(英文)Genomic imprinting

研究代表者

有馬 隆博 (ARIMA, TAKAHIRO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80253532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムインプリンティング(GI)は、胎盤を有する哺乳類に特有な現象で、胎盤形成にその生物学的重要性が指摘されている。本研究では、胎盤における胎盤特異的GI遺伝子の役割を明らかにするため、エピジェネティックな分子機構と未分化維持に機能するシグナル伝達経路について解析した。また、クローンマウス胎盤では、胎盤特異的GI遺伝子のインプリント異常を確認し、核の初期化現象に重要な役割を果たす事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genomic imprinting is an epigenetic gene regulatory mechanism which leads to the preferential monoallelic expression of a subset of genes. The majority of imprinted genes has differential methylated regions (DMRs). While the importance of DNA methylation is widely accepted, the presence of DNA methylation-independent establishment of imprinting is also proposed for some imprinted genes (Okae et al., 2012). Somatic cell nuclear transfer (SCNT) can produce viable individuals, but the success rate is very low and many abnormalities were reported for SCNT-derived animals. In this study, we performed a transcriptome-wide analysis of imprinted gene expression in cloned mouse placenta and found that several imprinted genes did in fact show LOI. Our data advances the understanding the underlying mechanisms of reprogramming of somatic cell nuclei and the regulatory mechanisms of genomic imprinting.

研究分野：産婦人科学、分子生物学

キーワード：胎盤 エピジェネティクス ゲノムインプリンティング

1. 研究開始当初の背景

特定の親由来アレルの選択的発現様式を示すゲノムインプリンティング機構は、哺乳類の胚発生、分化に必須な現象である。哺乳類特有のGI機構と胎盤の存在は、胎盤組織におけるGI調節機構の生物学的重要性を示唆する『胎盤仮説』。申請者らは、次世代シーケンサー装置を用い、胎盤特異的GI遺伝子を網羅的に検索し、10種類の遺伝子を同定した(Okae et al. Hum. Mol. Genet. 2012)。これらの遺伝子は、胎盤形成過程で重要な機能を持つが(Schaeper et al. PNAS 2007 他)、何故胎盤組織だけにインプリントが存在するのか、その分子機構は明らかではない。

体細胞クローンマウスは、胎盤肥大を典型的な特徴とする(Ogura et al. Nature Genet. 2002 他)。体細胞の「細胞核のリプログラミング(初期化)」の異常、つまりエピジェネティックな修飾異常が胎盤形成に影響する。最近申請者は、クローン胎盤では、胎児性GI遺伝子は正常インプリントを維持するが、胎盤特異的GI遺伝子(Gab1, Sfmtb2)では、異常を示す事を発見した。クローン胎盤に特有の胎盤特異的GI遺伝子のエピジェネティックな異常を解明することは、胎盤形成におけるGI機構の生物学の意義を明らかにする上で重要である。本研究では、DNA多型を有する胎盤幹細胞(TS細胞)とクローンTS細胞株を用い、胎盤特異的GI遺伝子のエピゲノム分子機構の特性とシグナル伝達経路を明らかにする。さらに、ヒト胎盤組織への保存性とインプリント異常が疑われている疾患へのアプローチに挑戦する。

2. 研究の目的

本研究では、均一で未分化なTS細胞を用い、胎盤分化過程におけるエピジェネティックな修飾機構と分子間相互作用の解明し、胎盤特異的GI遺伝子の役割を明らかにする。そのため、

1)胎盤特異的GI遺伝子のエピゲノム分子機構の解明: TS細胞を用い、胎盤特異的GI遺伝子(10種類)のエピゲノム分子機構について明らかにする。

2)胎盤における胎盤特異的GI遺伝子(Gab1, Sfmtb2)のシグナル伝達経路: ノックダウンシステムとKOのTS細胞を用い、未分化幹細胞維持に働くシグナル伝達経路について

明らかにする。

3. 研究の方法

(1)胎盤特異的GI遺伝子の分子機構の解明:

DNA多型を有するES細胞・TS細胞: GIの解析を行うには、母由来と父由来の2つの対立遺伝子を識別する必要がある。そのため、遺伝的背景の異なるマウスを交配し、どちらの対立遺伝子が不活化、あるいは活性化されるのか解析する必要がある。汎用マウスであるC57BL/6に加え、日本固有の亜型であるJF1(国立遺伝研、城石教授より供与)の遺伝的多型を活用した。DNA多型(JF1多型)を有するTS細胞、ES細胞(JF1xB6, B6xJF1)は、複数株保有している。胎盤特異的インプリントの解析:胎盤特異的GI遺伝子(10種類)の発現量と発現パターンについて、TS細胞株を用いて解析。分化誘導と共に、胎盤特異的GI遺伝子のアレル特異的発現パターンについて解析し、GIの確立時期と維持について明らかにする。分化度は細胞形態および分化マーカーにより評価した。

DNAメチル化およびヒストン修飾の解析: これらGI遺伝子について、エピジェネティックな修飾の解析を行った。具体的には、プロモーター領域のDNAメチル化はBisulphite Sequence法によって、ヒストン修飾(活性型: H3K4me2, H3K4me3、不活性型: H3K9me2, H3K27me3)はChIP-PCR法によって解析。これらの解析では、SNPsを用いることでアレルを区別した。

体細胞クローンマウス胎盤における胎盤インプリント:体細胞クローンマウスに由来する胎盤組織は、連携研究者(理化学研究所、小倉淳郎室長)より既に入手。クローン胚より樹立したTS細胞を用い、上記エピゲノム解析を行い、「初期化」の異常がもたらす修飾機構について解明した。

(2)胚体外組織における胎盤特異的GI遺伝子の未分化維持に関わるシグナル伝達経路:

胎盤特異的GI遺伝子(Gab1, Sfmtb2)は、TS細胞でインプリントを受ける。また、HGF, EGFなどの増殖因子に反応し、Ras/MAPK, PI3K/Aktシグナルの経路を介するドッキング蛋白である。これらの遺伝子がTS細胞で

未分化維持にどのようなシグナル伝達経路を介して、調節を受けているのか検討した。

ES, TS 細胞における FGF による Gab1, Sfmbt2 蛋白の活性化：増殖因子として FGF 蛋白を過剰投与し、ES, TS 細胞における Gab1, Sfmbt2 のリン酸化能について、細胞特異性、量依存性について検討した。

TS 細胞におけるシグナル伝達経路の解析：

・siRNA 強制発現用ベクターの作製と細胞の樹立：Gab1, Sfmbt2 ノックダウン用の siRNA を複数設計し、TS 細胞にトランスフェクション。各蛋白の減弱（消失）はウェスタンブロットティング(WB) によって確認。ノックダウン効率は、リアルタイム PCR によって測定した。

・ノックダウン TS 細胞株の形態学的変化と未分化維持機構の解析：ノックダウン TS 細胞株の細胞形態とコロニー形成について観察した。TS 特異的未分化遺伝子マーカー（Eomes, Id2, ErrB）の遺伝子発現量を比較する。同様に、ノックダウン TS 細胞株を分化誘導し、TS 特異的分化遺伝子マーカーの発現量と巨細胞の出現の有無を確認した。

・ノックダウン（Gab1、Sfmbt2KO）TS 細胞における分子間相互作用：Ras/MAPK, PI3K/Akt シグナル下流で機能する分子の活性化を検討。各種阻害剤を作用させ、その影響について WB にて解析した。

・強制発現用ベクターの作製と TS 細胞への遺伝子導入：Gab1, Sfmbt2 cDNA を、強制発現用ベクターにクローニング。Electroporation 法を用い、KO-TS 細胞株にトランスフェクションし強制発現細胞株を樹立。それぞれのシグナル下流で機能する蛋白の活性化が、レスキューされるか検討した。

4. 研究成果

(1) 胎盤特異的 GI 遺伝子の分子機構の解明

DNA 多型を有するマウス TS、ES 細胞を用い、胎盤特異的 GI 遺伝子（Gab1、Sfmbt2）の未分化維持におけるシグナル伝達機構について明らかにし、また胎盤異常を呈するクローンマウスの TS 細胞株についても、Gab1 の DNA メチル化とヒストン修飾の解析を行った。その結果、H3K4me3 や H3K9me2 などのヒストン修飾がアレル特異的に見られ

ることを明らかにした(図 1、2)。これらのアレル特異的エピジェネティック修飾はクローン胎盤では見られなかった。また、Gab1 ヘテロ KO マウスの胎盤を比較より、父由来の遺伝子が欠損した場合には胎盤重量が減少するが、母由来の遺伝子欠損では胎盤の異常は観察されなかった(図 3)。

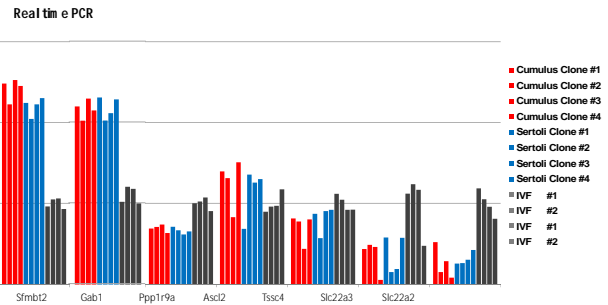


図 1 インプリント遺伝子の発現量解析

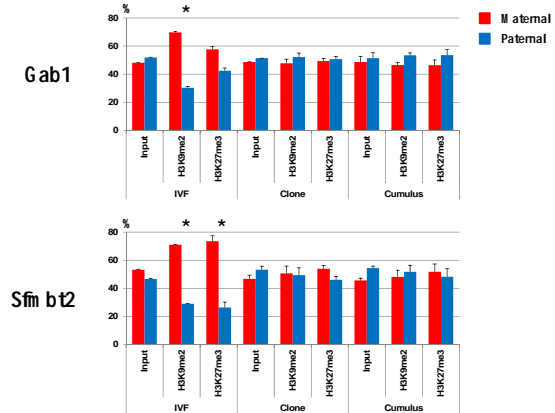


図 2 ヒストン修飾の解析

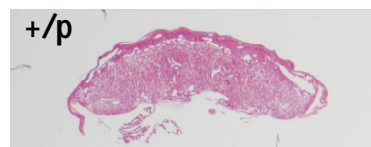
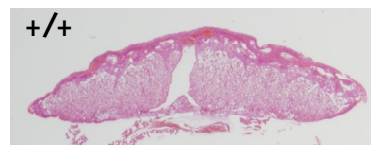
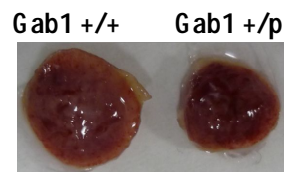


図 3 父由来アレル Gab1 ヘテロ KO マウスの胎盤の低形成

また、Gab1 DMR の配列特性の解析および、様々な組織における Gab1 DMR の DNA メチル化解析を行った。RepeatMasker を用いた Gab1 DMR の塩基配列解析より、Gab1 の DMR および第一エクソンは、LTR の一種である RLTR15 と高い相同性を示すことを発見した。さらに、Gab1 cDNA のシーケンシングを行い、LTR の転写開始点およびスプライシングサイトが胎盤において機能していることを確認した。よって、Gab1 は LTR の挿入によってインプリンティングを獲得したと考えられる。この LTR の挿入はげっ歯類特異的であり、ヒトでは見られなかった。一方、胎児細胞では Gab1 DMR は両アレルとも高度にメチル化されており、転写開始点としての働きも失っていた。興味深いことに、Gab1 DMR は核移植直後に両アレル共に脱メチル化されており、その結果クローン胎盤では Gab1 が両アレルから発現していると考えられる。これまでに、LTR が DMR として働く例は報告されていない。Gab1 DMR の発見は、LTR のサイレンシングとゲノムインプリンティングとの間に、共通の制御機構が存在する可能性を示唆している。また、核移植によって引き起こされる DNA メチル化制御異常が、クローンマウスにおける遺伝子発現異常の原因の一つであることが強く示唆された。

(2) 胚体外組織における胎盤特異的 GI 遺伝子の未分化維持に関わるシグナル伝達経路増殖因子として FGF 蛋白を過剰投与し、ES, TS 細胞における Gab1 のリン酸化能について、細胞特異性、量依存性について検討した結果、TS 細胞では特異な変化を認めた。そのため、TS 細胞におけるシグナル伝達経路について解析を進めた。Gab1 ノックダウン用の siRNA を複数設計し、TS 細胞にトランスフェクションし、各蛋白の減弱(消失)はウェスタンブロッティング(WB)により、ノックダウン効率は、リアルタイム PCR によって測定した。ノックダウン (Gab1KO) TS 細胞における分子間相互作用について、Ras/MAPK,

PI3K/Akt シグナル下流で機能する分子の活性化を検討するため、WB にて解析した。その結果、ES 細胞では、主に PI3K/Akt シグナルが機能し、TS 細胞では Ras/MAPK が作用する事が判明した。

(3) ヒト胎盤組織への保存性

我々が報告したマウスに存在する胎盤特異的インプリント遺伝子は 11 種類で、ヒト胎盤への保存性について、10 個体の胎盤を用いて解析した。その際、母体細胞が混入しないように、満期胎盤より細胞性栄養膜細胞と合胞体栄養膜細胞を高純度に分離した。低速遠心パーコール分離法と FACS を併用し、95%以上の均一な未分化細胞集団を分離した。胎盤特異的インプリント遺伝子について、RT-PCR 法を用い、ヒト胎盤組織でのインプリントの有無について検討した(図4)。

Chr.	Imprinting status in the mouse			Imprinting status in the human placenta
	Gene	Placenta	TS cells	
2	<i>Sfmbt2</i>	N.A.	Imprinted	-
6	<i>Tfpi2</i>	-	Imprinted	Imprinted(polymorphic)
6	<i>Ppp1r9a</i>	Imprinted	Imprinted	Imprinted(polymorphic)
7	<i>Th</i>	Imprinted	N.D.	N.A.
7	<i>Ascl2</i>	Imprinted	Imprinted	-
7	<i>Tspan32</i>	-	Imprinted	-
7	<i>Tssc4</i>	Imprinted	Imprinted	-
7	<i>Ano1</i>	-	Imprinted	Imprinted(polymorphic)
8	<i>Gab1</i>	Imprinted	Imprinted	-
17	<i>Slc22a3</i>	Imprinted	Imprinted	Imprinted(polymorphic)
17	<i>Slc22a2</i>	Imprinted	N.D.	Imprinted(polymorphic)

図 4 胎盤特異的インプリント遺伝子のヒトへの保存性

これまでに報告された胎盤特異的インプリント遺伝子はいずれも DMR を持たず、DNA メチル化非依存的な制御をうけると考えられてきた。しかし、Gab1 DMR の発見によって、胎子と同様に胎盤におけるインプリンティングにも DNA のメチル化が関与する可能性が示された。さらにクローン胎盤では全例で Gab1 のインプリント制御が異常になっており、「体細胞核の初期化」には限界があることが強く示唆された。これらの成果は、胎盤におけるインプリンティングの哺乳類進化上の制御機構および核の初期化現象を理解するうえで非常に重要なものである。

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 4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

[学会発表](計 11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、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、ニッソホール、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、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、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、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、神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル、神戸(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、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、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、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、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、広島市文化交流会館、広島(4/20/2013)

[図書](計 5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.

〔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

有馬 隆博 (ARIMA TAKAHIRO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80253532

(2)研究分担者

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