

胎盤幹細胞を用いた胎盤進化プロセスと哺乳類特異的ゲノムインプリント機構の解析

●有馬 隆博¹⁾ ◆河野 友宏²⁾ ◇樋浦 仁¹⁾

1) 東北大学未来医工学治療開発センター 2) 東京農業大学応用生物科学部

<研究の目的と進め方>

哺乳類の胎児の生存には、正常な機能を有する胎盤の存在が必須である。動物の種により胎盤組織構築は多様性を有するが、その機能、発生機序は共通である。すなわち胎盤は母体と胎児間で栄養交換を司る器官で、受精後最初に分化（細胞運命決定）が起こる組織である。また、胎盤トロホプラスト幹（TS）細胞は未分化で、自己複製能を維持し、胎盤構成細胞への分化が可能な細胞である。また、胚盤胞に注入するとキメラ胎盤が形成され、全て栄養膜細胞系列にのみ分化が限定される、という特徴を有する。このTS細胞は未分化で維持されるが、容易に分化させる事が可能で、*in vivo*では解析されない詳細な分子機構や分子間相互作用の解析を行うことが可能である。本研究では、哺乳類特異的なゲノム機能であるゲノムインプリンティング（GI）と哺乳類の進化の関連性を解明するため、胎盤形成に焦点をあて、異種動物間や遺伝子改変マウスのTS細胞と胎盤組織を用い、網羅的・系統的なゲノムインプリント遺伝子とその機構について、比較ゲノム解析を行うことを目的とする。胎盤組織構築の特異性・多様性を有する哺乳類の進化の過程と哺乳類特異的ゲノム機能であるGIの分子機構の解明は、進化の分子機構に新しい生物学的意義をもたらさう。

<2008年度の研究の当初計画>

(1) マウスTS細胞（単為発生、雄核発生胚）を用いた網羅的インプリント領域の検索

雄（精子）由来のゲノムで構成される雄核発生胚と雌（卵子）由来のゲノムで構成される雌核発生胚のTS細胞を用い、whole genome-tiling arrayとCHIP on chipを組み合わせた網羅的インプリント領域（アレル特異的メチル化領域）（DMR）の検索を行う。抗体には、抗メチルシトシン抗体を用いた免疫沈降法とwhole genome Tiling arrayを用いた。

(2) ヒト組織（胎児、胎盤）におけるインプリント調節領域の保存性に関する検討

真獣類（ヒト、マウス）は伴にGI機構を保存し、TS細胞の特性も類似している。しかし、胎盤の組織構築は異なる。マウスで報告されている21箇所のDMRについて、ヒトゲノム情報をもとに、ヒト精子及び胎盤血液DNAを用いヒトDMRを決定する。ヒト、マウスのDMRの共通性、多様性、相互性、連続性について、比較ゲノム解析を行う。

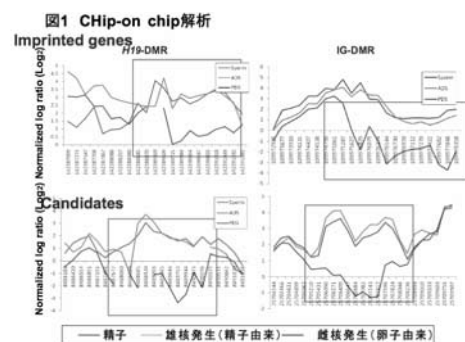
(3) GIの改善される同種動物（マウス）と胎盤形成

段階的にGIの改善を示す3種類の改変単為発生（PG）胚よりTS細胞を樹立し、胎盤分化過程におけるTS細胞の細胞特性とエピゲノム修飾について系統的に分析する。さらに、それぞれのPG胚と正常TS細胞のキメラマウスを作製し、形態的な胎盤組織の評価を行う。

<2008年度の成果>

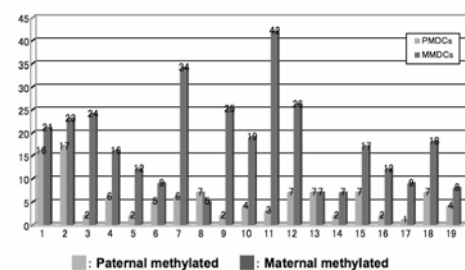
(1) PDS (parthenogenetic derived stem cells) および ADS

(androgenetic derived stem cells) を利用し、抗メチル化シトシン抗体による免疫沈降とwhole genome Tiling arrayを組み合わせた（CHIP-on-chip）、系統的・網羅的なDMRの単離を行ってきた。Tiling arrayで得られた結果はそれぞれデータ解析ソフトにより、各スポットの強度を数値に変換し、有意差検定した。（図1）。



(2) その結果、既知のDMRを含め、全ての染色体上に、およそ300のDMRの候補領域をスクリーニングした（図2）。このうち、少なくとも一つは新規のDMRであることをJF1/BALB6の多型マウスを用いて証明した。また、このDMRが精子でメチル化を獲得し、受精以降も維持されることがわかった。精子でメチル化を受けるインプリント領域は少なく、これまでにわずか3領域しか存在しない。

図2 生殖細胞でアレル特異的メチル化が予想される領域



(3) CHIP on chipで発見した少なくとも1領域（マウス染色体1番）には、新規のインプリント遺伝子の存在を確認した。この領域はヒト2番と相同しており、ヒト精子、胎盤、臍帯血を用い、マウスで発見されたインプリント遺伝子領域がヒトでも保存されている事が確認された。

<国内外での成果の位置づけ>

マウスインプリント遺伝子をマッピングしたマウスインプリントマップには、これまでに約80のインプリント遺伝子がクラスターを形成し、その遺伝子発現調節領域として21の生殖細胞特

異的 DMR が存在する。また、染色体転座と減数分裂時の染色体不分離を利用した、特定の染色体領域が片親のみから由来するダイソミーマウスの表現型解析から、由来する親特異的な染色体機能も明らかになり、同様にマッピングされている。マウス 12 番染色体中央部には個体発生および成長に関するインプリント表現型が知られているが、その領域にはインプリント遺伝子およびその遺伝子発現制御領域である DMR が報告されていない。また、個体発生や成長に関与しないインプリント遺伝子の報告やダイソミーマウスで表現型を示さない染色体領域にインプリント遺伝子および DMR が報告されていることから、インプリントマップには今までに明らかにされていないインプリント領域および DMR が存在する可能性がある。

これまでのメチル化 DNA 領域のスクリーニング法として、RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法、Me-RDA (methylation-sensitive representational difference analysis) 法および chip-on-chip を利用したマイクロアレイ法が知られている。RLGS および Me-RDA 法は、いくつもの DMR 発見に貢献してきたが、その手技は非常に煩雑であり、制限酵素認識部位のみに解析が制限されてきた。これまでの方法では、すべての DMR を網羅的にスクリーニングできたことと考えることは難しく、未だ発見されていない DMR が存在するはずである。近年開発された抗 5 メチルシトシン抗体および tiling array を組み合わせた methylation array は、メチル化を直接かつピンポイントに、さらに全ゲノムを対象とした解析方法で、インプリント遺伝子に注目した解析の報告はない。

また、今回新たに見つかったインプリント領域はこれまで3つしか報告のない精子型メチル化インプリント遺伝子領域で、ヒトで保存されていることも判明した。多くのインプリント遺伝子はヒト疾患の原因となっている。今回新たに見つかった領域にも、特定疾患の原因が示唆されている。これらの事実から、国内外からの関心は高まるものと予想される。さらに、多数のインプリント領域が発見されることが、期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本年度の研究目標はほぼ達成されたが、段階的に GI の改善を示す 3 種類の改変単為発生 (PG) 胚からの TS 細胞の樹立は未だ完成していない。本研究は、胎盤分化過程における TS 細胞の細胞特性とエピゲノム修飾について系統的に分析し、それぞれの PG 胚と正常 TS 細胞のキメラマウスを作製し、形態的な胎盤組織の評価を行うことが可能である。

受精率が悪いため、胚を十分得る事が出来なかったことが、原因である。そのため、現在体外授精の準備を行っている。インプリント領域の網羅的解析が終了するまでに完成させる予定である。

<今後の課題>

次年度は引き続きインプリント領域の単離・同定を行っていく。同時に以下のことを研究課題とする。

(1) GI が保持される異種動物 (ヒト・マウス) と胎盤形成

- エピゲノム解析: ゲノムタイアリングアレイと ChIP-on-Chip 法を用いた網羅的・系統的なエピジェネティクス解析 (抗メチル化シトシン、抗ヒストン抗体)
- 生物学的機能分類: 配列モチーフ解析、染色体分布解析、遺伝子発現解析

(2) GI の改善される同種動物 (マウス) と胎盤形成

段階的に GI の改善を示す 3 種類の PG 胚より TS 細胞を樹

立し、胎盤分化過程における TS 細胞の細胞特性と GI 分子機構について解析する。さらに、それぞれの PG 胚と正常 TS 細胞のキメラマウスを作製し、形態的な胎盤組織の評価を行う。

1) 改変 PG マウス TS 細胞の樹立:

- 胎生 3.5 日 fg/fgPG 胚、ng/fgPG 胚、H19 Δ 13ng/fgPG 胚より TS 細胞樹立
- fg 卵子は、Rosa26 マウスの卵子を用い、lacZ 染色にて細胞分布を可視化

2) 改変 PG マウス TS 細胞株の細胞特性の比較解析:

- 細胞形態と細胞増殖能細胞; 周期分布: 正常 (WT) TS 細胞と比較 (FACS)、DNA 合成能 (BrdU の取り込み率)、アポトーシス (Tunel 法)

3) 分化における GI の分子機構:

- 分化誘導後経時的 (3、5、7 日目) に解析
- インプリンティングの解析: 7 種類の GI 遺伝子 (母性: Lit1, Zac1, Peg1, Peg3, Rasgrf1 と父性: H19, Gtl2) の発現アレル解析 (RT-PCR-SSCP 法)
- アレル特異的メチル化領域 (DMR) の DNA メチル化の解析 (Bisulphite-PCR 法)
- ヒストン修飾の解析 (Chip-PCR-SSCP 法: クロマチン免疫沈降法) (活性型修飾: 抗ヒストン H3-K (リジン) 9、H3-K14 アセチル化、抗 H3-K4 ジメチル化抗体、不活性化型: 抗ヒストン H3-K9 ジメチル化、抗 H3-K27 トリメチル化抗体)

4) 改変 PG 胚と正常 TS 細胞のキメラマウスの作成:

- ラベルされた正常型 TS 細胞を Blastocyst に注入しキメラ作製
- 改変 PG マウスの胎盤機能の改善を組織学に解析
- Rescue により改変 PG マウスに表現型の違い (体重、臓器形成) や延命率の解析
- 改変 PG マウスの TS 細胞を正常胚に注入。胎盤における寄与率や分布状態、表現型を個体毎に評価

(3) 胎盤構造の異なる異種動物のインプリント

- 対象動物; カンガルー (絨毛膜卵黄囊胎盤)、アルマジロ (内反卵黄囊胎盤)、野生ブタ (絨毛膜尿膜胎盤) の胎盤組織各 5 例
- BAC ライブラリースクリーニング; 英国 Cambridge Univ. Mammalian Genome Project 作成の BAC ライブラリーから BAC クローンの選別
- DNA 多型解析; 各動物種の胎盤組織の DNA、両親および胎児の末梢血 DNA を用い exon 内を多型解析する。(PCR-SSCP 法、Direct Sequence 法)
- インプリントの解析; DNA 多型を用いインプリントの解析 (RT-PCR Sequence 法)
- DNA メチル化の解析; 前述の BAC クローンからアレル特異的メチル化領域を検索し、DNA メチル化の解析を行う。(Bisulphite-PCR 法)

<成果公表リスト>

なし