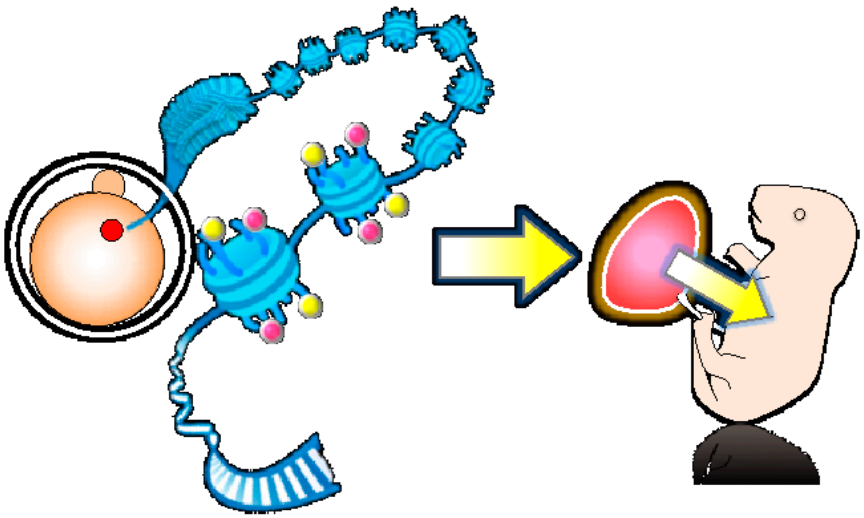
1　胎盤を介した肥満体質の遺伝機構の解明	井上　梓

【目的】近年、親の肥満が子供の代謝疾患リスクを上昇させるという肥満体質の遺伝性が注目を集めている。しかし大規模なゲノム解析の結果、ゲノム変異の寄与は5〜30%程度と見積もられており、ゲノム配列に非依存的な遺伝機構の存在が示唆される。生育環境などの交絡因子を排除できる動物モデルを用いた研究により、肥満体質の少なくとも一部は、卵のおそらくエピゲノムにより仲介されることが示唆されているが、その分子機構は全くわかっていない。そこで本研究では、肥満体質の母子遺伝に、卵から胎盤に伝達されるエピゲノムが関与すると仮説を立て、この検証に向けた知的基盤の構築を進めた。

【方法】我々は以前に、卵のエピゲノム修飾の一つであるヒストン H3 リジン 27 トリメチル化（H3K27me3）が、次世代の胚に伝達され、胎盤において片アレル性遺伝子発現を制御することを明らかにした。そして、H3K27me3 の母子伝達を阻害したマウスモデル（H3K27me3 の修飾酵素である *Eed* の欠損卵と野生型精子を受精させて生じる *Eed* 母性欠損体：以下、LOI（loss-of-imprinting）変異体と略す）において、胎盤特異的インプリンティングの破綻と胎盤の過形成が起こることを見出した。さらに、LOI 変異体は出生後に過体重を示すことから、母体環境などにより生じた卵のエピゲノム変異が、胎盤を介して次世代の代謝形質に影響を与えるという、肥満体質の母子遺伝機構を説明しうる新たな仮説を着想した（図）。そこで、本仮説の検証に向けた取り組みの一つとして、胎盤過形成と出生後過体重の因果関係を明らかにする実験を計画した。すなわち、LOI 変異体の胎盤過形成を治すことで、出生後過体重が治るかどうか、という点の検証である。具体的には、LOI 変異体の胎盤では 6 個の胎盤特異的インプリンティング遺伝子が両アレルから発現（2 倍量発現）しているが、この 6 個各々の遺伝子をヘテロ欠損させることで強制的に片アレル性発現（1 倍量発現）を回復させ、LOI 変異体の胎盤を治す。

【結果】CRISPR 等による遺伝子改変法により、6 個の胎盤特異的インプリンティング遺伝子である *Gab1*、*Jade1*、*Sfmbt2*、*Slc38a4*、*Smoc1*、*Xist* それぞれのヘテロ欠損マウスを得た。このヘテロ欠損体を LOI 変異体と交配させることで、胎盤過形成が回復するインプリンティング遺伝子を同定する計画であり、実験を進めている。この過程で我々は、X 染色体の不活性化に必須な *Xist* のヘテロ欠損により、LOI 変異体の胚性部分致死が大きく回復することを見出した。このことは、*Xist* の片アレル性発現制御が、発生自体における経世代 H3K27me3 の主要な役割であることを意味する。そこで、LOI 変異体の胚性部分致死を回避して胎盤回復実験を遂行するために、*Eed* と *Xist* の母性二重欠損マウスを作製した。

卵のエピゲノムが胎盤を介して次世代形質を制御する



1. 胎盤を介した肥満体質の遺伝機構の解明

井上　梓

理化学研究所 生命医科学研究センター

Key words：卵，ヒストン，経世代エピゲノム，インプリンティング，X 染色体不活性化

緒　言

近年世界中で肥満人口が増加しており、肥満および肥満予備軍の人口は世界の 1／3 に達している。肥満は 2 型糖尿病、循環器疾患、癌や不妊症など様々な疾患を引き起こし、QOL の著しい低下のみならず各国の医療財政を圧迫している。このような生活習慣病は一旦発症してしまうと対処療法しかできないため、肥満を予防することが重要である。しかし、そのためには食事制限などの“我慢”が必要であるため実際には効果が上がっていない。そのため、肥満体質が何に起因するのかを解明して根治治療に繋げる研究開発が求められている。

このような趨勢のもと、親の肥満が子供の代謝疾患リスクを上昇させるという肥満体質の遺伝性が近年注目を集めている。しかし大規模なゲノム解析の結果、ゲノム変異の寄与は 5〜30%程度と見積もられており、ゲノム配列に非依存的な遺伝機構の存在が示唆される［1］。環境要因などの交絡因子を排除できる動物モデルを用いた研究により、肥満体質の少なくとも一部は、卵のおそらくエピゲノムにより仲介されることが示唆されているが［2］、その分子機構は全くわかっていない。

エピゲノムによる母子遺伝機構の解明に向けて、卵のエピゲノムが次世代の胚に伝達される分子機構を理解する必要がある。卵のエピゲノムは、インプリンティング制御領域の DNA メチル化修飾以外は、受精直後に即座に初期化されるため、次世代には伝達されない、というのが通説である。しかし我々は近年、ヒストン修飾の一つであるヒストン H3 リジン 27 番目のトリメチル化修飾（H3K27me3）は、例外的に、受精直後の初期化を切り抜けることを見出した［3，4］。卵由来の H3K27me3 は、着床前発生から胎盤発生を通じて母由来の染色体に維持されることで、DNA メチル化非依存的に、片アレル性の遺伝子発現（インプリンティング）を制御する。さらに面白いのは、母性 H3K27me3 で制御されるインプリンティングの特徴は、胚の着床後に、胚体組織に分化する細胞においては自然に失われる一方で、胎盤を含む胚体外組織に分化する細胞においてのみ維持されることである。この、いわゆる「胎盤特異的インプリンティング」は、DNA メチル化修飾によらない謎のエピジェネティックな現象としてかつてから知られていたが［5, 6］、その制御機構の一端が明らかになった今、注目を集めている［7，8］。我々は、母性 H3K27me3 を欠損したマウスモデル（H3K27me3 の修飾酵素である *Eed* の欠損卵と野生型精子から生じる *Eed* 母性欠損体）では、胎盤特異的インプリンティングが破綻し、胎盤が過形成することを見出した。さらに、同時期に別グループにより作製された *Eed* 母性欠損体において、出生後の過体重が認められた［9］。このことは、母体環境等により卵のエピゲノムに変化が生じた場合に、胎盤を介して次世代の代謝形質に影響を与えるという、母子間エピゲノム伝達機構に関する新たな仮説を提示するものである。そこで、本仮説の検証に向けた取り組みの一つとして、胎盤過形成と出生後過体重の因果関係を明らかにする実験を計画した。このために、遺伝子改変マウスモデルを作製し、その過程で新規の知見を得たので報告する。

方法、結果、考察

1.　片アレル性発現の遺伝学的回復実験

Eed 母性欠損体（以下、LOI（loss-of-imprinting）変異体と略す）の胎盤過形成を治すことで出生後過体重が治るか、という点を検証したい。具体的には、LOI 変異体の胎盤では 6 個の胎盤特異的インプリント遺伝子が両アレルから発現

（2 倍量発現）しているが、この 6 個各々の遺伝子をヘテロ欠損させることで、強制的に片アレル性発現（1 倍量発現）を回復させ、LOI 変異体の胎盤を治す（表 1）。今年度までに、CRISPR 等による遺伝子改変法により、*Gab1*、*Jade1*、*Sfmbt2*、*Slc38a4*、*Smoc1*、*Xist* それぞれのヘテロ欠損マウスを得た。このヘテロ欠損体を LOI 変異体と交配させることで、胎盤過形成が回復する遺伝子を同定する。現在までに、結論付けられるだけの十分なサンプル数は取れておらず、現段階での結果の開示は控える。

2. *Xist* のヘテロ欠損による発生回復

我々は以前に、LOI 変異体は着床直後に発生遅延し、その半数以上が胚性致死になることを見出していたが、その原因は不明であった［10］。今回、上述のヘテロ欠損体の交配実験の過程で、*Xist* 遺伝子をヘテロ欠損させることで LOI 変異体の発生遅延が大きく回復することを見出した。そこで、*Eed* と *Xist* の母性二重欠損マウスを用いることで、発生遅延と胚性部分致死を最小限に抑えながら、LOI 変異体の胎盤回復実験を行うことを計画した（表 2）。*Eed*／*Xist* 母性二重欠損胚を解析したところ、胎生 6.5 日時点で認められていた LOI 変異体の発生遅延は大きく回復していた（図 1）。さらに、胎生 6.5 日胚の RNA シーケンス解析により、遺伝子発現レベルでも回復していることを確認した。*Xist* は X 染色体不活性化に必須の非コード RNA をコードする遺伝子であり、これが両アレルから発現すると、メス着床前胚において両方の X 染色体が一時的に不活性化される（図 1）。しかし、そのような状態においても着床後にはランダム型 X 染色体不活性化が起こるため、LOI 変異体における X 染色体不活性化異常は一過的であり、胚は生存可能であることを以前に見出していた［10］。今回の研究で明らかになった *Xist* ヘテロ欠損による発生回復の結果は、着床前における一過的な X 染色体不活性化異常が、着床後も胚発生に影響し、発生遅延および部分致死を引き起こしていたことを意味する。すなわち、*Xist* の片アレル性発現制御が個体発生における母性 H3K27me3 の主要な役割であることが示された。

3. 過形成胎盤の解析

胎盤は、母子間のガスや栄養・老廃物の交換を行うインターフェイスであり、他にもホルモン分泌など妊娠の継続と胎児の発生に重要な役割を果たす。胎盤を介した肥満体質の母子伝達機構を理解するためには、胎盤の過形成が何を意味し、胎盤の機能にどのような影響を与え、胎児にどのように作用するのかを明らかにする必要がある。その足がかりとして、今回、出生時点での LOI 変異体の胎盤の組織学的解析を行った。LOI 胎盤では、海綿栄養芽層が増大し、栄養交換の場である迷走路層に浸潤していた（図 2）。Periodic acid-Schiff stain（PAS）染色により、海綿栄養芽層に存在するグリコーゲン細胞の過増殖がその一因であることが示唆された。今後は、血管立体構造の可視化や血液の母子間相互輸送機能の定量評価などについて検討が必要である。

哺乳類のエピゲノム遺伝機構は未開の研究領域であり、個体形質という高次元の代物が、本当にゲノム変異によらずに次世代に伝達されるのか？という根本的な問いへの答えすら、まだ無い。しかし、少なくとも、配偶子のエピゲノム［それも、DNA メチル化修飾よりも不安定な（＝変化しやすい）ヒストン修飾］が胚に伝達されて、個体発生・胎盤発生に重要な遺伝子群の発現を制御することは紛れもない事実であり、親環境→生殖細胞エピゲノム→次世代形質を繋ぐ分子基盤として機能する可能性はある。本報告書に記した成果は、エピゲノム遺伝機構の解明に向けた準備段階に過ぎないが、今後も継続して本課題を遂行することでまた新たな知見が得られるであろう。

表 1. *Eed* 母性欠損体（LOI 変異体）の遺伝学的回復実験

	Xist	*Gab1*	*Jade1*	*Sfmbt2*	*Slc38a4*	*Smoc1*
野生型	x1	x1	x1	x1	x1	x1
*Eed*母性欠損	x2	x2	x2	x2	x2	x2
+ *Xist* ヘテロ	**x1**	x2	x2	x2	x2	x2
+ *Gab1*ヘテロ	x2	**x1**	x2	x2	x2	x2
+ *Jade1*ヘテロ	x2	x2	**x1**	x2	x2	x2
+ *Sfmbt2*ヘテロ	x2	x2	x2	**x1**	x2	x2
+ *Slc38a4*ヘテロ	x2	x2	x2	x2	**x1**	x2
+ *Smoc1*ヘテロ	x2	x2	x2	x2	x2	**x1**

*Eed*母性欠損体では、6個すべての胎盤特異的インプリンティング遺伝子が2倍量発現している。それぞれの遺伝子のヘテロ欠損体と交配させることで、強制的に1倍量発現に戻す。

表 2. *Eed/Xist* 二重母性欠損を用いた回復実験

	Xist	*Gab1*	*Jade1*	*Sfmbt2*	*Slc38a4*	*Smoc1*
野生型	x1	x1	x1	x1	x1	x1
Eed/Xist ダブル母性欠損	**x1**	x2	x2	x2	x2	x2
+ *Gab1*ヘテロ	**x1**	**x1**	x2	x2	x2	x2
+ *Jade1*ヘテロ	**x1**	x2	**x1**	x2	x2	x2
+ *Sfmbt2*ヘテロ	**x1**	x2	x2	**x1**	x2	x2
+ *Slc38a4*ヘテロ	**x1**	x2	x2	x2	**x1**	x2
+ *Smoc1*ヘテロ	**x1**	x2	x2	x2	x2	**x1**

*Eed/Xist*二重母性欠損では、*Eed*単独母性欠損で認められた部分胚性致死が抑制される。
これを用いて、残りのすべてのインプリンティング遺伝子のヘテロ欠損マウスと交配させる。

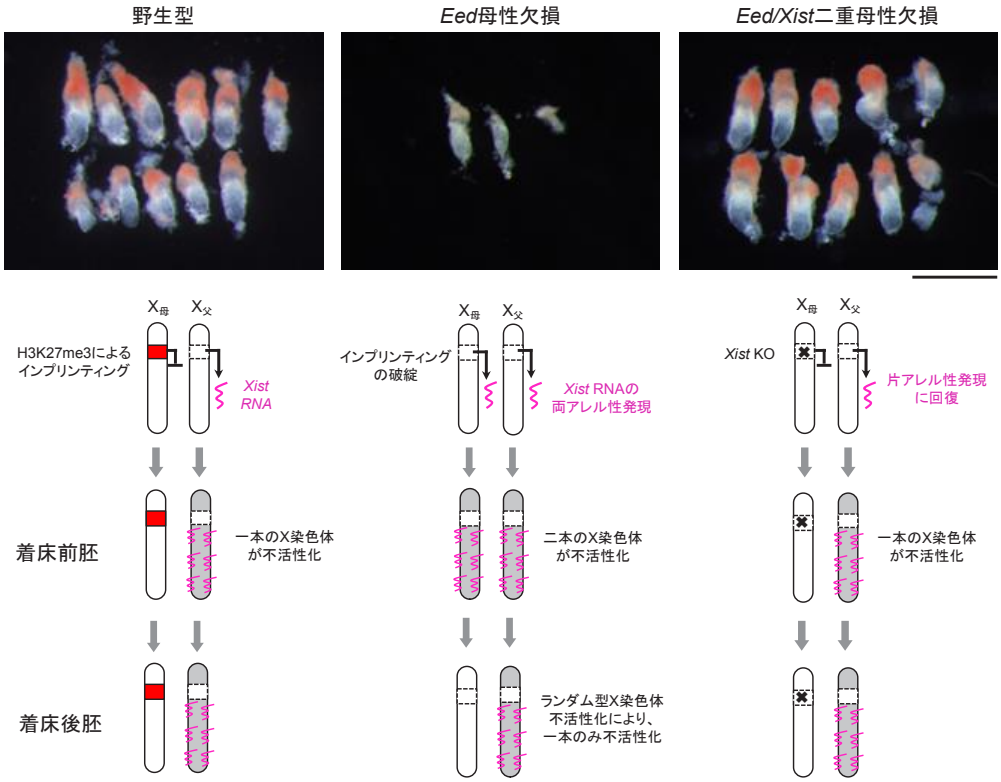


図 1.　*Eed* 母性欠損体（LOI 変異体）の発生遅延の回復

胎生 6.5 日齢の *Eed* 母性欠損体は、顕著な発生遅延を示すが、*Xist* をヘテロ欠損させると回復する。スケールバー：1 mm。各写真の下に模式図で X 染色体の状態を示す。

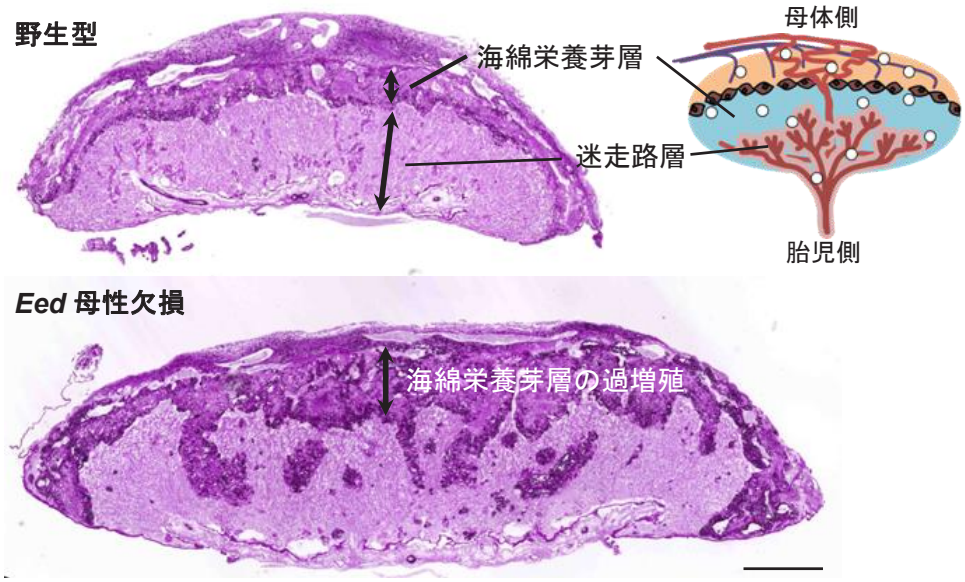


図 2.　*Eed* 母性欠損体（LOI 変異体）の胎盤切片の PAS 染色像

出生時点における *Eed* 母性欠損体の胎盤では、海綿栄養芽層の過増殖に伴う迷走路層への浸潤が見られる。PAS 染色により、海綿栄養膜層のグリコーゲン細胞を染色した。スケールバー：1 mm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所バイオリソース研究センター遺伝工学基盤技術室の小倉淳郎主任研究員、的場章悟専任研究員、井上貴美子専属研究員である。この場を借りて深謝申し上げます。

文　献

1) McCarthy, M.I., Genomics, type 2 diabetes, and obesity. The New England journal of medicine, 2010. 363(24): p. 2339-2350. PMID: 21142536 DOI: 10.1056/NEJMra0906948
2) Huypens, P., et al., Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. Nature Genetics, 2016: p. 1-4. PMID: 26974008　DOI: 10.1038/ng.3527
3) Inoue, A., et al., Genomic imprinting of Xist by maternal H3K27me3. Genes Dev, 2017. 31(19): p. 1927-1932. PMID: 29089420　DOI: 10.1101/gad.304113.117
4) Inoue, A., et al., Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. Nature, 2017. 547(7664): p. 419-424. PMID: 28723896　DOI: 10.1038/nature23262
5) Chiba, H., et al., De novo DNA methylation independent establishment of maternal imprint on X chromosome in mouse oocytes. genesis, 2008. 46(12): p. 768-774. PMID: 18932249　DOI: 10.1002/dvg.20438
6) Okae, H., et al., Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. Human molecular genetics, 2012. 21(3): p. 548-558. PMID: 22025075　DOI: 10.1093/hmg/ddr488
7) Hanna, C.W., Placental imprinting: Emerging mechanisms and functions. PLoS Genet, 2020. 16(4): p. e1008709. PMID: 32324732　DOI: 10.1371/journal.pgen.1008709
8) Matoba, S. and Y. Zhang, Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. Cell Stem Cell, 2018. PMID: 30033121　DOI: 10.1016/j.stem.2018.06.018
9) Prokopuk, L., et al., Loss of maternal EED results in postnatal overgrowth. Clin Epigenetics, 2018. 10(1): p. 1-22. PMID: 30005706　DOI: 10.1186/s13148-018-0526-8
10) Inoue, A., et al., Maternal Eed knockout causes loss of H3K27me3 imprinting and random X inactivation in the extraembryonic cells. Genes Dev, 2018. 32(23-24): p. 1525-1536. PMID: 30463900　DOI: 10.1101/gad.318675.118