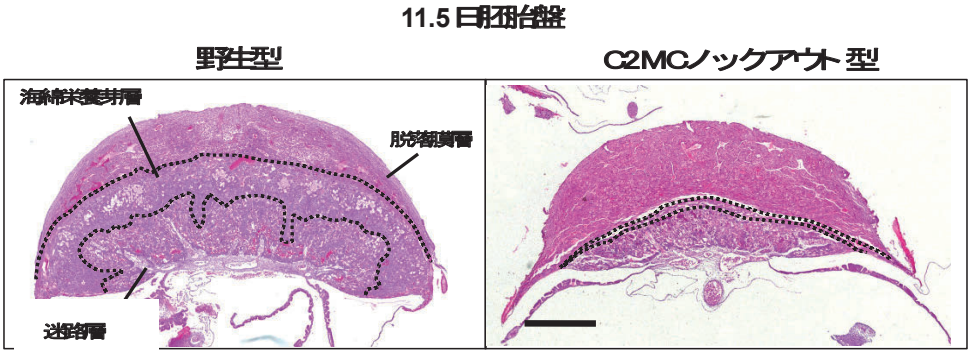
22　胎盤形成におけるマイクロRNAクラスターの機能解明	井上　貴美子

【目的】本研究においては、胎盤形成時における胎盤発現マイクロ RNA（miRNA）クラスター（MC）の役割とそれにより制御されるがん抑制因子との関連性を明らかにすることを目的としている。我々は実験動物を用いたこれまでの研究により、胎児期の胎盤成長にはタンパク質をコードしない短い RNA である miRNA の適切な発現が重要であることを報告している（下図）。この過程で胎盤形成に必須とされる miRNA は 2 番染色体上に 72 個の遺伝子を含む大規模なクラスター構造（chromosome2 MC : C2MC）を取っており、その標的遺伝子として多くのがん抑制因子が含まれていることを明らかにした。C2MC は齧歯類特異的 MC であるが、ヒトには同様に胎盤で高発現を示す MC である Chromosome19 MC（C19MC）が存在する。C19MC は、46 個の連続した miRNA 遺伝子を含むヒトゲノム上で最大の MC の一つであり、C2MC との配列類似性も示唆されているものの、その機能は未だ明らかにされていない。本研究では、胎盤形成において抑制的に制御されているがん抑制因子と miRNA とのカスケードを明らかにすると共に、ヒト型 C19MC が胎盤形成においてどのような役割を持っているのかを明らかにするためにマウスモデルを作製することを目的としている。

【方法】本研究では、第一に、胎盤形成過程において C2MC により抑制的な制御を受けているとされる 102 個の遺伝子のうち、(1) C2MC KO マウス胎盤で発現上昇が大きいこと、(2) 胎盤での機能が未知であること、を指標として 12 個の遺伝子を本課題に供する遺伝子として選別し、これら 12 種類の遺伝子において、Triple target CRISPR と呼ばれるゲノム編集方法によりノックアウト産仔を作製した。Founder 世代にて妊娠満期である 19.5 日齢で帝王切開を行い、(1) 産仔体重、胎盤重量を測定した。また、(2) 遺伝子発現量を測定した上で、(3) 胎盤形態を観察した。得られた産仔は里親に哺乳させ、(4) 離乳まで成長を観察した。Negative control としてチロシナーゼ遺伝子をターゲットとすることで、産仔体重・胎盤重量、離乳率を測定し、同時に毛色を観察することで、同手法を用いたゲノム編集効率も測定した。齧歯類型の C2MC に対して、ヒトにはこれに類する胎盤発現性の C19MC が存在している。本研究では C19MC の機能を明らかにするために、マウス受精卵にヒト大腸菌人工染色体（bacterial artificial chromosome : BAC）を導入することで、C19MC を導入したモデルマウスを作製することも試みた。

【結果】Negative control として行ったチロシナーゼ遺伝子ノックアウトによるゲノム編集効率は 97%であった。同様の方法を用いて、12 種類の遺伝子においてノックアウト産仔の作製を行ったところ、1 遺伝子において胎盤重量の低下が観察された。また、3 遺伝子においては産仔体重の低下が観察された。4 種の遺伝子においては胎盤重量に有意差はないものの、胎盤の層構造に変動が見られた。また、C19MC 導入マウスを作製するために、ヒト BAC を用いて、マウス受精卵への遺伝子導入を行った。現状では、遺伝子導入が認められる生存個体は得られていないが、胚移植後、妊娠中に死亡した胎仔には導入されていることが認められた。したがって、C19MC の過剰発現は、胎仔の正常な発生に影響している可能性が示唆される。

野生型と C2MC ノックアウト型における胎齢 11.5 日胎盤形態



スケールバー: 1mm

22. 胎盤形成におけるマイクロ RNA クラスターの機能解明

井上　貴美子

理化学研究所 バイオリソース研究センター

Key words：胎盤，非コード RNA，ゲノム編集，がん抑制遺伝子

緒　言

胎盤は、哺乳動物の妊娠期間において母体と胎児間を結ぶ哺乳類特有の器官である。胎盤は妊娠期間中に母体より栄養や酸素を胎児側に供給し、胎児側は老廃物や二酸化炭素を母体に還流させることによって、長期間にわたる胎児の成長を維持している。胎盤異常は胎児の成長と母体の健康に大きな影響をもたらすことが知られている。例えば、先進国では、死産は妊婦の約 0.3%で生じるが、その内の 2～3 割は胎盤の異常が原因であると言われている。また近年、胎児期の成長不良が成人後の疾患の罹患率に影響を与えるとされる DOHaD 仮説が提唱されており、妊娠期間中の胎児の成長を担っている胎盤の健康に注目が集まっている［1］。

我々は実験動物を用いたこれまでの研究により、胎児期の胎盤成長にはタンパク質をコードしない短い RNA であるマイクロ RNA（miRNA）の適切な発現が重要であることを報告した［2］。この過程で胎盤形成に必須とされる chromosome2 miRNA クラスター（C2MC）と呼ばれる miRNA 遺伝子群は 2 番染色体上に 72 個の遺伝子を含む大規模なクラスター構造を取っており、マウスのゲノムでは最も大きな miRNA クラスターの一つであるといえる。我々は、C2MC のノックアウトマウスを作製し、*in silico* 解析によりその標的遺伝子として多くのがん抑制因子が含まれていることを明らかにした。C2MC は齧歯類特異的 MC であるが、ヒトには同様に胎盤で高発現を示す miRNA クラスターである Chromosome19 MC（C19MC）が存在する［3］。本研究では、胎盤形成において抑制的に制御されているがん抑制因子と miRNA とのカスケードを明らかにすると共に、ヒト型 C19MC が胎盤形成においてどのような役割を持っているのかを明らかにするために、マウスモデルを作製することを目的としている。

方　法

1. C2MC ターゲット遺伝子のノックアウト産仔作製

C2MC のターゲットとして *in silico* で同定された 102 個の候補遺伝子の内、(1) C2MC ノックアウトマウス胎盤で発現上昇が大きいこと、(2) 胎盤での機能が未知であること、を指標として 12 個の遺伝子を本課題に供する遺伝子として選別した（表 1）。本課題内では、迅速に表現型を観察するために、Triple target CRISPR 法［4］を用いて、ノックアウト産仔の作製を行った。

Triple target CRISPR は以下の方法にて行った。

1） ガイド RNA（gRNA）の合成

選定された 12 の遺伝子におけるターゲット配列は CRISPick（https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public）を使用して上位 3 件のターゲット配列を選定した。gRNA の合成は Precision gRNA Synthesis Kit（Thermo Fisher Scientific）を利用して行った。

2） 体外受精による受精卵の作製

過排卵は 8 週齢（C57BL6/N x DBA/2）F1 雌マウスに 7.5IU PMSG と 48 時間後に 7.5IU hCG を腹腔投与することで行い、hCG 投与から 14～16 時間後に HTF 培地中に卵子を採取した。精子は C57BL6/N の精巣上体から採取し、HTF 培地で 1～1.5 時間培養した後、卵子への媒精を行った。媒精後 5 時間で卵子を洗い、前核が確認できたものを受

精卵として使用した。

3） Triple target CRISPR によるノックアウト胚の作製

得られた受精卵は、CZB 培地に移して培養を行った後、以下の方法で Cas9 ヌクレアーゼと gRNA の導入を行った。受精卵を CZB-Hepes 培地で洗浄後、白金ブロック電極（1 mm gap、NEPA gene）内のエレクトロポレーション溶液（各 gRNA：150 ng/μl、Cas9 ヌクレアーゼ：312.5 ng/μl）に移し、エレクトロポレーションにより gRNA と Cas9 ヌクレアーゼの導入を行った（NEPA21、NEPA gene）。

4） 胎仔、胎盤重量の測定、胎盤形態の観察

Cas9、gRNA を導入した受精卵は、翌日まで CZB 培地で培養し、偽妊娠雌に胚移植を行った。偽妊娠雌は 8～12 週齢 ICR 雌を精管結紮 ICR 雄と交配させ、膣栓が確認された個体を偽妊娠雌として胚移植に用いた。発生した 2 細胞期胚は偽妊娠雌の卵管に移植した。膣栓が確認された日を妊娠 0.5 日として、19.5 日で帝王切開し産仔を得た。

得られた産仔について、①産仔体重、胎盤重量を測定し、②遺伝子発現量を測定した上で、③胎盤形態を観察した。得られた産仔は里親に哺乳させ、④離乳まで成長を観察した。Negative control としてメラニン合成酵素を産生するチロシナーゼ遺伝子をターゲットとした上で、産仔・胎盤重量、離乳率を測定した。同時に毛色を観察することで、同手法を用いたゲノム編集効率も測定した。

2. C19MC 導入マウス作製の試み

ヒト BAC は、ジェノテックスより購入し、クロラムフェニコール存在下で増幅後、NucleoBond BAC（Takara Bio）を用いて精製した。8 週齢（C57BL6/N x DBA/2）F1 卵子と C57BL6/N 精子の体外受精により得られた受精卵の前核に BAC を注入し、CZB 培地で翌日まで培養を行った。発生した 2 細胞期胚は偽妊娠雌の卵管に移植した。膣栓が確認された日を妊娠 0.5 日として、19.5 日で帝王切開、または自然分娩により産仔を得た。誕生したマウスの尾から DNA を採取し、ゲノム上に BAC 遺伝子が導入されているか否かを PCR により検出した。

結果および考察

1. 遺伝子ノックアウトによる胎盤形成への影響

Negative control として使用したチロシナーゼ遺伝子の Triple target CRISPR によるゲノム編集効率を Founder 産仔の毛色により判断したところ、編集効率は 97%であった（29/30 匹、図 1）。したがって、本手法によるゲノム編集効率は非常に高く、Founder での表現型観察が可能であることが示された。



図 1. チロシナーゼ遺伝子のノックアウトにより誕生した産仔（上 5 匹）
チロシナーゼ遺伝子のノックアウトにより、毛色がアルビノとなる。
下 3 匹は ICR 由来産仔（ゲノム編集に由来しないアルビノ産仔）

以上の条件設定を基盤として、以下の 12 遺伝子においてゲノム編集によるノックアウト産仔の作製を行った。結果を表 1 に示す。

表 1. C2MC ターゲット遺伝子ノックアウトにおける産仔体重、胎盤重量と出生後の産仔の状況

遺伝子名	Position	Accession	Fold change (C2MC KO/WT)	産仔体重	胎盤重量	産仔の状態
Rgs4	chr1:171672547	NM_009062	3.85621	1.85±0.03	0.115±0.006	異常なし
Ptpn18	chr1:34530561	NM_011206	4.711056	1.69±0.04	0.12±0.006	異常なし
Angptl2	chr2:33102102	NM_011923	11.564922	1.63±0.07	0.13±0.098	異常なし
Ptgfr	chr3:151464382	NM_008966	7.0084705	1.18±0.09***	0.11±0.004	異常なし
Rasl11a	chr5:147658864	NM_026864	5.5671434	1.44±0.04	0.098±0.004	異常なし
Bst1	chr5:44233465	NM_009763	5.9165893	1.65±0.03	0.87±0.77	異常なし
Gkn2	chr6:87329285	NM_025467	43.198532	1.19±0.02****	0.08±0.003****	異常なし
Bmper	chr9:23289301	NM_028472	2.9902012	1.58±0.06	0.102±0.003	出生直後に全て死亡
Arg1	chr10:24636253	NM_007482	5.9624867	1.49±0.04	0.12±0.004	離乳前に全て死亡
Nfkbia	chr12:56591440	NM_010907	3.8196292	1.68±0.03	0.13±0.01	離乳前に全て死亡
Fst	chr13:115243624	NM_008046	8.762529	1.26±0.01****	0.103±0.003	出生直後に全て死亡
Rnf182	chr13:43764119	NM_183204	4.3575788	1.45±0.06	0.102±0.006	異常なし
Tyrosinase	chr7:87073979	NM_011661	-	1.67±0.04	0.12±0.006	異常なし

Kruskal-Wallis test（** : P＜0.01、*** : P＜0.0005、**** : P＜0.0001）。太字はがん抑制因子。

以上の産仔体重・胎盤重量の変化とその後の飼育状況から以下の観察結果が導き出された。

1) 産仔重量がコントロールであるチロシナーゼノックアウトと比較して有意に低かったのは、*Ptgfr*、*Gkn2*、*Fst* の 3 種の遺伝子であった。また胎盤重量が有意に低かったのは *Gkn2* のみであった。

2) ターゲット遺伝子を対象として胎盤の遺伝子発現量を解析したところ、有意に発現量の低下が見られた遺伝子は *Rgs4*、*Rasl11a*、*Bst1*、*Gkn2*、*Bmper*、*Fst* であった。その他の遺伝子については、設計したプライマーの位置により有意な発現の低減を検出できないケースがあるため、プライマー位置の検討を再度行う予定である。

3) また、胎盤重量が正常範囲内ではあるが、*Angptl2*、*Bmper*、*Arg1*、*Fst* については、胎盤形態に何らかの異変が見られた。具体的には *Bmper*、*Arg1*、*Fst* で海綿栄養芽層の肥厚が見られ（図 2）、*Angptl2*、*Bmper*、*Fst* でグリコーゲン細胞の増加という傾向が見られた。これらの形態変化はコントロールであるチロシナーゼノックアウトでは観察されない変化であるため、対象の遺伝子欠損に起因する変化であると考えられる。

4) さらに、出生直後に胎仔の死亡が確認されたのは *Fst*、*Bmper* であった。*Arg1*、*Nfkbia* については、出生直後は生存していたものの、離乳前に死亡した［5，6］。

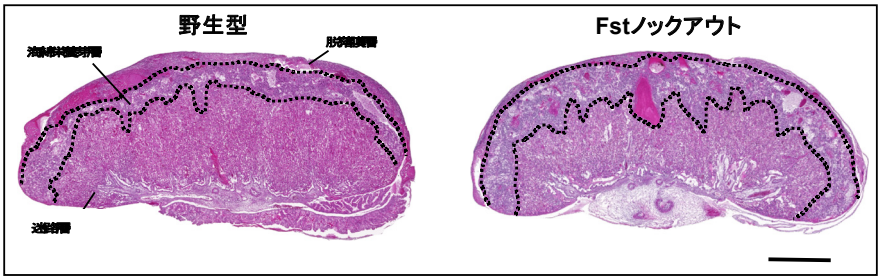


図 2. 野生型と *Fst* ノックアウト（19.5 日齢）における胎盤形態

Fst ノックアウト胎盤では海面栄養芽層の肥厚が見られる（スケールバー：1 mm）。

2. C19MC 遺伝子導入の試み

マウス特異的な C2MC と同様にヒトには霊長類特異的な C19MC が存在するが（図 3）、この領域の詳細な機能は明らかになっていない。これらの機能を明らかにするために、C19MC 領域を導入したマウスモデルを作製することを試みた。

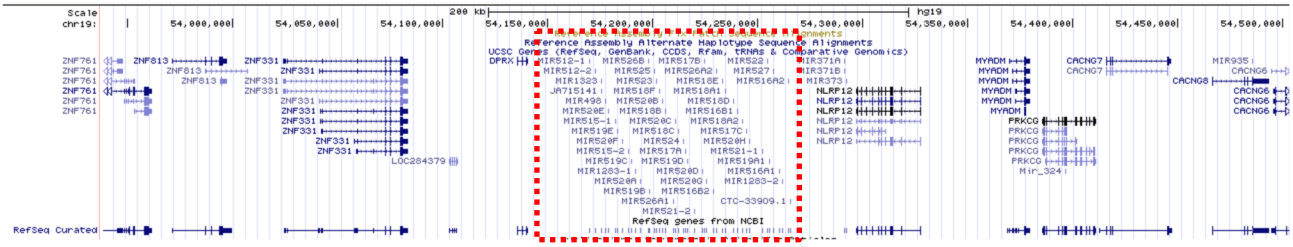


図 3. ヒト 19 番染色体上に存在する C19MC 領域

赤枠の領域が C19MC を示す。

受精卵の前核に BAC クローンを注入することで、遺伝子導入個体の作出を試みたが、6 回の試行により 79 匹の産仔を得たものの、これまでのところ、ゲノムに導入された産仔は得られていない。一方で妊娠中に死亡した胎仔を用いて検出を行ったところ、3 個体中 2 個体で BAC 由来の遺伝子が検出されたことから、本ゲノム領域の遺伝子発現が発生に重大な影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後は、低コピー数で導入可能な条件を検討することで、生存可能な産仔の作出を目指す予定である。

以上の結果から、KO による胎盤形態変化の表現型が見られた複数の遺伝子（現段階で明らかな変化が見られたのは 4 種類）が、胎盤形成過程で C2MC による抑制を受けることで海綿栄養芽層の構造や細胞構成が維持され、正常な胎盤形成が確立されていることが予想される。個々のターゲット遺伝子のノックアウトにおいては胎盤重量に変化をもたらすほど大きな形態異常は見られないものの、C2MC ノックアウト胎盤では複数の遺伝子による形態変化が積み重なって、重大な形態変化をもたらすと考えられる。したがって、C2MC 内の miRNA 発現が何らかの事情により変動すると、胎盤形態の異常をもたらし、胎仔の発生異常に繋がっている可能性がある。

C19MC 導入モデルマウスについては、現状では生存している産仔は得られていないが、今後は、低コピー数で導入できる条件を検討し産仔の作出を目指す予定である。

文　献

1) Hoffman DJ, Powell TL, Barrett ES, Hardy DB. Developmental origins of metabolic diseases. Physiol Rev. 2021 101:739–95. PMID: 33270534 DOI: http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00002.2020

2) Inoue K, Hirose M, Inoue H, Hatanaka Y, Honda A, Hasegawa A, et al. The rodent-specific microRNA cluster within the Sfmbt2 gene is imprinted and essential for placental development. Cell Rep. 2017 19:949–56. PMID: 28467908 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.018

3) Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefèvre A, Coullin P, Moore GE, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. Hum Mol Genet 2010 19:3566–82. PMID: 20610438 DOI: http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq272

4) Sunagawa GA, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Perrin D, Fujishima H, Ukai H, et al. Mammalian reverse genetics without crossing reveals Nr3a as a short-sleeper gene. Cell Rep. 2016 14:662–77. PMID: 26774482 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.052

5) Matzuk MM, Nalfang L, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. Nature. 1995. p. 360–3. PMID: 7885475 DOI: http://dx.doi.org/10.1038/374360a0

6) Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozengurt N, Tsoa R, O'Brien WE, et al. Mouse model for human arginase deficiency. Mol Cell Biol [Internet]. 2002 22:4491–8. PMID: 12052859 DOI: http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.13.4491-4498.2002