

## 4-2-9 周産期病態研究部（合併症妊娠管理研究室、胎児発育研究室）

### 1. 研究体制

平成 18 年 10 月 1 日付けで、秦健一郎（前国立遺伝学研究所助手）が部長に就任した。平成 19 年 1 月 1 日付けで、合併症妊娠管理室長として中林一彦が着任し、胎児発育研究室長に深見真紀が就任した。また、実験助手および秘書業務に日高可奈子が参加した。

### 2. 研究内容

#### 2.1 異常妊娠の病因と病態解明に関する研究

##### 2.1.1 習慣流産の発生機序に関する分子遺伝学的研究

流産や胎児発育遅延等の異常妊娠は、染色体異常を含む様々な母体因子、胎児因子の異常により起こり得る事が知られている。しかし、従来の解析手技では明らかな病因を同定できない症例が稀ではない。染色体構造異常の一つである UPD (uniparental disomy) は、マウスモデルの解析から流産や胎児・胎盤発育異常の原因となる事が明らかになっており、ヒトでも同様の異常が起こり得ると予測される。実際に、UPD を伴うゲノムインプリンティング異常症候群は、胎盤や胎児発育に異常を来す。また、DNA メチル化や X 染色体不活性化などのエピゲノム因子に異常があるモデルマウスは、trophoblast cell の分化異常、胎盤の形成不全を伴い、不妊や胎児発育異常を呈する。加えて、インプリンティング遺伝子の発現異常モデルマウスは、胎盤形成不全や、妊娠高血圧症候群様の表現型を呈することが知られている。

このように、エピゲノム因子は胎盤の分化・発生と付随する周産期病態に深く関わっていると考えられるが、ヒト症例での系統的網羅的な解析は行われるに至っていない。

そこで、DNA マイクロアレイの技術を用いたデジタルカリオタイピングと、DNA メチル化に注目したエピゲノム異常解析を行い、ヒト発生異常の新たな病因・病態を解明することを目的とした研究を現在進行中である。

##### 2.1.2 子宮内胎児発育遅延に関する分子遺伝学的研究

子宮内胎児発育遅延は、高い周産期死亡率を呈すると共に、生児を得た場合でもしばしば合併症や後遺症に対して長期にわたる治療が必要とされ、成育医療上重要な疾患である。およそ半数は孤発例とされ、成因が解明されていない為、確立された治療方針は無く、医療資源の適正配置という観点からも常に周産期管理法に苦慮する疾患である。近年の医学・生物学的知見より、生殖細胞・受精から出産に至るまで、胎児と胎盤の正常な発育に関わる様々な因子が同定されつつあるが、実際の疾患との関連は不明なものが多い。また、多くの症例で、既存の細胞遺伝学的検査では異常が同定されない。子宮内胎児発育遅延には、従来の細胞遺伝学的な解析では同定できない微細な染色体構造異常が存在すると予想される。

我々を含む複数の研究グループが作成した DNA メチル化異常マウスの解析により、生殖細胞・胎児・胎盤の発生と分化のポテンシャルにエピジェネティクス機構が深く関与していることが明らかとなった。また、エピゲノム異常は胎児発育異常や胎盤形成異常の病因・病態となり得ることが推測されるが、ヒト症例での詳細は解析されていない。

そこで、子宮内胎児発育遅延を呈する症例を対象に、(1)胎盤と臍帯血のゲノム DNA を用いて網羅的なメチル化解析を行い、(2)同定された異常領域の遺伝子発現異常の有無を解析し、(3)微細な染色体構造異常の有無を検討し、(4)臨床像および胎盤の病理学的解析結果との対比を行えば、子宮内胎児発育遅延を惹起するエピゲノム異常因子の抽出と、臨床経過や病理診断結果との相関を検討することができると考えられる。

現在、当センター病院周産期診療部をはじめ、複数の外部病院および研究期間と協力し、子宮内胎児発育遅延のエピゲノム解析を行うための準備を進めている。

## 2.2 胎盤の発生と分化に関する研究

### 2.2.1 DNA メチル化異常を呈する胎盤分化異常の解析

我々の作成した DNA メチル化異常モデルマウスは、全例妊娠中期に致死であった。これらの胎盤を病理学的に解析すると、ラビリンス層（母体胎児間のガス・栄養交換に必須の領域）の形成が著しく障害されており、妊娠が維持されない直接の要因であると考えられた。異常初期胚から樹立した trophoblast stem cell を用い、in vitro で分化実験を行うと、ラビリンス層を構成する spongiotrophoblast への分化が不良であり、分化に必須であることが知られている遺伝子やインプリンティング遺伝子の発現に異常が認められた。

現在これらの知見を元に、胎盤分化を制御するエピゲノム機構の解析を進めている。

## 2.3 生殖細胞の発生と分化に関する研究

### 2.3.1 正常な胎児発育に必須の配偶子分化（配偶子性差）の研究

精子核に似たエピジノタイプの卵子を用いると、卵子2個からマウス個体を発生させる事が可能である。この結果から、DNAメチル化パターンは配偶子核の雌雄差を規定する主因の一つであることが示された。DNAメチル化酵素関連因子 *Dnmt3L* は、上述の配偶子DNAメチル化パターンの雌雄差形成に必須であることが明らかになった唯一の因子であるが、同遺伝子のみでは制御機構の説明が困難であり、未知因子と複合体を形成して作用する事が予想される。本研究は、性染色体に依存しない配偶子の性差を規定するエピゲノム分子機構を、特に *Dnmt3L* と相互作用する因子に着目し、メチル化パターン形成制御機構の観点から明らかにすることを目的とした。

上述のように、*Dnmt3L* タンパク質と相互作用する候補因子（機能未知の新規遺伝子のため、以下候補 A と記す）を同定した。In vitro でこれらの因子を用いて配偶子の DNA メチル化パターン雌雄差形成を再現する事が不可能なため、候補 A 機能解析を目的に、まず先行して遺伝学的解析（ターゲティングマウスの作成）を現在準備している。並行して、候補 A タンパク質の機能を、特に *Dnmt3L* との相互作用能の観点から、哺乳類培養細胞を用いた強制発現系で解析中である。強制発現系では、他種とのバイオインフォマティックな比較解析を利用して様々な欠失変異体を作成し、相互作用に必須の領域やアミノ酸の同定を試みている。

### 2.3.2 精子形成異常の分子生物学的研究

本研究では、*Dnmt3L* 変異マウスが、臓器幹細胞である精原細胞を生後の生殖細胞分化過程で失うことに着目し、DNA メチル化を中心に、生殖幹細胞を特徴付けるエピジェネティクス機構を明らかにすることを目的とした。変異生殖細胞ゲノム DNA を用いた DNA メチル化解析により、変異マウスの卵子とは異なり、オス変異生殖細胞では、一部正常な DNA メチル化状態を呈するインプリンティング遺伝子も存在した。しかし、DNA マイクロアレイ解析により、変異マウス精巣では、レトロトランスポゾンのひとつである IAP の発現量が上昇しており、実際に同領域が低 DNA メチル化状態であることが確認された。このような表現型は他に類例を見ず、反復配列特異的かつ生殖幹細胞特異的な DNA メチル化制御機構の存在を示すものである。現在これら知見を元に、*Dnmt3L* タンパク質と相互作用する候補因子を同定し、その機能解析を進めている。

### 2.3.3 卵子老化のエピゲノム異常の解析

卵子は加齢の影響を受けやすく、臨床的には老化卵子核移植や提供未受精卵細胞質の移植がすでに試みられている。しかし、全ての老化卵子に有効ではないと共に、子供に両親以外の遺伝情報が混入するという倫理的・医学的問題を避けられず、標準的治療法とはなりえない。老化卵子核やクローンの体細胞核は、適当な環境下に置かれると失っていた分化能を取り戻すと捉えることができる。その分子機構として、遺伝子配列の変化を伴わないゲノム機能制御機構、すなわちエピジェネティクス機構が寄与していることが諸家の報告から示唆されている。本研究は、卵細胞核機能をエピジェネティックな観点から質的に診断するという独創的かつ先駆的な研究である。本研究の知見に沿って、卵子老化や高齢不妊症の質的診断を行うことにより、遺伝情報を改変せずに卵細胞核機能を修復し、安全で効率的な不妊症治療法への応用が早期に可能となる。

現在、加齢マウス卵子を用い、微量検体からのエピゲノム解析の準備を進めている。

## 2.4. 胎児発生を司るエピジェネティクス機構の研究

### 2.4.1 染色体ドメインレベルでのゲノムインプリンティング維持機構の解明

ゲノム刷り込み遺伝子はクラスターを形成することが多いが、そこでの協調的な発現制御機構については未知の部分が多い。疾患の責任領域に相当する刷り込み遺伝子クラスターの解析は疾患機序の解明という観点から重要であり、更に染色体ドメインレベルでの遺伝子発現制御の優れたモデル解析系となりうる。我々は、疾患関連の二つの刷り込み遺伝子クラスターについて、そのインプリンティング発現維持機構を解明するための試みを開始したので紹介したい。マウス7番染色体遠位部の約1 Mbの領域(Bechwitth-Wiedemann症候群の責任領域と相同)には独立した2つの刷り込みサブドメイン(Cdkn1c-Kvlqt1-Mash2ドメインおよびIns2-H19ドメイン)が存在する。2つのサブドメイン間に存在する210kbの反復配列リッチな領域の役割を明らかにするために、この領域を欠失するゲノム改変マウスの樹立を試みる。ヒト7番染色体上の刷り込み遺伝子がRussell-Silver症候群に関連することが示唆されており、我々の網羅的探索により7q32領域のKLF14(Krueppel-like factor 14)遺伝子が新規の母性発現刷り込み遺伝子として同定された。MEST/PEG1, CPA4, KLF14の3つの刷り込み遺伝子が含まれる400kb領域について、染色体ドメインレベルでの発現制御機構の解析に着手する。

## 2.5 胎児発育異常の分子遺伝学的研究

### 2.5.1 性染色体上の成長遺伝子SHOXの分子遺伝学的解析

SHOXの骨特異的発現が、翻訳領域の3側に存在する75bpの塩基配列に依存する可能性を見出した。その後、SHOX半量不全の症状を有する変異陰性患者を対象として、この塩基配列の変異解析を開始した。また、SHOX cDNAを導入したトランスジェニックマウスを作成し、SHOX遺伝子導入による成長障害治療にむけての基礎実験に着手した。

### 2.5.2 胎児発育異常におけるインプリンティング異常の解析

成長障害を伴う子宮内発育遅延およびシルバーラッセル症候群患者において、第7番、第11番染色体メチル化可変領域のメチル化異常を同定し、これらの疾患の発症にインプリンティング異常が関与することを明らかとした。

### 2.5.3 新規性分化異常症責任遺伝子の同定

Xq28に位置するCXorf6が男性性分化異常症の責任遺伝子であることを発見し、新規ヒト遺伝疾患を確立した。さらに、CXorf6マウス相同遺伝子が、性分化決定期の胎児Sertoli細胞とLeydig細胞、および、成獣期卵巣顆粒膜細胞で強く発現することを明確にした。さらに、CXorf6がNotch共役因子mastermind-like 2と同源性を有し、Notch標的遺伝子Hes3のプロモーターを直接的に活性化することを見出した。その後、RNAiの手法を用いたCXorf6の機能解析およびノックアウトマウスの表現型解析を開始した。

### 2.5.4 胎児期特異的男性ホルモン産生経路の同定

P450 oxidoreductase異常症患者における尿ステロイドプロファイル解析および詳細な遺伝子型-表現型解析により、本症における女性外生殖器異常の発症に新生児期-乳児期特異的新規男性ホルモン産生回路(backdoor pathway)が関与していることを明らかとした。