

# 博士論文

ヒト胎盤栄養膜細胞分化モデルを用いた  
新規ヒト内在性レトロウイルスの探索

森 田 一 輝

# ヒト胎盤栄養膜細胞分化モデルを用いた新規ヒト内在性レトロウイルスの探索

所属：東京大学大学院 医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員：藤井 知行

申請者名：森田 一輝

## 目次

要旨	3 ページ
序文	4 ページ
目的	10 ページ
方法	12 ページ
・ 課題 1	12 ページ
・ 課題 2	19 ページ
・ 課題 3	23 ページ
結果	27 ページ
・ 課題 1	27 ページ
・ 課題 2	31 ページ
・ 課題 3	35 ページ
考察	43 ページ
結論	46 ページ
謝辞	46 ページ
参考文献	47 ページ

要旨：

絨毛形成にヒト内在性レトロウイルス(HERV)が重要な役割を果たすことが知られている。今回我々は胎盤から栄養膜細胞(CTB)を単離し、合胞体栄養膜細胞(STB)へと分化させるモデルを作成し経時的な遺伝子発現変化を RNA-seq を用いて調査し、HERV のデータベースである gEVE を使用することで、絨毛細胞の分化過程において発現している新規の HERVs の同定を試みた。gEVE を使用して抽出した HERV 候補は 166 個あり、その中で遺伝子データベースに登録がなく、新規と思われる候補は 132 個であった。その中で既知の HERV と同等の発現量が認められたものまたはアミノ酸をコードしていると UCSC のデータベースより確認できたものは 10 個であり、全て PCR で発現が確認された。10 個の遺伝子の中でも特異的な発現が確認できたものは 9 つであった。それぞれの新規遺伝子候補に対して、5'RACE 法と 3'RACE 法により遺伝子末端の同定を試み、2 個の新規 HERV の遺伝子末端を同定した。

序文：

胎盤は妊娠期間中に渡り、成長する胎児を維持し、保護するために重要な臓器である。胎盤の中でも絨毛は母体血と直接接触する場であり、母体と胎児との間でのガス交換や物質交換を行う役割を担っている(1)(2)(3)。母体血と接する部位は、母体血に浮遊している部位と脱落膜に付着する部位に分かれており、それぞれ自由絨毛と付着絨毛と呼ばれる(4)。自由絨毛の表面には多核細胞である合胞体栄養膜細胞(syncytiotrophoblast: STB)が存在し、その内層には単核の栄養膜細胞(cytotrophoblast: CTB)が裏打ちするように位置している。付着絨毛は絨毛外栄養膜細胞(extravillous-trophoblast: EVT)が脱落膜へと浸潤しており、子宮らせん動脈の平滑筋細胞を置換し血管抵抗を下げることで、絨毛間腔へ母体血を供給しやすくしている(2)。絨毛形成の過程で CTB は重要な役割を果たすことが知られており STB や EVT へと分化する幹細胞としての機能を果たしていることが知られている(2)(図 1)。

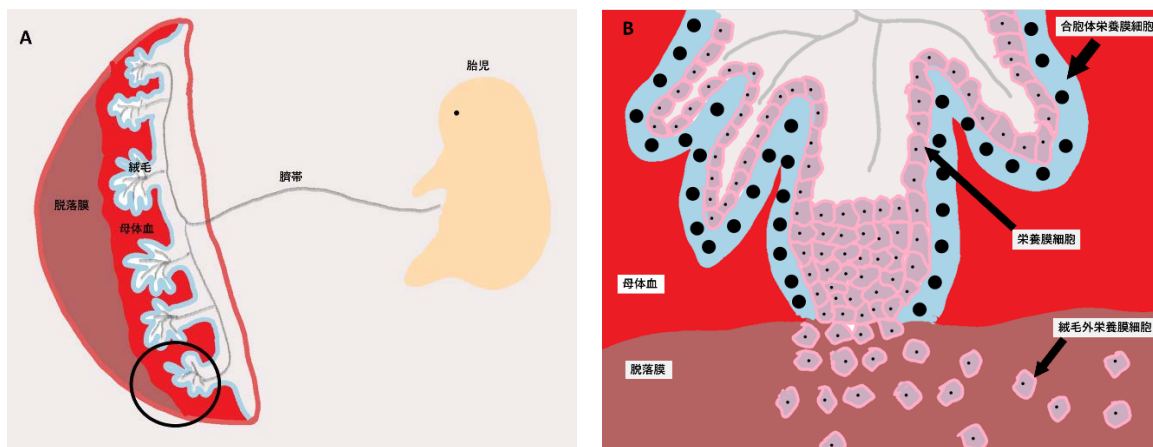


図 1. 胎盤・絨毛の構造

A は胎盤の大まかな構造で、B は A の黒丸内を拡大した図である。A:胎児血管である臍帯は胎盤内では絨毛内へと入り込み、母体血と直接接する絨毛を通じて母体と栄養やガス交換、物質交換を行う。B:絨毛は母体血に浮遊している部分と脱落膜と接する部分があり、それぞれ自由絨毛と付着絨毛と呼ばれる。自由絨毛表面には多核の細胞である合体体栄養膜細胞 (syncytiotrophoblast:STB)が存在し、直接母体血と接している。その内層には栄養膜細胞 (cytotrophoblast:CTB)と呼ばれる単核の細胞が存在する。付着絨毛から一部の CTB は脱落膜に侵入していき、絨毛外栄養膜細胞(extravilloustrophoblast:EVT)へと分化する。

STB はヒト絨毛性ゴナドトロピン(human chorionic gonadotropin: hCG)やヒト胎盤ラク トーゲン(human placental lactogen: hPL)といった妊娠関連のホルモンを産生し、妊娠維 持の重要な役割を担っている(5) (6)。形成を終え成熟した絨毛は妊娠期間中にその構 造の変化はないが、多核細胞である STB は細胞分裂をする能力を有さない。そのため 細胞分裂により形態や機能を維持するわけではなく、CTB が隣接する STB へと融合 し STB へと取り込まれることで、新陳代謝を起こしているものと考えられている(2)。

レトロウイルスは RNA ウイルスであり、宿主に感染した後に自身の RNA 配列を宿

主のゲノム中に挿入し寄生を行う。この際に、偶然にも生殖細胞に感染したものは、次の世代へと受け継がれることがある。宿主 DNA 内に入り込んだレトロウイルスは時の経過とともに遺伝子内でその配列に変異を受け、感染力を失い、やがて宿主内のゲノムに取り込まれて内在化してしまう。内在化したこれらを LTR 型レトロトランスポゾンと呼ぶ。レトロウイルスのゲノムはその構成として、両端に LTR 配列を有し、その間に、gag 遺伝子、pro 遺伝子、pol 遺伝子、env 遺伝子など、ウイルス構成タンパク質をコードしている遺伝子を有している。内在化したレトロウイルスは、その構成遺伝子の多くが宿主により変異を受けた状態で存在しているが、現在も宿主ゲノム内でその配列を保存しているものが存在する。それを内在性レトロウイルス (endogenous retroviral gene: ERVs) と呼び、とりわけヒトの場合はヒト内在性レトロウイルス (human endogenous retrovirus: HERVs) と呼ぶ(7) (8) (9) (図 2)。

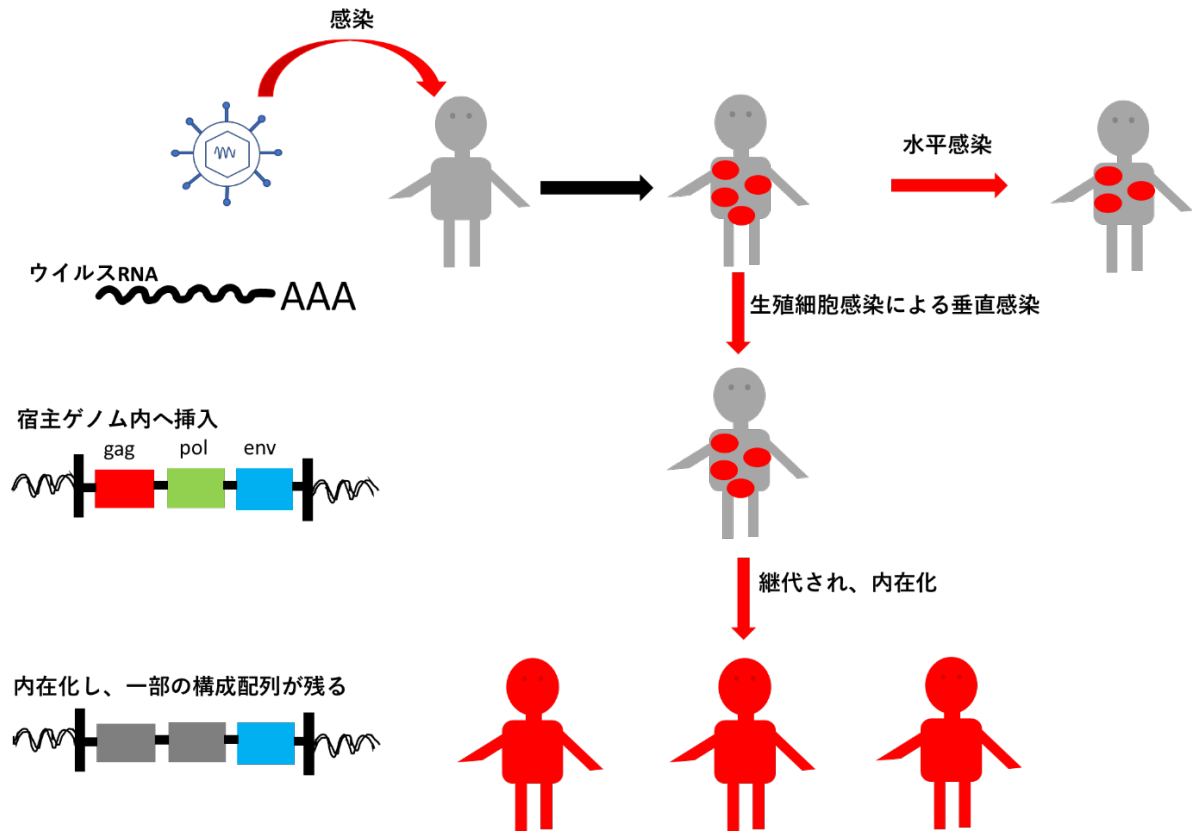


図2. 内在性レトロウイルス

ある生物にレトロウイルスが感染すると、宿主ゲノム内に自身のゲノム配列を挿入する。感染した細胞が生殖細胞の場合、次の世代へと継代されることがある。

継代されていく中で、ウイルスゲノムは宿主から変異を受け、ウイルスとしての感染力を失い、宿主のゲノム内に内在化してしまう。内在化した際に、ウイルスを構成していた遺伝子の配列の一部が保存されることがあり、これを内在性レトロウイルス(endogenous retroviral genes:ERVs)と呼ぶ。

ERVs は元のレトロウイルスが感染した時期、特に内在化した時期によっては種を超えて保存され、保存している種は進化系統樹に沿っている。そのため保存している種のゲノムを調べ、その共通性を調査することで内在化した時期を推定することもできる(7)(10)(図3)。



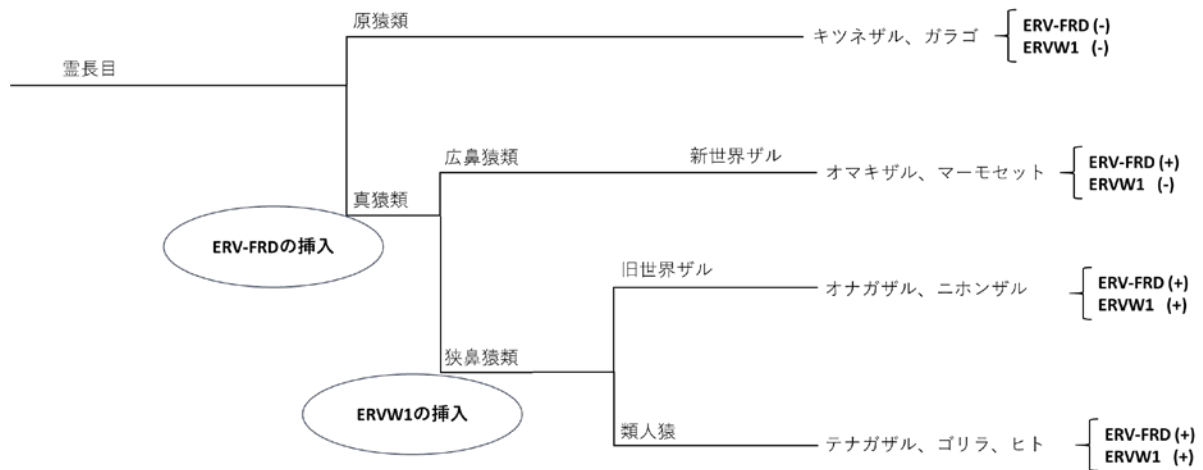


図3. 種を超えた ERV の保存

ERV は挿入された時期によって、その後の子孫に受け継がれていく。例えば、約 4000 万年以上前に挿入されたと考えられる ERV-FRD は真猿類に進化した以降の種には保存されるが、原猿類には存在しない。また同様に約 2500~4000 万年前、広鼻猿類と狭鼻猿類が分かれた後に挿入されたと考えられる ERVW1 は、広鼻猿類には存在しないが狭鼻猿類属する旧世界ザルや類人猿には種を超えて保存されている。

CTB の STB への融合のメカニズムの全容は解明されていないが、syncytin1 というタンパク質が関与していることが示されている(9)。syncytin1 は ERV 由来の機能性タンパク質である。syncytin1 は CTB や STB 上に発現しており、そのレセプターは ASCT2 とされ、同様に CTB や STB に発現している。それぞれの細胞の syncytin1 と ASCT2 が結合することで、細胞膜が融合するといわれており、CTB-CTB 融合による STB の形成や CTB-STB 融合に関与し、STB の新陳代謝に関与していることが示されている(11)(12)。同様に ERV 由来のタンパク質である syncytin2 が CTS-STB 融合に関与しているという報告(13)(14)(15)や ERV 由来の suppressyn というタンパク質が CTB-STB

融合を阻害し syncytin1 とレセプターを拮抗することで CTB-STB 融合を調整している  
ということを示唆する報告がある(16)。また PEG10 (17)や PEG11 (18)など胎盤の形成  
そのものに関与しているという報告や HERV-H7/F や HERV-HML6-c14 など機能はわ  
かっていないが遺伝子発現が胎盤で確認されている ERV の報告(2) (19)も存在し、ヒ  
ト胎盤では HERV が活発に発現していると考えられる。

LTR 型レトロトランスポゾン、ヒトゲノム全体の約 8%程度を占めているといわれ  
ている(20)。前述のように胎盤内では ERV が多く発現していることが知られてい  
るが、ヒトゲノム内の LTR レトロトランスポゾンの割合からもその他に HERV が多数  
発現している可能性が考えられる。ERV の一部が絨毛の形成に重要な役割を果たして  
いることが示唆されているが、未知の HERV がまだ存在していると考え、その同  
定および機能の解明を行うことで、絨毛形成の全容解明に新たな知見を加えること  
ができる。今回我々は、ヒト胎盤から CTB を単離し、培養し融合させる STB への分化  
モデルを作成し、その分化過程で RNA シークエンスを行い CTB の融合分化における  
経時的な網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果を最近発表された gEVE(Genome-  
based endogenous viral element database: <http://geve.med.u-tokai.ac.jp/>) (21) という理論的  
にゲノム配列上でウイルス由来のモチーフを有する部位を抽出できるデータベース  
使用し、CTB の融合に関与する未知の HERVs の発見を試みたので報告する。

目的：

CTB の STB への分化過程で発現する未知の HERVs を発見することを目的として、本研究を行った。そのために、以下の課題を設定した(図 4)。

課題 1. CTB 分化培養モデルの確立

課題 2. CTB の分化における mRNA 発現プロファイルの解析・HERVs の発現解析

課題 3. 各 HERVs の発現の確認および遺伝子の同定

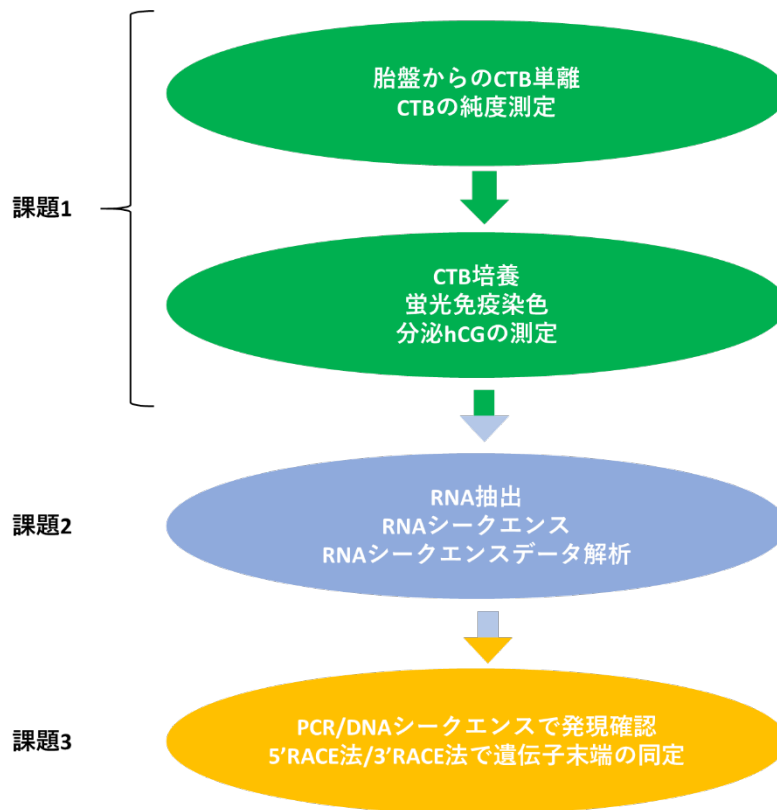


図 4.本研究の概要

課題 1(緑)では、胎盤より栄養膜細胞(cytotrophoblast:CTB)を採取し、純度測定を行い、高純度に採取できていることを確認。その後 CTB を培養し、蛍光免疫染色および培地中の hCG 濃度測定によって、合体栄養膜細胞(syncytiotrophoblast:STB)へと分化していることを確認し、CTB の分化融合モデルの確立を行った。

課題 2(青)では、課題 1 で作成した分化モデルを用いて培養後 24 時間、48 時間、96 時間の 3 点で RNA を採取し、RNA シーケンスを行った。3 つの別の胎盤から得られた CTB を使用し、それぞれ培養し得られた RNA を混合して 1 検体とし、合計 3 検体で RNA-seq を行った。National Center for Biotechnology information(NCBI)のデータベースを使用して mRNA 発現解析を行い、CTB が STB へと分化する際の遺伝子発現変化を過去の報告と比べ、報告と同様に発現変化をしていることを確認し、作成したモデルが CTB 分化モデルとして矛盾しないことを確認した後に、Genome- based endogenous viral element database(gEVE)という HERVs のデータベースを使用し、新規の HERVs を抽出した。

課題 3(黄)では、課題 2 によって抽出した新規 HERVs 候補に対して PCR を行い、発現を確認した。HERVs は多数のコピーをゲノム内に作成しており、プライマーが非特異的に反応を起し、必ずしもターゲットを増幅させているとは限らない。そのため、PCR 産物をクローニングし、PCR 産物が挿入された複数個の大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、DNA シーケンスを行い、ターゲットからの発現であることを確認した。発現が確認できた HERVs に対して、5'RACE 法および 3'RACE 法を行い遺伝子の 5'末端および 3'末端を同定し、新規の HERVs の同定を行った。

方法：

既往帝王切開後妊娠および骨盤位分娩の適応で妊娠 37 週 0 日から 38 週 6 日の間で選択的帝王切開となった方より、手術前日までに本研究内容を紙面で説明し、胎盤の提供を承諾してくださった方より胎盤を入手した。(東京大学研究倫理審査番号: 10580)

### 課題 1. CTB 分化モデルの確立

CTB 分化モデルの確立のために、CTB の単離および純化、CTB の純度測定、CTB 培養、蛍光免疫染色、hCG 測定を行った。

#### ・ CTB の単離および純化

既往帝王切開後妊娠および骨盤位妊娠の適応で、妊娠 37 週 0 日から 38 週 6 日の間で選択的帝王切開となった方から提供していただいた胎盤を使用した。1986年に Kliman らによって胎盤から CTB を採取する方法が発表されて以来、その変法が発表されている(22)(23)(24)。我々はその変法を参考に胎盤から CTB を単離した。帝王切開で胎盤娩出後 5 分以内に 50g-60g の胎盤組織を採取し、生理食塩水で洗浄後、剪刀を用いて細断した。カルシウムおよびマグネシウム不含のハンクス平衡塩溶液(Calcium and

Magnesium Free Hanks' Balanced Salt Solution: CMF-HBSS)(ThermoFisher SCIENTIFIC:14175079)に 0.15%のトリプシン(ThermoFisher SCIENTIFIC:15090046)、0.25%のディスパーゼ II (Roche:04942078001)、DNase1(Roche:11284032001)、0.1mM の塩化カルシウムおよび 0.8mM の硫酸マグネシウムを混合した溶液を作成。その溶液の中に細断した胎盤を入れ、浸透しながら 37 度の恒温槽の中で 30 分間反応させた。反応液を回収し、再度上記溶液を追加し、合計で 4 回反応を行った。反応後に全ての溶液を回収し、1000g で 15 分間遠心した。遠心後上清を捨て、沈殿している細胞を CMF-HBSS で再懸濁し、100  $\mu$ m の網でろ過し、再度 1000g、10 分間遠心。上清を捨て CMF-HBSS で再懸濁を行った。100%パーコール溶液と 10 $\times$ CMF-HBSS を用いて 90%濃度のパーコール溶液を作成し、その溶液と CMF-HBSS を用いて、50%、45%、25%および 20%のパーコール溶液を作成した。濃度の濃い順に遠心管に重層し、遠心分離用のパーコール濃度勾配液を作成した。パーコール濃度勾配液上層に、細胞懸濁液を静置し、アクセルやブレーキなしの設定で 1200g、20 分間遠心した。遠心後、45%と 25%のパーコール層の間に白い帯状の細胞層が確認でき、同部分を回収(図 5)。CMF-HBSS で希釈し、1000g、5 分間遠心した。この時点で沈殿しているものが、CTB である。

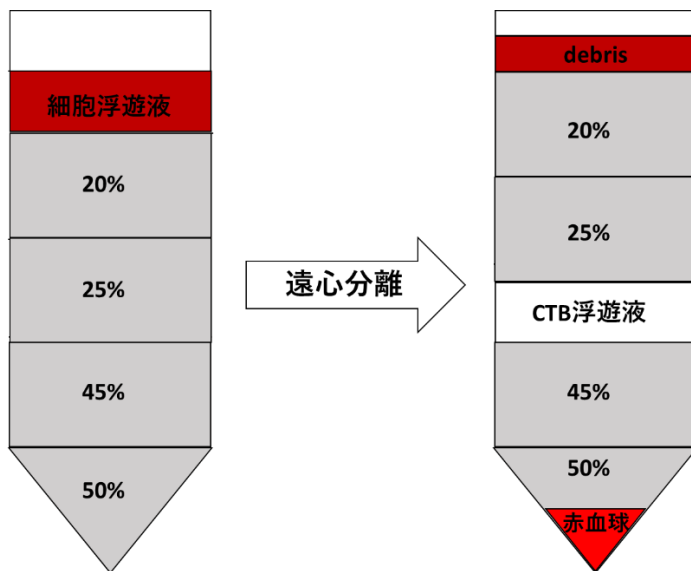


図 5. CTB 単離時の遠心分離  
胎盤組織を細断した後に、トリプシンおよびディスパーゼIIで酵素処理を行い、胎盤より細胞を回収。回収した細胞から細胞浮遊液を作成。パーコール濃度勾配を50%/45%/25%/20%の4層で作成し、その上層に細胞浮遊液を静置し、比重を用いた遠心分離を行った。45%/25%の間にCTB含有層が作成され、回収した。

CTB の特徴として、MHC class I タンパクを細胞表面に提示していないことが知られている(2)。そのため、さらに CTB の純度を上げるために HLA-ABC 抗原をターゲットとして磁気分離を行った(図 6)。上記で回収した細胞に抗 HLA-ABC 抗体 (BioLegend:311402)を添加し、ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum:FBS)を 10%加えたリン酸バッファー溶液(PBS)で懸濁を行い、4°Cで 30 分間反応させた。その後、上記 PBS/10%FBS で希釈し、1000g、2 分間遠心し、上清を捨てた。沈殿物に抗マウス IgG ヤギ抗体-マイクロビーズ(Miltenyi Biotec:130-048-401)を添加し、PBS/10%FBS を加え、4°Cで 30 分間反応させた。同様に希釈・遠心を行った。沈殿している細胞に、PBS/0.5% ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albin)を加え再懸濁し、磁気細胞分離装置 (MACS®)を使用し、磁気カラム(Miltenyi Biotec:130-042-201)に流した。CTB は前述のとおり HLA-ABC は発現していないことが知られており、カラムの流出液を回収した。回収した液を、PBS で希釈し、1000g、2 分間遠心し、沈殿している細胞を下記実験の

CTB として使用した。

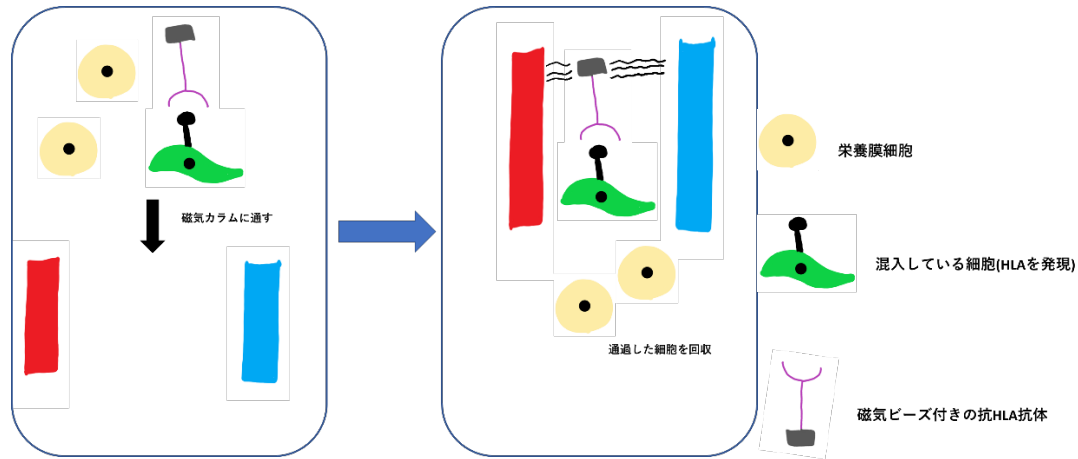


図 6. 磁気ビーズを用いた栄養膜細胞の純化

栄養膜細胞(cytotrophoblast:CTB)は、ヒトの細胞の中でも HLA を発現していないという特徴を有する。胎盤より回収した CTB 細胞の中に混入している他の細胞を取り除き、栄養膜細胞の純度を上げるために、磁気ビーズを用いたネガティブセレクションを行った。採取した細胞群に、磁気ビーズ付きの抗 HLA-ABC 抗体を反応させたのち、磁気を帯びたカラムに細胞群を通過させる(上左図)。すると、抗体が反応した HLA-ABC 陽性細胞はカラムにトラップされ、栄養膜細胞のみがカラムより流出してくる(上右図)。この流出液を回収することで、CTB の純化を行った。

#### ・ CTB 純度測定

採取した CTB の純度を測定する方法として、細胞表面抗原をターゲットとしたフローサイトメトリー法を使用した。CTB は EVT への分化の過程で細胞接着分子であるインテグリン分画に変化があることが知られており、その分化においてインテグリン



$\alpha 1$  が陽転化し、インテグリン  $\alpha 6$  が陰転化することが知られている(2)。また MHC class II に属する HLA-G が陽転化することも知られている(25)(図 7)。そのため、本研究では、純度測定のため、HLA-ABC 陰性、インテグリン  $\alpha 1$  が陰性、インテグリン  $\alpha 6$  が陽性、HLA-G が陰性であることを未分化な CTB のマーカーとして純度測定を行った。抗 HLA-ABC 抗体-FITC(ThermoFisher SCIENTIFIC: 11-9983-42)、抗インテグリン  $\alpha 1$  抗体-PE(BioLegend:405305)、抗インテグリン  $\alpha 6$  抗体-APC(Biolegend 313615)および HLA-G 抗体-PE(eBioscience:12995741)の色素付加された抗体をそれぞれ、回収した CTB  $1 \times 10^6$  個に添加し PBS/3%BSA を加え、4°C で 30 分間反応させた。ネガティブコントロールは、抗体を加えずに同量の PBS/3%BSA を添加し、同様に 4°C で 30 分間反応させた。反応後、PBS で希釈し、1000g で 2 分間遠心し、上清を捨て、再度 PBS で希釈し同様に遠心し、上清を捨てた。その後、PBS/10%FBS で細胞を懸濁し、フローサイトメトリーで解析を行った。

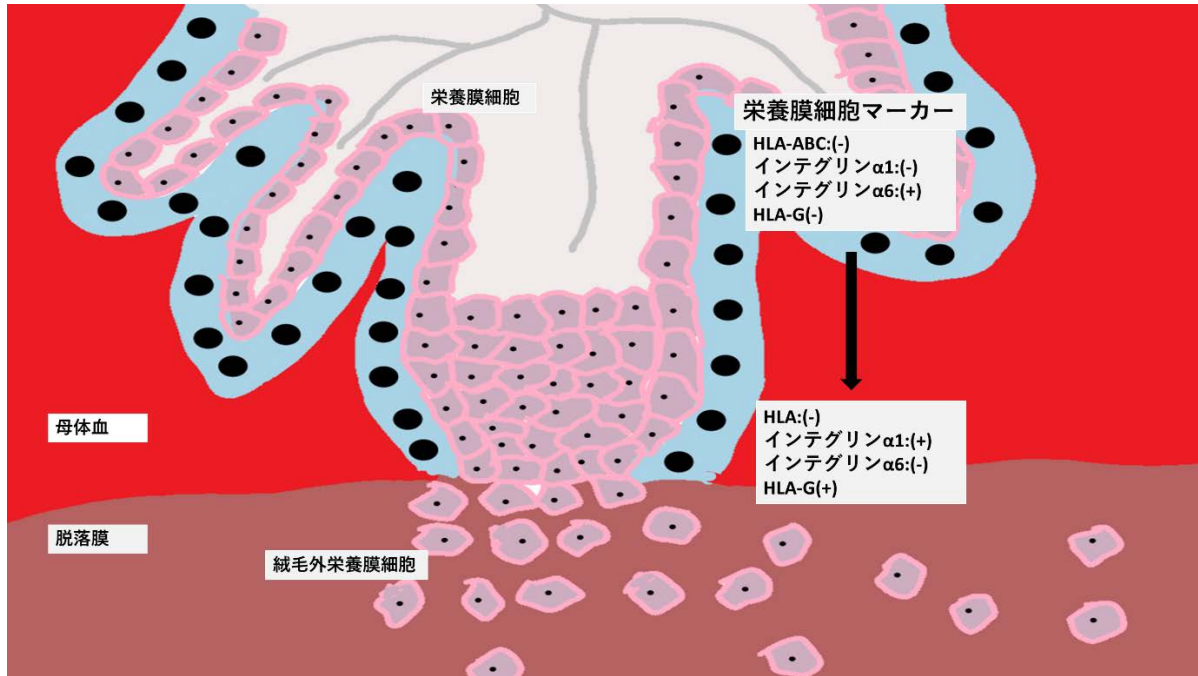


図 7. 栄養膜細胞のマーカー

栄養膜細胞(cytotrophoblast:CTB)は、図のようにその分化とともに発現マーカーが変化する。特に CTB から絨毛外栄養膜細胞(extra-villous trophoblast:EVT)へと分化する際に起こるインテグリンの変化や HLA-G の発現がよく知られている。本研究では、CTB は HLA-ABC が陰性であること、インテグリン  $\alpha 1$  が陰性であること、インテグリン  $\alpha 6$  が陽性であること、HLA-G が陰性であることを栄養膜細胞のマーカーとして使用した。

#### ・ CTB 培養

回収した CTB は、I 型コラーゲンで表面をコーティングした 24 ウェルプレート、または同様にコーティングをしたスライドガラスで培養を行った。IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(ThermoFisher SCIENCE:31980030)に FBS を 10% 添加した培地を使用し、 $2 \times 10^6$  個/ml となるように希釈し、各ウェルに 1ml ずつ細胞を播種し、

37 度で CO<sub>2</sub> が 5% の条件で培養を行った。連日、培地は交換した。

・ 蛍光免疫染色

前述の条件で培養を行った CTB で、培養開始後 24 時間、48 時間、96 時間のものを使用した。培地を除去した後に、PBS で 3 回洗浄した。細胞を -20°C に冷却したメタノールを 1ml 入れ、-20°C で 20 分間固定をした。メタノールを除去した後、PBS で 3 回洗浄を行った。非特異的反応を避けるために、PBS/10%FBS を 1ml 入れ、室温で 60 分間反応させた。反応液を除去した後、抗デスマプラキン I + II 抗体(Abcam:ab16434)を PBS/1%BSA で 1:200 に希釈した抗体反応液を 1ml 入れ、室温で 1 時間反応させた。ネガティブコントロールには PBS/1%BSA のみを入れ、同様に反応させた。反応液を除去した後、PBS で 5 分間浸漬させ、除去するという洗浄を 3 回行った。Alexa Fluor 488 付加ヤギ抗マウス IgG 抗体(Abcam:ab150113)を PBS/1%BSA で 1:200 に希釈させた抗体反応液をそれぞれに 1ml 入れ、室温暗所で 2 時間反応をさせた。反応液を除去した後、PBS で 5 分間浸漬させ除去する洗浄を 3 回行った。核染色のため 1 μg/ml の Hoechst33342 溶液(同仁化学研究社:23491-52-3)を各検体に入れ、室温暗所で 5 分間反応させた。反応液を除去した後、PBS で 3 回洗浄を行った。免疫染色用のマウンティング溶液(DAKO:S3023)を乗せ、カバーガラスをかけて検体を封入し、共焦点顕微鏡(Zeiss:LSM700)を使用して観察した。

- ・ hCG 測定

培養ディッシュから連日回収した培地を遠心管に入れ、12000g で 10 分間遠心を行った。その上清を回収し、ELISA 法で hCG の濃度を測定した。

## 課題 2. CTB の分化における mRNA 発現プロファイルの解析・HERVs の発現解析

CTB 分化における mRNA 発現プロファイルの解析および HERVs の発現解析のために、課題 1 で確立した分化培養モデルから RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った後にデータを解析した。

- ・ RNA 抽出

前述培養条件で培養を行った CTB で、培養開始後 24 時間、48 時間、96 時間経過した検体を使用した。RNA 抽出に際し、Favorgen 社の RNA 抽出キット (FAVRGEN: FABRK001-2) を使用し、メーカーの説明書に従って RNA を抽出した。なお説明書にはオプションとなっている RNA 吸着カラムに DNase1 を加え反応させることで、RNA

抽出時に DNA を除去するステップを追加した。

- ・ RNA シークエンス

24 時間後、48 時間後、96 時間後の 3 検体をそれぞれ 3 つの別の胎盤より採取した CTB から前述の方法で total RNA を抽出した。それぞれ、total RNA の RNA integrity number(RIN 値: RNA の品質の指標。RNA の分解の度合いにより 1~10 で評価され、全く分解されていない状態を 10 とし、分解に従って数値が下がっていく。) を 2100 バイオアナライザー(Agilent 社) で測定し、RIN 値が 8 以上のものを使用した。3 つの胎盤から得られた RNA で RIN 値が 8 以上のものを混和し、1 検体とし、24 時間、48 時間、96 時間の合計 3 検体を TruSeq RNA samples preparation kit v2(illumina 社) を使用し、メーカーの説明書に従ってシークエンスライブラリーを作成した。作成したライブラリーは Hiseq 2500(illumina 社) を使用し、ペアエンドシークエンスを行った。RIN 値の測定、ライブラリーの作成、シークエンスは北海道システムサイエンス株式会社に依頼した。

- ・ RNA シークエンスデータ解析(図 8)

FastQC というソフトウェアを用いて、シークエンスデータが高品質で安定している

ことを確認した後に解析を行った。まず、シーケンスデータを TopHat2(v2.1.0) (26)というソフトウェアを使用し、ヒトゲノム(GRCh38)にマッピングを行った。その結果を Cufflinks(v2.2.1)というソフトウェアを使用し、ヒト遺伝子データベース (illumina 社:[ftp://igenome:G3nom3s4u@ussdftp.illumina.com/Homo\\_sapiens\\_NCBI\\_GRCh38.tar.gz](ftp://igenome:G3nom3s4u@ussdftp.illumina.com/Homo_sapiens/NCBI/GRCh38/Homo_sapiens_NCBI_GRCh38.tar.gz))およびヒト gEVE のデータベースに照合した。

Cufflinks(26)の中の Cuffdiff というコマンドを使用し、各検体間における発現量を比較した。発現量の解析には、24 時間、48 時間、96 時間の全てのデータで、発現量の指標となる Fragments per kilobase of exon per million mapped fragments(FPKM)が 1 未満で、発現量が低いと考えられるデータを切り捨てて抽出したデータを使用した。その後、過去に CTB が分化する際に発現が変化すると報告されている遺伝子についてヒト遺伝子データベースを使用した解析結果と過去の報告を比較した。gEVE を用いた結果の中で、University of California SANTA CRUZ (UCSC: <https://genome.ucsc.edu/index.html>)のデータベース(genomebrowser)と照合し、既知の遺伝子と重なるものを除外した。除外できなかったもの新規の HERV 候補とし抽出した。

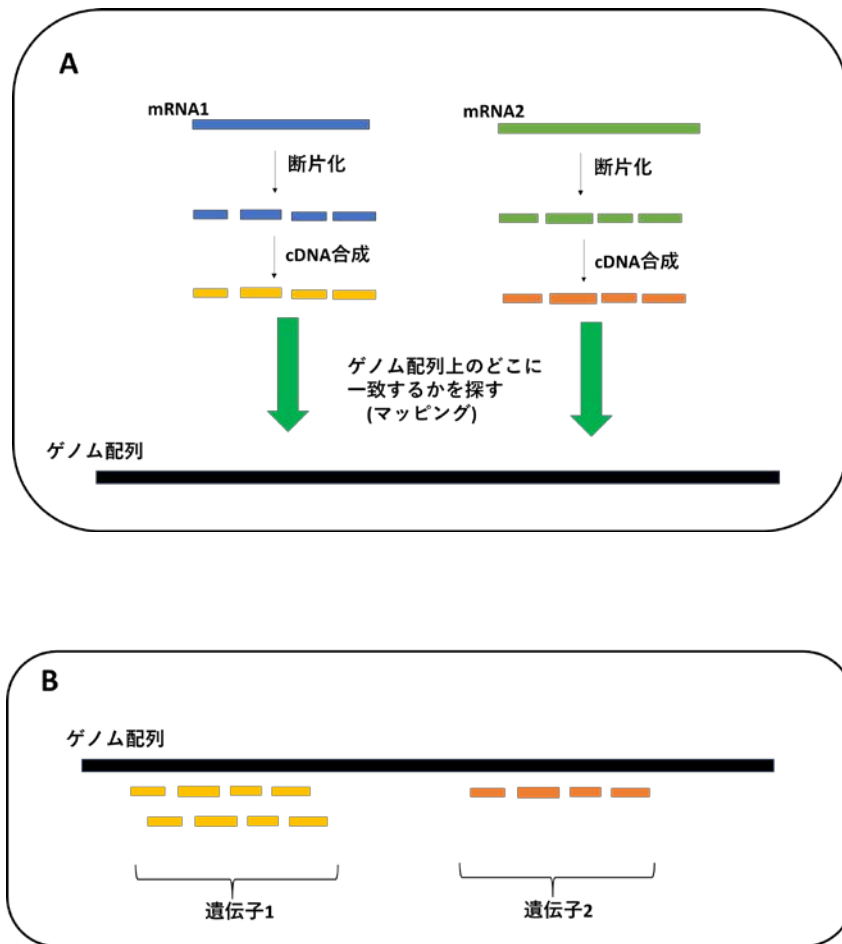


図 8. RNA シークエンス解析模式図

発現しているメッセンジャーRNA(mRNA)の全てをシーケンサーが読める範囲に断片化し、その配列を全て読むことを RNA シークエンスといい、網羅的な遺伝子発現の解析を可能とする(A 上部)。読んだ配列が、ゲノムの配列のどこに一致するのか、その位置のみをまず確認を行う。これをマッピングと言う(A 下部)。その後マッピングしたデータにゲノム配列上の遺伝子のデータ(名前や位置など)を照合することにより、ある遺伝子の発現があるのか、発現量はどれくらいなのかを見る(B)。例えばこの場合には、mRNA1 と mRNA2 というものがあり、その断片化された配列を読み、ゲノム配列上の一致する部位を確認する(A)。その後、ゲノム配列にマッピングされた同じ部位に遺伝子1 と遺伝子2 という遺伝子が存在することがデータベースと照合することで判明した。そのことから、遺伝子1 と遺伝子2 より発現があった、ということがわかる。

ヒトゲノムは2本鎖のDNAからなっており、マッピングや照合の際にどちらの鎖からの発現かを見ることも可能である。本研究では、順鎖からの発現をストランド(+ )もしくは left、とし、逆さからの発現をストランド(-)もしくは right、と表現している。

### 課題 3;各 HERVs の発現の確認および遺伝子の同定

課題 2 で抽出した新規 HERV 候補の発現確認および遺伝子の同定のために PCR および DNA シークエンスによる発現の確認、遺伝子末端を同定するために 5'RACE 法と 3'RACE 法を行った。

- ・ PCR による発現確認と DNA シークエンスによる PCR 産物の塩基配列の決定

上記方法で新規遺伝子と考えられる部分の塩基配列より、Primer3 Plus(<http://www.primer3plus.com/>)というオンラインソフトウェアを使用し、特異性の高いプライマーを作成した。PCR で使用した試薬は Prime STAR HS DNA polymerase(タカラバイオ:R010A)または TAKARA ExTaq Hot Start version(タカラバイオ:RR006A)であり、各 RNA 検体から cDNA を作成し、メーカーの説明書に従って、PCR 反応液を作成した。サーマルサイクラーを使用し、98°Cで 10 秒、55°C~60°C(プライマーによって温度は変動)で 5 秒、72°Cで 40 秒を 30 サイクルの設定で PCR を施行した。アガロース S を使用し、TBE バッファーと加温・混和し、2%アガロースゲルを作成し、PCR 産物を 100V で 30 分間電気泳動した。電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液に 5 分間ゲルを浸し、紫外線を照射して PCR 産物を確認した。

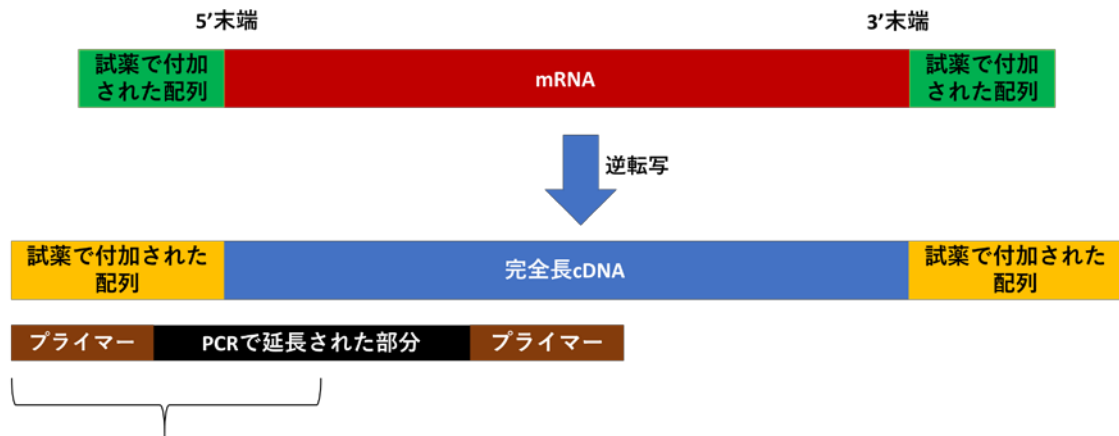


電気泳動後のゲルから PCR 産物を切り出して、Nucleospin gel and PCR clean kit(MACHERY-NAGEL:740609)を使用し、メーカーの説明書に従って、PCR 産物のみを回収した。クローニングを行うために、Mighty TA cloning kit(タカラバイオ:6028)を使用した。説明書に従い、キットに付属している試薬を使用し PCR 産物の両端にアデニン(A)を付加し、pMD20-T vector と混和し 16°Cで 30 分間反応をさせた。HST08 コンピテントセルと反応液を混和し、氷中で 30 分間冷却させ、42°Cの恒温槽に入れ、45 秒間反応させた。その後すぐに氷中で 2 分間冷却し、37°Cの SOC 培地に入れ、浸透しながら 37°Cで 1 時間培養した。培地を Fast-Media(invivogen:fas-am-x)で作成した寒天培地に播種し、37°Cで 12 時間培養した。培養後、カラーセレクションにより白色コロニーを選択し、EmeraldAmp MAX PCR Master Mix(RR320A)および M13\_M4 プライマーおよび M13\_RV プライマーをメーカーの説明書に従って作成し、コロニーの一部を試薬に入れ、コロニーPCR を施行した。その後、前出のように PCR 産物を確認し、ターゲットとなる PCR 産物が得られているかを確認した。確認できたコロニーはターゲットとなるインサートが入っている可能性があるかと判断し、TB 液体培地(invivogen 社: fas-am-b)にコロニーの一部を入れ、浸透しながら 37°Cで 12 時間培養した。培養液を回収し、Nucleo spin Plasmid Easy Pure(MACHENARY-NAGEL:740727)を使用して、メーカーの説明書に従って、プラスミドを抽出した。BigDye TerminatorV3.1 cycle sequencing kit(アプライドバイオシステムズジャパン: 433745)を使用し、メーカーの説明書に従って、プラスミド、M13 プライマー M4 または M13 プライマー RV

およびキット付属の試薬を混和し、3730xl DNA analyzer(アップライドバイオシステムズジャパン)を使用し、インサートの DNA 配列を決定した。DNA シークエンスは株式会社ファスマックに委託した。

- ・ 予測遺伝子の両末端の決定のための 5'RACE 法および 3'RACE 法(図 9)

遺伝子の末端を調べるために、5'RACE 法および 3'RACE 法を行った。実験には SMARTer RACE 5'/3' kit(clonetech:634858)を使用し、メーカーの説明書に従って実験を行った。詳細は説明書に譲り、簡潔に方法を記述する。キットの試薬を使用し、培養後 48 時間の CTB 検体より抽出した total RNA を用いて 5'RACE 用の完全長 cDNA および 3'RACE 用の cDNA をそれぞれ作成した。キット付属のプライマーと特異的なプライマーを使用し、前述の方法に従って PCR を行い、PCR 産物を上述の方法と同様にクローニングを行った。得られたプラスミド検体に関しても、上述同様に DNA シークエンシングを行い、配列をヒトゲノム配列で参照し、遺伝子の 5'末端および 3'末端の同定を行った。



この部分の配列を読むことで5'末端(または3'末端)を同定する。  
 (黄色の配列は、ヒトゲノム配列には一致しないように設計されている。)

### 図9. 本研究での RACE 法の概要

通常の逆転写反応を行うと mRNA が cDNA へと変換される際に、両末端の配列が保存されずに、遺伝子の末端を同定することは難しい。そこで、今回は市販のキットを用いて、完全長 cDNA を作成することとした。mRNA 末端に付加配列を付けることで末端の配列を保護し、それを cDNA へと逆転写する際にさらに伸長反応を起こすことで、末端の配列が保存された cDNA が作成される。その完全長 cDNA を用いて、伸長された配列に対するプライマー(キットに付属)および作成したプライマーを使用し、PCR を行い、DNA シークエンスで塩基配列を読むことで、遺伝子の 5'末端または 3'末端を同定することができる。図9は5'末端同定時の様子を表している。

結果：

## 課題 1. CTB 分化培養モデルの確立

### ・ CTB の単離および純度測定

既往帝王切開後妊娠または骨盤位妊娠のため、妊娠 37 週 0 日～38 週 6 日までに選択的帝王切開で分娩した方より胎盤を提供していただいた。胎盤 50～60 g を使用し前述の方法で、 $6.0 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^8$  個の CTB を単離した。

単離した CTB の純度測定にはフローサイトメトリーを使用した。方法でも記載したが、分化前の CTB は細胞表面に HLA-ABC を発現せず、またインテグリン  $\alpha 1$  は発現しておらず、インテグリン  $\alpha 6$  は発現している。また分化した後の EVT に特徴的な HLA-G は発現していない。それらをマーカーとして純度測定を行った。その結果を図 10 に示す。いずれのマーカーを使用しても、純度は 98% 以上を示しており、我々の方法で、胎盤から高純度に CTB が採取できたことを示した。

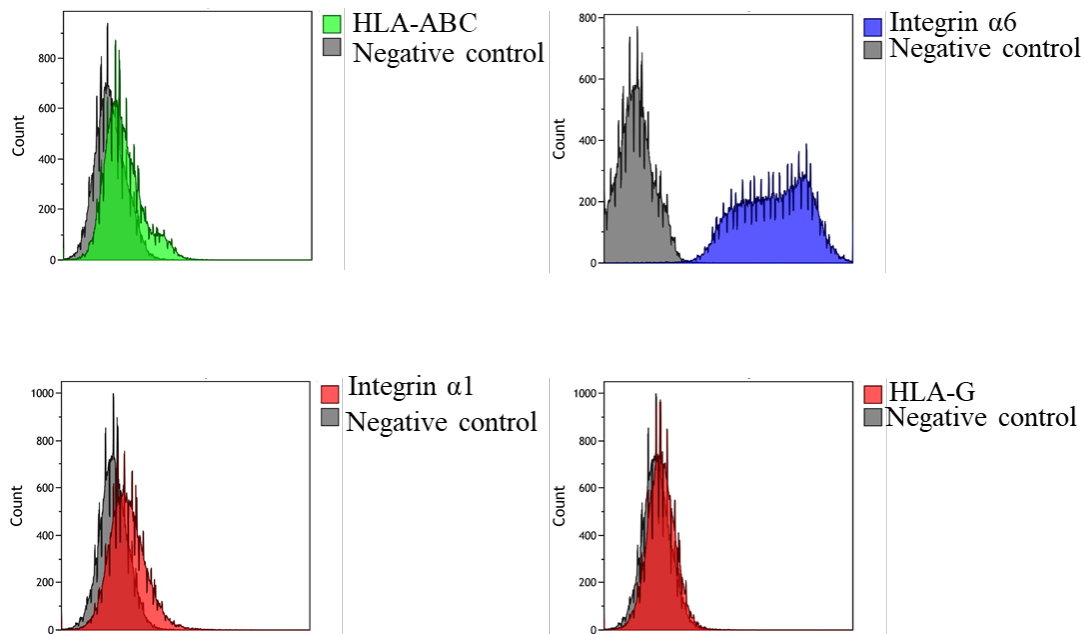


図 10.単離した cytotrophoblast(CTB)の純度測定

フローサイトメトリーを用いて測定した。CTB は HLA-ABC が陰性、インテグリン α1 や HLA-G は陰性であり、インテグリン α6 は陽性となる特徴を有する。それらをマーカーとし、フローサイトメトリーを行ったところ、いずれのマーカーを使用しても、純度は98%以上を示している。

・ CTB 分化融合モデルの作成

前述で得られた CTB を IMDM/10%FBS/2M L-グルタミンの血清培地で培養を行った。

方法で記載した通り、連日培地を交換した。血清培地で CTB を培養すると CTB が培養経過とともに自然に融合し STB に分化することが知られている。そこで単離した

CTB を使用し、融合し STB への分化モデルを作成した。

CTB の融合を直接視覚的に確認するために蛍光免疫染色を行った。細胞膜に存在するデスモプラキンを染色した図を下記(図 11)に示す。培養後 24 時間後には単核であった CTB が、48 時間後には細胞質が大きくなり一部に多核細胞が確認され、96 時間後には細胞質がさらに大きくなり、そのほとんどが多核細胞となっている様子がわかる。分化効率は培養 96 時間後には CTB は 1 枚の膜状に変化しており、その形態から 96 時間後には 100% の分化効率であると考えられる。

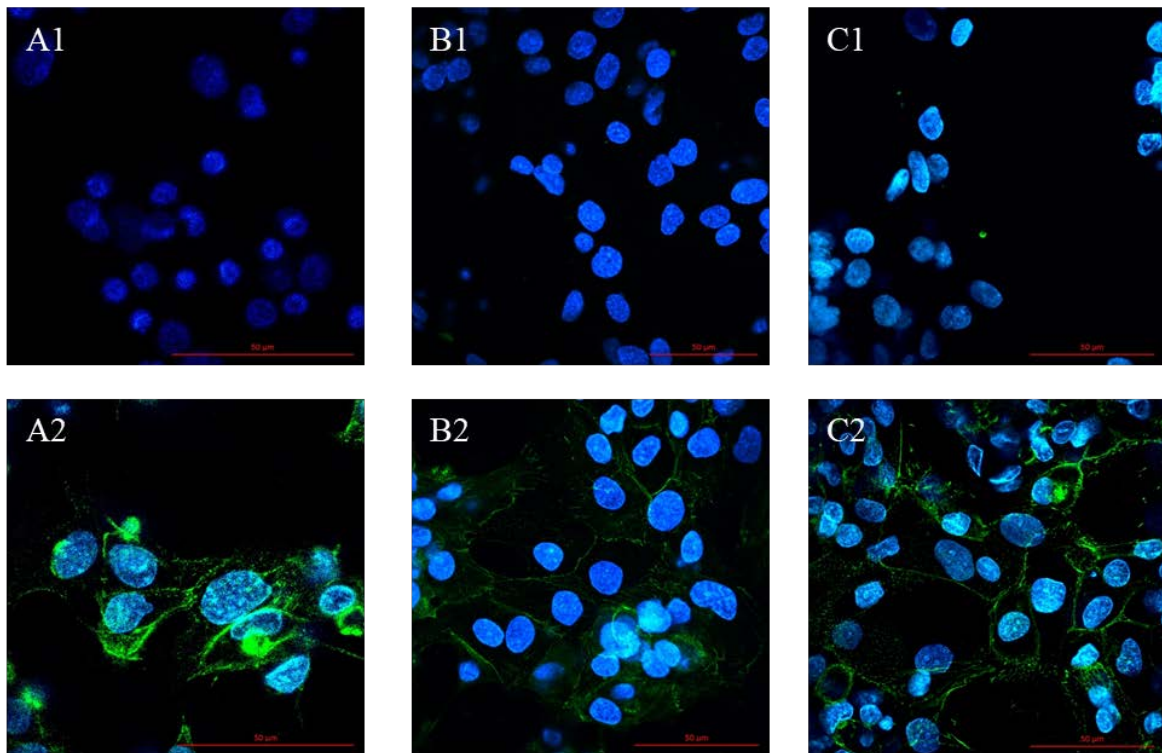


図 11. 蛍光免疫染色を用いた CTB の合胞体化の視覚化

培養後、CTB をメタノールで固定し抗デスモプラキン抗体で染色した(緑色)。核の対比染色は Hoechst で行った(青)。A1 と A2 は 24 時間培養後であり、B1 と B2 は 48 時間培養後、C1 と C2 は 96 時間培養したものである。上段(A1/B1/C1) はそれぞれ A2/B2/C2 のネガティブコントロールである。培養後 24 時間ではほとんどが単核であるのに対し(A2)、培養後 48 時間のものでは部分的に多核細胞が確認され (B2)、培養後 96 時間のものはそのほとんどが多核の細胞であることがわかる(C2)。

また STB は前述のように hCG を分泌することで妊娠を維持すると考えられており、CTB が STB へと分化するモデルであれば、培地中の hCG 濃度は上昇するものと考えられる。連日交換した培地を回収し、ELISA 法で培地中の hCG を測定した。結果を図 12 に示す。培養後 24 時間の培地と比較し、時間を追うごとに培地中の hCG 濃度は上昇していき、培養 96 時間後には平均で約 1000 倍まで上昇した。

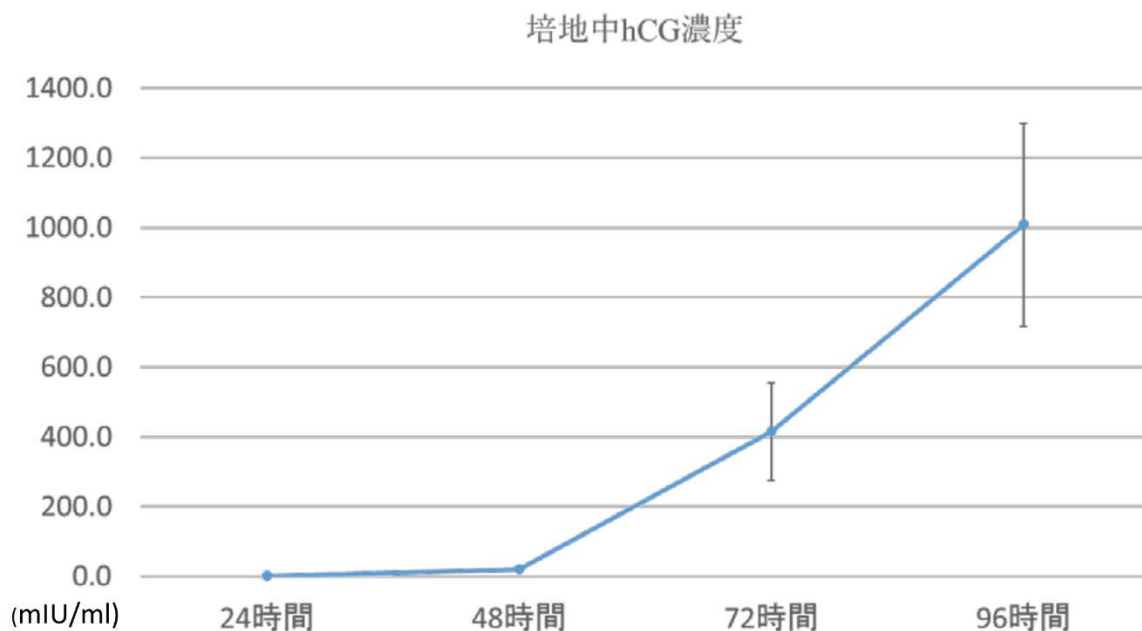


図 12.培地中の Human chorionic gonadotropin(hCG)濃度の比較

培地は連日交換を行い、その培地中の hCG 濃度を ELISA 法で測定し比較した。CTB の培養時間を追うごとに hCG 濃度は著しく増加し、96 時間後にはおよそ 1000 倍の濃度にまで達していた。

この結果より、培養の経過とともに形態的および生化学的に CTB が融合し STB へと分化する様子が再現されたと考えられた。

## 課題 2. CTB の分化における mRNA 発現プロファイルの解析・HERVs の発現解析

### ・ RNA シークエンス解析

融合する過程における遺伝子発現変化を確認するために、3 人の別の胎盤から得た CTB をそれぞれ培養させ、培養後 24 時間、48 時間、96 時間で totalRNA を採取した。

3 人の別の胎盤から得た CTB から抽出した各 RNA を混合し、混合した 24 時間、混合した 48 時間、混合した 96 時間の各 RNA 検体を使用し、前述したように RNA シークエンスを行い、解析を行った。ヒトゲノム配列(GRCh38)に TopHat2 を使用し、マッピングした結果を表 1 に示す。



サンプル	リードの方向性	シーケンサーで読み込まれたリード数	マッピングされた数	複数か所マッピングされた遺伝子(20回以内、データとして使用)	20か所以上マッピングされたリード数(除外)
24時間	Left	22103577	20677156 (93.5%)	410811 (2.0%)	3172
	Right	22103577	20598572 (93.2%)	407600 (2.0%)	3174
48時間	Left	23836982	22277513 (93.5%)	398633 (1.8%)	4300
	Right	23836982	22147639 (92.9%)	394674 (1.8%)	4301
96時間	Left	23568092	21902106 (92.9%)	410157 (1.9%)	4782
	Right	23568092	21757202 (92.3%)	404721 (1.9%)	4787

表 1.RNA シークエンスの結果を TopHat2 でヒトゲノム(GRCh38)にマッピングした結果どの検体も 92%以上のリードがマッピングされており、高率にマッピングされていることがわかる。また重複カウントされているリード数も 2%以下であることがわかる。

全ての検体において、全リード数の 92%以上と高確率でヒトゲノムへとマッピングでき、またデータ内に残った重複してマッピングされているものは約 2%と低値であった。RNA シークエンスは問題なく施行できたものと示唆される結果であった。

また、この結果が CTB の STB への分化を反映しているかどうかを確認するため、過去の文献で、STB への分化過程で発現変化が知られている遺伝子について、既報との比較を行った。主なものとして、PSG1(27)、ERVW-1(28)、LGALS13 や CGB(5)といった CTB の融合によって遺伝子発現が上昇するもの、ETS1(29)や CDH1(30)といった融合によって遺伝子発現が低下するものについて、本データと比較したものを表 2 に示す。

遺伝子	既報での 変動	FPKM		
		24時間後	48時間後	96時間後
PSG1	↑	18.116	37.0239	168.993
ETS1	↓	9.20751	3.01618	1.12159
ERVW-1	↑	233.67	528.3	692.177
LGALS13	↑	13.4151	86.5946	367.899
CDH1	↓	170.892	105.731	60.7402
CGB	↑	1.07763	15.4949	395.301

↑:合胞体化とともに発現上昇  
↓:合胞体化とともに発現低下

表 2.RNA シークエンスデータと STB 分化時の遺伝子変動についての既報との比較  
融合分化する際に、PSG1 や ERVW-1、LGALS13、CGB は上昇すると既報があるが、RNA シークエンスの結果でも同様の結果であった。ETS1 や CDH1 の発現は減少すると既報があるが、RNA シークエンスの結果でも同様に減少していた。

表 2 にあるように上記遺伝子は、本データと合胞体化に関する既報との間で一致した発現動態をしており、本培養分化モデルは CTB が STB へと融合分化する過程を in-vitro で再現したモデルと示唆する結果である。

gEVE データベースは既知の HERVs のほかに、理論的に 80 アミノ酸以上をコードしている塩基配列で、かつウイルスの構造タンパク質の配列を有しているものをゲノム上に集積しているデータベースである。それ故、タンパク質をコードしている HERVs を網羅的に調べるのに最適なデータベースと考えられる。前述の方法に従って gEVE データベースに照合をしたところ、166 個の遺伝子候補が抽出された。UCSC のデータベースの Genomebrowser を用いて前出の 166 個の候補を照合し、既知の遺伝子と重複するものを除いたところ、132 個の遺伝子候補が同定された。132 個の遺伝子候補のうち、FPKM 値が各検体で上位 40 位と既知の HERVs と同等の発現を示しているもの、または UCSC データベースでアミノ酸をコードしていると予測されているものを抽出した。TopHat2 によるマッピングの結果を可視化し、抽出した候補の中で gEVE データベースでは複数個となっているものであっても、遺伝子座が近く視覚的に 1 つの遺伝子と予測されるものをまとめたところ、新規の遺伝子候補は 10 個となった(図 13)。

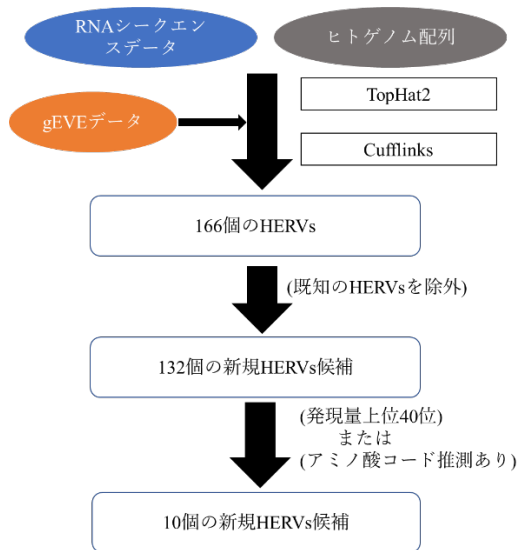


図 13.RNA シークエンス解析の模式図

TopHat2 というソフトウェアを使用し RNA シークエンスの結果をヒトゲノム(GRCh38)配列へとマッピングを行い、その結果を gEVE データベースのヒトデータに照合した。すると 166 個の HERVs の情報を得た。その中から既知の HERVs を除外すると 132 個の新規 HERVs 候補を得た。その中から発現量の上位 40 位のもの、または UCSC データベースでアミノ酸コードをしているとの推測のあるものを抽出した。そのなかで、視覚的に一つの遺伝子と予測される近位のを 1 つの新規遺伝子候補と推測し、10 個の新規 HERVs 候補とし、抽出した。

### 課題 3. 各 HERVs の発現の確認および遺伝子の同定

- ・ 予測遺伝子の発現確認

候補として抽出した 10 個の遺伝子候補について、それぞれ特異的なプライマーを作成し、PCR を行った(図 14)。便宜上、各候補 HERVs に表 3 にあるように番号を振った。

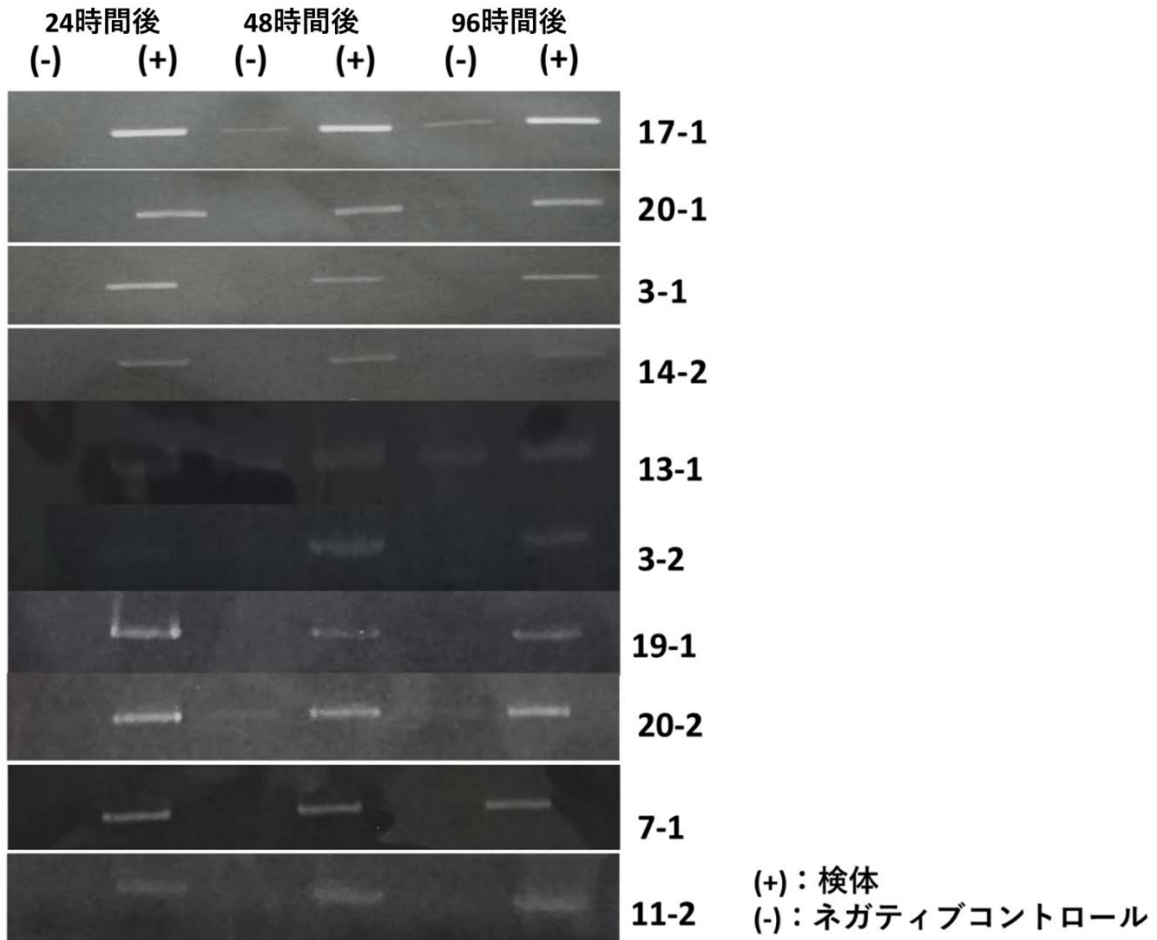


図 14. 新規 HERVs 候補の発現確認

新規候補 10 個に対してそれぞれプライマーを作成した後、PCR を施行し、2%アガロースゲルを用いて 100V で 30 分間電気泳動した結果を示した。全て、培養 24 時間後、48 時間後および 96 時間後の検体で発現を認めていた。また、それぞれの検体でゲノム DNA の混入があることで発現が認められていることを除外するために、逆転写反応を行わなかった検体を使用し、ネガティブコントロール検体として使用した。全て、ネガティブコントロールと検体とは明らかな増幅差を認めており、ゲノム DNA の混入は否定的であった。

電気泳動後、バンドは全て 1 本であったが、プライマーの特異性が高くても、LTR 型トランスポゾンヒトゲノム上のいたるところにコピーを作るため、PCR では類似する配列も増幅される可能性がある。そのため、クローニングを行い、複数のコロニー

から抽出したプラスミドに目的の PCR 産物の配列が挿入されているか確認することで、間違いなくターゲットから増幅されていることを確認することとした。得られた PCR 産物を前述の方法でクローニングを行い、DNA シークエンスで配列を確認し、目的産物が増幅されていることを確認した。その結果を表3に示す。

染色体番号 (番号)	新規HERV候補		プライマー (Forward) (Reverse)	DNAシークエンスの結果と ターゲット配列一致割合 (一致した数/調査した数)
	遺伝子座	ストランド		
17 (17-1)	28230623- 28234025	(-)	TAGGCTGGCCTTGGACTACT GAGGTTGGGGAGAACTGGG	20/20(100%)
20 (20-1)	24930682- 24932952	(+)	TAGCCTCTTTGTGCCCATGG AGGGGGCTCAGATGGGTAT	16/16(100%)
3 (3-1)	42887740- 42900191	(+)	CTCCTCCCCACAAGACAAC TTGGGTGGCTGGGATAGGTA	16/16(100%)
14 (14-1)	23696874- 23698875	(+)	CTCCACATTGTTCCCTGGG AGGAGAGGTAAGAGACAAGGGA	16/16(100%)
13 (13-1)	109265443- 109271036	(+)	CTACTCCTCAAGGATCATTGAGCCCT AAGTTGGTCTGGTGTCTGGGATGAGACT	10/16(62.5%)
3 (3-2)	46426830- 46433734	(+)	TTGGGAAATGAGATGGGGGC TTGAGCCTAAACGCCAGAGG	14/14(100%)
19 (19-1)	53007512- 53013171	(+)	GTACCCCAAGGATTCCTCT TCCTGCATGGAAAAGGGGAC	16/16(100%)
20 (20-2)	24931227- 24932958	(+)	TAGCCTCTTTGTGCCCATGG AGGGGGCTCAGATGGGTAT	13/15(87%)
7 (7-1)	135177670- 135181959	(+)	CCAGACAAGGTGGCCGTAT GGGCAGTTCGGTAAAGTCCA	15/16(94%)
11 (11-1)	129234384- 129237136	(-)	TTTCAGGACTCGGGGAGTAGTGGG GAGAAGGCCACGTGAAGGGAGTGTG	6/7(85.7%)

表3.新規 HERV 候補をターゲットとした PCR 産物の配列とターゲットの一致率  
設計した PCR 用プライマーで目的の産物が増幅されていたかをクローニングおよび DNA-seq を行うことで確認した。13 番染色体の候補は、一致した確率が 62.5%であり、発現していることは確認できるものの、類似する配列からの発現も同様にあることが推測され、この後の研究の候補からは除外した。それ以外の候補は高確率に目的配列と一致している。

10 個の遺伝子候補についてその配列も確認したところ、80%以上が目的配列であったものは 9 個であった。1 個(13-1)は調べたコロニー数の中で目的産物と考えられるものは 62.5%であり、発現していることは確認できるが、効率的に調査できないと考えられ、候補より除外した。

- ・ 候補遺伝子の 5'末端および 3'末端の同定

抽出した 9 つの新規 HERVs 候補について、前述の方法で 5'RACE 法および 3'RACE 法を行った。検体は培養後 48 時間(Day2)の CTB より得られた RNA を使用し、それを用いて前述の方法で完全長 cDNA を作成した。完全長 cDNA を使用して 5'RACE 法および 3'RACE 法を施行し、その産物をクローニングし、DNA シークエンスを行った。その結果を下記に示す(表 5)。使用したキットでは 5'末端および 3'末端にある決まった配列を付加することで mRNA の 5'末端および 3'末端を保護するのだが(図 9)、その際に遺伝子の塩基配列特異的に使用できるプライマーは 1 つであり特異性が下がることがある。そのため、nested PCR を行うことで特異性を上げた(表 4)。今回の RACE 法で遺伝子末端を同定できたものは 4 つ、PCR 増幅がうまくいかずに同定できなかった候補が 4 つ、5'末端が同定できなかったものが 1 つであった(表 5)。

候補番号	プライマー	nestedPCR用プライマー
	5'RACE用 3'RACE用	5'RACE用 3'RACE用
(17-1)	TGGCTGGGAGAGCGCTTGTGGACC TCGTCTGACCACTCCACCGCTGT	ACAGCGGTGGGAGTGGTCAGGACGA GGTCCACAAGCGCTCTCCAAGCCA
(20-1)	CTGGCAGCACAGGAGGGTTGGCTT CCTGCAGCGCCTGAATCTGGGAGG	CCTCCCAGGATTCAGGCGCTGCAGG ACTGGTCCACGCACAGCCGAAGCAT
(19-1)	CCGCATTGACGTGCTGCCTCCAGA CTGTCCTCGTCGCGGGCTTCTTG	TAAGCGAGCATCCTGCCAGTGCCGG GCAAGCACCCCAAGCTCTTCTCC
(20-2)	CTGGCAGCACAGGAGGGTTGGCTT CCTGCAGCGCCTGAATCTGGGAGG	ATGCTTCGGCTGTGCGTGGACCAAGT AAGCCAACCCCTCCTGTGCTGCCAG
(11-1)	GCACCTGCCACGAGCTTACCTGGT ACTCGGGGAGTAGTGGGAAGGGGG	CCCCCTCCCCACTACTCCCGAGT ACCAGGTAGAGCTCGTGGCAGGTGC

表 4. RACE 法で使用したプライマー

本研究で使用した市販のキットは、付加配列に使用するプライマーを使用するという都合上、遺伝子特異的なプライマーを1つのみしか使用できない。そのため、それで増幅したPCR産物のその内側に遺伝子特異的なプライマーを作成しPCRを行うという nested PCR を行った。そのプライマーを表に示す。



新規HERV候補			RACE法の結果		
染色体番号	遺伝子座	ストランド	染色体番号	遺伝子座	ストランド
	5'末端 3'末端			5'末端 3'末端	
17	28234025	(-)	17	28234031	(-)
	28230623		17	28230561	
20	24930682	(+) )	20	24919848 or 24930637	(+) )
	24932952		20	24932983	
3	42887740	(+) )	(PCRで増幅産物ができず)		
	42900191		(PCRで増幅産物ができず)		
14	23696874	(+) )	(PCRで増幅産物ができず)		
	23698875		(PCRで増幅産物ができず)		
3	46426830	(+) )	(PCRで増幅産物ができず)		
	46433734		(PCRで増幅産物ができず)		
19	53007512	(+) )	17	28233177	(+) )
	53013171		19	53011659 or 53016122	
20	24931227	(+) )	20	24930637	(+) )
	24932958		20	24932985	
7	135177670	(+) )	(PCRで増幅産物ができず)		
	135181959		(PCRで増幅産物ができず)		
11	129237136	(-)	11	129235827 or 129236391	(-)
	129234384		11	129233777	

表 5. 5'RACE 法および 3'RACE 法の結果

RACE 法により、遺伝子の両末端が同定できたものは 3 つであった。①17 番染色体:28230561-28234031,ストランド(-) ②20 番染色体:24919848-24932983,ストランド(+) または、24930637-24932983,ストランド(+) ③11 番染色体:129233777-129235827,ストランド(-) または、129233777-129236391、ストランド(-) であった。

RACE 法の結果をヒトゲノム(GRCh38)に照会し、その配列が一致した部分を確認し、5'末端および 3'末端を確認すると、chromosome 17: 28230561-28234031 (-)、chromosome 20:24919848-24932983(+)または chromosome 20: 24930637-24932983(+)、chromosome 20:24930637-24932985(+)、chromosome 11:129233777-129235827(-)または chromosome 11:129233777-129236391(-)という結果になった。この実験も、前述の発現確認の際の

PCR と同様に、複数個のコロニー(8 個)を検討し、他の遺伝子座からの発現でないかを確認した。この結果より Chromosome 20 の 2 つの候補は、場所として同一のものを見ていたことが明らかとなった。しかし、5'末端はこの結果からは 2 か所認められた。同様に chromosome 11 に関しても、5'末端が 2 か所あるという結果となった。再度過去の既報とも照らし合わせたところ、chrmosome 17 の候補に関しては、ERV-E1 と重複する部分が多く、同一のものと考えられた。また、chromosome 20 の候補に関しては、M11119 として Genbank に登録されている mRNA を内包しており、M11119 の遺伝子であると推察される。Chromosome 11 の候補に関しては、新規の遺伝子と考えられる。すなわち、chrmosome 20 の候補および chrmosome 11 の候補は新規の候補と考えられ、本研究で 2 つの新規の遺伝子を見つけた、と考えられる。各遺伝子の内包しているウイルスエレメントおよび遺伝子発現の変動を表 6 および図 15 に示す。

番号	ウイルスエレメント	FPKM値		
		Day1	Day2	Day4
17-1	env,pol	5.52	12.3	21.6
20-1	int	12.6	15.4	19.3
11-1	pol	1.10	0.39	0.60

表 6.同定した遺伝子のウイルスエレメントと発現量

本研究で遺伝子末端を同定できた3つのウイルスエレメントと FPKM 値の変動を示す。

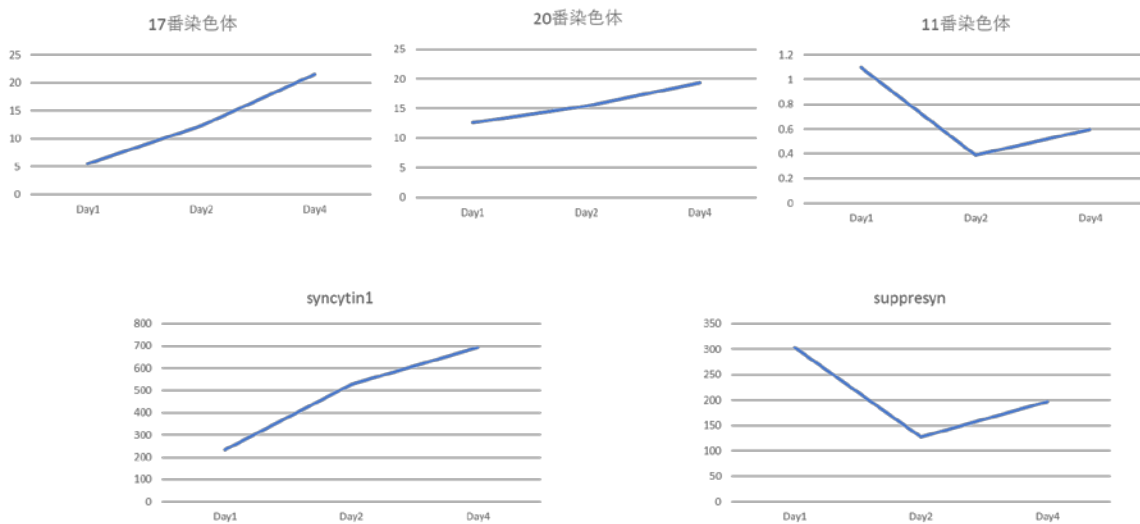


図 15. 3つの遺伝子と syncytin1(ERVW1)、suppressyn(HERVH48-1)の FPKM 値の変動比較  
各遺伝子の発現変動を図に示す。17-1 や 20-1 の遺伝子は上昇を続けていき、ERVW-1 と同様の変動を示す。また 11-1 は ERVH48-1 と同様の変動を示している。

考察：

課題 1 では、胎盤よりトリプシン・ディスパーゼ II による酵素処理を行い、比重遠心分離を用いて CTB を単離し、さらに CTB の特徴である HLA-ABC が陰性であることを利用したネガティブセレクションにより、98%以上と高純度に CTB を採取することができた。本研究の培養モデルと既報の違いはパーコール濃度勾配を 50%、45%、25%、20%の 4 層に分けた点である。Kliman らの 70%から 0%まで 5%刻みでパーコールを重層する原法に比べ操作が簡便である上に、抗 HLA-ABC 抗体を使用したネガティブセレクションを追加することで、98%以上と従来の方法に比べ、より高純度で CTB を単離することができた。また CTB を血清培地で培養することで融合し STB へと分化することを、蛍光免疫染色による形態の観察および hCG の分泌能の上昇から証明した。本研究では播種細胞数を増やし、細胞同士の接触を密にし、100%の融合を行うことを目標としたが、融合後には膜状へと変化することから目標を果たせているものと考えられた。課題 2 では、課題 1 で作成したモデルの分化過程を経時的に RNA シークエンスを行い、その遺伝子発現解析から、CTB が STB へと分化していく過程を再現していることを再度証明し、gEVE を用いて、HERV の網羅的発現解析を行った。その結果、166 個の HERV が抽出でき、132 個の新規の HERV 候補を抽出できた。その中から既知の HERV と同等の発現量のあるもの、または UCSC データベースでアミノ酸のコードが推察されるものを抽出したところ、10 個の新規 HERV 候補を抽

出できた。課題3では、抽出した10個の発現をPCRおよびDNAシーケンスで証明し、それぞれに対して5'RACE法と3'RACE法で最終的に2つの新規HERVsを特定した。

同定した新規のHERVに関して、5'RACE法により特定した遺伝子5'末端はともに2つずつ認められた。選択的スプライシングのように、1つの遺伝子がコードしているメッセージRNAやタンパク質は1つではなく、発現させるエクソンを変化させるなど数種類のタンパク質を司ることが少なくない。今回の結果で認められた5'末端の違いは、転写開始点をずらすことで複数の機能を有している可能性があると考えられる。

M11119の3'末端は、chromosome 20:24932983と今回の結果とほぼ同じであることもこの考えを示唆するものである。つまり”広義”の意味での遺伝子という点では最長のものを指すと考えられ、本研究より得られた結果から、chromosome 20:24919848-24932983(+)と chromosome 11:129233777-129236391(-)が新規の遺伝子と考えられ、M11119を含め chromosome 20:24930637-24932985(+)と chromosome 11:129233777-129235827(-)はその遺伝子のプロセッシング後の mRNA の配列であると推察される。

遺伝子変動に関しては、絶対値は違うものの、17-1や20-1はsyncytin1(ERVW-1)の発現変動に類似し、また11-1に関してはsuppressyn(HERVH48-1)の発現変動に類似している。syncytin1、suppressynはともにASCT2というレセプターを利用しており、

syncytin1 を発現している CTB が他の CTB の ASCT2 と結合することで細胞融合を起こすとされ、また suppressyn は ASCT2 を syncytin1 と競合することで、CTB の融合を阻害することで、CTB の分化を調整していると考えられている。それらと似た発現変化を起こしていることから、今回遺伝子末端を同定した3つの遺伝子に関しても、同様に CTB の分化に対して、17-1 や 20-1 は促進的に、11-1 は抑制的に働くことが推測される。現在、HERV に関しては前述した syncytin1 や syncytin2、suppressyn など env 由来の遺伝子の機能解析が主に研究されている。しかし、PEG10 や PEG11 など胎盤形成に重要に関連すると示唆されている遺伝子は gag 由来の遺伝子であり、env 由来以外の遺伝子も機能を持っている可能性は十分考えられる。本研究で同定した2つの遺伝子は、発現量の増減からは前述のように CTB 分化に関与している可能性が示唆されるが、それぞれ int 由来と pol 由来であり、従来の env 由来の遺伝子とは別の機能を有している可能性も考えられる。

本研究は、方法にも記載したが、PCR を行う際に試薬を2種類のうち1つを使用しているが、片方では全く反応がなく、しかしもう一方では反応があるということにしばしば遭遇した。HERV は、理由は不明であるが、試薬によって PCR 増幅高率に大きな差が出ることにしばしば遭遇する。したがって、5'3'RACE 法を行う際に、9 個の候補に対してその5個しか反応しなかったことも、試薬との相性ではないかと推察された。また、今回新規の HERVs として抽出した遺伝子のうち chromosome 11 のものに

関しては、FPKM 値でみると発現量は上位 40 位内に入っていない。すなわち、発現量が低いと思われ、今回除外した候補の中にも十分な発現をしているものはあると考えられる。この 2 つの事実より、我々が今回抽出しなかった候補の中に、重要な HERV が隠れている可能性も十分考えられ、今回抽出した候補も含め、今後のさらなる検討が必要である。

結論：

今回我々は CTB の融合分化モデルを使用し、gEVE データベースを使用することで新規の HERV を 2 個抽出することができた。今後、これらについてさらなる検討を行っていく。

謝辞:

本研究は、東京大学医学部附属病院女性診療科産科の永松健先生のご指導の下研究をさせていただきました。心より感謝申し上げます。

また本研究共同研究者である東海大学医学部基礎医学系分子生命科学の中川草先生

には gEVE データベースの提供のみならず RNA-seq の解析のご指導をしていただきました。広島大学大学院医歯薬保健学研究院産婦人科の杉本潤先生には、研究を遂行する際に研究全体や個々の実験に対する助言をいただき、大いに参考にさせていただきました。心より感謝申し上げます。

1. K. E. Brett, Z. M. Ferraro, J. Yockell-Lelievre, A. Gruslin, K. B. Adamo, Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int J Mol Sci* **15**, 16153-16185 (2014).
2. L. Ji *et al.*, Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med* **34**, 981-1023 (2013).
3. B. Huppertz, Placental pathology in pregnancy complications. *Thromb Res* **127 Suppl 3**, S96-99 (2011).
4. E. Maltepe, A. I. Bakardjiev, S. J. Fisher, The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1016-1025 (2010).
5. M. A. Costa, The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod Biomed Online* **32**, 14-43 (2016).
6. L. A. Cole, Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clinical chemistry* **43**, 2233-2243 (1997).
7. K. Imakawa, S. Nakagawa, K. Kusama, Placental Development and Endogenous Retroviruses. *Virus* **66**, 1-10 (2016).
8. A. Dupressoir, C. Lavalie, T. Heidmann, From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* **33**, 663-671 (2012).
9. S. Mi *et al.*, Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**, 785-789 (2000).
10. N. Bannert, R. Kurth, The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annual review of genomics and human genetics* **7**, 149-173 (2006).
11. M. Gauster, G. Moser, K. Orendi, B. Huppertz, Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* **30 Suppl A**, S49-54 (2009).
12. I. Knerr *et al.*, Stimulation of GCMa and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS letters* **579**, 3991-3998 (2005).



13. A. Malassine *et al.*, Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. *Retrovirology* **5**, 6 (2008).
14. A. Malassine *et al.*, Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta* **28**, 185-191 (2007).
15. A. Vargas *et al.*, Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *Journal of molecular biology* **392**, 301-318 (2009).
16. J. Sugimoto, M. Sugimoto, H. Bernstein, Y. Jinno, D. Schust, A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion. *Scientific reports* **3**, 1462 (2013).
17. R. Ono *et al.*, Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nature genetics* **38**, 101-106 (2006).
18. Y. Sekita *et al.*, Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nature genetics* **40**, 243-248 (2008).
19. G. Okahara *et al.*, Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs. *Genomics* **84**, 982-990 (2004).
20. J. Denner, Expression and function of endogenous retroviruses in the placenta. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **124**, 31-43 (2016).
21. S. Nakagawa, M. U. Takahashi, gEVE: a genome-based endogenous viral element database provides comprehensive viral protein-coding sequences in mammalian genomes. *Database : the journal of biological databases and curation* **2016**, (2016).
22. H. J. Kliman, J. E. Nestler, E. Sermasi, J. M. Sanger, J. F. Strauss, 3rd, Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* **118**, 1567-1582 (1986).
23. M. G. Petroff, T. A. Phillips, H. Ka, J. L. Pace, J. S. Hunt, Isolation and culture of term human trophoblast cells. *Methods Mol Med* **121**, 203-217 (2006).
24. F. Le Bellego, C. Vaillancourt, J. Lafond, Isolation and culture of term human cytotrophoblast cells and in vitro methods for studying human cytotrophoblast cells' calcium uptake. *Methods Mol Biol* **550**, 73-87 (2009).
25. S. C. Shorter *et al.*, Antigenic heterogeneity of human cytotrophoblast and evidence for the transient expression of MHC class I antigens distinct from HLA-G. *Placenta* **14**, 571-582 (1993).
26. C. Trapnell *et al.*, Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* **7**, 562-578 (2012).
27. S. Camolotto *et al.*, Expression and transcriptional regulation of individual pregnancy-specific glycoprotein genes in differentiating trophoblast cells. *Placenta* **31**, 312-319 (2010).
28. Y. Kudo, C. A. Boyd, Changes in expression and function of syncytin and its receptor, amino acid transport system B(0) (ASCT2), in human placental choriocarcinoma BeWo cells during syncytialization. *Placenta* **23**, 536-541 (2002).
29. C. A. Kessler, J. W. Stanek, K. F. Stringer, S. Handwerger, ETS1 induces human trophoblast

- differentiation. *Endocrinology* **156**, 1851-1859 (2015).
30. S. Getsios, G. T. Chen, C. D. MacCalman, Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression. *J Reprod Fertil* **119**, 59-68 (2000).