

論文の内容の要旨

論文題名：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

氏名：森田 一輝

要旨：

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。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。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。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。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。

レトロウイルスは、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、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。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。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ERV由来のタンパク質が関与していることが示されている。同様にERV由来のタンパク質であるsyncytin2やERV由来のsuppressynというタンパク質が融合に関与しているといった報告がある。またPEG10やPEG11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

認められている ERV の報告も存在し、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。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 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 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。そのために、以下の 3 つの課題を設定した。

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

課題 1. CTB 分化培養モデルの確立

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、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。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。また絨毛外栄養膜細胞(Extravillous trophoblast)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用いて、純度測定を行った。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、胎盤から高純度に CTB が採取できたことを示した。得られた CTB を血清培地で培養を行った。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 の融合を視覚的に確認するために蛍光免疫染色を行った。培養後 24 時間後には単核であった CTB が、培養時間とともに徐々に多核細胞となり、96 時間後にはそのほとんどが多核細胞となっている様子が観察された。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た。

また STB は前述のように hCG を分泌するため、CTB が STB へと分化するモデルでは、培地中の hCG 濃度は上昇すると考えられる。連日培地を回収し、ELISA 法で培地中の hCG を測定した。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。この結果より、培養の経過とともに形態のおよび生化学的に 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

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 検体を使用して 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、マッピングしたところ、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。

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。PSG1、ERVW-1、LGALS13 や CGB 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 や CDH1 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。これらの遺伝子は、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った。

RAN-seq のデータを 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。

課題 3. 各 HERVs の発現の確認および遺伝子の同定

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。電気泳動後では、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。そこで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ところ、80%以上と高率に一致したものは9個であった。1個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。

抽出した9つの新規 HERVs 候補について、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シークエンスを行うことで、遺伝子末端の同定を試みた。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。両末端が同定できたものは 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(-)であった。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。これは選択的スプライシングの存在の可能性を示唆する結果と考えられた。また既報と照らし合わせたところ、chromosome 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、chromosome 20の候補および chromosome 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。

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、これらについて機能解析などさらなる検討を行っていく必要がある。