

令和 6 年 7 月 31 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2022 年

受付番号 202270001

氏名 北澤 萌恵

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1-1. 用務地（派遣先国名）用務地： メルボルン （国名： オーストラリア ）

1-2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

有袋類での新規ゲノム編集方法の開発による有袋類胎盤における PEG10 の機能解析

1-3. 派遣期間： 令和 4 年 5 月 5 日 ～ 令和 6 年 5 月 4 日（731 日間）

1-4. 受入研究機関名及び部局名

受入研究機関名： The University of Melbourne

部局名： School of BioSciences

入も可)**【記載事項】**

- ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等

<研究背景と目的>

「私たちヒトを含む哺乳類はどのようにして胎盤を獲得したのか？」この問いの解決には胎盤獲得の起源に近い未熟な胎盤を持つ有袋類（カンガルー・コアラなど）の解析が重要だが、有袋類における遺伝学的解析法が確立されていないため研究が進んでいない。

PEG10 (*Paternally expressed 10*) は胎生獲得とほぼ同時期に出現したウィルス由来の遺伝子であり (Suzuki *et al.*, PLoS Genet. 2007)、真獣類（ヒト・マウスなど）の胎盤形成に必須の遺伝子であり (Ono *et al.*, Nat Genet. 2006)、胎盤固有の細胞であるトロフォブラスト細胞の分化に必須の機能を持つことから (Abed *et al.*, 2019; Shiura *et al.*, 2022)、*PEG10* の獲得が哺乳類における胎生獲得の原動力となった可能性がある。

本研究は、I) 有袋類での KO 個体の作製方法を確立し、II) 哺乳類特異的遺伝子 *PEG10* の有袋類胎盤での機能を解析することで、*PEG10* が胎生獲得に果たした意義を明らかにすることを目的とした。哺乳類特異的遺伝子である *PEG10* が胎盤獲得にどのように貢献したかを明らかにすることで、哺乳類の進化の歴史を探る。

<研究の実施状況>**研究方法の変更**

当初の予定では、小型の有袋類ダナート (fat-tailed dunnart: *Sminthopsis crassicaudata*) を用いて遺伝子改変有袋類を作製する予定だったが、COVID-19 パンデミックの影響による飼育頭数の削減の影響でダナート個体の使用が制限されたため、ワラビー (Tammar wallaby: *Macropus eugenii*) での発現解析およびダナート iPS 細胞で実験を代替することにした。

研究の成果**(1) ワラビーの胎盤での *PEG10* の生化学的解析**

多くの有袋類は卵黄嚢胎盤 (choriovitelline placenta) を形成し、母体の子宮組織と接触している。ワラビーの胎盤は有袋類の中でも比較的発達し、真獣類の胎盤への進化の原型とする説もある。卵黄嚢胎盤は血管が発達した領域 TOM (the vascular trilaminar omphalopleure) と血管のない領域 BOM (the avascular bilaminar omphalopleure) に分けられる。どちらも single trophoblast cell layer (TL) および single endodermal cell layer (EL)を含み、TOM のみに血管を形成する mesodermal layer (ML)が存在する。

PEG10 mRNA は卵黄嚢胎盤が子宮に接着する妊娠 18 日目から出産前日の妊娠 25 日目の BOM、TOM どちらでも発現し、妊娠 20 日目の TOM が最も発現が高い(図 1 -A)。免疫染色の結果からは *PEG10* タンパク質は特に endodermal cell layer での発現が高いことが観察された (図 1 -B, C)。真獣類胎盤の trophoblast cell マーカーとして知られる Pan-Cytokeratins と GCM1 はワラビーの胎盤では endodermal cell layer のみで強く発現し、trophoblast cell では発現していない。GCM1 は胎児母体間で栄養や酸素を交換するラビリンス層のマーカーである。これはワラビー胎盤の endodermal cell layer が栄養輸送の中心として機能していることを示唆しており、ワラビー endodermal cell layer が真獣類胎盤の trophoblast cell と同様の機能をしていることが考えられる (Guernsey *et al.*, 2017)。つまり、細胞種は違わが *PEG10* は真獣類・有袋類ともに栄養交換の機能を果たす重要な組織で発現している可能性が明らかとなった。

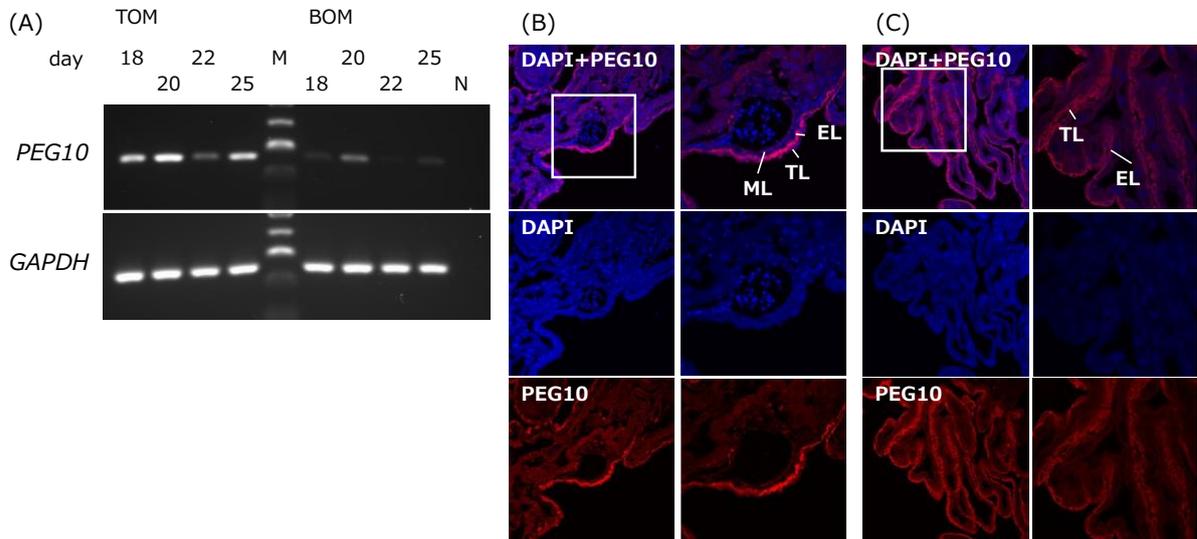


図1. ワラビー卵黄嚢胎盤での PEG10 の発現

(A) 妊娠 18~25 日目までのワラビー卵黄嚢胎盤での PEG10 mRNA の発現。PEG10 は着床時の妊娠 18 日目の卵黄嚢胎盤から発現している。PEG10 の発現量は BOM よりも TOM で高く、妊娠 20 日目がピークである。(B, C) 妊娠 22 日目のワラビー卵黄嚢胎盤での PEG10 タンパク質の発現。PEG10 (赤) と DAPI (青) の蛍光免疫染色像。(B) TOM、(C) BOM。

(2) ワラビーの脳での PEG10 の生化学的解析

近年、PEG10 の過剰発現はヒト神経疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やインプリンティング疾患で有名なアンジェルマン症候群の神経発達異常に関係していることを示す報告があった (Pandya et al., 2021; Black et al., 2023; Whiteley et al., 2020)。そこで PEG10 が脳の進化にも重要な役割を果たすと考え、PEG10 の有袋類の脳機能進化への寄与を解析した。

ワラビーの脳において PEG10 mRNA は胎児期 (妊娠 25 日目) から新生児期、乳児期 (生後 0~74 日目) の脳および脊髄で発現していることが確認できた (図 2 -A)。PEG10 タンパク質も胎児期 (妊娠 25 日目) から新生児期 (生後 10 日目) の脳で発現しており、免疫染色により SOX2 陰性細胞でより高発現していることが観察された (図 2 -B)。SOX2 は神経幹細胞マーカーであるため、PEG10 はより発生の進んだ細胞で発現している可能性が示唆された。

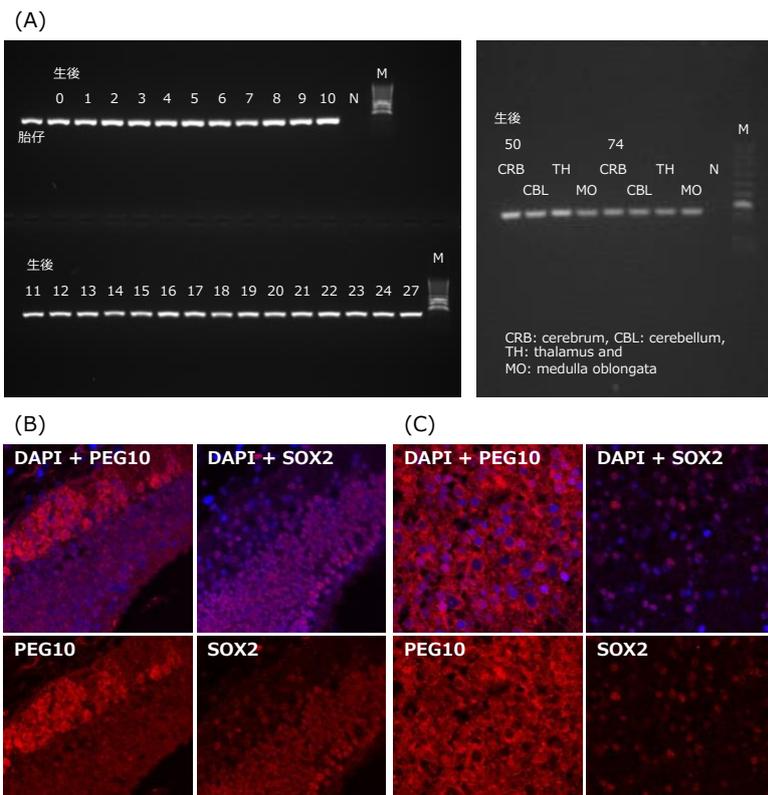


図2: ワラビー脳での PEG10 の発現

(A) 妊娠 25 日目および生後 0~24, 27, 50, 74 日目までのワラビー脳での PEG10 mRNA の発現。PEG10 は出産前から乳児期にかけての全脳で発現している。(B, C) ワラビー脳での PEG10 および SOX2 タンパク質の発現。PEG10 (赤) と DAPI (青) (左図) および SOX2 (赤: 神経幹細胞マーカー) と DAPI (青) (右図) の蛍光免疫染色像。(B) 妊娠 25 日目胎児脳での発現。(C) 生後 10 日目脳での発現。

(3) Dunnart iPS 細胞から EPS 細胞への誘導 (安定して培養可能な全能性細胞の樹立)

有袋類 iPS 細胞についての研究は共同研究先である Pask 研究室と行った。Pask 研究室ではダナートの iPS 細胞の樹立に成功している。しかし、継代による分化や核型の異常など、正常細胞の長期維持が困難であることが問題となっている。また、iPS 細胞は成体のすべてのタイプの細胞を生成する能力を持っているが、胚体外胎盤組織への寄与が限られていることが問題であった。しかしマウスとヒトの iPS 細胞に、低分子化合物を加えることで、胚組織と胚体外組織の両方に分化可能な Extended Pluripotent Stem (EPS) 細胞と呼ばれる独特の機能と分子的特徴を持つ細胞への誘導が可能となった (Yang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021)。そこで、ダナート iPS 細胞もより未分化状態を安定して維持可能かつ胎盤の細胞への分化も可能な EPS 細胞への誘導を試みたところ、EPS 様細胞が得られ (図3)、現在 RNA-seq にて解析するとともに分化能を確認している。

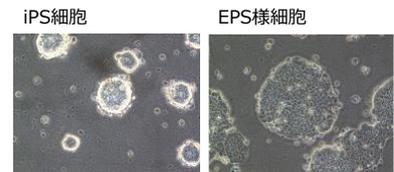


図3:ダナート iPS 細胞(左)と EPS 細胞(右)。

(4) ダナート iPS 細胞および EPS 細胞から iTS 細胞への分化方法の検討

ダナート iPS 細胞および EPS 細胞を iTS (trophoblast stem cell)細胞に分化させることで、今までアプローチできなかった有袋類の初期胎盤発生のメカニズムの解析に繋げる。

ダナート iPS 細胞および EPS 細胞をマウス iTS 細胞分化誘導時に検討された条件を含む培地で培養し、iTTS 細胞への誘導を試みたところ、iTTS 様細胞が得られた (図4)。現在、RNA-seq にて解析中であり、今後ダナート胎盤の RNA-seq データと比較することで培地の最適化を検討する。

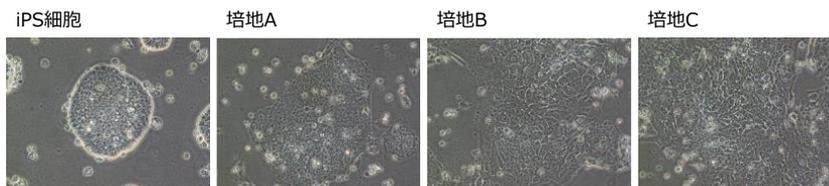


図4:ダナート iPS 細胞(左)と iTS 様細胞(右)。

<今後の展望>

ワラビーの胎盤と脳の解析については発生段階を追って PEG10 タンパク質の発現レベルを調べ、胎盤細胞マーカー遺伝子である GCM1, CDX2 や神経細胞マーカー遺伝子である TBR1, 2, NeuN などと共染色することで局在部位を特定し論文にまとめる。

ダナート EPS 様細胞および iTS 様細胞については、現在 RNA-seq にて解析中のため、今後ダナート胎盤の RNA-seq データと比較することで培地の最適化を検討する。また、他種有袋類での iPS 細胞の樹立および胎盤系細胞への分化方法の確立にも挑戦し、分化過程で PEG10 をノックダウン (KD) し、表現型を観察することで有袋類胎盤における PEG10 の機能解析を行う予定である。

<成果の発表>

派遣期間中に *Peg10* に関する論文を 2 報執筆した。

1. Shiura H., Kitazawa M., Ishino F. *, and Kaneko-Ishino T.* Functions of two retrovirus-derived acquired genes, *PEG10* and *PEG11/RTL1*, in mammalian development and their relation to human genomic imprinting diseases. *Front Cell Dev Biol.* (2023) doi: 10.3389/fcell.2023.1273638.
2. ○ Kitazawa M.* Evolution of the Nerve System by Acquisition of LTR Retrotransposon-derived Genes in Mammals. *Genes Genet Syst.* (2024) doi: 10.1266/ggs.23-00197.