

令和 3 年 4 月 30 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 平成 31 年度

受付番号 201960736

氏名 高島 謙

(氏名は必ず自署すること)

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. 用務地（派遣先国名）用務地：ボストン（国名：米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

新規ゲノムインプリンティング制御機構の解明

3. 派遣期間：平成・令和 31 年 4 月 1 日～令和 3 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：ハーバード医科大学

部局名：ハーバード医科大学 小児科、ボストン小児病院 新生児科

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(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)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

I. 研究背景・目的

ゲノムインプリンティングは、両親から受け継いだ対立遺伝子のうち、一方の発現が選択的に抑制される現象である。インプリンティングの確立には DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな制御が重要であることが知られているが、その確立、維持、制御のメカニズムについては明らかになっていない。また一方で、インプリンティングは胎児の発生や発達に深く関与することが知られており、制御機構の解明は生物学的、医学的見地からの意義が大きい。

胞状奇胎は胎盤を形成する栄養膜細胞が子宮内で異常に増殖した病態であり、流産などの不育症の原因となり、さらに若年女性で絨毛性腫瘍へと癌化する危険性がある。

近年、反復性胞状奇胎患者のゲノム解析から、細胞質内タンパク質 NLRP7 および KHDC3L に機能欠損型の変異が同定された。さらに、この変異をもつ患者の胎盤組織では、母性アレルでの DNA メチル化の減少などのインプリンティング異常が認められた (Sanchez-Delgado M et.al., PLoS Genet., 2015)。しかし NLRP7 や KHDC3L の機能欠損がインプリンティング異常を導く機序は不明である。

本研究は反復性胞状奇胎でインプリンティング異常を引き起こすと考えられている NLRP7 と KHDC3L の異常に着目し、インプリンティングを制御する新規分子機構を明らかにすることを目的とする。予備実験の結果から、CRISPR-Cas9 システムにより Nlrp7 および Khdc3l 遺伝子をノックアウトしたヒト胎盤栄養膜細胞株 HTR8 では、インプリンティング制御領域の DNA メチル化の喪失が認められ、複数のインプリンティング遺伝子の異常な発現上昇を認めた。さらに興味深いことに、野生型 HTR8 細胞の培養上清を NLRP7 および KHDC3L 欠損 HTR8 細胞に添加すると、インプリンティング遺伝子の発現異常が部分的に回復した。これはインプリンティングを制御する細胞外分泌因子が存在する可能性を示唆している。NLRP7 と KHDC3L を切り口に、新規インプリンティング制御機構を明らかにすることを目的とし、以下の解析を進めた。

また、ゲノムインプリンティングの制御機構については、最近になって大きな発見があった。これまで配偶子に存在するインプリンティングを示すマークとしてDNAメチル化が知られていたが、卵子のDNAメチル化を欠失させても受精卵にて父性アレルに特異的な発現を示すインプリンティング遺伝子が存在し、DNAメチル化に依存しない別のインプリンティング機構が存在することが示唆されていた。近年、それが母性アレルのH3K27me3修飾に依存していることが明らかとなった(Inoue A et al., *Nature*, 2017)。H3K27me3修飾は転写抑制性のマークとして知られており、これまでにDNAメチル化に依存しないと報告されていたインプリンティング遺伝子がこの修飾に依存していた。さらに興味深いことに、このヒストン修飾依存型のインプリンティングは、着床後にも胎盤などの胚体外では維持されるが、胚体組織自体では失われてゆくことが明らかとなった。すなわちH3K27me3修飾の制御は本研究で着目する正常な胎盤発生に必要なゲノムインプリンティング制御に関わる可能性が高い。

私は海外特別研究員派遣前から行なっていたPEG10 ICRを標的とした改変型CRISPR-Cas9を用いた新規インプリンティング制御因子のスクリーニングから分子Xを同定し、これがH3K27me3修飾の制御に関わることを見出した。引き続き、エピジェネティクス制御およびインプリンティング制御における分子Xの役割の解析を行なった。

II. 遂行状況

(1) NLRP7/KHDC3Lの新規結合タンパク質の同定とインプリンティング制御機構の解明

・NLRP7/KHDC3Lの新規結合タンパク質の探索

まずFLAGタグを融合させたNLRP7およびKHDC3Lの発現プラスミドの構築、レトロウイルスベクターによる発現系の構築、検討を行った。次に胎盤栄養膜細胞の培養細胞株として知られるHTR8、JEG3、BeWo細胞について、NLRP7およびKHDC3Lの安定発現細胞株の樹立を試みた。その結果、NLRP7の長期にわたる強制発現は細胞死を誘導することが認められたため、一過性発現の系に切り替えた。一方でKHDC3L安定発現細胞株の取得には成功した。

その後、FLAG抗体を用いて共免疫沈降を行い、SDS-PAGEによる分離およびゲル染色を行った。Harvard Medical School共同研究施設との共同研究により質量分析機による解析を行ったが、新規の結合因子を得ることはできなかった。

さらにHTR8細胞のみならず、JEG3、BeWo細胞についてもCRISPR-Cas9システムを用いたNLRP7欠損細胞の樹立に成功した。

一方で、HTR8、JEG3、BeWoはいずれも不死化処理済または腫瘍組織由来の細胞株であり、本来の胎盤栄養膜細胞の機能を正しく反映できているか定かではない。近年、他のグループよりヒト胎盤栄養膜幹細胞(human Trophoblast Stem Cell: hTSC)の樹立が報告された(Okae H et al., *Cell Stem Cell*, 2018)。ヒト胎盤栄養膜細胞は、大きく細胞性栄養膜細胞(CT)、外絨毛細胞栄養膜細胞(EVT)、合胞体栄養膜細胞(ST)の3種に分かれる。過去の報告からCTは高い増殖力を示すこと、EVTやSTに分化することが知られていたが、ヒト検体を用いた培養技術が確立されておらず、詳細な機能解析は行われてこなかった。しかし、当グループは妊娠初期のヒト胎盤からCTを分離し、種々の培養条件を整えることでCTの長期培養に成功し、この長期培養が可能なCT株からEVT、STへの分化能を確認し、これを栄養膜幹細胞(TSC^{CT})と定義した。JEG3、BeWo細胞はCT由来の絨毛癌腫瘍細胞株であるが、これらの腫瘍細胞株に比べてTSC^{CT}はより自然な状態の胎盤栄養膜細胞であることが考えられる。私は当グループが公開している栄養膜幹細胞(TSC^{CT})の分化過程におけるRNA-seqデータから、NLRP7はTSC^{CT}栄養膜幹細胞で発現が非常に高く、EVTやSTへの分化に伴って、その発現量が著明に減少することを発見した。我々はNLRP7はが栄養膜幹細胞の幹細胞性(自己複製能、多分化能)の維持等に関わる因子なのではないかと予想している。

(2) インプリンティングを制御する細胞外分泌因子の同定とその制御機構の解明

・インプリンティングを制御する細胞外分泌タンパク質の探索

予備実験の結果から、インプリンティングを制御するような細胞外分泌因子の存在が示唆されたため、我々はこの細胞外分泌因子の同定を試みた。その候補因子の幅を絞るため、まず野生型とNLRP7欠損細胞の培養上清の特徴について、さらなる解析を行った。

まず、この因子がタンパク質であるという想定のもと、分子量に着目した。野生型細胞の培養上

清について、遠心式限外ろ過フィルターを用いて 3kDa 以下の小分子とそれ以上のタンパク質に分離した。それぞれの分離物を NLRP7 および KHDC3L 欠損細胞株に添加し、欠損株で最も影響が大きかったインプリンティング遺伝子 Tfpi2 の発現量を RT-qPCR 法を用いて確認した。その結果、3kDa 以上の分画に NLRP7/KHDC3L の欠損によるインプリンティング異常を回復させる因子が存在することが判明した。

3kDa 以上の分画に含まれる未知の制御因子を同定するため、HTR8 野生株および NLRP7 欠損株の培養上清からこの画分を分離し、Judy Liberman 研究室 (Harvard Medical School)との共同研究により、2次元 SDS-PAGE 泳動による分離を行った。その結果、両細胞株の培養上清間で、銀染色像にいくつかの違いが認められた。その部位を回収し、質量分析機による解析を行った。しかし、有意な発現差を認めるタンパク質を同定することはできなかった。

現在、標的となる分泌因子を分離・同定する方法について様々な検討を加えている状況であり、明確な新規分泌タンパク質の同定には至っていない。2次元 SDS-PAGE 泳動に加え、研究計画にあるように高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)を用いた分画を試みたが、培養液中の血清 (FBS)などの影響が大きく、系の構築が困難であった。しかし、これまでの結果から、3kDa 以上のタンパク質が含まれる培養上清画分に何らかのインプリンティング制御因子が含まれていることは確かである。

(3) インプリンティングを制御する核内因子の網羅的スクリーニングおよびその機能解析

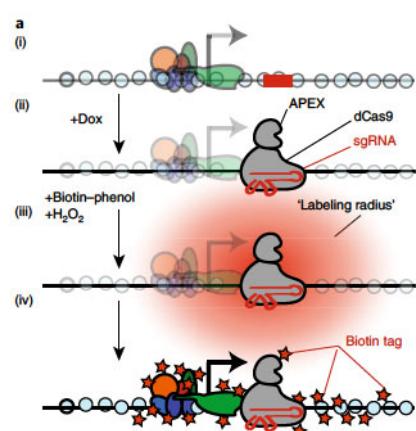
・PEG10 ICR に着目した新規核内インプリンティング制御因子の探索

NLRP7 欠損細胞では数あるインプリンティング遺伝子の中でも、Tfpi2 などの PEG10 クラスターに属する遺伝子の発現に影響が見られた。NLRP7 欠損細胞を用いたバイサルファイトシーケンスの結果から、PEG10 ICR のメチル化が喪失していることが明らかとなった。

PEG10 はレトロトランスポゾン由来の遺伝子であり、マウスにおいて胎盤形成に必須であり、Peg10 ヘテロ欠損マウスでは、胎盤形成が全くなされず胎生致死となることが報告されている(Ono R et al., *Nat. Genet.*, 2006)。PEG10 は哺乳類においては、母性アレルからの発現が抑制されており、父性発現インプリンティング遺伝子であることが知られている。父性アレルに比べ、母性アレルでは PEG10 のプロモータ領域から Exon1 領域にかけて、メチル化が優位である ICR が存在することが明らかになっている。しかし、PEG10 の機能や時空間的な発現制御機構には不明な点が多い。PEG10 は胎盤の正常発生に必須であること、NLRP7 欠損株で PEG10 ICR への影響が見られたこと、また上記の PEG10 ICR は未知の因子が制御を行っている可能性が高いこと等の理由から、本研究において PEG10 ICR 制御因子のスクリーニングは極めて有用であると考えられ、研究計画に盛り込むこととした。

近年、インプリンティング制御領域の DNA メチル化を保護する因子として DNA 結合タンパク質 ZFP57、ZNF445 などが同定され(Quenneville S et al., *Mol. Cell.*, 2011, Takahashi N et al., *Genes Dev.*, 2019)、多くのインプリンティング制御領域がこれらの因子で保護されることが明らかになった。しかし、PEG10 ICR の制御はこれらの因子には依らず、他の未知の制御機構が存在することが示唆されている(Juan AM et al., *Genes Dev.*, 2019)。しかし、特定のゲノム領域に局在する因子を同定する有効な手法はこれまで無かった。

私は海外特別研究員採用以前から Greer 研究室にて PEG10 のインプリンティング制御領域に存在する新規制御因子について、CRISPR-Cas9 改変体を用いたスクリーニング系の構築に着手していた。DNA 切断活性を欠失した dCas9 と、ビオチン化酵素 APEX2 を融合し、この遺伝子カセットを TET-ON システムにより発現誘導を行うことができる培養細胞株を、MIT/Broad 研究所の Sam Myers 博士との共同研究で構築した(Myers SA et al., *Nat. Methods*, 2018, 右図)。さらに標的となるゲノム領域について sgRNA を設定し、導入することにより、特定のゲノム領域に dCas9-APEX2 複合体をリクルートし、基質



を加えることでその一帯に存在する因子をビオチン化することが可能となる。ビオチン化された因子は、ストレプトアビジンビーズによって回収され、その後、質量分析機を用いて同定する。私は誘導性 CASPEX システムを導入した培養細胞株を複数樹立し、PEG10 ICR 領域に複数の sgRNA 配列を設定し、CASPEX 細胞への導入、ビオチン化、そしてストレプトアビジンビーズによるプルダウンまでを担当し、Myers 博士が現在質量分析機による同定、インフォマティクス解析を行った。その結果、1000 を超える候補因子を得ることに成功した。今後、さらなる網羅的二次スクリーニングを行い、候補因子の絞りこみを行う予定である。

・新規ヒストン修飾制御因子 X の同定

我々は PEG10 ICR に局在する 1000 以上の因子の中から、分子 X に着目した。分子 X はデータベースを用いた *in silico* での結合因子の予測から、ヒストン修飾に関連する複数の因子と結合することが明らかとなった。申請者は分子 X が抑制性ヒストンマークとして知られる H3K27me3 の修飾因子と相互作用することを見出し、分子 X が H3K27me3 の制御因子であることを分子 X 安定過剰発現細胞、および分子 X 欠損細胞を用いて証明した。

現在、分子 X は特定の腫瘍での予後不良因子として報告があるものの、そのエピジェネティクス、さらにはゲノムインプリンティングでの役割は不明である。前述のとおり、最近ゲノムインプリンティングの制御での H3K27me3 修飾の重要性が報告されており、分子 X が H3K27me3 修飾を介し、ゲノムインプリンティングを制御する可能性がある。興味深いことに分子 X 欠損細胞について RNA-seq によるトランскriプトーム解析を実施したところ、一部のインプリンティング遺伝子の発現異常が認められた。現在分子 X による H3K27me3 のさらなる制御機構の解明を進めるとともに、インプリンティング遺伝子の発現制御、NLRP7 および KHDC3L との機能連関について解析を進めている。

当研究課題ではゲノムインプリンティングの新規制御機構として、NLRP7 および KHDC3L について注目し解析を始めた。しかし新規結合因子の探索、細胞外分泌因子の同定には至らず、既存の方法の改善、およびさらなるスクリーニング系の構築に時間を要した。

しかし、私は新たなスクリーニング系からインプリンティングのみならずヒストン修飾およびエピジェネティクス一般の制御に関わるような分子 X を同定した。分子 X の欠損は一部のインプリンティング遺伝子の発現異常を引き起こすことも大変興味深い。当初の予定とはやや異なる進行となつたが、分子 X の同定およびそのエピジェネティクス制御における役割の解明はインプリンティング制御機構という当初の目的につながるものと考えられる。今後、分子 X によるヒストン修飾の制御機構についてさらに解析を続けるとともに、NLRP7 や KHDC3L との機能連関についても注目し、新たなエピジェネティクス・ゲノムインプリンティング制御機構の解明を目指す。

学会参加については、2019 年冬に一時帰国し、日本分子生物学会および日本免疫学会に参加了。特に 2019 年の日本分子生物学会年会ではエピゲノム変化に焦点を当てたセッションが多く、意見交換の機会を持つことができた。また、日常的に研究室でのミーティングでの発表を行っており、本成果の一部はハーバード大学内の Jessica Whited lab および Issac Chiu lab との合同で行っている joint lab meeting などすでに発表を行っており、ディスカッションを行った。本成果の学会発表は未だ行っていないが、今後、日本分子生物学会および欧米の各種学会にて発表することを検討中である。