

胎盤特異的遺伝子操作法を用いた 栄養膜細胞の機能解析

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター

武藤 真長

はじめに

個々の遺伝子機能を生体レベルで明らかにすることができる遺伝子改変動物は、胎盤形成機構や胎盤を起因とする妊娠疾患の原因解明などに非常に有用である。そのため外来遺伝子を過剰発現させるトランスジェニック (Tg) マウスや、内在遺伝子を破壊したノックアウト (KO) マウスが汎用されている。特にノックアウトマウスでは胚性致死となる表現型が数多く報告されており、それらの系統のほとんどに胎盤形成異常が認められる。さらに表現型として胎盤異常が認められる KO マウスでは、胎仔における心臓形成異常も多く見られることが報告されており¹⁾、胎仔と胎盤の両方のゲノムが操作されてしまう通常の KO 法では、妊娠期の表現型について胎仔と胎盤のいずれに起因するのかを解析することが困難となる。2007年にレンチウイルスベクターをマウスの胚盤胞期胚に感染させることで、胎盤特異的に遺伝子操作を可能にする系が確立した²⁾。これにより KO マウスの胎生致死の原因解明と治療、さらに胎盤に起因する疾患モデルの開発にも応用が可能となった。本トピックスでは、胎盤特異的遺伝子操作法を用いた疾患モデル動物の開発だけでなく、臨床応用への可能性についても概説する。

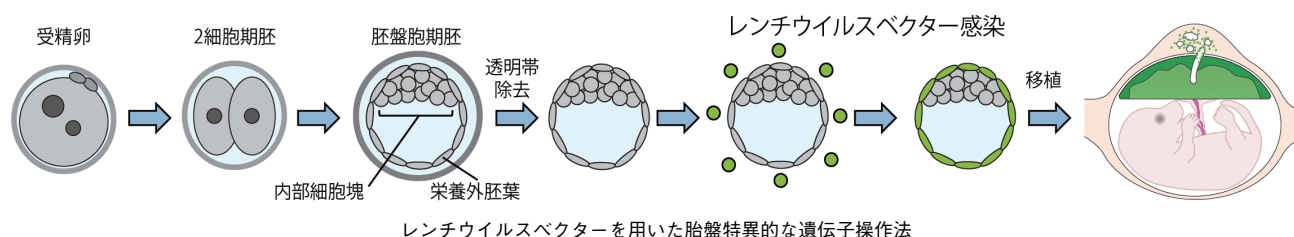
レンチウイルスベクターを用いた 胎盤特異的遺伝子操作

遺伝子導入のために広く使われているレンチウイルスベクターはヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) をベースに作製されたレトロウイルスベクターであるが、ウイルス粒子の構成に必要な要素が数種類のプラスミドに分割されたシステムで作製できる³⁾。3'-LTR プロモーター部分を削除することにより、目的遺伝子が染色体に組み込まれた後にウイルスゲノムが転写されない self-inactivat-

ing (SIN) タイプとなり P2A 実験として実施できるため⁴⁾、トランスジェニック (Tg) 動物作製に広く利用されるようになった。哺乳類の卵は透明帯と呼ばれる細胞外マトリクスに覆われているため、ウイルスは感染できない。そこで酸性タイロイド処理や Pronase 処理により透明帯を溶解させたり、透明帯と卵との隙間である囲卵腔にウイルス液を注入するなどして受精卵にウイルスベクターを感染させて行うことができる。

マウス受精卵は卵割を繰り返すことで2細胞期胚、4細胞期胚となり、最終的には胚盤胞期胚となる。また胚盤胞期胚では将来胎児になる内部細胞塊と、将来胎盤になる栄養外胚葉と大きく分けて2つの細胞が存在し、この時点で細胞の分化運命が定まっている。例えば透明帯を除去したマウス受精卵に GFP を発現するレンチウイルスベクターを感染させて胚盤胞期まで培養すると、内部細胞塊と栄養外胚葉の両方に GFP の発現が確認できる。またレンチウイルスベクターを胚盤胞期に感染させれば、外側の栄養外胚葉の細胞にのみウイルスが感染し遺伝子導入が可能となる²⁾。つまり胚盤胞の内部細胞塊には目的遺伝子が発現せず、将来胎盤となる栄養外胚葉にのみ GFP が発現する胚を作製可能となる。

GFP を発現するレンチウイルスベクターを感染させた胚を偽妊娠マウスの子宮に移植して、胎仔と胎盤を採取すると、受精卵時に感染させた場合は胎仔と胎盤の両方に発現が見られるのに対して、胚盤胞期胚に感染させた場合は GFP の発現が胎盤組織にのみ認められる²⁾。つまり内部細胞塊およびその後発生する胎仔組織には一切ウイルス感染は起こらず、胎盤にのみ目的遺伝子を導入することが可能である。遺伝子導入された胎盤切片を観察すると、マウス胎盤の3つの主要な細胞層を構成する栄養膜巨細胞層 (trophoblast giant cells)、海綿状栄養膜層 (spongiotrophoblast)、迷路層 (labyrinth layer) のすべてに遺伝子導入されていると同時に、全妊娠期間を



通して安定的に遺伝子発現ができる²⁾。

胎盤特異的な遺伝子発現補完／ 遺伝子機能喪失モデル

前述したように遺伝子機能を解析するために作製された KO マウスでは胎仔と胎盤の両方のゲノムが操作されているため、胚性致死という表現型を呈した場合、胎仔と胎盤のどちらで遺伝子欠損が起きたから致死となったのが不明のままである。これまで作製された KO マウスの中で胎盤形成異常により胚性致死を呈するものは *Mapk1* (*Erk2*), *Mapk14* (p38alpha), *Ets2* など数多く存在するが、レンチウイルスベクターを用いた胎盤特異的な遺伝子補完の実験によりそれぞれ責任遺伝子を発現させると、胎盤が正常化し、自然交配では決して得られない KO マウス新生児を得ることが可能となったことが報告された²⁾。また著書らはクローンマウスの過形成胎盤において発現異常が見られる *Plac1* (Placental specific protein 1) 遺伝子の KO マウスを作製し、胎盤のサイズが劇的に増加したことを見だし、さらに栄養交換機能の低下が起こり、大部分が胎生致死となることを見出した。そこで、著者らは *Plac1* を発現するレンチウイルスベクターを *Plac1* KO マウスの胚盤胞に感染させて胎盤特異的な遺伝子発現によるレスキュー実験を試みたところ、*Plac1* KO マウス胎盤の栄養交換機能が改善し胎生致死の表現型がレスキューされることを明らかにした⁵⁾。このことから、これら KO マウスの胚性致死の原因は胎盤異常による表現型であることが明らかになり、胎盤特異的な遺伝子発現補完による KO マウス胎仔の遺伝子治療が可能となることがわかった。

またレンチウイルスベクターを用いて胎盤特異的に遺伝子機能欠損を導入する手法も存在する。あらかじめ目的遺伝子領域を loxP サイトで挟んでおいたマウス胚盤胞に、Cre リコンビナーゼを発現するレンチウイルスベクターを感染させることで、胚移植後に採取した胎仔では遺伝子欠損が起こらず、胎盤にのみ遺伝子欠損を導入

することができる⁶⁾。これにより、Cre を発現させた胚盤胞と発現させていない胚盤胞を同時に偽妊娠マウスに移植することで同じ妊娠時における表現型を比較して解析することができる。この技術の注意点は、Cre リコンビナーゼは細胞毒性が高いため、インテグラーゼを不活性型にしたレンチウイルスベクター (integrase defective lentiviral vector; IDLV) により逆転写されたウイルスゲノムを宿主ゲノムに組み込ませず、一過性発現させる必要があることである。これにより胎盤特異的なコンディショナル KO マウスの作製が可能である。一方で特定の遺伝子に対する short hairpin RNA (shRNA) を発現するレンチウイルスベクターを用いることで胎盤特異的な遺伝子ノックダウンも導入できる。この系では野生型の胚盤胞にウイルスを感染させるだけで行えるため、胚盤胞への感染から移植後の胎盤の表現型をワンステップで行うことが可能である⁷⁻⁹⁾。

胎盤特異的な遺伝子操作による 栄養膜細胞の浸潤能解析

妊娠20週以降に高血圧を認める妊娠高血圧症候群は、胎盤の機能不全に起因する妊娠疾患の一つである。発症機序として胎盤内の浸潤性栄養膜細胞の不適切な分化や母体への浸潤不全が挙げられる。これにより子宮らせん動脈の拡張が不十分となり、胎盤内が低酸素状態になることで血管増殖因子受容体 VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) の可溶型 (sFLT1) が産生され、母体の血管内皮障害が起こることが発症の原因と考えられてつつある¹⁰⁾。しかしながら患者における栄養膜細胞の浸潤不全の原因は不明であり、適切な実験動物モデルがないためにそもそも正常な栄養膜細胞の分化・浸潤における詳細な分子機構の全容も明らかとなっていない。実験動物モデルとしてマウスは非常に有用であり、2011年には、ヒト sFLT1 をマウスの胎盤特異的に過剰発現させたモデルが作製され、妊娠後期の血圧上昇、尿タンパクの増加が認められた妊娠高血圧症候群モデルとして報

告された¹¹⁾。また別の報告では、*Atg7*というオートファジーに必須の遺伝子に対し、前述のCreリコンビナーゼを使った胎盤特異的コンディショナルKOモデルを作製したところ妊娠時の高血圧を呈し、オートファジー欠損による胎盤形成不全が妊娠時の高血圧を引き起こす原因の一つであることが示唆された¹²⁾。これらのことから、妊娠時の高血圧に関する表現型に関してはマウスモデルを用いて研究を行うことが可能である。しかしマウス胎盤では浸潤性栄養膜細胞が少なく、母体側組織へ浸潤する細胞もヒトに比べて限られているため、栄養膜細胞の浸潤に焦点を当てた研究を行うことは難しい¹³⁾。一方で同じげっ歯類であるラットは、栄養膜細胞の浸潤がより起こりやすく、子宮らせん動脈のリモデリングが顕著に見られる¹³⁾。そのためレンチウイルスベクターをラット胎盤に応用して、栄養膜細胞の浸潤性に焦点を当てた研究が行われている。著者らは浸潤性栄養膜細胞において抗血液凝固因子群が強く発現することを見だし、なかでも特に強い発現を示した*Tfpi* (tissue factor pathway inhibitor) に着目した。ラット胎盤における*Tfpi*の機能解析を行うため、shRNAを発現するレンチウイルスベクターを胚盤胞に導入することで、胎盤特異的*Tfpi*ノックダウンモデルを作製した。*Tfpi*ノックダウン群ではコントロール群に比べて胎仔と胎盤の重量が低下した。さらに栄養膜細胞の浸潤能を解析するため、*Tfpi*ノックダウン胎盤の免疫組織学的解析を行ったところ、サイトケラチン陽性の栄養膜細胞が子宮壁側まで到達できず、浸潤率が顕著に低下することがわかった¹⁴⁾。ところで過去に*Tfpi*KOマウスは胎齢9.5–11.5日程度で致死となる表現型が報告されており、著者らも以前から*Tfpi*KOラットを作製していたが、やはりラットでも胎齢10.5–12.5日頃に致死となることがわかった¹⁴⁾。ラット胎盤における栄養膜細胞の浸潤は胎齢14.5日頃から起こるため、それより前に致死となってしまうと栄養膜細胞の浸潤について解析を行うことができなくなる。今回の胎盤特異的な*Tfpi*ノックダウンモデルでは、胎仔側に表現型が現れず致死とならなかったため、胎盤にのみ焦点を当てて*Tfpi*が栄養膜細胞浸潤に機能することを明らかにできた。つまり通常であれば着床後早期に致死となる全身性KO個体では不可能であった栄養膜細胞の浸潤能における表現型解析が可能になったといえる。

終わりに

ゲノム編集技術により簡便に遺伝子機能欠失モデル動物を作製することが可能になっているが、作製した動物が妊娠時の胎盤形成以前に致死となってしまうと、胎盤機能に焦点を当てた研究を行うことが難しくなる。これは胎仔側の遺伝子機能破綻が原因で起こるが、胎盤特異的な遺伝子機能喪失モデルを用いることで胎仔側の致死性を回避しながら胎盤機能に関する表現型を解析することも可能になっている。近年発達が目覚ましいCRISPR/Cas9システムなどのゲノム編集技術は人工制限酵素が起こすDouble strand Breakによるものであり、リファレンスとなるオリゴDNAなどと同時に導入することで点変異を引き起こすことができる。本トピックスで紹介した研究で主に用いられているレンチウイルスベクターは人工制限酵素を発現させることもできるため、妊娠疾患患者において発見されている遺伝子変異を胎盤特異的に導入した動物モデルの作製も可能となり、今後の研究が期待される。

引用文献

1. Perez-Garcia V, Fineberg E, Wilson R (2018) Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. *Nature* 555 (7697), 463–468.
2. Okada Y, Ueshin Y, Isotani A, Saito-Fujita T, Nakashima H, Kimura K, Mizoguchi A, Oh-Hora M, Mori Y, Ogata M, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M (2007) Complementa-tion of placental defects and embryonic lethality by tro-phoblast-specific lentiviral gene transfer. *Nat Biotechnol* 25 (2), 233–237.
3. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vec-tor with a conditional packaging system. *J Virol*, 72 (11), 8463–8471.
4. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72 (10), 8150–8157.
5. Muto M, Fujihara Y, Tobita T, Kiyozumi D, Ikawa M (2016) Lentiviral Vector-Mediated Complementa-tion Restored Fetal Viability but Not Placental Hyperplasia in Plac 1-Deficient Mice. *Biol Reprod* 94 (1), 6.
6. Morioka Y, Isotani A, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M (2009) Placenta-specific gene activation and inactivation us-ing integrase-defective lentiviral vectors with the Cre/LoxP system. *Genesis* 47 (12), 793–798.
7. Zhou Z, Zhang Q, Lu X, Wang R, Wang H, Wang YL, Zhu C, Lin HY, Wang H (2013) The proprotein convertase furin is required for trophoblast syncytialization. *Cell*

- Death Dis 4 (4), e593.
8. Zhang Q, Yu S, Huang X, Tan Y, Zhu C, Wang YL, Wang H, Lin HY, Fu J, Wang H (2015) New insights into the function of Cullin 3 in trophoblast invasion and migration. *Reproduction* 150 (2), 139–149.
 9. Lee DS, Rumi MAK, Konno T, Soares MJ (2009) In vivo genetic manipulation of the rat trophoblast cell lineage using lentiviral vector delivery. *Genesis* 47 (7), 433–439.
 10. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1(sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111 (5), 649–658.
 11. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M (2011) Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (4), 1451–1455.
 12. Aoki A, Nakashima A, Kusabiraki T, Ono Y, Yoshino O, Muto M, Kumasawa K, Yoshimori T, Ikawa M, Saito S (2018) Trophoblast-specific conditional Atg7 knockout mice develop gestational hypertension. *Am J Pathol* 188 (11), 2474–2486.
 13. Ain R, Canham LN, Soares MJ (2003) Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol* 260 (1), 176–190.
 14. Muto M, Chakraborty D, Varberg KM, Moreno-Irusta A, Iqbal K, Scott RL, McNally RP, Choudhury RH, Aplin JD, Okae H, Arima T, Matsumoto S, Ema M, Mast AE, Grundberg E, Soares MJ (2021) Intersection of regulatory pathways controlling hemostasis and hemochorial placentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 118 (50), e2111267118.