

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小田 真由美

エピジェネティクスとは「細胞世代を超えて、DNA の塩基配列を変えることなく継承される遺伝子機能について研究する学問分野」を意味する。DNA メチル化は、エピジェネティクス機構の中心で遺伝子のサイレンシングに関与し、調節領域がメチル化されていると、転写因子の有無にかかわらず遺伝子発現のスイッチは切れた状態に保たれる。哺乳類の発生に重要な胎盤の主要な部分は、発生開始後、最も初期に胚体細胞と分かれる栄養膜細胞により形成される。本研究は、マウスを用いて通常の発生と体細胞核移植による個体発生について、特に胎盤栄養膜細胞に焦点をあて、エピジェネティクスの観点から解析した結果を論じたもので2章より構成されており、要約すれば以下ようになる。

第1章では、まず、DNA メチル基転移酵素 1 (*Dnmt1*)変異マウスの胎盤の形態学的・生化学的解析が行われた。*Dnmt1* の低活性型アリル (*Dnmt1^{ln}*)をホモに持つマウス胚 (*Dnmt1^{ln/ln}*)は妊娠 8 日目より成長遅延を起こし 11 日前後に胚性致死となる。*Dnmt1^{ln/ln}*マウスの妊娠 8-10 日目の胎盤組織を観察したところ、胎盤組織の基本構造は形成されていた。*in situ* ハイブリダイゼーション法により *Dnmt1^{ln/ln}*マウス胎盤組織の遺伝子発現解析を行った結果、3種の栄養膜細胞サブタイプ (栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜細胞、迷路部栄養膜細胞)のマーカージェネティックである placental lactogen-1 (*Pl-1*), trophoblast specific protein (*Tpbp*), transcription factor EB (*Tfeb*) 等の遺伝子発現部位及び発現時期に異常は無かった。さらに BrdU の取り込みと TUNEL 法により胎盤組織における細胞増殖・細胞死を調べたが、正常胎盤と比較して異常は認められなかった。以上の様に、胎盤を構成する栄養膜細胞の分化および分化後の細胞の増殖・生存には *Dnmt1* の活性低下は大きな影響はなかった。*Dnmt1^{ln/ln}*マウスの栄養膜細胞では、増殖分化を司るゲノム領域のメチル化パターンは保たれている可能性が考えられた。そこで、*Dnmt1* の活性低下により栄養膜細胞のゲノム DNA メチル化パターンが、実際にはどの程度変化しているのかを解析するため、*Dnmt1^{ln/ln}*胚盤胞から栄養膜細胞の分化過程を *in vitro* で再現できる栄養膜幹細胞 (TS 細胞)株の樹立を試みた。初代培養により、*Dnmt1^{ln/ln}*胚からも、野生型胚からと同様の形態を持つ TS 細胞様のコロニーが僅かに得られた。ところが、*Dnmt1^{ln/ln}* TS 様細胞は増殖を続けられず、長期にわたる培養は不可能だった。以上より、胎盤発生でも幹細胞の増殖において *Dnmt1* によるメチル化修飾が重要な役割を果たしていることが示された。これらより、*Dnmt1* の重要性は細胞系列・ステージ特異的に変化していることがわかった。

第2章では、体細胞核移植により作出されたクローン胚からの TS 細胞株の分離・樹立が行われた。卵丘細胞の核を未受精卵に移植して得られた胚のうち、胚盤胞様に発生した 77 個のクローン胚を TS 細胞樹立に用いた。クローン胚盤胞からは、自然交配により得られた胚盤胞を用いた場合とほぼ同じ割合で TS 細胞様コロニーが見いだされた。これらの一部を継代して樹立した TS 細胞株 (ntTS 細胞; M9#3, M12#3, M12#12) を用いて、栄

養膜細胞分化マーカー遺伝子の発現を指標に *in vitro* での分化能を調べた。正常 TS 細胞では、分化誘導後一過的に *Mash2* の発現が上昇するが、M12#12 株では分化 8 日目まで高いレベルでの発現が維持されていることがわかった。*Mash2* は胎盤の海綿状栄養膜細胞分化と増殖に重要であることが知られているので、クローン胎盤における海綿状栄養膜細胞の過形成との関連が示唆される。胎盤の胎仔血管網の形成に必須である *Gcm1* の発現も通常分化 2 日目にピークがあるが、M9#3 および M12#3 株ではそのピークが 2 日遅れることから、これらの由来する胚は正常に発生できなかった可能性が高い。最後に、多数の遺伝子発現を一挙に解析する DNA チップ法を用いて、ntTS 細胞における遺伝子発現が解析され、ntTS 細胞株に共通してインプリント遺伝子 *Igf2r* の発現低下 (対照細胞株の約 1/10 以下の発現量) がみられることが明らかになった。また、複数の ntTS 細胞株に共通して、*Tssc3/Ipl*、*Meg1/Grb10*、*Cdkn1c/p57kip2* など他のインプリント遺伝子の発現低下も見られた。これら遺伝子発現の変化については、ノーザン法解析でも確認された。

以上より、本研究では、*Dnmt1* 低活性型マウス胚と体細胞核移植クローンマウス胚由来の TS 細胞の樹立を行い、DNA メチル化による胎盤発生のエピジェネティクス制御系の重要性を明らかにした。これらの発見と概念の提示は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論分が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。