

# 胎盤のエンハンサー立体構造解明と疾患原因遺伝子探索

東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野

小林 枝里

## 【研究成果の概要】

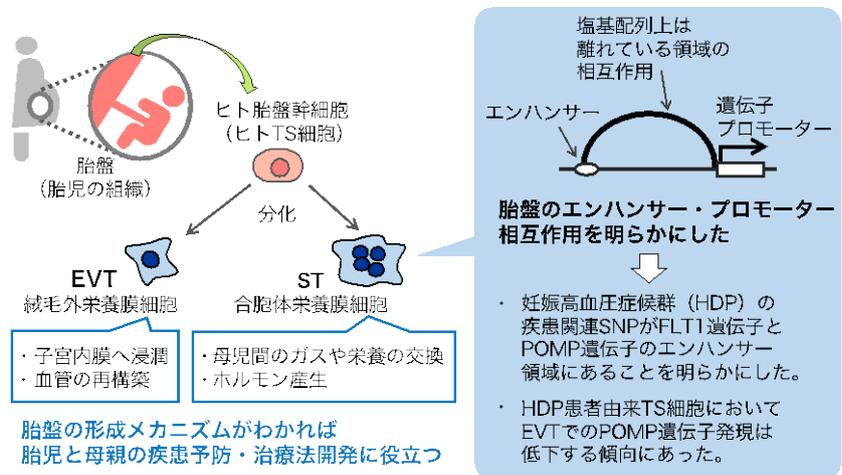
近年の晩婚化による高齢妊娠や生殖補助医療の普及に伴い、胎盤異常を示す周産期合併症の頻度は年々増加傾向にある。これらの疾患の発症には、胎盤を構成する栄養膜細胞の分化異常が関与することが指摘されているが、詳細な分子メカニズムは不明で、有効な治療法も確立されていない。通常、細胞の分化は、転写因子が結合するエンハンサー領域がDNAの立体構造を介して遺伝子の転写開始点に結合し、適切な発現を促すことで制御される。こうしたエンハンサー領域は標的遺伝子から数百kb以上離れていることもあり、転写因子の標的遺伝子の同定や分化制御機構の理解を難しくしている。また、疾患リスクと相関する一塩基多型 (SNP) のほとんどは遺伝子間領域に位置し、エンハンサー機能の変化を介して疾患責任遺伝子の発現を制御すると考えられているが、SNPを含むエンハンサー領域と標的遺伝子が離れているために、疾患責任遺伝子の特定が困難であることも多い。したがって、プロモーター・エンハンサー相互作用の解析は、分化制御メカニズムの理解に役立つだけでなく、ゲノムワイド関連解析データを利用した疾患責任遺伝子の探索にも有用である。当研究室では最近、ヒト胎盤幹 (TS) 細胞を樹立し、世界で初めてヒト栄養膜細胞のin vitroでの分化誘導や遺伝子改変方法を確立している (Okao H et al., Cell Stem Cell, 2018)。本研究では、このヒトTS細胞を用いて、分化した栄養膜細胞のエンハンサー立体構造を明らかにした。その結果、従来のChIP-seq解析では見つかっていなかった転写因子の標的遺伝子を明らかにするとともに、妊娠高血圧症候群 (HDP) の疾患リスク遺伝子座と近接する新規の責任遺伝子候補を見出した (図1)。さらに、HDP疾患TS細胞を樹立し、このHDP新規標的候補遺伝子がHDP患者由来の細胞で発現低下する傾向にあることを見出した。これらの成果は、HDPの病態の理解に役立つだけでなく、妊娠中の医薬品開発や胎児毒性試験法の開発に発展できる可能性があり、子育て世代の働く女性の健康への貢献が期待できる。

## 【方法と結果】

### 1) プロモーター・エンハンサー相互作用の解析

栄養膜細胞のプロモーター・エンハンサー相互作用を網羅的に明らかにするため、ヒトTS細胞を絨毛外栄養膜細胞 (EVT) もしくは合胞体栄養膜細胞 (ST) に分化誘導し、HiChIP解析を行った。具体的には、細胞を固定し、ゲノムDNAを制限酵素により切断した後、空間的に近接していたDNA同士を融合させ、転写開始点に特異的なヒストン修飾であるH3K4m3に対する免疫沈降の後にNGS解析を行なって、遺伝子のプロモーターと空間的に近接していたゲノム領域を網羅的に明らかにした。

栄養膜細胞分化に重要なGCM1転写因子の標的遺伝子について解析したところ、GCM1ノックアウト細胞で発現低下する遺伝子の多くは、GCM1の結合部位と長距離相互作用していることが明らかになった。それらのうち数百遺伝子は、プロモーターの10 kb以内に有意な転写因子結合部位を持たず、転写因子が結合するエンハンサー領域と遺伝子プロモーターの長距離相互作用によって制御される標的遺伝子であった (図2)。このことから、プロモーター・エンハンサー相互作用データの利用によって、ChIP-seq等の従来法では見過ごされていた遺伝子制御メカニズムを発見できることが確認できた。



### 図1 研究の概要

本研究では、胎盤を構成する細胞のエンハンサー・プロモーター相互作用を網羅的に明らかにし、ゲノムワイド関連解析の結果を利用して、妊娠高血圧症候群 (HDP) 責任遺伝子の検討を試みた。ヒト胎盤から樹立された胎盤幹細胞 (TS細胞) を絨毛外栄養膜細胞 (EVT) および合胞体栄養膜細胞 (ST) に分化誘導し、HiChIP法を用いてエンハンサー・プロモーター相互作用を明らかにすることで、HDPの疾患リスクと相関が報告されている一塩基多型 (SNP) がFLT1遺伝子およびPOMP遺伝子のエンハンサー領域にあることを見出した。

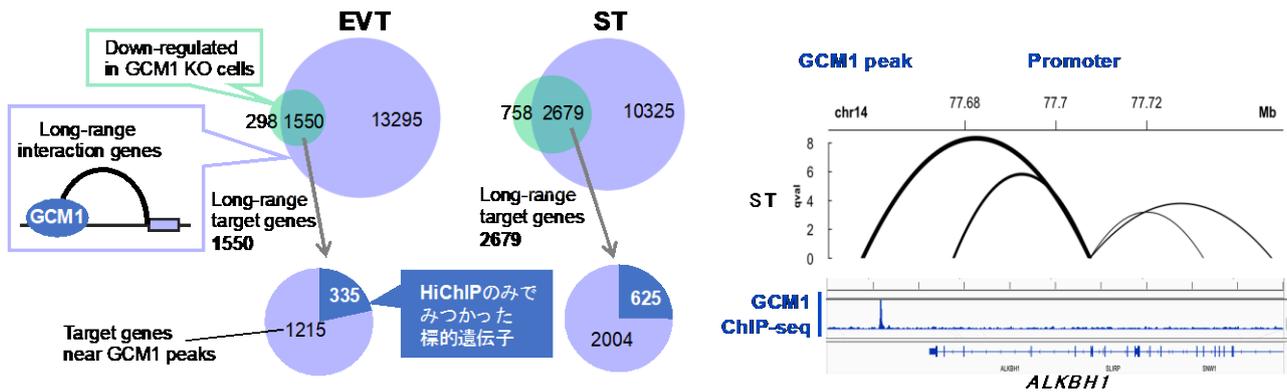


図2 エンハンサー・プロモーター長距離相互作用を介した転写因子標的遺伝子の発見

EVT、ST両方の分化に重要なGCM1転写因子の標的遺伝子について、20 kb以上の長距離相互作用を介して発現制御されている遺伝子を探した。GCM1ノックアウト細胞で発現低下し、かつGCM1結合部位と長距離相互作用する遺伝子のうち、EVTで335遺伝子、STで625遺伝子は、転写開始点から10 kbにはGCM1結合部位を持たず、HiChIP解析によってはじめて見つかったGCM1標的遺伝子である。GCM1結合部位と長距離相互作用を示す遺伝子の一例を右図に示す。

## 2) HDP責任遺伝子座のプロモーター・エンハンサー相互作用の検討

次に、このプロモーター・エンハンサー相互作用データを利用して、周産期疾患責任遺伝子の検討を試みた。HDPは胎盤の形成異常に関連する疾患の一つであり、栄養膜細胞の子宮内膜への浸潤やEVTによる母体血管のリモデリング不全が原因と考えられている。ゲノムワイド関連解析からは、血圧を上昇させる因子であるsFLT1をコードするFLT1遺伝子近傍のSNPが、HDPの疾患リスクと関連することが報告されている (McGinnis et al., Nature Genet., 2017)。しかし、この疾患関連SNPはFLT1遺伝子とPOMP遺伝子の間に位置し、FLT1遺伝子の発現に影響している証拠は得られていなかった。

本研究で得られたプロモーター・エンハンサー相互作用のデータからは、疾患関連SNPを含むエンハンサー領域がFLT1遺伝子のプロモーターと相互作用することが確認された。これは、FLT1がHDPの責任遺伝子であることを裏付ける結果である。

さらに、このHDP関連SNPを含むエンハンサー領域がPOMP遺伝子のプロモーターと相互作用することを新たに見出した (図3)。POMPは免疫プロテアソームの形成に必要なシャペロンであり、免疫プロテアソームの構成遺伝子をノックアウトしたマウスではMHC ClassI分子の発現低下が報告されている (Kincaid et al., Nat. Immunol., 2012)。MHC classIは、子宮内膜に浸潤するEVTが母体側の免疫細胞と相互作用するのに重要な分子であることから、HDP患者の胎盤では、POMP遺伝子の発現異常が、胎盤形成を補助する母体の免疫細胞との細胞間コミュニケーションを阻害し、不完全な胎盤形成によって後の胎盤内低酸素状態を引き起こし、低酸素依存的に誘導されるsFLT1などの血圧上昇因子の発現につながっている可能性がある。

## 3) HDP患者由来TS細胞の樹立と発現解析

プロモーター・エンハンサー相互作用解析の結果から、HDP患者の胎盤ではPOMP遺伝子の発現異常が起きている可能性が考えられたが、POMP遺伝子がさまざまな細胞種に発現していること、胎盤を用いた既存の遺伝子発現データでは栄養膜細胞の他にも血管や免疫細胞などが混在していることから、栄養膜細胞における発現の検討が困難であった。そこで、HDP患者の胎盤からTS細胞を樹立し、HDP胎盤におけるPOMP遺伝子の発現について検討した。

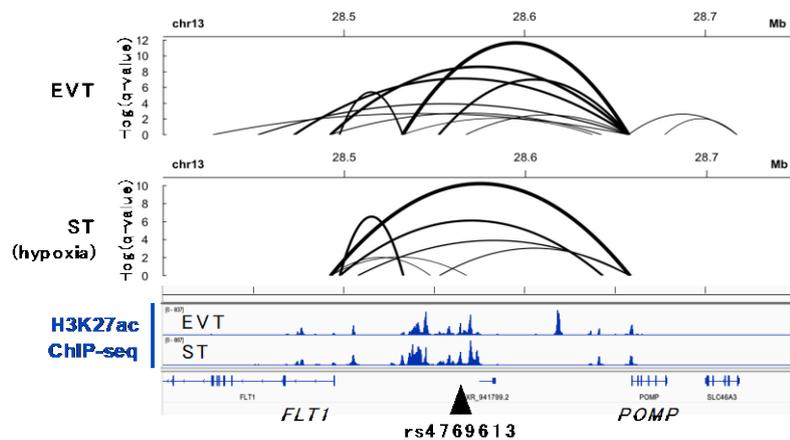
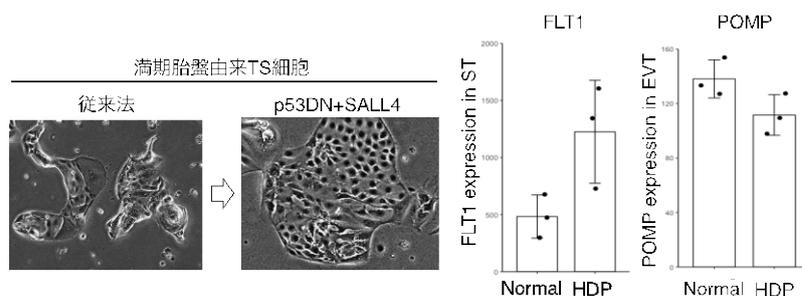


図3 HDPリスク遺伝子座のエンハンサー・プロモーター相互作用

HDP発症リスクとの相関が報告されているSNPであるrs4769613と、周辺の遺伝子のエンハンサー・プロモーター相互作用。rs4769613はH3K27ac陽性のエンハンサー領域に位置し、既知のHDP原因遺伝子であるFLT1およびイムノプロテアソームのシャペロンであるPOMP遺伝子と長距離相互作用を示す。

従来のヒトTS細胞は妊娠初期の胎盤より樹立していたが、HDPの診断後に得られる胎盤は、妊娠中期以降の胎盤である。これまでと同様の方法を用いた場合、妊娠中期以降の胎盤由来のTS細胞は、初期胎盤由来のTS細胞と明らかに形態が異なっており、細胞老化を起していることも判明した。そこで、細胞老化抑制に作用するp53ドミナントネガティブ変異体

(p53DN)と同時に3種類の転写因子をそれぞれ満期の栄養膜細胞に遺伝子導入した。その結果、SALL4を導入した場合に限り、TS細胞様の形態を示す細胞株が得られた。また、この満期TS細胞の細胞分化能について解析したところ、ST細胞、EVT細胞へ正常に分化することが明らかとなった(図4)。SALL4を導入した満期TS細胞の遺伝子発現についてPCA解析を行い、SALL4を導入した満期TS細胞は、本来のTS細胞の遺伝子発現パターンと類似していることを確認した。この改良法で樹立したHDP胎盤由来TS細胞の遺伝子発現について検討したところ、正常TS細胞と比較して、STでのFLT1遺伝子発現は上昇傾向にあり、EVTでのPOMP遺伝子発現は低下する傾向にあった。このことから、FLT1とPOMPが共にHDP胎盤で発現異常を呈することが示唆される。今後、さらに多くのHDP症例について疾患特異的TS細胞の樹立と遺伝子発現解析を進めることで、HDP胎盤におけるPOMPの発現異常について明らかにできると考えている。



**図4 SALL4-p53DNを用いた満期胎盤由来TS細胞の樹立**

HDP患者から入手可能な妊娠中期以降の胎盤からは、従来の方法ではTS細胞が樹立できなかった。p53DNとSALL4を導入する改良法によってHDP患者由来の胎盤からもTS細胞樹立が可能になった(左図)。こうして樹立された満期胎盤由来のTS細胞はEVTおよびSTへの分化能を持ち、HDP患者由来TS細胞から分化されたEVTではPOMP遺伝子の発現低下傾向が見られた(右図:TPMを示す)。

### 【考察】

HDPは、全世界で年に約5万人もの妊産婦死亡を引き起こし、軽症の場合も安静指示によって仕事との両立が妨げられるなど、人々が安心して子供を産み育てられる社会の実現に向けて克服されるべき疾患である(Mol et al., Lancet, 2016)。周産期疾患の発症機序を解明するには胎盤形成メカニズムの理解が不可欠であるが、胎盤は動物種によって構成する細胞や遺伝子発現が大きく異なるため、マウスなどの実験動物で得られた知見をヒトに当てはめることが難しい。実験動物での再現が難しく、胎盤形成時期の患者由来検体の取得も実質的に不可能な胎盤関連疾患において、患者由来細胞の利用とゲノムワイド関連解析データの有効利用は重要な課題である。本研究で得られたプロモーター・エンハンサー相互作用データは、HDPのみならず、流産や早産、胎児発育不全、絨毛癌など、胎盤の異常に起因するさまざまな疾患の研究に役立つと期待される。

特に、HDP関連SNPとPOMP遺伝子プロモーターの相互作用は興味深い発見である。HDP患者由来EVTで見られたPOMP遺伝子の発現低下傾向は、EVTのMHC class I発現や、MHC上に提示されるペプチドレパートリーの変化につながることで予想され、子宮内膜に浸潤するEVTに対する母体免疫寛容や、浸潤促進作用の阻害を介してHDPの病態形成に関与している可能性がある。今後は、さらに多くのHDP症例について疾患特異的TS細胞の樹立を進めるとともに、胎盤におけるPOMP遺伝子の機能解析を進め、HDP発症機序の理解につなげたい。

本研究で実現したHDP患者由来TS細胞の樹立により、遺伝子発現だけでなくHDP患者由来栄養膜細胞の分化能や浸潤能、母体免疫細胞との相互作用などについて正常細胞と比較できるようになったことは、胎盤関連疾患の発症機序を理解するうえで大きな進展である。今後はより多くの症例についてHDP患者由来TS細胞の樹立と解析を進め、胎盤形成異常の原因となるHDP患者由来TS細胞の機能破綻を明らかにするとともに、薬剤スクリーニングなどにより、HDP患者由来TS細胞の異常を回復させる方法についても検討していきたい。

### 【謝辞】

本研究助成を採択いただいたアステラス病態代謝研究会に心より感謝いたします。また、共同研究者である熊本大学発生医学研究所 岡江寛明教授と、東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野の研究室の皆様、貴重な検体をご提供いただきました患者様、ご家族様に感謝申し上げます。