

## 胎盤特異的な遺伝子操作技術の開発とその有用性評価

岡田 裕香

## Development and Evaluation of a Novel Placenta-specific Gene Manipulation Method Using Lentiviral Vectors

Yuka OKADA

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita City 565-0871, Japan

(Received March 11, 2008)

The placenta plays numerous important roles to support fetal development such as gas exchange, nutrient supply, and hormone production. Placental defects underlie many aspects of pregnancy losses and complications; thus understanding and regulating gene function during placentation is of high clinical relevance. However, the lack of a facile and efficient method for placenta-specific gene manipulation has hampered study of the placenta. We have previously shown that transduction of fertilized mouse eggs with lentiviral (LV) vectors efficiently generates transgenic animals; however, transgene expression occurred in both the fetus and the placenta. In the present study, we transduced zona-free blastocysts with LV vectors expecting placenta-specific gene expression, since most placental cells differentiate from trophoblast cells that form the outermost layer of the blastocyst. Transgene expression was observed in trophoblast cells from preimplantation stages and in the placenta throughout gestation. All the analyzed placentas carried the transgene, while none of the fetuses became transgenic. By applying this method, embryonic lethality caused by placental defects in several knockout animal models was substantially rescued. This technology provides a powerful system for gene manipulation exclusively in placental organogenesis with implications for the treatment of placental dysfunction.

**Key words**—lentiviral vector; placenta-specific gene manipulation; blastocyst; trophoblast; gene therapy

## はじめに

胎盤は、妊娠時にのみ形成される特殊な臓器であり、母体と接して相互作用することにより妊娠の維持や胎児の発生に重要な役割を担っている。胎盤の機能や形成機構に関する研究は、ヒトの不妊・不育や、クローン動物を含めた家畜における流産の原因解明などの観点から社会的要求性が高いが、適当な実験系が確立されていないことが大きな障壁となり、分子生物学的な研究が立ち遅れている。実際、これまでの胎盤研究では解剖学的・形態学的な解析が主流となってきたが、近年の飛躍的なゲノム研究の発展を受け、遺伝子レベルでの研究方法の開発が急務とされている。最近では遺伝子操作動物を利用した研究も試みられているが、既存のトランスジェ

ニックやノックアウトといった技術では胎盤のみならず胎児の遺伝子も操作されてしまうため、胎盤に対する影響を正確に評価することはできない。

このような背景を踏まえて筆者らは、胎盤特異的に遺伝子操作できる全く新しい技術を開発し、さらに、その技術が胎盤における遺伝子機能解析ツールとして極めて有用であることを明らかにした。<sup>1)</sup>以下に、その研究成果について紹介する。

## 1. 遺伝子導入用ベクター

遺伝子導入用ベクターとしては、第3世代レンチウイルス (LV) ベクター [Fig. 1(a)]<sup>2,3)</sup>を利用した。LVベクターはレトロウイルスベクターの一種であり、感染した細胞のゲノムに組み込まれることで長期的に遺伝子を発現できる。さらに、レトロウイルスベクターにより導入された遺伝子が発現抑制を受け易いものに対して、LVベクターを用いた場合には *in vivo* においても安定した遺伝子発現が可能であることが報告されている。<sup>3-5)</sup>

筆者らはこれまでに、VSVG (vesicular stomatitis

大阪大学微生物病研究所附属感染動物実験施設 (〒565-0871 吹田市山田丘 3-1)

e-mail: okada@gen-info.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成19年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

virus G glycoprotein) のエンベロープを使用することで感染域を広げるとともに物理的な強度を付加し、超遠心により濃縮した LV ベクターを発生工学的な研究に応用してきた。一連の研究の中で、酸性タイロイド液で処理して透明帯を除去した受精卵又は 2 細胞期胚 (2-cell) に LV ベクターを感染させることで、効率よくトランスジェニックマウスが作製できることを報告しており [Fig. 1 (b)],<sup>2)</sup> LV ベクターがマウス初期胚への遺伝子導入に優れたベクターであることを明らかにしている。透明帯はウイルスの感染に対する物理的な障壁となるため、それを除くことが重要なポイントである。

これらの知見を基に本研究では、新たに胎盤特異的な遺伝子導入法の開発を試みた。

## 2. 胎盤特異的な遺伝子導入法の開発

胎盤特異的な遺伝子導入法を開発するに当たり、2-cell からさらに発生が進んだ胚盤胞期胚 (胚盤胞) に着目した。マウス初期胚の発生においては胚盤胞で最初の細胞分化が起こり、将来胎児に発生する内部細胞塊 (inner cell mass; ICM) と、胎盤を形成する栄養外胚葉層 (trophoblast; TE) が生じる [Fig. 1 (c)]。このとき、TE は ICM を包み込む構造を取るため、胚盤胞を LV ベクター溶液中に入れると外側の TE のみに感染が起こり、その結果、胎盤特異的な遺伝子発現につながるのではないかと考えた [Fig. 1 (b)]。実際に、透明帯を除去した胚盤胞に、レポーターとして enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現する LV ベクター (LV-EGFP) を感染させたところ、ICM には全く蛍光が検出されず、TE のみで EGFP の発現が観察された [Fig. 1 (d)]。注目すべき点として、感染後わずか 6 時間で十分に遺伝子が発現していた。胚盤胞はこの後、子宮に着床して発生するため、着床に関連する因子を遺伝子レベルで解析できる新しい技術としても期待できる。さらに、これらの胚盤胞を偽妊娠マウスに移植し、胎盤の構造がほぼ完全にでき上がる胎生 14.5 日目に解剖したところ、解析したすべての個体において胎盤のみに EGFP が発現していた [Fig. 1 (e)]。このとき、移植した胚の発生率は未処理の場合と同等であり、LV ベクターを感染させても胚が傷害を受けることはなかった。胎児に遺伝子が導入されていないことは、ゲノムの polymerase chain reaction (PCR) 解析によっても確認

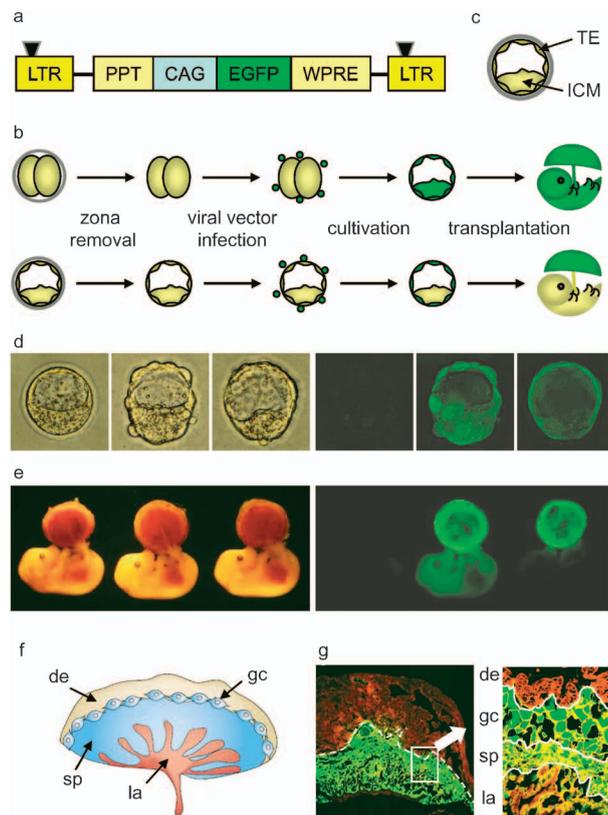


Fig. 1. LV Vector Transduction of Blastocysts Results in Placenta-specific Gene Expression

(a) LV-EGFP, a self-inactivating type of LV vector, expressing EGFP under the CAG promoter was prepared as previously reported.<sup>1)</sup> PPT: a central polypurine tract of HIV-1, WPRE: woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element, LTR: long terminal repeat, ▼: self-inactivating mutations in the LTR. (b) A scheme for the transduction of preimplantation embryos. After removal of the zona pellucida, 2-cell stage (top) or blastocyst stage (bottom) embryos were incubated with LV vectors and then implanted into pseudopregnant females. (c) Two distinct cell lineages appear at the blastocyst stage. TE: trophoblast (future placenta), ICM: inner cell mass (future fetus). (d) Transgene expression before implantation. Whereas blastocysts developed after transduction at the 2-cell stage expressed EGFP in the ICM and TE (middle), transduction of blastocysts resulted in TE-specific expression (right). Left: untransduced control. (e) Transgene expression after implantation. Embryos recovered at E14.5 after transferring untransduced embryos (left), embryos transduced at the 2-cell stage (middle) and embryos transduced at the blastocyst stage embryos (right). (f) Simplified figure of placental structure. de: decidua, gc: giant cell, sp: spongiotrophoblast, la: labyrinth. (g) Merged image of phalloidin staining (red) and EGFP fluorescence (green) of a placental section at E10.5 after blastocyst transduction. The right panel is a magnified view of the area boxed in the left panel.

できた。また、胎盤は、母体由来の decidua に接する側から大きく分けて、giant cell, spongiotrophoblast, labyrinth の 3 種類からなる複雑な構造をしているが [Fig. 1 (f)], 切片を作製して詳細に解析した結果、3 層すべてに EGFP が発現しており、胎盤全体に効率よく遺伝子が導入されていた [Fig. 1 (g)]。これに対し、2-cell に LV-EGFP を感染させた場合には、胚盤胞に発生した時点で ICM と TE

の両方に緑色蛍光が観察され [Fig. 1(d)], この結果を反映して, 胎児・胎盤の両方に遺伝子が導入されていた [Fig. 1(e)].

以上の結果から, 透明帯を除去した胚盤胞に LV ベクターを感染させることで, 胚にダメージを与えることなく胎盤特異的に遺伝子操作できることが明らかとなった. この技術を利用すれば, 胎盤特異的に 1 種類又は複数の遺伝子を導入し, それらの遺伝子が胎盤の構造や機能に与える影響を簡便に評価することが可能であるため, 遺伝子レベルでの胎盤研究に大きく貢献できると考えられる. 次項に, その具体例の一部を紹介したい.

### 3. 胎盤特異的な遺伝子操作技術の応用

近年, ノックアウトマウスが次々と作製され, 多くの遺伝子の機能が個体レベルで解明されつつあるが, 実際には, 胚性致死となるために生後解析を行えない例が多く存在する. 胚性致死の原因としては第一に, ターゲットの遺伝子が胎児の生存に必須であることが予想されるが, それ以外に, 胎盤の機能不全を引き起こすことにより胎児の発生を正常にサポートできない可能性も考えられる. 実際に, 胎盤異常が原因で胚性致死となるようなノックアウトマウスの系統が 100 ライン以上も報告されている.<sup>6,7)</sup> これらのマウス系統では, 胎盤の機能を正常に回復させることで産仔が得られる可能性があるため, 今回開発した方法を用いて欠損している遺伝子を胎盤特異的に補い, 胎盤の機能回復並びにノックアウトマウスの作出を試みた.

転写因子 *Ets2* (*E26 avian leukemia oncogene 2,3' domain*) のノックアウトマウスは, 胎盤形成に寄与する栄養膜細胞の増殖不全により胎生 8.5 日目までに致死となることが報告されている.<sup>8)</sup> そこで, *Ets2* ノックアウトマウスの胚盤胞に *Ets2* を発現する LV ベクター (LV-*Ets2*) を感染させて偽妊娠マウスに移植したところ [Fig. 2(a)], 胚の発生が野生型と同程度にまで回復し [Fig. 2(b)], 自然交配又は, コントロールベクターとして LV-EGFP を感染させた場合には全く得られないホモ欠損マウスを 24 匹も産ませることに成功した [Fig. 2(c), Table 1]. PCR 解析を行った結果, トランスジーンは胎盤のみに検出され, 産仔には全く遺伝子が導入されていない [Fig. 2(d)]. 以上の結果から, 欠損している遺伝子を TE のみに発現させることで, 胎

盤の初期発生における異常を回復できることが示された. 誕生したホモ欠損マウスは, 毛穴の異常が原因で体毛がウエーブするという表現型を示すものの正常に発育し [Fig. 2(e)], 雌雄とも妊孕性を示した. 今回開発した技術を利用することで, これまで胚性致死の影に隠れていた表現型が解析可能となるため, 個体レベルでの遺伝子機能解析に大きく貢献できると考えられる.

さらに, 別の原因で胎盤異常となる例として, labyrinth 層が極めて薄くなり, 胎生 10.5 日目までに致死となる *Mapk14* (*mitogen-activated protein kinase 14*) ノックアウトマウス<sup>9-11)</sup> についても同様の検討を行った. その結果, 胎盤特異的に *Mapk14* を補うことで labyrinth 層の厚さが回復し, それに伴って胎児も正常に発生してホモ欠損マウスが誕生した [Fig. 3(a)-(c), Table 1]. これは, 前述の *Ets2* ノックアウトマウスの結果と同様であり, 欠損している遺伝子そのものを胎盤特異的に補うことで胎盤の機能を回復できることが, 複数の遺伝子について確認された.

次に, 新たな試みとして, 胎盤機能における *Mapk* アイソフォームの関係を検討した. MAPK11 と MAPK14 はアミノ酸レベルで 74% という比較的高い相同性を有するが, MAPK14 が胎盤に豊富に存在するのに対して, MAPK11 はほとんど発現していない.<sup>12,13)</sup> そこで, *Mapk14* ノックアウトマウスの胎盤に *Mapk11* を導入したところ, *Mapk14* を導入した場合と同様に胎盤が正常に形成され, 産仔が得られた [Fig. 3(a)-(c), Table 1]. このことから, 「胎盤において, *Mapk11* は *Mapk14* の機能を相補できる」という新しい事実が明らかとなった. どのようなメカニズムでこれらの制御が行われているかについては今後の検討課題であるが, 胎盤における遺伝子機能を解析するための新しいアプローチを提案できたものとする. 今回はアイソフォームの解析を行ったが, 何種類ものポイントミューテーションやディリーションミュータントの機能解析など, 様々な応用が期待される.

### おわりに

近年の遺伝子工学技術の目覚ましい進歩に伴い, 胎盤への遺伝子導入に関しても種々の検討が行われている. 代表的な例として, ウイルスベクターを用いた胎盤や子宮内腔への局所投与, 胎盤特異的なプ

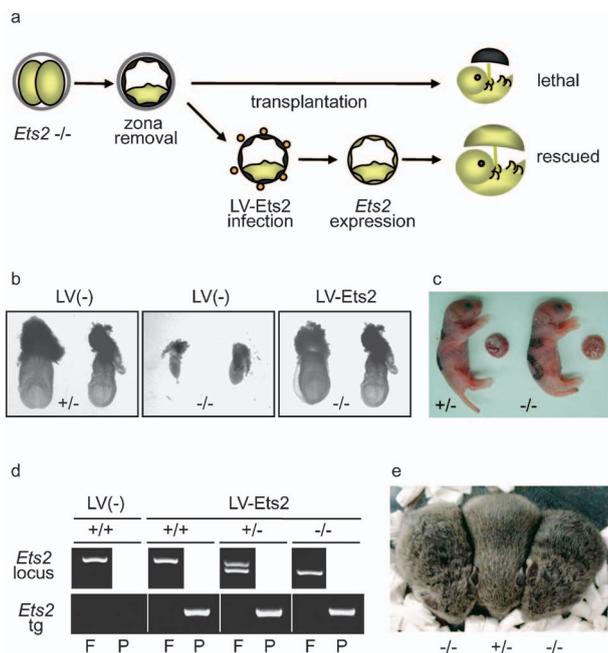


Fig. 2. Restoration of Placental Defects and Embryonic Lethality in *Ets2*  $-/-$  Mice by Placenta-specific Gene Expression

(a) A scheme for the placental gene therapy. To determine whether lethality in *Ets2*  $-/-$  mice can be rescued, mutant blastocysts were transduced with a LV-*Ets2* and then implanted into pseudopregnant females. (b) E7.5 embryos after LV-*Ets2* treatment. (c) Live *Ets2*  $-/-$  pups obtained by LV-*Ets2* treatment. (d) Fetal (F) and placental (P) tissue were subjected to PCR analysis for transgene detection. The LV vector transgene was detected only in the placenta. tg: transgene. (e) Rescued *Ets2*  $-/-$  mice showed wavy hair.

Table 1. Genotypes of Newborn Pups after LV Vector Transduction

Deficient gene	Treatment	Genotypes of newborn pups			Total
		+/+	+/-	-/-	
<i>Ets2</i>	(-)	19	37	0	56
	LV-EGFP	14	30	0	44
	LV- <i>Ets2</i>	45	84	24	154
<i>Mapk14</i>	(-)	16	33	0	49
	LV- <i>Mapk14</i>	51	100	29	180
	LV- <i>Mapk11</i>	31	59	16	106

Preimplantation embryos collected from heterozygous intercrosses were transduced with LV vectors at blastocyst stage and implanted into pseudopregnant females.

ロモーターの利用などが挙げられるが、胎盤組織に対するダメージが大きく、遺伝子発現の強さや特異性が十分でないといった問題点が山積しており、現時点では満足いく技術の開発には至っていない。<sup>14,15)</sup> 本研究では、このような状況を打開すべ

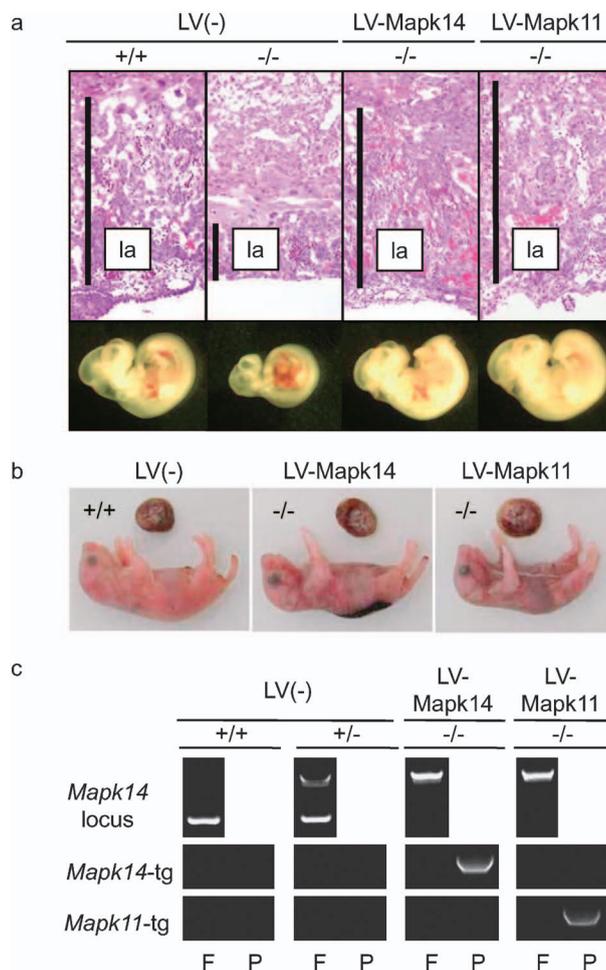


Fig. 3. Functional Complementation of *Mapk14* with *Mapk11* during Placentation

(a) Embryos collected at E10.5 after LV-*Mapk14* or LV-*Mapk11* transduction at the blastocyst stage. (top) Placental sections stained with hematoxylin and eosin observed at 20 $\times$  magnification. Vertical bars labeled la mark the labyrinthine layer. (bottom) Fetuses. (b) Live *Mapk14*  $-/-$  newborn pups obtained by LV-*Mapk14* or LV-*Mapk11* treatment. (c) Fetal (F) and placental (P) tissue collected at birth subjected to PCR analysis for transgene detection. The LV vector transgene was detected only in the placenta. tg: transgene.

く、既存の方法とは一線を画する全く新しい研究ツールの開発を試み、その結果、「透明帯を除去した胚盤胞にLVベクターを感染させる」という極めて簡便な方法で、胚にダメージを与えることなく胎盤特異的に遺伝子操作する技術の確立に成功した。さらに、この技術が特定の遺伝子の胎盤における機能解析に有用であること、また、胎盤異常が原因で胚性致死となるノックアウトマウスの生後解析を可能にすることで、胎盤だけではなく、個体レベルでの遺伝子機能研究の発展に貢献できることを示した。

本研究成果は、上記のような基礎研究の進展に大きく貢献できるだけでなく、胎児に遺伝子導入され

る危険性を伴わないことから、将来的には「胎盤の遺伝子治療」とも言うべき新しい技術としての発展や、毎年30万件とも推定されるヒト流産の治療法開発への応用が期待される。現在は、単なる過剰発現だけでなく、Cre/loxPシステムを利用した胎盤特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作製や、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムを利用した発現時期特異的な遺伝子機能解析、胎盤でファミリーを形成している遺伝子の共通配列をターゲットとしたRNA干渉技術の確立などにも着手している。今後は、これらの技術を駆使することで、まだまだ不明な点が多い胎盤の機能や形成機構の解明に、個体レベル、遺伝子レベルで迫りたいと考えている。

本研究は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従って機関承認を受けており（課題番号1877, 2055）、また、大阪大学動物実験委員会の承認の下に遂行されたものである。

**謝辞** 本総説で紹介した研究成果は、大阪大学微生物病研究所附属感染動物実験施設において得られたものであり、多大なるご指導とご鞭撻を賜りました岡部 勝教授、伊川正人准教授、並びに実験にご協力頂きました研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。また、*Ets2* ノックアウトマウスをご供与頂いたDr. Robert G. Oshima (The Barnham Institute for Medical Research), *Mapk14* ノックアウトマウスをご供与頂いた緒方正人先生 (三重大学医学部)、組織学的解析にご協力頂いた溝口 明先生 (三重大学医学部) に深謝致します。なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金の援助の下に行われたことを記して感謝申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Okada Y., Ueshin Y., Isotani A., Saito-Fujita T., Nakashima H., Kimura K., Mizoguchi A., Oh-Hora M., Mori Y., Ogata M., Oshima R. G., Okabe M., Ikawa M., *Nat. Biotechnol.*, **25**, 233–237 (2007).
- 2) Ikawa M., Tanaka N., Kao W. W., Verma I. M., *Mol. Ther.*, **8**, 666–673 (2003).
- 3) Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y., Verma I. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2140–2145 (2002).
- 4) Cherry S. R., Biniszkiwicz D., van Parijs L., Baltimore D., Jaenisch R., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7419–7426 (2000).
- 5) Hamaguchi I., Woods N. B., Panagopoulos I., Andersson E., Mikkola H., Fahlman C., Zufferey R., Carlsson L., Trono D., Karlsson S., *J. Virol.*, **22**, 10778–10784 (2000).
- 6) Cross J. C., *Placenta*, **26**, S3–9 (2005).
- 7) Rossant J., Cross J. C., *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 538–548 (2001).
- 8) Yamamoto H., Flannery M. L., Kupriyanov S., Pearce J., McKercher S. R., Henkel G. W., Maki R. A., Werb Z., Oshima R. G., *Genes Dev.*, **12**, 1315–1326 (1998).
- 9) Adams R. H., Porras A., Alonso G., Jones M., Vintersten K., Panelli S., Valladares A., Perez L., Klein R., Nebreda A. R., *Mol. Cell*, **6**, 109–116 (2000).
- 10) Mudgett J. S., Ding J., Guh-Siesel L., Chartrain N. A., Yang L., Gopal S., Shen M. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10454–10459 (2000).
- 11) Tamura K., Sudo T., Senftleben U., Dadak A. M., Johnson R., Karin M., *Cell*, **102**, 221–231 (2000).
- 12) Jiang Y., Chen C., Li Z., Guo W., Gegner J. A., Lin S., Han J., *J. Biol. Chem.*, **271**, 17920–17926 (1996).
- 13) Wang X. S., Diener K., Manthey C. L., Wang S., Rosenzweig B., Bray J., Delaney J., Cole C. N., Chan-Hui P. Y., Mantlo N., Lichtenstein H. S., Zukowski M., Yao Z., *J. Biol. Chem.*, **272**, 23668–23674 (1997).
- 14) Senut M. C., Suhr S. T., Gage F. H., *J. Clin. Invest.*, **101**, 1565–1571 (1998).
- 15) Xing A., Boileau P., Caüzac M., Challier J. C., Girard J., Hauguel-de Mouzon S., *Hum. Gene Ther.*, **11**, 167–177 (2000).