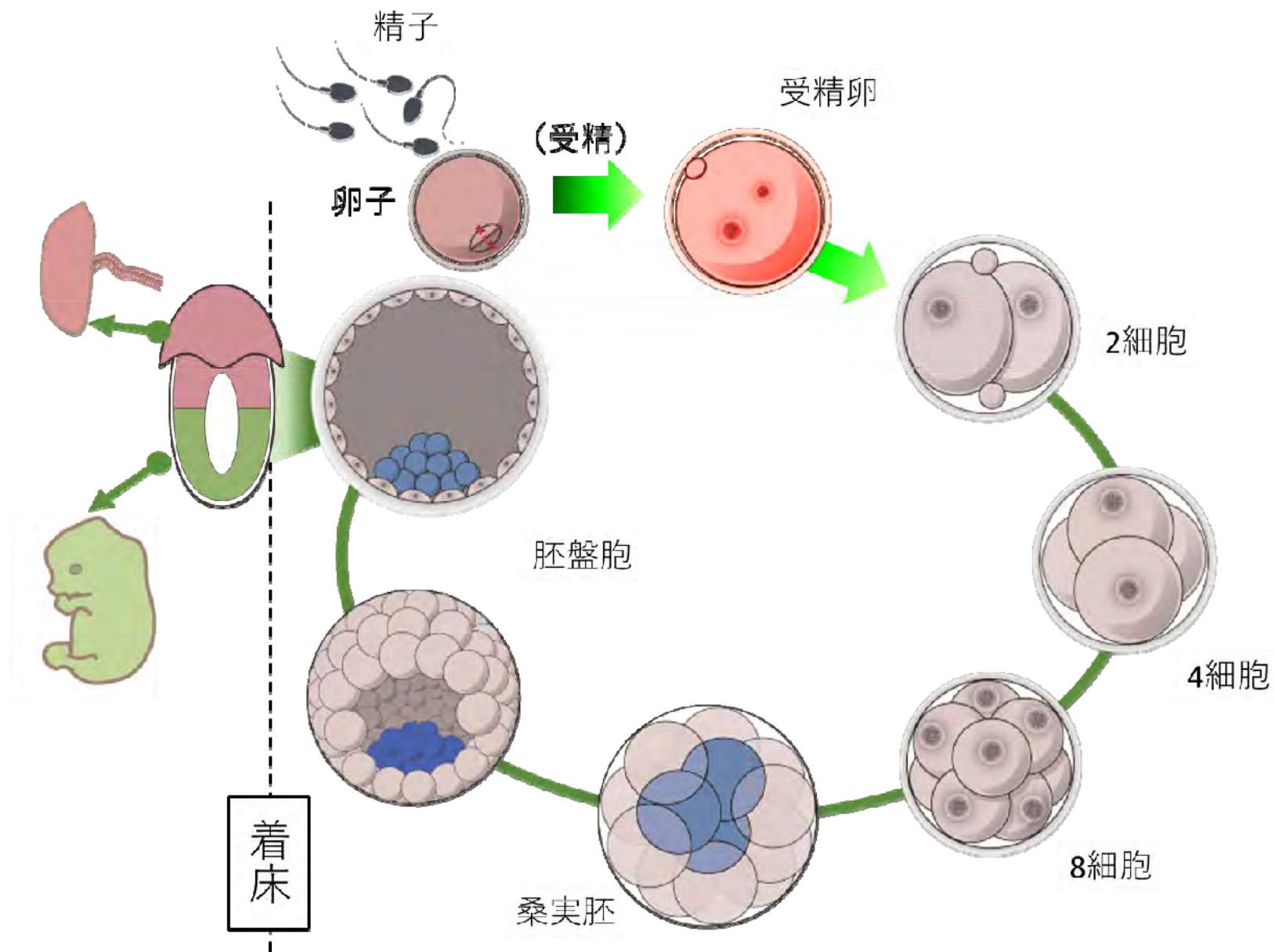


ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方「見直し等」に係るタスク・フォース
(第13回)

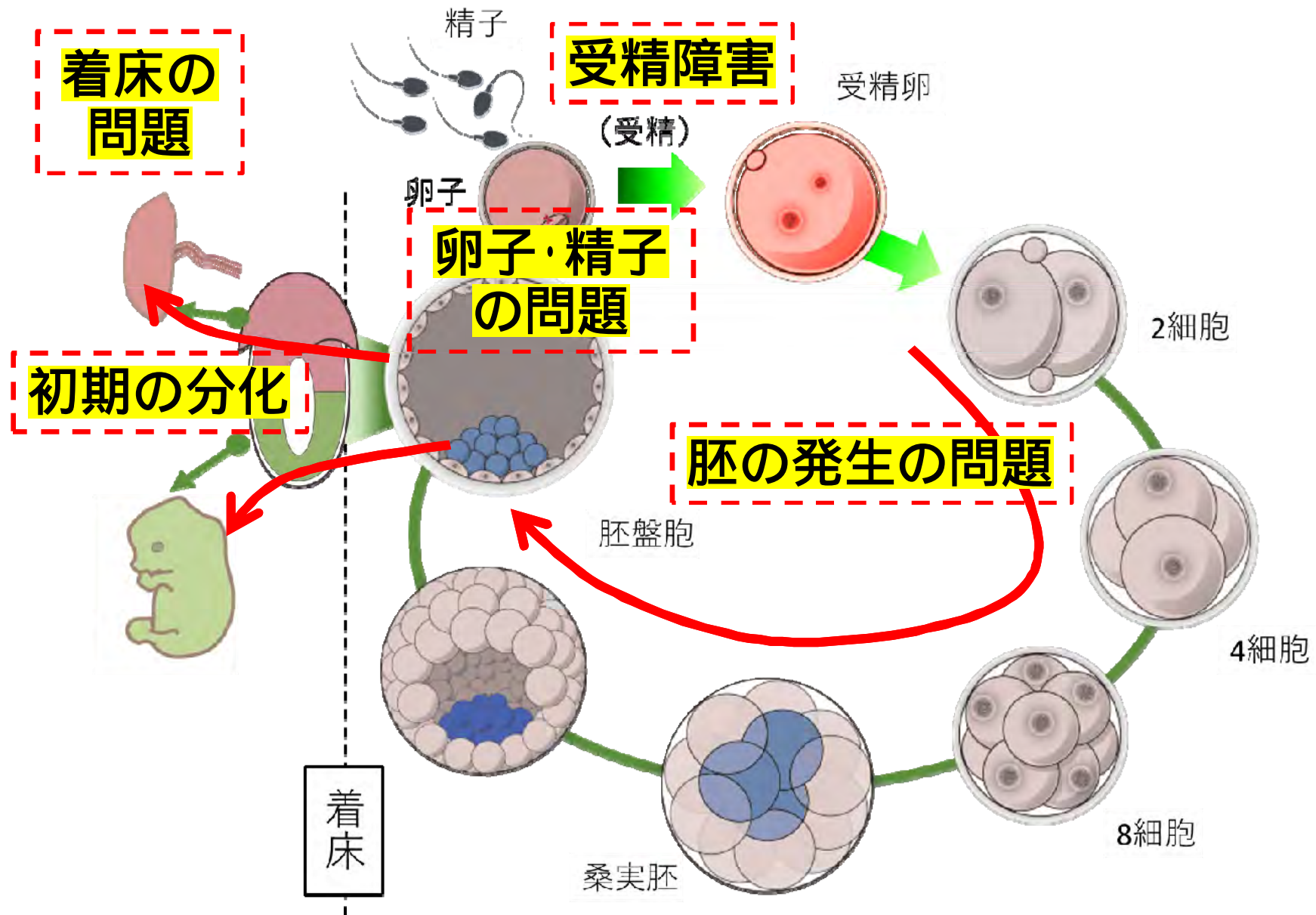
ヒト受精胚を用いたゲノム編集利用研究について

国立成育医療研究センター研究所
生殖医療研究部 阿久津 英憲

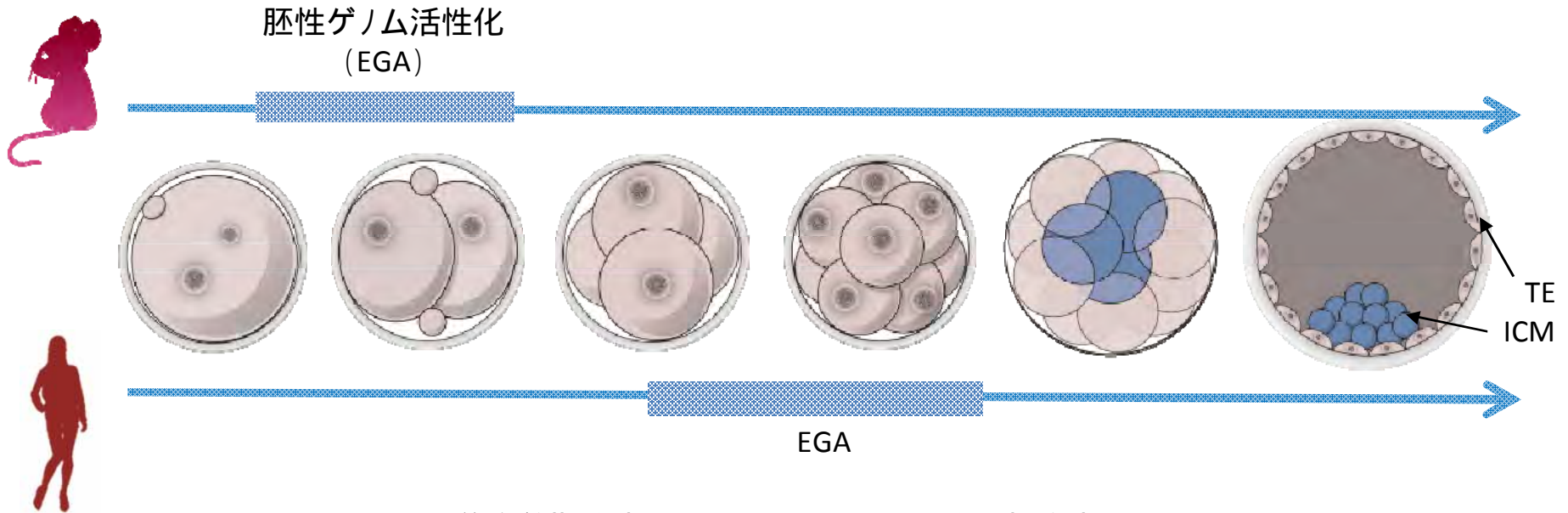
受精から着床前期胚発生を理解



受精から着床前期胚発生を理解



着床前期発生におけるマウスとヒトの主な相違点



着床前期発生におけるマウスとヒトの主な相違点

	マウス	ヒト
受精から着床までの期間	4~4.5日	7~10日
主要な胚性ゲノム活性化 (EGA)	1細胞後期 ~ 2細胞期	4 ~ 8細胞期
Oct4/OCT4遺伝子の寄与	ICM	ICMとTE
割球間の染色体異数率	1%	50-80%
胚盤胞までの発生率 (体外培養系, 胚盤胞/受精卵)	80%	30 - 50%

着床前期発生におけるマウスとヒトの主な相違点

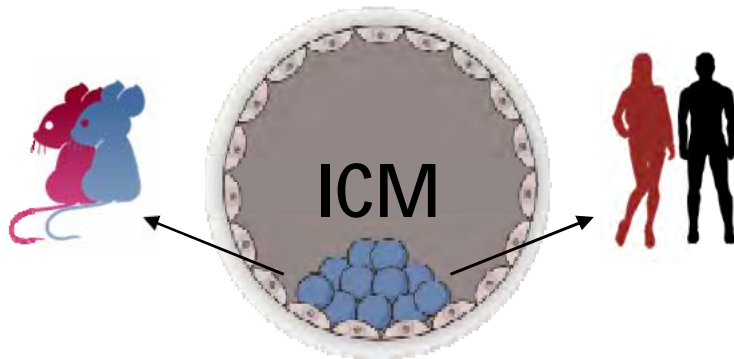
Development



Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq

Paul Blakeley^{1,2}, Norah M. E. Fogarty^{1,2}, Igrisio del Valle¹, Stacy E. Wamath¹, Tim Xianming Hu^{1,2}, Kay Elder¹, Philip Snell¹, Lela Christie¹, Paul Robinson^{1,2} and Kathy K. Niakan^{1,2}

Blakeley P, et al. Development 2015; 142: 3151-3165



胚盤胞期におけるマウスとヒトの遺伝子発現の相違

ヒトのICM遺伝子
発現の約4%が
マウスと重なる

4%



15%

Mouse ICM
Fgf4, Esrrb, Klf2, Nr0b1, Rxrg



Human EPI
*BMP2, KLF17, ARGFX, VENTX,
ETV4, DPPA5, OTX2*



Overlap

POU5F1, SOX2, NANOG, PRDM14, ZSCAN10, HESX1, GDF3, DPPA2, DPPA4, PLOD2, MEIS1, PHYHD1, BHMT, EPHB4, ETV5, TDGF1, SERPINH1, EPHA4, WDR6, IFITM1, SOCS2, SLC43A1, UPP1, FGF4, RCBTB1, IFITM3, PFKF, WDRG2, PMAIP1, HILF, SPARC, TGIF1, PMEPA1, PHLDA1, IFITM2, PSRC1, MDK, MSH6, MIFR1, PLSCR1, STMN1, RNF19B, APEX1, PARP1, MRPL39, PGD, SAT1, SPPI1, SPRY2, PRDX6, SET, APOC1, RPL38, GNB2L1

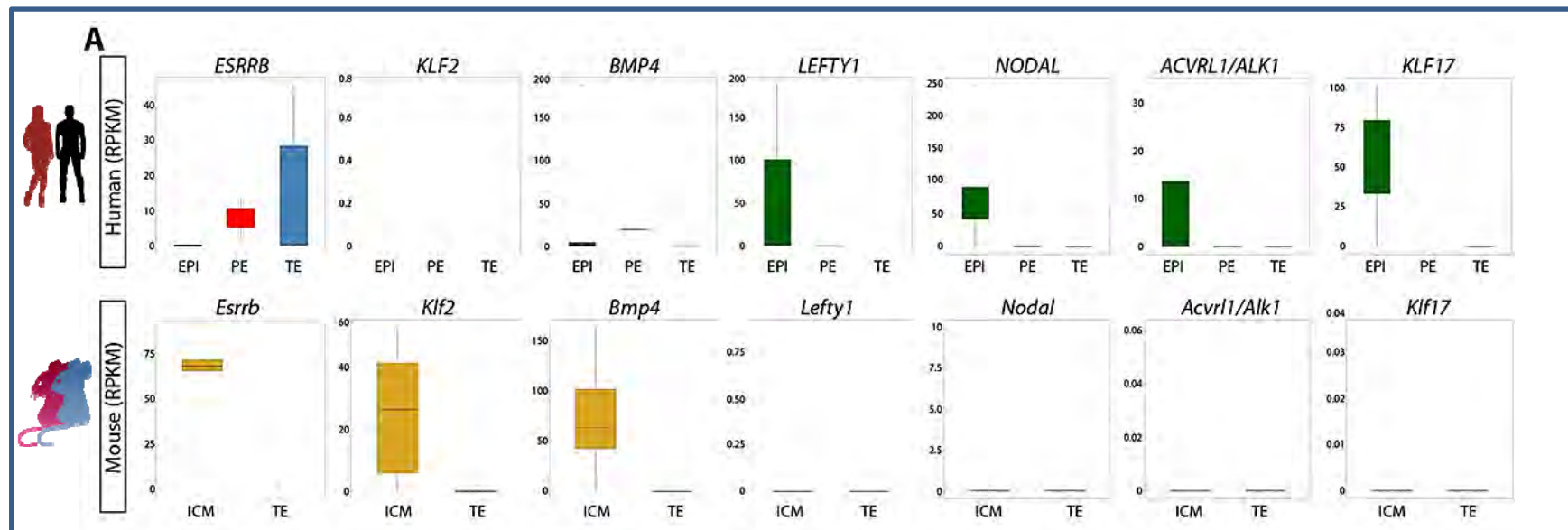


Fig. 6A; Blakeley P, et al. Development 2015; 142: 3151-3165

ヒト受精胚に対するゲノム編集技術の応用

ヒト初期胚に対するゲノム編集技術応用の適応例

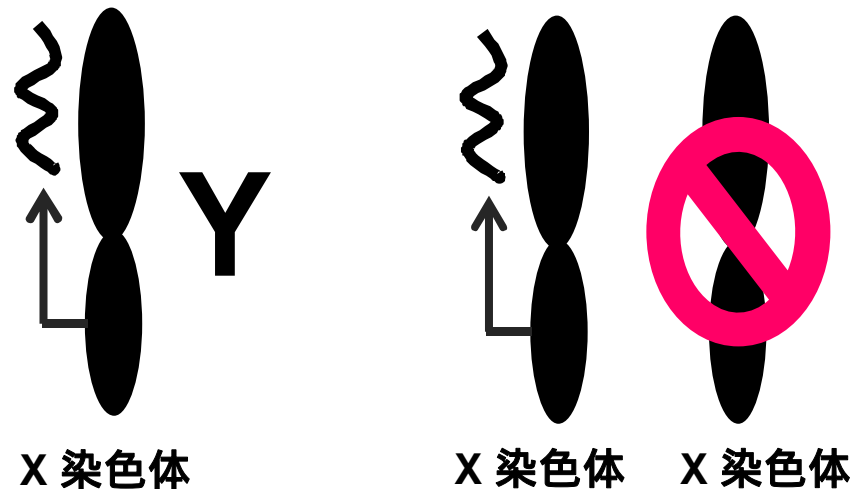
初期胚発生特異的遺伝子(機能性RNA含む)の機能評価、発現動態解析

- ・胚性ゲノム活性化(全能性・多能性の獲得)の分子機序
- ・胎盤と内部細胞塊(個体発生の元)の分化分子機序
- ・受精胚内性差非対称性エピジェネティック制御機構
- ・初期胚特異的X染色体不活化制御機序
- ・受精卵後の卵割期でおこる染色体分配にかかる分子機序
- ・ミトコンドリア複製に関わる分子機序(ミトコンドリア及び核ゲノム)

など

病態と関連性のある一例

X染色体の不活化：遺伝子の発現量を補正するしくみ



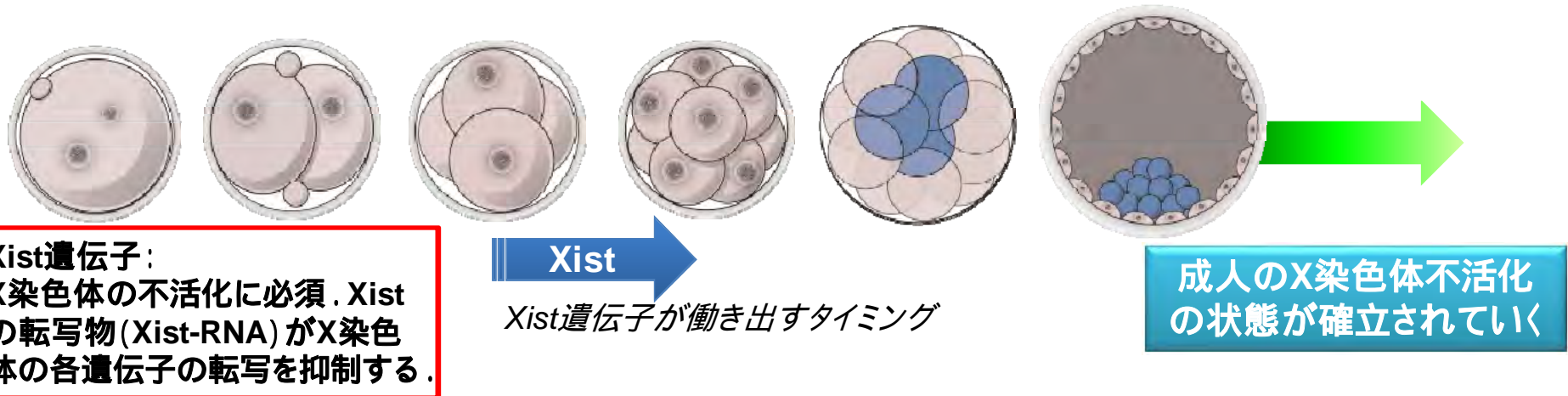
XX細胞()
どちらか一方のX染色体が不活化している

X染色体遺伝子発現量
: = 1:1

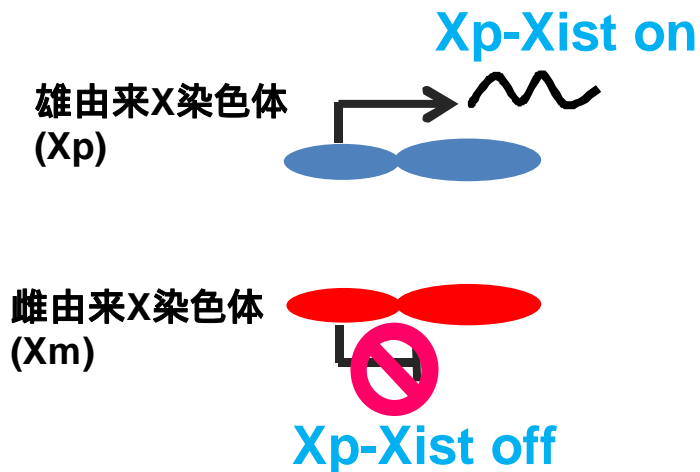
病態と関連性のある一例

X染色体の不活化：いつ、どのように制御されるか

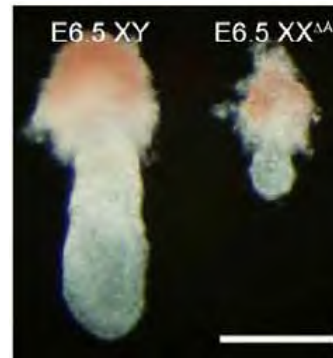
1. Xist 遺伝子が4細胞期に働き出す



2. 雌のX染色体だけ活性化



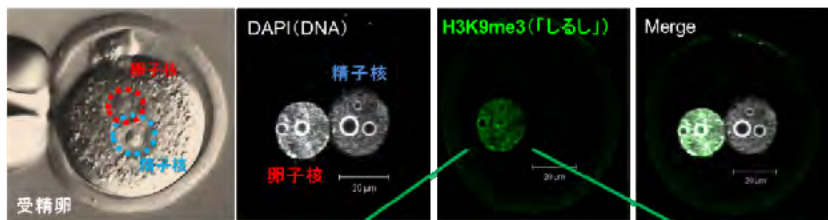
刷込み遺伝子発現型(性差のある遺伝子発現)の制御



この状態を乱すと
Xist父方欠損はメス特異的な**胚性致死**.

病態と関連性のある一例

核タンパク質の一つのアミノ酸の修飾が働く(マウス初期胚)



Fukuda A, et. al. *Nature Communications* 2014

「母からのX染色体、優先」カギ特定
成育医療研究センター 難病発症 解明に一步

主な哺乳類のメスの受精卵では、2本あるX染色体のうち母親由来の方が優先的に働くことが正常な発育に欠かせないとされる。この仕組みを支えるたんぱく質の「かぎ」をマウスで特定したと、国立成育医療研究センター研究所が英科学誌電子版に発表した。流産を繰り返す不育症などの原因解明につながる可能性があるという。

主な哺乳類のメスは性染色体として2本のXを持つ。このうち1本しか働かないメカニズムがあり、母親由来の方が優先的に働くことが知られているが、その仕組みは不明だった。

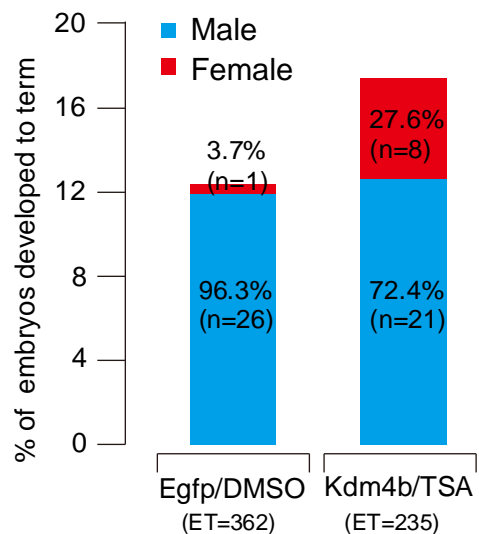
研究所の阿久津美恵・生殖医療研究部長らは、母親由来のX染色体のDNAが巻き付いているたんぱく質を詳しく調べ、X染色体を働かせる「かぎ」となる物質が特定の部位にくっついていることを見つけた。「かぎ」は父親由来の方にはくっついていなかった。

X染色体は筋ジストロフィーなど多くの難病の発症にもかかわる。阿久津さんは「発見によって病気が発症する仕組みが解明できれば、新たな治療法につながる可能性がある」と話す。(岡崎明子)

(2014年11月20日 朝日新聞朝刊)



特定の化学物質により致死からレスキュー



Fukuda A, et. al. *Plos genetics* 2016

精子異常 卵子の働き変え救済
難病解明期待
精子の遺伝子異常のため流産を繰り返しても産まれてこなかった胎児の救出に、国立成育医療研究センターが成功した。

センターの研究者らがマウスの実験で成功した。X染色体だけが働かなくなると、精子の働きが弱くなり、正常な精子の産生が難しくなる可能性がある。精子の働きが弱くなる場合、精子が卵子と受精できず、受精卵は着床できず、母体の胎内で死んでしまう。母体から正常な精子が産生されるまで待つ必要がある。

センターの阿久津美恵部長らは、精子の働きを正常に戻すために、精子の働きを助ける物質を新たに発見した。この物質は、精子の働きを助ける物質として知られていた「エストロゲン」の一種である。エストロゲンは、精子の働きを助ける物質として知られていたが、その働きが弱くなる場合、精子の働きが弱くなる可能性がある。精子の働きが弱くなる場合、精子が卵子と受精できず、受精卵は着床できず、母体の胎内で死んでしまう。母体から正常な精子が産生されるまで待つ必要がある。

同センターの阿久津美恵部長らは、精子の働きを正常に戻すために、精子の働きを助ける物質を新たに発見した。この物質は、精子の働きを助ける物質として知られていた「エストロゲン」の一種である。エストロゲンは、精子の働きを助ける物質として知られていたが、その働きが弱くなる場合、精子の働きが弱くなる可能性がある。精子の働きが弱くなる場合、精子が卵子と受精できず、受精卵は着床できず、母体の胎内で死んでしまう。母体から正常な精子が産生されるまで待つ必要がある。

(2016年 毎日新聞)

ヒト初期胚発生の遺伝子発現に関する知見

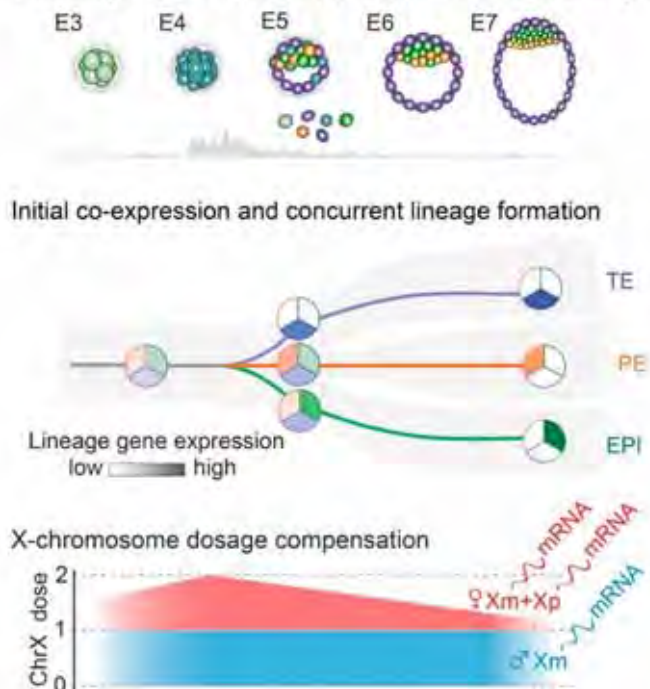
Cell

Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos

Sophie Petropoulos,^{1,2,3} Daniel Edsgård,^{2,3,4} Björn Reinius,^{2,3,4} Qiaolin Deng,^{2,3} Sarta Paulina Panula,¹ Simone Codeluppi,^{4,5} Alvaro Plaza Reyes,¹ Sten Linnarsson,² Rickard Sandberg,^{2,3,7,8} and Fredrik Lanner^{1,7,*}

ヒト胚発生の遺伝子発現動態を明らかにするため、受精胚の割球を1つずつ分けて遺伝子発現の変化を解析したところ、着床以降の発生運命決定に関しマウスとは異なる遺伝子発現動態であることやX染色体不活化制御もヒトではユニークな機構が存在するという知見が得られた。

1529 single-cell RNA-seq libraries from 88 human embryos



Graphical Abstract

Petropoulos S, et al. Cell 2016

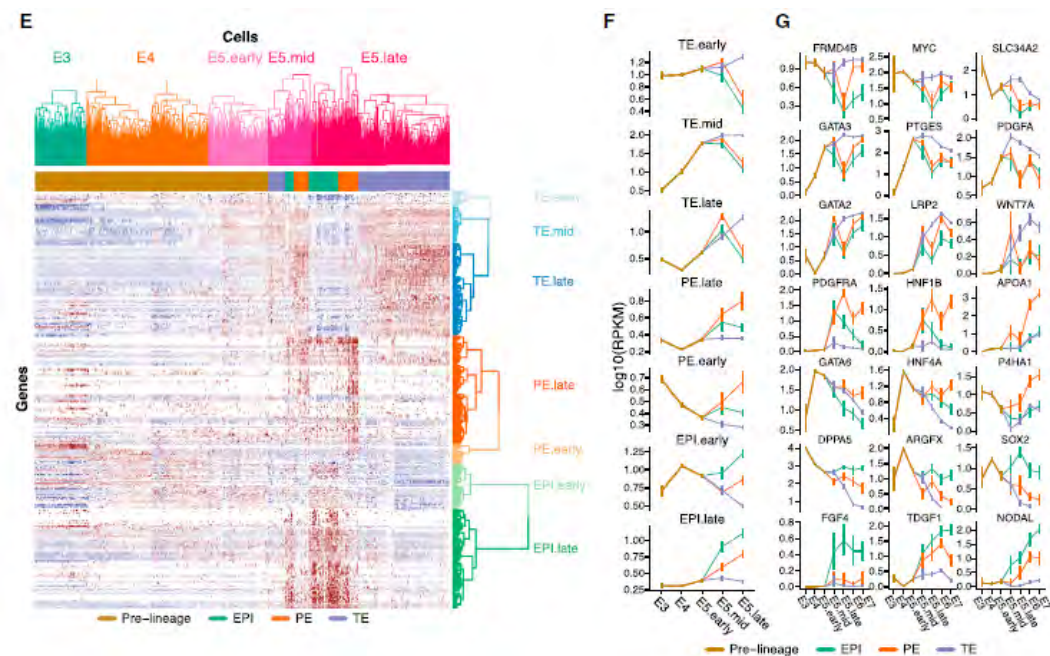
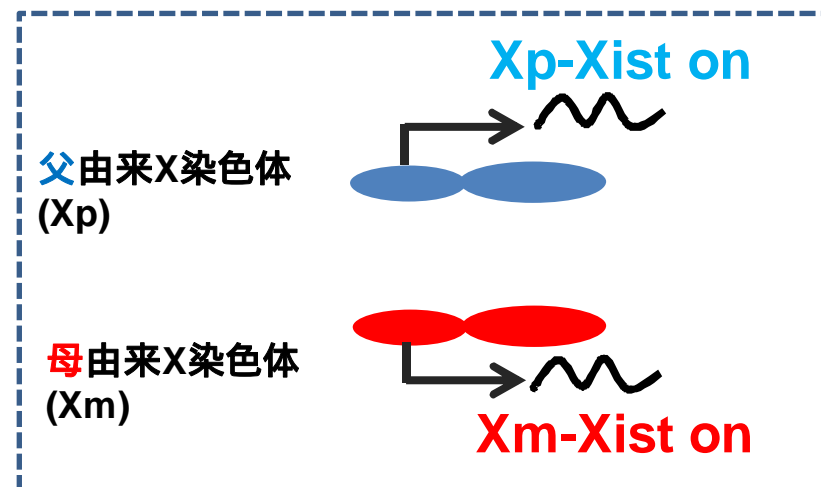
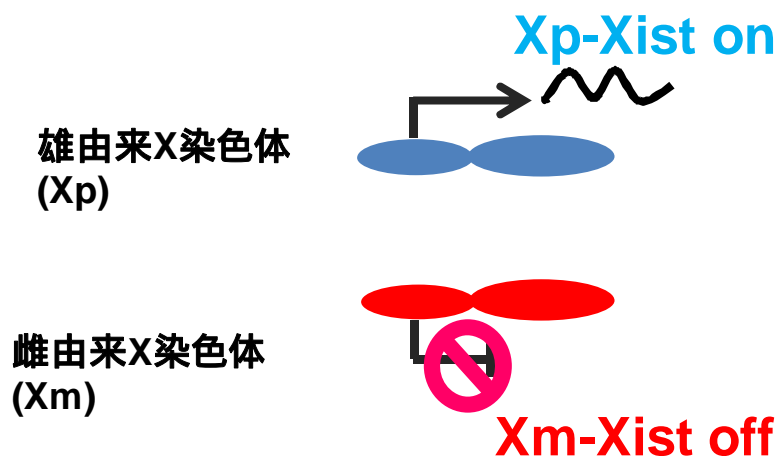
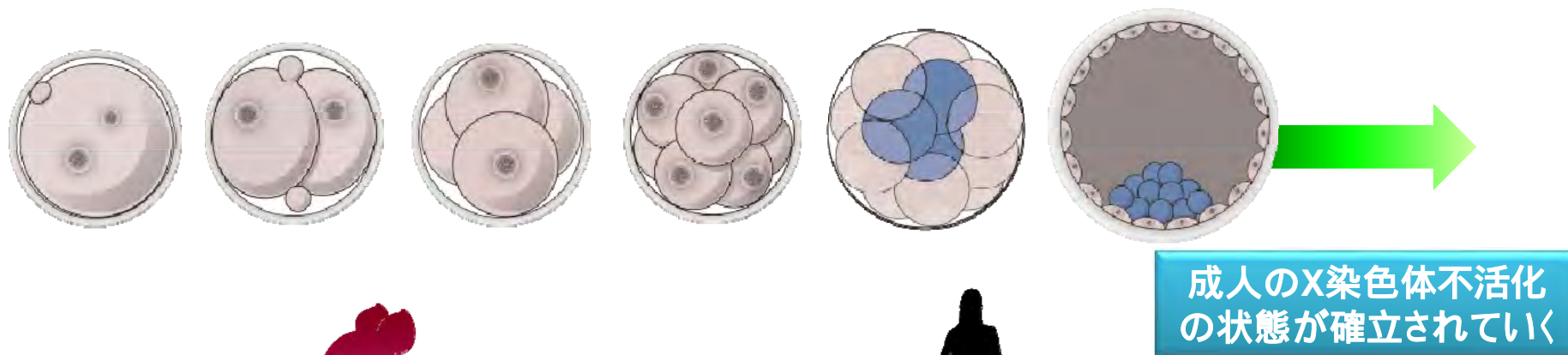


Figure 4 ; Petropoulos S, et al. Cell 2016

ヒト初期胚発生の遺伝子発現に関する知見



X染色体不活化の偏りと疾患

ヒトでX染色体不活化の偏りがあることが見つかった(1996)

Am. J. Hum. Genet. 58:1111-1119, 1996

Heritability of X Chromosome-Inactivation Phenotype in a Large Family

Anna K. Naumova,¹ Robert M. Plenge,³ Lynne M. Bird,⁴ Mark Leppert,⁵ Kenneth Morgan,⁶ Huntington F. Willard,³ and Carmen Sapienza^{1,2}

¹Fels Institute for Cancer Research and Molecular Biology and ²Department of Pathology, Temple University School of Medicine, Philadelphia; ³Department of Genetics and Center for Human Genetics, Case Western Reserve University School of Medicine and University Hospitals of Cleveland, Cleveland; ⁴Children's Hospital and Health Center, San Diego; ⁵Howard Hughes Medical Institute, University of Utah Medical Center, Salt Lake City; and ⁶Departments of Human Genetics and Medicine, McGill University and Montreal General Hospital Research Institute, Montreal

1. レット症候群 (Rett Syndrome)

発症頻度: 1/10,000-15,000.

“Rett症候群は自閉症・てんかん・失調性歩行・特有の常同運動(てもみ動作)を特徴とするX連鎖優性遺伝病。男性は胎生致死で、女性のみが罹患する疾患。RTTの遺伝型式はX連鎖優性遺伝式である。99.5%が家族内での孤発例であり、RTT患児での新規突然変異か、変異遺伝子の体細胞あるいは生殖細胞でのmosaicismを持つ、どちらかの親から遺伝したことによる。保因者である母親は偏りのある(skewedした)X染色体不活化パターンをとり、母親自身は無症状かわずかに症状があるだけである。”(GeneReviews 日本語版: <http://grj.umin.jp/>)

2. 筋ジストロフィー症

発症頻度: 17-20/100,000.

“骨格筋の壊死・再生を主病変とする遺伝性筋疾患の総称。筋ジストロフィーの中には多数の疾患が、いずれも筋肉の機能に不可欠なタンパク質の設計図となる遺伝子に変異が生じたためにおきる。遺伝子に変異が生じると、タンパク質の機能が障害されるため、細胞の正常な機能を維持できなくなり、筋肉の変性壊死が生じる。その結果筋萎縮や脂肪・線維化が生じ、筋力が低下し運動機能など各機能障害をもたらす。”(難病情報センター:

<http://www.nanbyou.or.jp/entry/4522>)

X染色体不活化の偏りと疾患

海外からの報告

Viggiano E, Picillo E, Ergoli M, Cirillo A, Del Gaudio S, Politano L. "Skewed X-chromosome inactivation plays a crucial role in the onset of symptoms in carriers of Becker muscular dystrophy." *J Gene Med.* 2017 ; 19(4).

BACKGROUND:

Becker muscular dystrophy (BMD) is an X-linked recessive disorder affecting approximately 1: 18.000 male births. **Female carriers are usually asymptomatic**, although 2.5-18% may present muscle or heart symptoms. In the present study, the role of the X chromosome inactivation (XCI) on the onset of symptoms in BMD carriers was analysed and compared with the pattern observed in Duchenne muscular dystrophy (DMD) carriers.

CONCLUSIONS:

The data obtained in the present study suggest that **the onset of symptoms in BMD carriers is related to a skewed XCI**, as observed in DMD carriers. Furthermore, they showed no concordance in the XCI pattern inheritance.

日本からの報告

昭和62年度厚生省心身障害研究
「小児期の主な健康障害要因に関する研究」

Duchenne筋ジストロフィー症女性患者のDNA分析

(分担研究：遺伝性疾患の発症予防に関する研究)

新川詔夫¹、松本正¹、
杉野茂人²

要約：女性DMDの遺伝的異質性を検討するため、DMD 遺伝子欠失の有無をDMD遺伝子cDNA及び近傍のクローン化DNAをプローブにして、臨床的にDMDと診断された女性患者3名とその家族を分子遺伝学的に分析した。結果は3名中2名に遺伝子欠失を検出しこの2名の診断は DMDであると確定した。これらの家族の筋ジストロフィー症の遺伝形式はX連鎖性と考えた。残り1名は用いたプローブに関する限り欠失がなく、且つ両親が血族婚であったので常染色体劣性遺伝の可能性が残った。

抜粋

である。今回の結果にもみられるように同じ遺伝子の欠失がある女性でも保因者となる場合と発症する場合がある。これは、non-randomなX染色体の不活化により説明可能であるが、家族3の患者のX X Xにおける不活化との関係は興味深くメチレーションパターン等も含め今後検討の予定である。



ご清聴ありがとうございました