

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

発達神経毒性の迅速化・高精度・省動物に資する新規評価手法開発のための研究
(23KD1003)

令和6年度 分担研究報告書

分担研究課題：胎盤の遺伝子発現プロファイリング

研究分担者 小野 竜一
国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター・毒性部
第五室・室長

研究要旨

発達神経毒性(DNT)は、発生期(胎生期)あるいは生後発達期の神経系に対する化学物質による有害作用と説明される。この評価に向けた、より迅速、低コストで省動物に資する新規評価手法の開発が急務となっている。しかしながら、神経系の発生・発達に極めて複雑な現象であり、ヒトの発達神経毒性の定義ですら専門家間で認識が異なるのが現状である。また、有害発現経路(AOP)に立脚した DNT の *in vitro* 試験法の開発が精力的になされているが、詳細な AOP の積上げ・組み合わせのみで複雑な DNT に係る試験法の開発や実体の解明が進むとは考えにくい。

本研究では、妊娠動物(マウス)の胎内における胎盤の発生への理解を深めることで、化学物質の胎児影響を予測することを目的としている。

具体的には、マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うことで、各ステージにおける胎盤を構成する細胞の subtype を明らかにすることで、胎盤の機能を明らかにする。

令和5年度において受精後7.5日および8.5日目のC57BL/6マウス胎盤のサンプリングを行ない、令和6年度においては受精後9.5日目のC57BL/6マウス胎盤のサンプリングを行っている。胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、受精後7.5日、8.5日目、および9.5日目においては胎盤および脱落膜の分離が可能であり、令和6年度において次世代シーケンスによる受精後8.5日目および9.5日目の胎盤における網羅的遺伝子発現解析を行ない、胎盤の網羅的遺伝子発現解析により、胎盤の分化度を評価することが可能であることを明らかにした(小野)。

A. 研究目的

「Trophectoderm」(栄養外胚葉)は、哺乳類の胚発生の初期段階で最初に形成される組織であり、胚の外側の細胞層である。マウスにおいては、受精卵が受精してから約 3.5 日目に形成されるこの層は、胚と母体組織との間に位置する胎盤を構成する細胞へと分化することが知られている。それ故、Trophectoderm が発生の過程でどのような細胞に分化していくのかを明らかにすることは、胎盤の機能を知る上で重要課題である。

マウスにおいては、胚盤胞が子宮に着床した後に、Trophectoderm が胚体外外胚葉への分化を経て、絨毛膜および胎盤外円錐を形成する。さらに、その後に成熟した胎盤が形成され、Trophoblast Giant cell、spongiotrophoblast 層、labyrinth layer の 3 層構造が形成される。

令和 5、6 年度に解剖を行なった受精後 7.5 日から 9.5 日目の胎盤においては、胎盤外円錐から spongiotrophoblast および labyrinth layer が形成される重要な期間である。そこで、これらのステージにおいて網羅的遺伝子発現解析を行うことで、胎盤外円錐の分化段階に特異的なバイオマーカー、および、labyrinth layer の形成に特異的なバイオマーカーの単離を行うことを目的としている。

B. 研究方法

マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウス胎盤の発生ステージごとの網羅的遺伝子発現解析データの取得を行う。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後 7.5 日、8.5 日目、9.5 日目において胎盤および脱落膜の採取を行う。国立医薬品食品衛生研究所・動物室において C57BL/6J ♂および ♀ (12 週齢) の交配を 3 ステージ (7.5dpc, 8.5dpc および 9.5dpc) (dpc: Days post coitum: 交配後) 分行う。1 ステージあたり、5 ペアで交配を行い、翌朝 10 時にプラグの確認を行う。予定日に雌性マウスをイソフルラン麻酔下で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行う。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行う。

凍結した胎盤より RNeasy mini kit(Qiagen)を用いて RNA を抽出および精製する。RNA は、Stranded mRNA kit (Illumina) を用いて次世代シーケンス用ライブラリーを作成する。作成したライブラリーは、Qubit

dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Life Technologies, CA, USA) によって、濃度測定を行った上で、2.0 pM のライブラリーを、国立医薬品食品衛生研究所の共通機器である Illumina 社 Nextseq2000 を用いて、pair end sequence (150bp x 2)にて RNA-seq を行なう。

・マウス胎盤 RNA の RNA-seq データ解析

Illumina 社 Nextseq500 より出力された raw data (raw reads) は、BCL2-FASTQ program (Illumina, USA) により、FASTQ format に変換する。以降、全てのデータ解析は、Galaxy platform (<https://usegalaxy.org>) で行った。FASTQ は、Filter by quality program を用いて、quality score が 20 以上のシーケンスが 90 % 存在するシーケンスのみ解析対象とした。また、5' および 3' 末端のアダプター配列は、Trim FASTQ program によって除いている。

これらの処理を行ったシーケンスデータは、マウスゲノム (mm10) に対し HISAT2 program を用いてマッピング作業を行い、BAM ファイルを生成した。BAM ファイルは、HTseq program を用いて、転写産物の定量化および、サンプル間のノーマライゼーションを行う。

マウス mRNA のリファレンスシーケンスは、UCSC genome browser より入手した。

(倫理面の配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

C-3-5: 発生ステージごとのマウス胎盤の網羅的遺伝子発現解析 (国立医薬品食品衛生研究所)

令和5年度、令和6年度は、マウス胎盤の発生・分化のバイオマーカーとなる遺伝子を単離する目的で、マウスの発生ステージごとの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うためのサンプリングを行った。マウス胎盤は、胎児由来の胎盤細胞と母体由来の脱落膜からなる組織であり、今回は、胎盤と脱落膜の分離が可能な受精後7.5日、8.5日目、9.5日目において胎盤および脱落膜の採取を行なった。雌雄C57BL6/Jマウス(12週齢)の交配を3ステージ(7.5dpc, 8.5dpc, 9.5dpc)分を行った。1ステージあたり、5ペアで交配を行い、翌朝10時にプラグの確認を行なった。

その結果、令和5年度において7.5dpc用の交配では、5匹中2匹の雌がプラグ陽性であり、8.5dpc用の交配では、5匹中3匹がプラグ陽性であった。受精後7.5日、8.5日目の予定日にプラグ陽性の雌性マウスをイソフルラン麻酔科で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行った。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行った。7.5dpcにおいては、9匹、8匹の正常発生胚を採取した。また、8.5dpcにおいては、8匹、9匹、7匹の正常発生胚の採取を行った。

令和6年度においては、9.5dpc用の交配では、5匹中2匹の雌がプラグ陽性であった。受精後9.5日目の予定日にプラグ陽性の雌性マウスをイソフルラン麻酔科で帝王切開を行い、子宮を採取し、母動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行った。採取した子宮より、マウス胚を取り出し、胎盤および母体側組織である脱落膜の採取を行い、液体窒素にて急冷し、凍結保存を行った。8匹、6匹の正常発生胚を採取した。

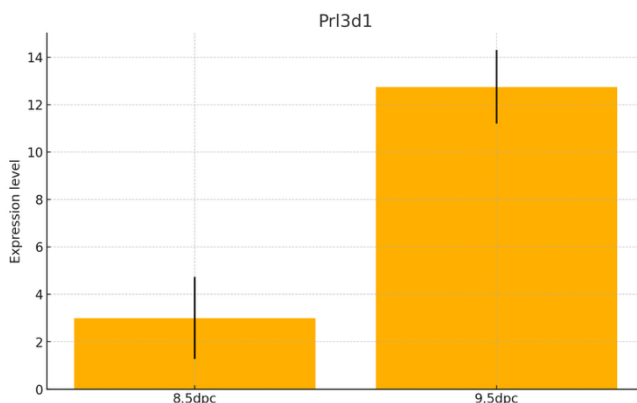
また、令和6年度において、このうち、8.5dpcおよび9.5dpcの胎盤組織の網羅的遺伝子発現解析(N=4)を行なった。

これらの胎盤の網羅的遺伝子発現解析を行うための次世代シーケンス用のライブラリーとして、Illumina社のStranded mRNA kitを選択し、網羅的遺伝子発現解析を次世代シーケンサー(Illumina社Nextseq2000)を利用して行なった。

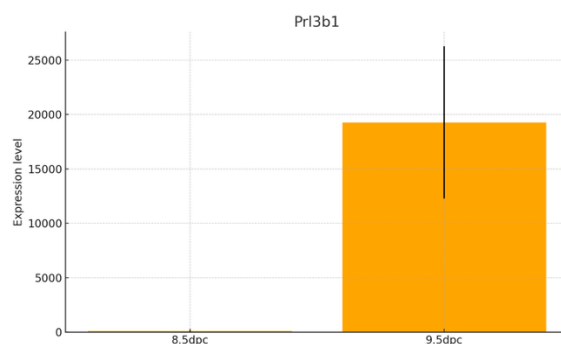
9.5dpcの胎盤組織においては、母体側と直接接している側から、trophoblast giant cell、spongiotrophoblast及びlabyrinth layerの3層構造からなることが報告されており、それぞれに特異的な遺伝子発現マーカーの存在が知られている。

網羅的遺伝子発現解析から、これらの遺伝子発現マーカーの遺伝子発現量を定量した。

その結果、trophoblast giant cellのマーカーであるP11(Pr13d1)およびP12(Pr13b1)の遺伝子発現においては、8.5dpcよりも9.5dpcにおいて遺伝子発現の顕著な増加が確認された。



図：Pr13d1 遺伝子 (P11) の8.5dpcおよび9.5dpc胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y軸は次世代シーケンスのreads counts。(**: P < 0.01)

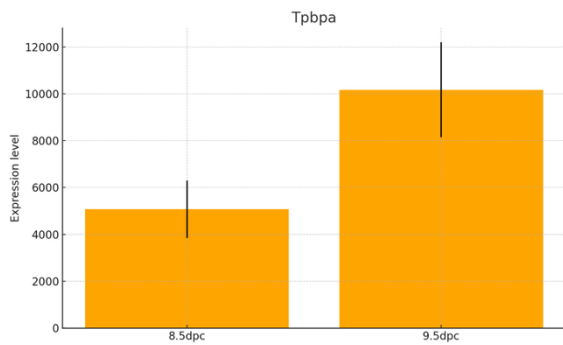


図：Pr13b1 遺伝子 (P12) の8.5dpcおよび9.5dpc胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y軸は次世代シーケンスのreads counts。(*: P < 0.1)

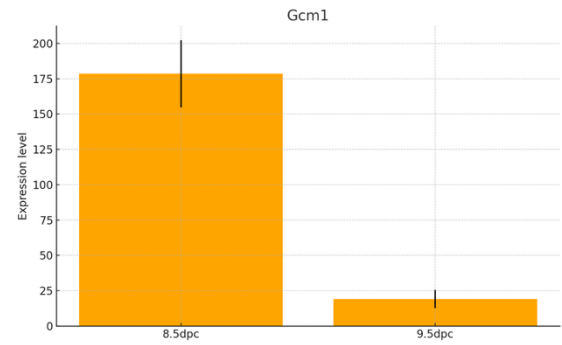
P11は、primary trophoblast giant cellであり、8.5dpcには既に存在しており、9.5dpcにおいても同様に存在していることが想定されているが、遺伝子発現データからも一致している。

また、P12はsecondary trophoblast giant cellであり、9.5dpc以降に増殖することが報告されており、9.5dpcにおいて発現量が急激に増加しており、これらも既知のin situ hybridizationのデータと一致している。

また、spongiotrophoblastのマーカーであるTpbpaの遺伝子の発現は、8.5dpcおよび9.5dpcで同様に確認された。

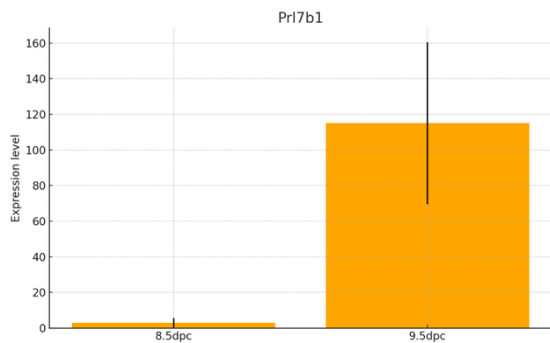


図：Tpbpa 遺伝子 の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.1$)

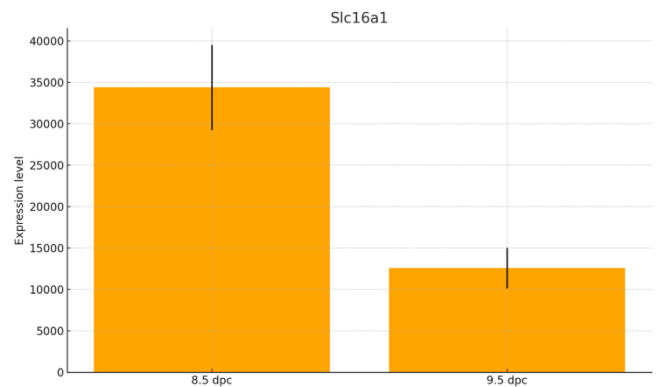


図：Gcm1 遺伝子 の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(** : $P < 0.01$)

Spongiotrophoblast は、spongiotrophoblast cells および glycogen cells に分化することが知られているが、glycogen cells に関しては、母体側に浸潤する invasive glycogen cells 集団が存在することが知られている。これらの細胞群は、発生が進むにつれて増加することから、母体側脱落膜と胎児由来胎盤細胞の分離が難しくなる。これらのマーカーとしては、Pr17b1 が報告されており、9.5dpc の方がより増加しており、すなわち、invasive glycogen cells が増加していることが想定される。

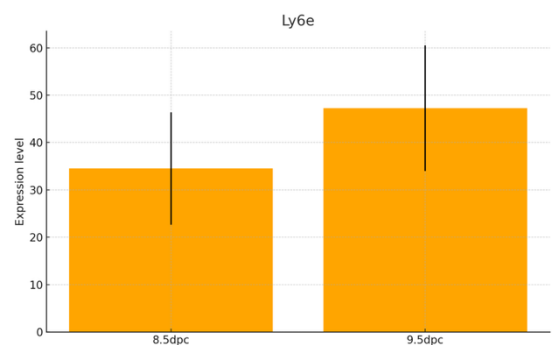


図：Pr17b1 遺伝子 の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(* : $P < 0.1$)



図：Slc16a1 遺伝子 の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。(** : $P < 0.01$)

Labyrinth layer に関しては、8.5dpc から形成されるものであり、そのマーカーである Gcm1 の発現が確認されている。また、labyrinth layer は、胎児側毛細血管と syncytiotrophoblast より構成されており、胎児側血管のマーカーとなる Slc16a1 および syncytiotrophoblasty のマーカーとなる Ly6e の発現が確認されている。



図：Ly6e 遺伝子 の 8.5dpc および 9.5dpc 胎盤での遺伝子発現量の比較。(N=4) Y 軸は次世代シーケンスの reads counts。

今年度、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析結果が胎盤の分化解析 (secondary trophoblast giant cell, invasive glycogen cells など) の検出にも有用

であることがわかったことから、他のステージに関しても同様の解析を行う予定である。

D. 考察と結論

哺乳類の正常な発生において、正常な胎盤形成は必要不可欠である。胎盤により、母子間のガス交換、栄養交換などが行われており、化学物質の胎児移行についても寄与することが知られている。

これらの正常な胎盤の発生には、胎児胎盤細胞の母体側への浸潤などが起こることが必須であることが報告されている。

令和6年度においては、母体側へと浸潤することは報告されている *invasive glycogen cells* に特異的なマーカー遺伝子である *Prl7b1* 遺伝子が胎盤の分化度に応じて発現が増加することを検出することに成功している。

また、母子間の物質交換は、主に *labyrinth layer* において母体血と胎児血との間で行われていることから、*labyrinth layer* の成熟が、母子間の物質交換に大きく影響する。

そこで、正常胎盤の発生過程における遺伝子発現データをより多くのステージで解析することで、*labyrinth layer* の分化度を知るために重要なマーカー遺伝子の単離することができ、発生ステージ特異的な化学物質の胎児移行効率などを明らかにできる。

近年、動物福祉の 3Rs の観点から、*in vitro* 系の毒性評価系の開発が進められている。発達神経毒性においては、胎盤において化学物質が胎児に移行するかどうかが重要になる。胎盤幹細胞や胎盤オルガノイドなどが、毒性評価系で利用されることが想定されるが、それらが、実際に *in vivo* を反映しているのかどうかは、正常な発生過程における詳細な胎盤の遺伝子発現解を行うことで、実際に *in vivo* に近い遺伝子発現をしているのかのバイオマーカーとして利用することで厚生労働行政に貢献しうる研究開発となっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

●Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

Fujioka T, Shiura H, Ishii M, Ono R, Endo T, Kiyonari H, Hirate Y, Ito H, Kanai-Azuma M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F
Targeting of retrovirus-derived Rtl8a/8b reduces social response and increases apathy-like behavior associated with GABRB2 reduction
OPEN BIOLOGY 2025 Jan;15(1):240279. doi: 10.1098/rsob.240279. Epub 2025 Jan 29..

●小野 竜一

非臨床安全性評価における New approach methods と
しての細胞外小胞の活用
医学のあゆみ Vol.291 No.9 2024. 11. 30

2. 学会発表

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima
Detection of EVs in Hepatotoxicity Using CD9-mEmerald Reporter Mouse
INTERNATIONAL SOCIETY FOR
EXTRACELLULAR VESICLES ANNUAL MEETING
2024, (2024.5.12, Melbourne, Australia) 、口頭

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡：ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第 71 回日本実験動物学会総会、京都、2024 年 5 月 29 日、ポスター

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S
バルプロ酸 (VPA) の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA
第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.6.21 福岡) 、口頭

●Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S

Extracellular Vesicle Small RNAs Secreted from Mouse Amniotic Fluid Induced by Repeated Oral Administration of VPA to Pregnant Mice

Annual Conference of the International Federation of Placenta Associations (IFPA 2024) (2024.9.4., Montreal, Canada)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Yusuke. Yoshioka, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima

Detection of extracellular vesicles (EVs) in Hepatotoxicity Using CD9-EGFP Reporter Mouse

58th Congress of the European Societies of Toxicology (2024.9.20., Copenhagen, Denmark)

●Ryuichi Ono, Mie Naruse, Yoko Hirabayashi, Takahiro Ochiya, Masahito Ikawa, Satoshi Kitajima; Evaluation of CD9-EGFP Reporter Mice for Organ-Specific EV Detection, ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.17, Orlando、口頭

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。