

博士論文

ヒト胎盤におけるゲノムインプリンティングと
X 染色体不活性化現象に関する研究

東北大学大学院医学系研究科博士課程
環境遺伝医学総合研究センター情報遺伝学分野
濱田 裕貴

目 次

要約	P.3~4
研究の背景と目的	P.5~10
研究方法	P.11~18
研究結果	P.19~27
考 察	P.28~35
結 論	P.36
謝 辞	P.37
参考文献	P.38~46
図の説明	P.47~56
図 表	P.57~81

<要約>

【研究目的】

ゲノムインプリンティングは胎盤を有する哺乳類に共通の現象で、胎盤形成にその生物学的な重要性があると指摘されている。インプリンティングを受ける遺伝子（インプリント遺伝子）は、特定の一方の親由来のアリルが選択的に発現（片親性発現）し、他方のアリルは不活性化される。インプリント遺伝子の片親性発現は、DNA メチル化などのエピジェネティックな分子機構により制御されている。これまでに、マウスでは 12 種類の胎盤特異的インプリント遺伝子が存在し、胎盤発生に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかし、これら遺伝子のヒトホモログはヒト胎盤ではインプリンティングを受けておらず、ヒト胎盤におけるゲノムインプリンティングの理解はあまり進んでいない。また、マウス胎盤では父由来 X 染色体が選択的に不活性化（インプリント型不活性化）されるが、ヒト胎盤の場合、X 染色体不活性化がインプリント型か否かは未だ明らかではない。そこで本研究では、ヒト胎盤組織におけるゲノムインプリンティングの全体像および X 染色体不活性化状態を明らかにすることを目的とした。

【研究方法】

ヒト胎盤組織の主要構成細胞は栄養膜細胞で、細胞性栄養膜細胞、合胞体性栄養膜細胞、絨毛外栄養膜細胞の 3 種類に分類される。免疫磁気細胞分離法を用いて、これら 3 種類の細胞を各々 2 例ずつ、計 6 例の胎盤より精製し、各々の細胞の発現プロファイルを RNA-seq 法で解析した。次に、母体血および胎盤組織の DNA 多型を利用し、アリル特異的遺伝子発現解析を行い、インプリント遺伝子を網羅的に同定した。さらに、同定した新規インプリント遺伝子の DNA メチル化状態を解析した。また、性染色体が XX の胎盤 18 例において、X 染色体不活

性化状態をアリル特異的遺伝子発現解析により決定した。

【研究結果】

免疫磁気細胞分離法により、3種類の栄養膜細胞を高純度（90%以上）に精製することに成功し、各細胞の遺伝子発現パターンを明らかにした。また、アリル特異的遺伝子発現解析により、29種類の新規ヒトインプリント遺伝子（18種類の父由来アリル発現遺伝子、11種類の母由来アリル発現遺伝子）を同定した。このうち少なくとも12遺伝子はアリル特異的なDNAメチル化によって制御されることが示唆された。さらに、ヒト胎盤におけるX染色体不活性化は不完全なインプリント型制御を受けており、父由来X染色体が母由来X染色体に比べて約1.5倍不活化されやすいことを明らかにした。

【考察及び結論】

本研究により、ヒト胎盤ではマウス胎盤とは全く異なる遺伝子群がインプリンティングを受けることが明らかとなった。同時に、X染色体不活性化に関しても、ヒト胎盤では不完全なインプリント型を示し、完全なインプリント型を示すマウス胎盤とは異なることが明らかとなった。これらの結果は、ゲノムインプリンティング機構と胎盤の進化の関わりを理解する上で重要なデータとなりうる。また、今後インプリント遺伝子と胎盤異常を呈するヒト疾患との関連を明らかにすることで、疾患の発症予防、治療法の開発にも繋がることが期待される。

＜研究の背景と目的＞

1. ヒト胎盤組織の特徴

胎盤は、胎児生存に不可欠な臓器である。初期胚は子宮内膜に着床後、子宮内膜へ浸潤しながら初期の胎盤を形成し、母体血と接すると母体から胎児への栄養供給が開始する。胎盤の主要構成細胞は栄養膜細胞であり、胎児血と母体血を隔て、胎児-母体間の栄養・ガス交換や、妊娠維持および胎児成長に必要なホルモン産生を行っている。ヒト胎盤の異常は、妊娠高血圧症候群¹⁾といった妊娠特有な疾患や胎児発育不全²⁾などの原因となりうることが知られている。特に、子宮内の環境悪化は、胎児および胎盤のエピゲノム変異をもたらし、胎盤の形成や機能に影響を及ぼし、出生後の児の身体的発育、精神神経学的な発達、さらには成人での疾患（高血圧および糖尿病）にも関与することが報告されている³⁾。

胎盤の構造は、母体血と接する面積を確保するために、生物種ごとに各々特徴的な構造を呈している。例えば、ウマやブタの胎盤は、子宮内全体に小さな胎盤組織が散在性の構造をとることで、母体血と触れる面積を確保している（散在性胎盤）⁴⁾。また、マウスなどの齧歯類では、円盤状の胎盤を有しており、迷路状のラビリンスと呼ばれる構造をとることで、母体血と接する面積を広げている。一方、ヒト胎盤は、肉眼的にはマウスと同じく円盤状の形態をとっているが、その組織構造はマウスのものと大きく異なる。すなわち、ヒト胎盤は絨毛と呼ばれる無数の分枝により形成され、微細な絨毛構造をとることで母体血と接触する面積を大幅に拡大している。

ヒト胎盤絨毛を構成する栄養膜細胞は、細胞性栄養膜細胞（Cytotrophoblast : CT）、絨毛外栄養膜細胞（Extravillous trophoblast : EVT）、合胞体性栄養膜細胞（Syncytiotrophoblast : ST）に分類される⁵⁾。初期 CT 細胞は、妊娠初期には胎盤

の絨毛基底膜に連続的に存在し、胎盤全体に分布している。CT 細胞は、高い増殖能を有する未分化な細胞であり、EVT 細胞および ST 細胞へ分化する⁶⁾。ST 細胞は CT 細胞が融合して多核の巨大な細胞を形成し、胎盤の母体側の表層に単層で分布し、胎児血と母体血を隔てる連続的な膜を形成している。また ST 細胞は、栄養・ガス交換やホルモン産生などの働きを担っている。この ST 細胞は、妊娠期間中、新陳代謝を続け、古くなった ST 細胞は母体血中へと排泄される⁷⁾。一方、EVT 細胞は絨毛から母体の脱落膜へ浸潤し、母体免疫細胞との相互作用により、免疫寛容成立における中心的な役割を担うとともに、らせん動脈のリモデリングを行い、胎盤における母体血の循環を促進している⁸⁾。また、胎盤絨毛には胚体外組織由来の栄養膜細胞以外にも、胚体組織由来の線維芽細胞や血管内皮細胞、Hofbauer 細胞と呼ばれるマクロファージなども存在する⁹⁾。これらの細胞はストローマ細胞と総称される (図 1)。

これまで、ヒト胎盤栄養膜細胞の研究には絨毛癌細胞株や CT 細胞、EVT 細胞の初代培養細胞を用いて盛んにおこなわれてきた¹⁰⁾。しかし、これらの解析結果が *in vivo* における細胞の性質を反映しているかどうかについては、十分な検討がなされていない。

2. ゲノムインプリンティングとその発現制御機構

哺乳類においては、一部の遺伝子の発現が由来する親の性に依存する、ゲノムインプリンティング機構が存在し、ヒトではこれまでにおよそ 80 個、マウスではおよそ 100 個のインプリント遺伝子が報告されている (<http://igc.otago.ac.nz/home.html>)。また、インプリント遺伝子は染色体上にクラスターを形成して存在することが知られている。このインプリント遺伝子の発現調節には、アリル特異的な DNA メチル化が重要であることが、マウスを使ったこれまでの研究で明らかとなっている (図 2)¹¹⁾。このアリル特異的な DNA

メチル化を生ずる領域は、DMR (Differentially methylated region) と呼ばれている。DMR のメチル化は、体細胞では細胞分裂を経ても安定的に維持されるが、生殖細胞ではダイナミックな変化を生ずる。卵子および精子の元になる細胞である始原生殖細胞で DMR のメチル化は一旦消去され、配偶子形成過程を通じて、卵子では卵子型、精子では精子型のメチル化インプリントが確立する (図 3 および図 4) ¹¹⁾。

確立した卵子型および精子型のメチル化インプリントは、受精後にみられるリプログラミング (ゲノム全体の脱メチル化) の影響を受けることなく、発生を通じて安定に維持される。生殖細胞形成過程や初期発生過程でこのゲノムインプリンティングに異常が生じると、マウス個体の発生、成長、形態形成、行動などに異常をきたすことが知られている ¹²⁾。ヒトでは、流産、死産、妊娠高血圧症候群、胎児発育不全などの胎盤異常と胎盤組織でのゲノムインプリンティング異常の関連が指摘されている ¹³⁾。また、インプリンティング機構の破綻は、Beckwith-Wiedemann 症候群や Angelmann 症候群、Silver-Russell 症候群、Prader-Willi 症候群などの先天異常症や網膜芽細胞腫などの癌の発生や進展につながるものが次第に明らかになってきている ¹²⁾。このように、ヒトにおいてゲノムインプリンティングは様々な疾患発症に関与しており、ヒトインプリント遺伝子の全体像を明らかにすることが重要であると考えた。

3. 胎盤におけるインプリント遺伝子の役割

マウスでは、雌核発生胚 (卵子核のみで構成される受精卵) と雄核発生胚 (精子核のみで構成される受精卵) は、いずれも妊娠中期に致死となる ¹⁴⁾。しかし、その表現型は両者で大きく異なり、雌核発生胚は胎盤の形成がほとんど起こらないのに対し、雄核発生胚は胎盤過形成を示す。同様に、ヒトにおいても雄核発生を原因とする、父 (精子) 由来ゲノムのみで構築される全胎状奇胎は、胎

盤の異常増殖を呈する¹⁵⁾。またゲノムインプリンティング機構は、脊椎動物のうち胎盤を有する哺乳類に特異的な現象であることが報告されている¹⁶⁾。つまり、胎盤はゲノムインプリンティングの生物学的意義を考える上で、極めて重要な臓器であると考えられている。

インプリント遺伝子の中には組織特異的に片親性発現を示すものが存在し、マウスでは特に胎盤や脳において組織特異的インプリント遺伝子が多数見つかっている¹⁷⁾。岡江らは、マウス胎盤および胎盤幹細胞を用い、網羅的なインプリント遺伝子の探索を行った¹⁸⁾。その結果、それまで報告されてきた多くの胎盤特異的インプリント遺伝子が母体組織のコンタミネーションによるものであり、実際にインプリントを受ける遺伝子は12種類であることが判明した。また、胎盤肥大を典型的な特徴とする体細胞クローンマウスの胎盤では、これらの胎盤特異的インプリント遺伝子の片親性発現が破綻していることを明らかにし、胎盤におけるインプリント遺伝子の機能的重要性を示した¹⁹⁾。しかし、マウスの胎盤特異的インプリント遺伝子のヒトホモログは、ヒト胎盤では片親性発現がみられず¹⁸⁾、ヒト胎盤におけるゲノムインプリンティングの全体像は全く報告されていない。

4. ヒト胎盤における X 染色体不活性化

X 染色体不活性化とは、哺乳類の雌の細胞において、2 本ある X 染色体のうち 1 本が不活性化される現象である²⁰⁾。雄の細胞は 1 本しか X 染色体を持たないため、雌の細胞では一方の X 染色体を不活性化することによって、X 染色体上の遺伝子発現量を補正している。有袋類では、胚体組織および胚体外組織ともに父由来の X 染色体が一部選択的に不活性化される、インプリント型の制御を受けている²¹⁾。またマウスでは、胚体組織における X 染色体不活性化は父由来または母由来の X 染色体のどちらか一方がランダムに選択されて不活性化さ

れるが、胎盤ではインプリント型制御を受けており、父由来の X 染色体が選択的に不活性化を受けている²²⁾。しかし、ヒト胎盤における X 染色体の不活性化に関しては、マウスと同様に父由来の X 染色体が不活性化されるという報告²³⁾やランダムな不活性化を呈するという報告²⁴⁾など様々であり、明確な結論には至っていない（表 1）²³⁾⁻³⁵⁾。その原因としては、サンプル調製方法の違い（胎児や母体細胞コンタミネーションの疑い）や、解析方法の違い（X 染色体不活性化のマーカーとして使用される遺伝子の違い）などが考えられる。そのため、ヒト胎盤における X 染色体不活性化状態を正確に評価するためには、精製した絨毛細胞を用いた網羅的な遺伝子解析が適切であると考えられる。

5. X 染色体上のインプリント遺伝子

マウスの X 染色体上のインプリント遺伝子は、Xlr gene family³⁶⁾、RhoX5/Pem³⁷⁾の報告がある。一方、これらの遺伝子のヒトホモログはいずれも、ゲノムインプリンティングを受けていない。また、これまでに X 染色体上のヒトインプリント遺伝子は報告されていない。しかしながらヒトにおいても X 染色体にゲノムインプリンティングが存在することを示唆する現象がいくつか知られている³⁸⁾⁻⁴³⁾。X 染色体のモノソミーは 99%が自然流産となるが³⁸⁾、出生した個体は Turner 症候群を呈する。この症候群は、大動脈の先天奇形、低身長、第 2 次性徴の欠如を主な特徴とする⁴⁴⁾。Turner 症候群の個体の持つ 1 本の X 染色体の由来が父由来か母由来かで、症状に違いがあることが様々な研究で明らかになっている。Turner 症候群の 70-80%が母由来 X 染色体のモノソミーであることや⁴³⁾、体格³⁸⁾、脂質代謝³⁹⁾、脳の高次機能⁴⁰⁾、神経学的発達⁴¹⁾が異なることが報告されている。特に X 染色体の部分欠損症例の脳の高次機能の解析によって、X 染色体短腕（Xp11.23）から長腕テロメアにかけてインプリント遺伝子が存在することが示唆されている⁴²⁾。

6. 研究目的

本研究では、ヒト胎盤におけるゲノムインプリンティングの全体像および X 染色体不活性化状態を明らかにすることを目的とした。そのため、起源の異なる複数の細胞から成り立つ胎盤から、まず、胎盤の主要な機能を担う栄養膜細胞を高純度に精製した上で、次世代シーケンサーを用いて網羅的な発現解析を行い、それぞれの細胞の特性を明らかにした。次に、母体のゲノム情報を元にアレル特異的発現解析を行い、常染色体上および X 染色体上インプリント遺伝子の網羅的探索および X 染色体不活性化がインプリント型制御を受けているか否かについて解析を行った。図 5 に研究の全体像を示した。

<研究方法>

1. 対象症例

東北大学医学系研究科倫理委員会に本研究計画を提出し、承認を得て研究を開始した（承認番号 2012-1-333）。その後、研究の継続と一部内容の変更を追加した申請を行い、さらに研究の承認を得た（承認番号 2015-1-219）。

母体合併症のない健康な妊婦で、母体の身体的理由以外の適応で人工妊娠中絶術を受ける妊娠初期（妊娠 5 週から 9 週）の患者に、本研究の目的について十分な説明を行い、同意が得られた場合は、胎盤組織を譲り受けた。妊娠週数については、経膈超音波検査により、胎児頭殿長（Crown-rump length : CRL）を計測し、日本超音波医学会の提唱する基準値⁴⁵⁾を用いて正確な妊娠週数を決定した。また、胎児心拍を認め、かつ形態学的に異常所見を認めなかった 29 症例の胎盤組織を収集した。胎児心拍を確認できたものは妊娠継続率が有意に高いと報告されている⁴⁶⁾。

2. ヒト胎盤構成細胞の分離及び精製

人工妊娠中絶術により得られた胎盤組織は、生理食塩水中で一時的に保存した。また、患者の末梢血 5 ml 採血し、EDTA 付加採血管に保存した。これらの検体は 1 時間以内に当研究室へ移送し、細胞の分離および精製を行った。精製法は、過去の論文⁴⁷⁾を元に、改変を加えた方法を用いた（図 6）。CT 細胞、EVT 細胞、ストローマ細胞の精製には、各々の細胞特異的な表面抗原である CD49f⁴⁸⁾、HLA-G⁴⁹⁾、CD90⁵⁰⁾を標的にしたポジティブセレクション法を用いた。ST 細胞の精製には、胎盤から放出された細胞より濃度勾配法⁵¹⁾を用いて ST 細胞を濃縮した上で、CT 細胞、EVT 細胞、ストローマ細胞、有核赤血球、免疫細胞の各々に特異的な表面抗原 CD49f、HLA-G、CD90、CD71⁵²⁾、CD45⁵³⁾を標的としたネ

ガティブセクション法を用いた。ヒト細胞の標準エピゲノムの解読を目的とした国際研究プロジェクトである国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) のガイドラインに準拠し⁵⁴⁾、細胞純度が 90%以上のサンプルのみを解析対象とした。

(1) 単一細胞の調整：胎盤組織は、生理食塩水で洗浄後、少量の生理食塩水を加え、外科鉗を用いて細切した。次に細切した組織を 50 ml のチューブに移し、Accumax (Innovative Cell Technologies 社)、TrypLE (Life Technologies 社) 各々 20 ml を加え、37°C で 15 分間震盪した。さらに、70 μ m フィルター (Nylon 製、Falcon 社) でろ過を行い、上清を回収した。回収した上清に 10% FBS を含む DMEM 液 (FBS/DMEM Gibco 社) 5 ml を加え、380 \times g、3 分間遠心した後、上清を破棄し、細胞塊を得た。次に細胞塊に FBS/DMEM/PBS 液 (和光純薬工業社) を 10 ml 加え、上下動撹拌した。70 μ m フィルターに残った組織も、この操作を 3 回繰り返す、細胞浮遊液を得た。得られた細胞浮遊液は、再度 70 μ m フィルターでろ過し、380 \times g、3 分間遠心、上清を破棄し、PBS/EDTA (2% FBS、1 mM EDTA を含む PBS) 液 1 ml を加え、細胞を懸濁した。

(2) CT 細胞の精製：(1)で得られた単一な細胞調整液に、PE 標識抗 CD49f 抗体 (クローン GoH3、Miltenyi Biotec 社) を 50 μ l 加え、遮光下で 10 分間インキュベートした。さらに、Human PE selection kit (STEMCELL Technologies 社) を使用して Easy sep (STEMCELL Technologies 社) による免疫磁気細胞精製を行い、ポジティブセクションによる細胞精製を行った。精製した細胞数は、倒立顕微鏡 (Olympus 社、CKX31) を用い、100 倍率視野下に Burkert-Turk 細胞計算盤 (Erma 社) を用いて計算した。また、細胞純度は、蛍光実体顕微鏡 (Olympus 社、SZX16) で 115 倍率視野下に全細胞 50 個以上を数え、(PE 陽性細胞) / (全

細胞数) ×100 にて細胞純度 (%) を算出した。細胞の発現解析用に 2 例、アリル特異的解析用にさらに 19 例を加えた 21 例、X 染色体不活性化状態の分布解析用に 13 例を用いた。

(3) EVT 細胞の精製: (1)で得られた単一細胞調整液に PE 標識抗 HLA-G 抗体(クローン MEM-G/9、Novus Biologicals 社) を 50 μ l 加えた。(2)と同様、遮光下で 10 分間インキュベートし、Human PE selection kit を使用して Easy sep による免疫磁気細胞精製を行い、ポジティブセクションによる細胞精製を行った。精製した細胞数は、倒立顕微鏡で 100 倍率視野下に Burker-Turk 細胞計算盤を用いて計算した。細胞純度は、蛍光実体顕微鏡で 115 倍率視野下に全細胞 50 個以上を数え、(PE 陽性細胞) / (全細胞数) ×100 にて細胞純度 (%) を算出した。細胞の発現解析用に 2 例を用いた。

(4) ストローマ細胞の精製: (1)で得られた単一細胞調整液に、PE 標識抗 CD90 抗体 (クローン DG3、Miltenyi Biotec 社) を 50 μ l 加えた。(2)同様、遮光下で 10 分間インキュベートし、Human PE selectin kit を使用して Easy sep による免疫磁気細胞精製を行い、ポジティブセクションによる細胞精製を行った。精製した細胞数は、倒立顕微鏡で 100 倍率視野下に Burker-Turk 細胞計算盤を用いて計算した。細胞純度は、蛍光実体顕微鏡で 115 倍率視野下に全細胞 50 個以上を数え、(PE 陽性細胞) / (全細胞数) ×100 にて細胞純度 (%) を算出した。細胞の発現解析用に 2 例を用いた。

(5) ST 細胞の精製:胎盤を洗浄した生理食塩水を 70 μ m フィルターろ過後、380 \times g、3 分間遠心し、上清を破棄し、FBS/PBS 液 1 ml を加え単一細胞の調整を行った。細胞浮遊液を Percoll 濃度勾配液 (40/70%) に静かに滴下し、1200 \times g、20 分間

の遠心分離を行い、上清を回収し、ST 細胞を精製した。FBS/PBS 液を加え 380×g、3 分間遠心したのち、100 μl の PBS/EDTA に懸濁し、CD45 depletion Cocktail (STEMCELL Technologies 社) 20 μl、PE 標識抗 CD49f 抗体、PE 標識抗 CD90 抗体 (クローン DG3、Miltenyi Biotec 社)、PE 標識抗 HLA-G 抗体、PE 標識抗 CD71 抗体 (クローン AC102、Miltenyi Biotec 社) を各々 10 μl 加え、Human PE selection kit を使用して Easy sep による免疫磁気細胞精製を行い、ネガティブセレクションによる細胞精製を行った。精製した細胞の純度は、実態顕微鏡で 115 倍視野下に全細胞 50 個以上を数え、(巨細胞)/(全細胞)×100 にて細胞純度 (%) を計算した。細胞の発現解析用に 2 例を用いた。

(6) 細胞保存：精製したそれぞれの細胞は、2000×g、3 分間の遠心分離によりペレット化し、液体窒素を用いて凍結後、-80℃にて凍結保存した。

3. ゲノム DNA の抽出

凍結保存された細胞を、Genome Lysis 液 (50 mM Tris-HCl、20 mM EDTA、100 mM NaCl、1% SDS) 500 μl と Proteinase K (Roche 社、600 U/ml) 10 μl の混合液に懸濁の上、60℃にて一晩振盪した。その後、室温にて、フェノール 500 μl を加え、30 分上下に攪拌し、13000×g、3 分間遠心後、上清を回収した (フェノール処理)。次にフェノール/クロロホルム液 500 μl を加え、15 分上下に攪拌し、13000×g、3 分間遠心、上清を回収した (フェノール/クロロホルム処理)。クロロホルム液 500 μl を加え、15 分上下攪拌後、13000×g、3 分間遠心し、上清を回収 (クロロホルム処理) した。さらに、RNase 10 μl を加え、37℃にて 60 分インキュベーション (RNase 処理) 後、再度フェノール/クロロホルム処理およびクロロホルム処理を行った。その後イソプロパノール 500 μl を加え、DNA を沈降させ、80% エタノールで洗浄後、30 μl の MilliQ 水で溶解した。

母体血は、DNA Extractor WB-Rapid Kit（和光純薬工業社）を用いて、ゲノム DNA を抽出後、上記 RNase 処理、フェノール/クロロホルム処理、クロロホルム処理を行い、エタノール沈降にてゲノム DNA を抽出し、80% エタノールにて洗浄後、30 μ l の MilliQ 水で溶解した。得られたゲノム DNA 溶解液は、分光光度計（Nano drop ND1000、LMS 社）を用いて吸光度を測定し、濃度 50 ng/ μ l 以上、吸光度 260/280 値が 1.8 以上、260/230 値が 2.0 以上であることを確認し、続く実験使用までは -30°Cにて凍結保存した。

4. RNA 抽出

各細胞からの RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit（Qiagen 社）を用いて実施した。得られた RNA 溶解液は、分光光度計を用いて吸光度を測定し、濃度 10 ng/ μ l 以上、吸光度 260/280 値が 1.8 以上、260/230 値が 2.0 以上であることを確認した。さらに、Agilent TapeStation 2200 および RNA screenTape（Agilent 社）を用いて RNA 分解度を計測し、RINe 値 8.0 以上であることを確認した。続く実験使用までは、-30°Cにて凍結保存した。

5. 性別判定

胎盤サンプルの性別は、Y 染色体特異的遺伝子である *SRY*（Sex-determining region Y）遺伝子で判別を行った。母体血 DNA と精子 DNA を、それぞれネガティブおよびポジティブコントロールとして、各細胞より抽出したゲノム DNA を SYBR Premix Ex Taq II（Takara Bio 社）および StepOnePlus Real-Time PCR System（Applied Biosystems 社）を用いて Real time-PCR を行った（反応条件：95°C 30 秒後、95°C 5 秒+62°C 30 秒を 40 サイクル）。 $\Delta\Delta C_t$ 法⁵⁵⁾にて、*SRY* 陽性となったサンプルを XY と判定した。PCR に用いたプライマー配列は以下のとおりである。

SRY forward: 5'-TGAAATTAAATATAAGAAAGTGAGGGTTG-3'

SRY reverse: 5'-CCACACACTCAAAAATAAAACACCA-3'

6. 全 RNA のシーケンス解析

Total RNA から poly A を含む mRNA を poly T を付加した磁気ビーズを用いて回収し、TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep kit (Illumina 社) を用いて、操作説明書どおりにサンプル調整を行い、ライブラリーを作成した。ライブラリー液は、HiSeq 2500 (Illumina 社) にて 101 bp ペアエンドにて配列解析を行った。

7. 遺伝子オントロジー (Gene ontology: GO) 解析

CT 細胞と EVT 細胞、CT 細胞と ST 細胞の発現をそれぞれ比較し、10 FPKM (fragments per kilo bases of exons for per million mapped reads) 以上、かつ 10 倍以上の発現量の変化があった遺伝子を抽出した。CT 細胞に対して EVT 細胞および ST 細胞で発現が上昇した遺伝子と、発現が減少した遺伝子は、解析ソフト DAVID⁵⁶⁾を用いて GO 解析を行った。Benjamini-Hochbeng 法を用いて多重比較補正を行い、生物学的プロセスの GO term のうち、 $p < 0.05$ の上位 5 term を有意な結果として抽出した。

8. 全 Exome のシーケンス解析

DNA Shearing システム M220 (Covaris 社) を用いて 1.0 μ g のゲノム DNA を 150-200 bp に断片化し、SureSelect Human All Exon V5+UTRs (Agilent 社) を用いて説明書どおりにサンプル調整を行い、ライブラリーを作成した。Index を付加し、HiSeq 2500 にて 101 bp ペアエンドにて配列解析を行った。

9. アリル特異的遺伝子発現解析

全 Exome シークエンス解析で得られたリードは Bowtie2⁵⁷⁾でヒトゲノム(hg19)にマッピングし、GATK⁵⁸⁾にて一塩基多型 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)を抽出した。Total 20 reads 以上マッピングされた SNP のうち、母体血のゲノムでホモ接合、CT 細胞ゲノムでヘテロ接合の SNP を抽出し、父由来・母由来のアリルを識別した。RNA シークエンス解析で得られたリードは Tophat2⁵⁹⁾を用いてヒトゲノムにマッピングした。遺伝子毎に (母由来アリル発現量) / (両アリル発現量) ×100 = (母由来アリル発現率) (%) を算出した。アリル特異的遺伝子発現解析の全体像は図 7 に示した。

10. バイサルファイトシークエンス解析

ゲノム DNA は、EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research 社) を用いてバイサルファイト変換し、TaKaRa EpiTaq™ HS (Takara Bio 社) で PCR 増幅を行った。PCR 産物は、pGEM-T Easy vector (Promega 社) にクローニングし、各々のクローンをダイレクトシークエンシング法によって解析した。解析には、以下の配列のプライマーを用いた。

NUDT10 DMR forward: 5'-TTT TGT AAG GTG GGA ATT TGT TGA-3'

NUDT10 DMR reverse: 5'-CTC CTA AAA CCA AAA ACC TCC T-3'

11. *NUDT10* 遺伝子の発現定量解析

NUDT10 の発現量と X 染色体不活化状態との関係を明らかにする目的で、*NUDT-10* 遺伝子の発現定量解析を行った。抽出した RNA は、Oligo dT プライマーを用いて、Prime Script II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara bio 社) にて cDNA に合成した。SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio 社) および StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社) を用いて Real time-PCR を行っ

た（反応条件：95℃ 30 秒後、95℃ 5 秒+62℃ 30 秒を 40 サイクル、95℃ 15 秒、60℃ 1 分）。検量線法⁶⁰⁾を用いて検量線を作成し、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* を用いて補正し、遺伝子発現量を定量化した。以下の配列を示すプライマーを用いた。

NUDT10 forward: 5'-CAAGTATGTGAATGGATGGATGAA -3'

NUDT10 reverse: 5'-TTGTAATAAACAGGGAAGAAGTGTCC -3'

GAPDH forward: 5'-CCTCAACGACCACTTTGTCAAG-3'

GAPDH reverse: 5'-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTG-3'

12. 統計学的解析

個体間での X 染色体不活化状態のばらつきの原因を明らかにする目的で、以下の統計解析を行った。X 染色体不活性化を受ける発生段階で存在する胎盤前駆細胞数を n 、父由来 X 染色体が活性化する確率（母由来 X 染色体が不活性化される確率）を p と仮定した。また、前駆細胞数 n は平均 μ 、標準偏差 σ の正規分布に従うと仮定した。 p 、 μ 、 σ を変数として 2 項分布を作成し、実データとの比較より、最小の平均二乗誤差を持つ分布を決定した。解析には、C 言語プログラミングを用いた。

13. シークエンスデータの登録

本研究で得られたデータは DDBJ Japanese Genotype-phenotype Archive データベースに登録した（登録番号 JGAS000000000038）。また、ヒト細胞の標準エピゲノムの解読を目的とした国際研究プロジェクトである国際ヒトエピゲノムコンソーシアム（IHEC）にも登録した。

<研究結果>

1. 胎盤構成細胞の精製

胎盤構成細胞の特徴を明らかにするために、まず、CT 細胞、EVT 細胞、ST 細胞を各々精製した。またコントロールとして、胚体組織由来のストローマ細胞も精製した。CT 細胞、EVT 細胞、ストローマ細胞は、胎盤組織より単一細胞を精製し、各々の表面抗原に対する抗体を用いて免疫磁気細胞分離法を用いたポジティブセクション法にて精製した。一方、ST 細胞は胎盤洗浄液に遊離した細胞から、CT 細胞・EVT 細胞・ストローマ細胞・免疫細胞・赤血球をパーコールや免疫磁気細胞分離法を用いて除いたネガティブセクション法にて精製した。精製した胎盤構成細胞は、免疫染色法により純度を測定し、すべての検体で 90%以上、平均では 94%であることを確認した（表 2）。

胎盤構成細胞の既知の発現マーカーについて、各々の細胞の発現特性を RNA-seq 法により解析した（図 8）。未精製胎盤での RNA 発現量を基準とし、CT 細胞マーカーとして *ELF5* と *ITGA6*、EVT 細胞マーカーとして *HLA-G*、ST 細胞マーカーとして *SDC1* と *CGB*、ストローマ細胞マーカーとして *VIM* と *THY1* 合計 7 種類の遺伝子の発現量を解析した。CT 細胞では、未精製胎盤に比べて、CT 細胞のマーカーである *ELF5* と *ITGA6* が 4~5 倍に上昇し、分化マーカーである *SDC1*、*CGB*、*VIM*、*THY1* は 0.1~0.003 倍に低下していた。EVT 細胞では *HLA-G* が 66 倍、その他のマーカーが 0.5~0.002 倍であった。ST 細胞では、ST 細胞マーカーである *SDC1* と *CGB* が 1.4~0.8 倍、その他のマーカーが 0.5~0.005 倍であった。ストローマ細胞では、*VIM* と *THY1* が 7~8 倍、その他のマーカーが 0.5~0.005 倍であった。以上より、精製された細胞集団が、各細胞に特徴的な発現パターンを示していることが明らかとなった。また、Y 染色体特異的遺伝子 *SRY* を用いた性別判定により、CT 細胞は XX 個体・XY 個体が各々 18 検体・3 検体、EVT 細胞は XX 個体が 2 検体、ST 細胞は XY 個体が 2 検体、ストロー

マ細胞は XX 個体が 2 検体、未精製の胎盤は XX 個体・XY 個体が各々1 検体であることを確認した。

2. 胎盤構成細胞の次世代シーケンスを用いた発現解析

各細胞の遺伝子発現は、RNA-seq 法で次世代シーケンス解析を行った。各細胞の全遺伝子発現の相関に基づき、系統樹を作成した（図 9）。Biological replicate 間で強い相関が得られた。また、栄養膜細胞に分類される CT 細胞、ST 細胞および EVT 細胞は未精製胎盤と同じ系統枝に分類され、胚体組織由来であるストローマ細胞は別の系統枝に分類された。胎盤に最も多量に存在する ST 細胞は未精製胎盤と近い発現パターンを示し、CT 細胞と EVT 細胞が近い発現パターンを示した。以上より、今回用いた細胞精製方法は、再現性よく、かつ、高純度に胎盤構成細胞を精製することが可能であることが示された。

CT 細胞は、栄養膜細胞の中で比較的未分化な細胞であり、EVT 細胞や ST 細胞へ分化すると考えられている。そこで、分化に伴い変動する遺伝子群を抽出するために、CT 細胞と EVT 細胞、および CT 細胞と ST 細胞の発現を比較し、CT 細胞に対して EVT 細胞および ST 細胞で発現が上昇した遺伝子と、発現が減少した遺伝子を各々抽出し、遺伝子オントロジー（GO）解析を行った（図 10 および表 3）。CT 細胞に対して EVT 細胞で発現が上昇した遺伝子は、EVT 細胞表面抗原マーカーである *HLA-G* や細胞接着因子の *MMP2* などが挙げられた。GO 解析では、妊娠、炎症反応、創傷治癒、生体防御、免疫反応の生物学的プロセスが抽出され、EVT 細胞の細胞特性を反映した結果となった。また、CT 細胞に対して ST 細胞で発現が上昇した遺伝子は胎盤特異的ホルモンである *CGA*、*CGB* などが挙げられた。GO 解析では、ガス交換、ホルモン産生、酸素運搬、妊娠の生物学的プロセスが抽出され、ST 細胞の細胞特性を反映した結果となった。一方、CT 細胞に対して ST 細胞で発現が減少した遺伝子群は、未分化マ

カーである *ELF5* や細胞周期に関わるサイクリン関連遺伝子 *CDK* などが挙げられた。GO 解析では、細胞分裂や細胞周期に関わる生物学的プロセスが抽出された。

インプリント遺伝子は胎盤発生に重要な役割を果たしている⁶¹⁾。また、組織・細胞特異的なインプリント遺伝子も報告されており、各々の胎盤構成細胞において、異なる発現パターンを示していると推察される。そこで、栄養膜細胞の3細胞系列における既知の41種類のインプリント遺伝子の発現比較を行った(表4)。インプリント遺伝子の発現は、EVT細胞やST細胞に比べ、CT細胞で有意に上昇していた(スチューデントの t 検定 $p < 0.05$)。なお、妊娠7週以降で胎児心拍を確認できた流産組織には、生存可能な染色体異常(Trisomy 13, 18, 21, X monosomy)が有意に高いといわれており⁶²⁾、Exome 解析にて16番染色体のリード数が1.5倍を示し Trisomy 16 と診断した症例と X 染色体にヘテロ接合を示す SNP が極端に少なく X Monosomy と診断された症例の、合計2症例は解析から除外した。精製に用いたサンプルの臨床情報、性別判定、細胞純度および次世代シーケンス解析で、ゲノムにユニークにマップされたリード数の一覧を表2に示した。

3. CT細胞におけるインプリント遺伝子の網羅的探索

栄養膜細胞の遺伝子発現解析より、CT細胞で多くのインプリント遺伝子が高発現していることが明らかとなった。そこで、CT細胞を用いてアレル特異的遺伝子発現解析を行い、新規インプリント遺伝子の網羅的探索を行った。

まず、母由来および父由来アレルを区別するため、母体血およびCT細胞のゲノムDNAを用いて Exome シーケンス解析を行い、母体血でホモ接合、CT細胞でヘテロ接合を示す SNP を抽出した。続いて RNA シーケンス解析(RNA-seq)の結果に基づき、SNP 毎に、母由来アレルおよび父由来アレルのリード数を算

出した。さらに、各遺伝子について母由来アリのリードの割合を算出した。図 11 に一例を示した。*CYP2J2* 遺伝子に存在する SNP は、母体血で G/G のホモ接合、CT 細胞で T/G のヘテロ接合である。よって、CT 細胞では G が母由来アリ、T が父由来アリである。CT 細胞の RNA シークエンス解析より、同 SNP は G:49 リード、T:978 リードであり、母由来アリからの発現率は $(49 \div (978 + 49)) \times 100 = 4.8\%$ と算出された。よって、*CYP2J2* は父由来アリ特異的発現を示すインプリント遺伝子と判定した。

このように遺伝子ごとに母由来アリ発現率を算出し、3 サンプル以上でアリ特異的な発現情報が得られた 6302 遺伝子を解析対象とし、新規インプリント遺伝子を探索した。各遺伝子の母由来アリ発現率の分布を図 12 に示した。ほとんどの遺伝子が 50% に近い母由来アリ発現率を示し、両アリからほぼ同程度発現していることが確認された。本研究では、マウス胎盤におけるインプリント遺伝子の網羅的探索を行った過去の論文⁶³⁾に基づき、母由来アリ発現率 65% 以上のものを母由来アリ発現優位遺伝子、35% 以下のものを父由来アリ発現優位遺伝子と定義した。その結果、父由来アリ発現遺伝子として既に報告されている 23 種類のインプリント遺伝子は、全て父由来アリ発現を示すことが確認された。一方、母由来アリ発現遺伝子と報告されている 20 種類のインプリント遺伝子の内、11 種類の遺伝子が母由来アリ発現を示していたが、9 種類の遺伝子は両アリ発現を示した。アリ特異的な発現情報が得られた既に報告されている 43 種類のインプリント遺伝子について母由来アリ発現率を図 13 に示した。

既知のインプリント遺伝子以外で、母由来アリ発現率 65% 以上の遺伝子および 35% 以下の遺伝子を、各々母由来アリ発現、父由来アリ発現の新規インプリント遺伝子として抽出した。その結果、18 種類の父由来アリ発現遺伝子および 11 種類の母由来アリ発現遺伝子の合計 29 種類のインプリント遺伝

子を単離した。これらインプリント遺伝子の母由来アリル発現率を図 14 に示した。また、新規インプリント遺伝子について、栄養膜細胞間での発現量を比較したところ、既知のインプリント遺伝子同様に、EVT 細胞や ST 細胞に比べ、CT 細胞で有意に発現が上昇していた(スチューデントの t 検定 $p < 0.05$)。すなわち、新規インプリント遺伝子は、既知のインプリント遺伝子同様、CT 細胞において機能する可能性が示唆された (表 5)。

4. 新規インプリント遺伝子の DMR の検索

多くのインプリント遺伝子は、生殖細胞形成過程で獲得される DMR のメチル化によって制御される。本研究で単離したインプリント遺伝子の発現調節に DMR が関与するかどうかについて、岡江らが報告したヒト卵子、精子、胚盤胞および CT 細胞の全ゲノム DNA メチル化データ⁶⁴⁾を用いて解析を行った。

その結果、父由来アリル発現を示す *CUL7* の上流に、卵子で高メチル化、精子で低メチル化、胚盤胞で中等度メチル化、そして CT 細胞にて中等度メチル化を示す DMR が存在した (図 15)。この結果は、*CUL7* の母由来アリル発現は、卵子で獲得された DMR によって抑制されていることを示唆している。同様に、DMR を検索した結果、新規インプリント遺伝子の DMR を見出した (表 5)。18 種類の父由来アリル発現遺伝子のうち、11 種類がプロモーター領域に、3 種類の gene body 領域に DMR が存在した。一方、11 種類の母由来アリル発現遺伝子では、1 種類だけ Gene body 領域に DMR が存在した。また興味深いことに、いくつかの母由来アリル発現遺伝子は、DMR を有する父由来アリル発現遺伝子の近傍に存在し、クラスターを形成することを見出した (*S1PR2*、*PDK4* および *PROSER2*) (図 16)。これらクラスター内の遺伝子については、1 つの DMR が、近傍の複数のインプリント遺伝子を制御している可能性が考えられた。

5. ヒト胎盤における X 染色体不活性化現象

ヒト胎盤において、X 染色体不活性化現象 (X chromosome inactivation : X 染色体不活性化) がインプリント型か否かを解析するために、性染色体が XX 型の CT 細胞を用いて X 染色体連鎖遺伝子の母由来アリルの発現率を算出した。結果の一例として CT-3 を図 17 に示した。この症例では X 染色体上の多くの遺伝子が母由来アリル発現を示しており、父由来 X 染色体が不活性化を受けていることが明らかとなった。また、*XIST* は父由来アリル発現を示し、父由来 X 染色体不活性化現象に関与していることが示唆された。さらに、一部の X 染色体連鎖遺伝子は、母由来アリル発現率が 50% に近い値を示しており、これらは既知の不活性化されない遺伝子 (エスケープ遺伝子) であった。

XX 核型を示す CT 細胞 18 検体を用いて、サンプル毎に X 染色体連鎖遺伝子の母由来アリルの発現率を算出した (図 18)。母由来アリル発現率はサンプルごとに異なる分布を示しており、X 染色体不活性化は個体により多様性を示したが、全体の母由来アリル発現率の平均 $66.2 \pm 17.3\%$ と 50% を有意に上回っており、父由来 X 染色体が不活性化を受けやすいことが示唆された。

個々の X 染色体連鎖遺伝子の母由来アリル発現率の個体間での違いを見るために、遺伝子ごとの母由来アリル発現率をヒートマップに示した (図 19)。常染色体上のインプリント遺伝子はサンプル間で変化しなかったのに対し、X 染色体上の遺伝子はサンプル毎に母由来アリル発現率に多様性を示した。また、同一サンプル内では、遺伝子間でほぼ同等の母由来アリル発現率を示した (既知のエスケープ遺伝子を除く)。

6. エスケープ遺伝子の同定

エスケープ遺伝子を同定するために、特に父由来アリル不活性化が強かった CT-1、CT-2、CT-3 の 3 サンプルを用いて、遺伝子ごとに不活性化アリルからの

発現率を計算した。活性化アレルからの発現量を 100 としたとき、不活性化アレルからの発現量を I とした。各遺伝子の母由来アレル発現率 G% と、個体の母由来アレル発現率の平均 D% から、不活性化アレル発現量 I を計算した。概略を図 20 に示した。父由来 X 染色体不活性化を示す細胞（母由来 X 染色体活性細胞）での、ある遺伝子の父由来アレルからの発現は I、母由来アレルからの発現は 100 となる。逆に、母由来 X 染色体活性化を示す細胞での、ある遺伝子の母由来・父由来アレルからの発現は、おのおの 100、I となる。個体内では、母由来 X 染色体活性化の細胞が D%、父由来 X 染色体活性化の細胞が 100-D% 存在することから、母由来・父由来アレル全体の発現量は、それぞれ $[100 * D + (100 - D) * I]$ 、 $[D * I + (100 - D) * 100]$ となる。この計算により、この遺伝子の母由来アレル発現率 G は $100 * [100 * D + (100 - D) * I] / [(100 + I) * 100]$ と求められる。以上の式を変換すると、 $I = 100 * (D - G) / (D + G - 100)$ となる。これより、各遺伝子の母由来アレル発現率 (G) と、個体の母由来アレル発現率の平均 (D) から、各遺伝子の不活性化アレル発現量 (I) を算出した。

X 染色体連鎖遺伝子における不活性化アレル発現量 I の 3 サンプル (CT-1、CT-2、CT-3) 平均値を図 21 に示した。不活性化アレル発現量 (I) が高い遺伝子は、X 染色体の短腕テロメア側に多く存在し、これらは偽常染色体領域に含まれていた。過去に報告された解析手法に基づき⁶⁵⁾、不活性化アレルからの発現が、活性化アレルからの発現の 10% 以上あるものをエスケープ遺伝子と定義した。その結果、解析可能であった 90 遺伝子中 18 種類のエスケープ遺伝子を同定した (表 7)。既知のエスケープ遺伝子⁶⁶⁾のほかに 4 つの新規エスケープ遺伝子 (*LOC389906*, *CHM*, *TXLNG* および *YIPF6*) を同定した。

7. X 染色体上のインプリント遺伝子の探索

父由来 X 染色体からのみ発現しているインプリント遺伝子は、母由来 X 染色

体しか有しない XY 個体では発現しておらず、父由来 X 染色体が不活性化されていない XX 個体では発現を示すはずである。このことを利用し、X 染色体上の遺伝子において、XY 個体で低発現、XX 個体で高発現の遺伝子を探索すると、2 つの遺伝子 *XIST* (X-inactive specific transcript) と *NUDT10* (nudix nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif 10) が抽出された。*XIST* は X 染色体不活性化の開始に必須の遺伝子⁶⁶であり、X 染色体不活性化が起こっている XX でのみ発現を示していることに矛盾しない。

次に *NUDT10* について、解析を進めた。*NUDT10* 発現量を個体の母由来アリル発現率平均値と比較したところ、両者の間で強い負の相関 ($R^2 = 0.8448$) が見られた (図 22)。つまり、母由来 X 染色体の発現率が下がるほど、即ち父由来 X 染色体の発現率が上がるほど、*NUDT10* の発現量が上昇することが明らかとなった。*NUDT10* には SNP が存在せず、アリル特異的発現解析が不可能であった。そこで *NUDT10* のプロモーター領域に解析を拡大し、SNP を抽出した。その DNA メチル化状態を調べたところ、母由来アリルの DNA メチル化は高メチル化状態が維持されるが、*NUDT10* の発現量が増加するに従い父由来アリルの DNA メチル化が低下することが明らかとなった (図 23)。すなわち、*NUDT10* のプロモーター領域は父由来アリルの DNA メチル化が低下することで発現し、父由来 X 染色体の発現率が上昇するにつれて *NUDT10* の発現が増加することが明らかとなった。以上の結果より、*NUDT10* は父由来 X 染色体から発現するインプリント遺伝子であることが示唆された。

8. X 染色体不活性化状態の分布の統計学的モデル

NUDT10 発現量と個体の母由来アリル発現率の平均値が強い負の相関を示したことより、アリル特異的な RNA/Exome-seq を行わずとも、*NUDT10* 発現量からサンプルの母由来アリル発現率を推定することができることが示唆された。

そこで、上記でアリル特異的発現解析を行った 18 サンプルのデータから検量線を作成し（図 24）、新たに XX 個体胎盤 13 サンプルの母由来アリル発現率を qRT-PCR のデータから算出した。全 31 サンプルの母由来アリル発現率は、図 25 および図 26 に示したような分布となり、図 18 で示された母由来アリル発現率の個体間の多様性を確認できた。

ヒト X 染色体不活性化の個体間の多様性の分布機構を明らかにするために、個体の母由来アリル発現率の平均の分布について統計学的モデル構築を行った。X 染色体不活性化は、胚発生の初期段階で起こり、父由来 X 染色体、母由来 X 染色体のどちらかが不活性化され、その後の増殖・分化の過程でその状態は維持されていると考えられている。X 染色体不活性化を受ける段階でプールされている胎盤前駆細胞数 n 、父由来 X が活性化する確率（母由来 X が不活性化される確率） p を与えると、父由来 X が活性化されている細胞の割合は 2 項分布に従うことになる。X 染色体不活性化が開始される時期は個体ごとに多様性を示すことを考慮し、 n は正規分布に従うと仮定すると、 $n = 5.8 \pm 3.2$ を中心とした分布、 $p = 0.4$ のモデルが最も今回の結果の分布に合致することが明らかとなった（図 27）。まとめると、 n 個のプール細胞の時点で X 染色体不活性化は起こり、確率 p で父由来 X が活性化されやすい、つまり、父由来 X は母由来 X に比較して 1.5 倍不活性化を受けやすいことが明らかとなった。ヒト胎盤においては、完全なランダムな X 染色体不活性化ではなく、60:40 の弱いインプリント型制御により父由来 X 染色体不活性化が起こっていることが示唆された。

＜考 察＞

1. 胎盤構成細胞の遺伝子発現の特性について

胎盤のゲノムインプリンティングを解析する上で、母体組織のコンタミネーションによる影響に配慮をしなければならないが¹⁸⁾、本研究では胎盤を構成する細胞である CT 細胞を精製することにより、母体細胞や胎児細胞のコンタミネーションの影響を最小限に抑えることに成功した。CT 細胞は ST 細胞もしくは EVT 細胞へと分化する能力を持つ、比較的未分化な細胞である⁹⁾。今回の研究で、CT 細胞では細胞増殖および細胞周期に関する遺伝子の発現が多く発現しており、未分化な細胞の性質が反映された結果を得た。CT 細胞の遺伝子発現をマイクロアレイにて解析した過去の論文⁶⁷⁾でも、G タンパク質共役受容体 (*GPR*) 遺伝子ファミリーや溶質輸送体遺伝子 (*SLC*) ファミリーといったシグナル伝達に関連する遺伝子や、*ELF5* といった転写因子などに関わる遺伝子産物が濃縮されており、今回の研究と矛盾しない結果であった。CT 細胞は胎盤構成細胞の中で、細胞増殖が盛んにおこなわれている細胞集団であると言える。

ST 細胞は CT 細胞が融合・分化した細胞であり、胎盤におけるガス交換やホルモン産生など、胎盤で主要な機能を発揮している細胞である⁷⁾。本研究においてもガス交換、ホルモン産生、酸素運搬、妊娠に関わる遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった。これまでに、CT 細胞から ST 細胞へ分化誘導を行った細胞を用いて CT 細胞との遺伝子発現比較を行った研究があり⁶⁸⁾、インテグリン遺伝子ファミリー *ITGA* やケラチン *KRT* などの細胞骨格に関わる遺伝子、cyclophilin (*PPI*) などの代謝に関連する遺伝子、*HIF1α* などの遺伝子発現を制御する遺伝子、*CGA*、*CGB* などのホルモン産生、*CSF* といった細胞間相互作用を制御する遺伝子などに変化があったと報告されている。本研究では、CT 細胞に比べ ST 細胞で細胞分裂サイクル遺伝子 (*CDC*) やキネシン (*KIF*) など、細

胞分裂に関わる遺伝子発現が低下していることを新たに見出した。CT 細胞が盛んに細胞増殖を行う一方で、ST 細胞では細胞分裂せず、古くなった細胞核は絨毛間腔に排泄されることが報告されているが⁷⁾、この結果は、CT 細胞と ST 細胞の特性の違いを反映したものと考えられる。本研究では、培養・分化誘導の過程を経ずに、胎盤から ST 細胞を精製し発現解析が行っているため、より生体内での細胞の特徴を反映した解析となったと考えられる。

EVT 細胞では、胎盤組織片から EVT 細胞への分化誘導を行った培養細胞を用いて CT 細胞との遺伝子発現比較を行った研究があり⁶⁹⁾、*IL-1R* や *CCR1*、*IFI* とったサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子、*PAPPA*、*ADAM19*、*TIMP2* といった細胞遊走関連遺伝子、*ITGA*、*ITGB* などの細胞接着関連遺伝子などの発現上昇が報告されている。我々のデータも同様の結果を示した。また、妊娠や炎症反応、創傷治癒、生体防御、免疫反応に関わる遺伝子の発現上昇もみられた。*CCL*、*PTGER*、*TLR* などの創傷治癒関連の遺伝子の発現上昇が見られ、らせん動脈のリモデリングや脱落膜での母体免疫細胞との相互作用などの細胞特性を反映していると考えられた。

また、CT 細胞では、EVT 細胞に比較して *PEG3* や *PEG10* などのインプリント遺伝子の発現が高いと報告されているが⁶⁹⁾、本研究でも、ST 細胞や EVT 細胞に比較し CT 細胞では、高発現しているインプリント遺伝子が多く、未分化細胞でのインプリント遺伝子発現の重要性が示唆された。例えば、*IGF2* は増殖促進、*H19* や *CDKN1C* は増殖抑制に働いていることが知られている⁷⁰⁾が、これら真逆の機能を持つインプリント遺伝子が、双方バランスよく発現することにより、胎盤の適切な増殖の緻密なコントロールに関与していると考えられる。また、*DNMT1* は DNA メチル化酵素をコードする遺伝子で、DNA 複製時の DNA メチル化維持に必須であり⁷¹⁾、増殖能の高い CT 細胞で特に重要な役割を担うと考えられる。

2. DMR と胎盤特異的インプリンティング

ヒト胎盤においてインプリント遺伝子は胎盤形成や胎児成長に関与していることが報告されている¹³⁾。本研究において、ヒト胎盤のインプリント遺伝子を網羅的に単離同定することに成功した。その結果、34 種類の既知インプリント遺伝子に加え、29 種類の新規インプリント遺伝子を同定した。

父由来発現インプリント遺伝子の多くは、卵子で獲得される DMR のメチル化によって直接的に発現が制御されていると考えられる。一方で、大部分の母由来発現インプリント遺伝子はプロモーターや gene body 領域に DMR を持たず、父由来アレル発現遺伝子とは異なった機構で片親性発現が制御されていると考えられる。

新規インプリント遺伝子のうち 15 種類の遺伝子に DMR が存在した。これらの新規インプリント遺伝子は、マウスにおいて、インプリント遺伝子としては報告されておらず、ヒト胎盤特異的インプリント遺伝子である可能性が示唆された。新規インプリント遺伝子として同定された *CUL7* は、胎児発育不全に関わる遺伝子として報告されており⁷²⁾、ヒト胎児発育不全の胎盤でプロモーター領域が低メチル化され、遺伝子発現が上昇している。また、*CUL7* の欠損は胎児発育不全、出生後の重度成長障害、特徴的顔貌を主徴とする先天異常症候群である 3M 症候群タイプ I を引き起こすことが知られている⁷²⁾。さらに、*CUL7* 欠損マウスは、脱落膜での血管に異常を引き起こし、胎盤の発達障害、胎児発育不全などの表現型を示すことが報告されており⁷³⁾、胎盤形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。また、*CYP2J2* も、本研究で新規インプリント遺伝子として同定された遺伝子であるが、薬物代謝酵素として知られているチトクローム P450 の一つをコードする遺伝子である⁷⁴⁾。ヒト妊娠高血圧症候群の胎盤において高発現していることが報告されており⁷⁴⁾、妊娠高血圧症候群発症にかか

わる遺伝子の一つとされていて、胎盤形成に関わっていることが示唆される。また、妊娠高血圧症候群モデルラットにおいても、CYP2J2 の代謝産物 EET の上昇がみられ、この遺伝子およびコードするタンパクが妊娠高血圧症候群に関与していることが報告されている⁷⁴⁾。

これらのヒト胎盤特異的インプリント遺伝子が、マウス胎盤でインプリント制御を受けていない理由は現在のところ不明であるが、胎盤構造や妊娠期間、産仔数の違いなどに関連している可能性がある。今後さらに多くの生物種を対象として比較解析を行うことにより、胎盤進化における胎盤特異的インプリント遺伝子の重要性が明らかになると期待される。

3. 不完全な父由来インプリント型 X 染色体不活性化の存在

ヒト組織における X 染色体不活性化は、体細胞と胎盤で異なっている。ヒトの体細胞では、父由来 X 染色体と母由来 X 染色体のいずれかがランダムに不活性化されることが知られている⁷⁵⁾。

一方、ヒト胎盤の X 染色体不活性化については、古くより様々な研究がなされていたが（表 1）、父由来 X 染色体が選択的に不活性化されるという報告²³⁾やランダムな不活性化を呈する報告²⁴⁾など様々であり、明確な結論には至っていない。その理由として、3つの問題が挙げられる。1つは、母体組織のコンタミネーションの問題である。胎盤の組織を用いた解析では、母体組織のコンタミネーションの影響を考慮しなければならない。2つ目は、解析対象が限局した遺伝子であること。多くの研究は 1 つあるいは 2 つの遺伝子に関する検討を行ってきた。最新の研究では、22 遺伝子の SNP を用いて解析を行っているが、各個体で見ると数個の遺伝子での検討に留まっている。X 染色体の不活性化状態は領域によって異なっているといという研究より⁷⁶⁾、必ずしも一つの遺伝子のアリル発現比が、全体の X 染色体不活性化の程度を表しているとは限らない。最後

の問題は、サンプリングバイアスの問題である。胎盤の X 染色体不活性化は分葉ごとに異なった X 染色体不活性化状態を持っており⁷⁷⁾、サンプリングの部位によっては、必ずしもその個体の X 染色体不活性化状態を反映していないことが懸念される。本研究では、1 つ目の問題は CT 細胞を精製することで、2 つ目の問題はゲノムワイドな解析を行うことで、3 つ目の問題は胎盤全体をサンプリングすることで、それぞれの影響を最小限に抑えた解析を行うことが可能になった。その結果、ヒト胎盤の X 染色体不活性化について、2 つのことが明らかとなった。1 つは、ヒト胎盤の X 染色体不活性化は、父由来 X 染色体が優先的に不活性化を受けやすいこと、もう一つは個体により不活性化の程度に多様性を示すことである。

X 染色体不活性化現象の多様性は、妊娠週数・母体年齢などの臨床情報や細胞純度・細胞数などとは相関を示さず、サンプリングや実験手技によるバイアスである可能性は低いと考えられた。しかし、この現象の普遍性を証明するためには、今後、異なった遺伝的背景をもつ様々な人種を対象に、本研究と同様の遺伝子発現解析を行うことが必要であると考えられる。

偏った X 染色体不活性化を示すメカニズムは、2 つの仮説が考えられる。1 つ目はランダム X 染色体不活性化を受けた後、分化の過程で父由来 X 染色体不活性化の細胞が生存しやすい、あるいは増殖に有利である、という生存競争説である。胎盤は母体免疫にさらされるが、この際に父由来 X 染色体の遺伝子の発現が母体免疫の対象となり、増殖に不利だったり、生存できなかつたりするのかもしれない。2 つ目は X 染色体のインプリント型制御である。有袋類の胚体組織および胚体外組織、マウスの胚体外組織で、インプリント型 X 染色体不活性化の存在が報告されている⁷⁸⁾。ヒトでは、これらの生物種ほど厳密ではないインプリント制御が存在するのかもしれない。X 染色体上の DMR の存在は、この仮説を支持するものである。また、染色体不活性化状態の分布の統計学的モデ

ルの検討を通して、約 6 個のプール細胞において、60:40 で父由来 X 染色体に偏った不活性化が起こっていることが示唆された。これはつまり、胎盤発生の比較的早い段階で、厳密ではないインプリント型制御が存在することで、偏った X 染色体の不活性化が起こっていることに関与している可能性があると考えられる。こうしたメカニズムの解明には、初期胚でのより詳細な X 染色体不活性化の解析が必要となる。

X 染色体不活性化は哺乳類特有の遺伝子量補償機構であるが、その制御機構は哺乳類の中でも種により異なる。有袋類では、すべての細胞において父由来 X 染色体が不活性化している²¹⁾。その調節機構は DMR のメチル化により *Rsx* が母由来 X 染色体からのみ発現が開始し、*Rsx* 転写産物が父由来 X 染色体を覆い、不活性化ヒストン修飾を誘導することで、父由来 X 染色体のサイレンシングを行っている²¹⁾。一方で、X 染色体不活性化維持には不活性化ヒストン修飾が関与しているが、DNA メチル化は関与していないという報告⁷⁸⁾もある。マウスをはじめとする齧歯類では、初期胚にて父由来 X 染色体不活性化が開始され、胚体外組織ではこの状態が維持されるが、体細胞となる内部細胞塊胚盤葉上層では、不活性化されていた父由来 X 染色体の再活性化が起こり、その後ランダムな X 染色体不活性化が起こる²²⁾。しかし、体細胞でも、脳では父由来 X 染色体不活性化に弱いバイアスが⁷⁹⁾、乳腺組織では母由来 X 染色体不活性化へバイアスがかかっていることが報告されている⁸⁰⁾。また、ウマ、ロバ、ラバなどのウマ科では、体細胞、胚体外組織ともにランダムな X 染色体不活性化が起こっていると報告されている⁸¹⁾。このように、哺乳類における X 染色体不活性化は、生物種・細胞種でその機構が維持されつつも、その程度は多様性を示し、ヒト胎盤では不完全なインプリント型制御を受けていると考えられた (表 8)。

4. X 染色体上のインプリント遺伝子の探索

本研究で初めて *NUDT10* が X 染色体上のインプリント遺伝子と同定された。*NUDT10* の発現量は、その個体の不活性化の状態に応じて変化することが明らかとなった。これは、父由来 X 染色体の発現率が上昇するにつれて発現量が増えることを意味し、つまり、父由来 X 染色体上からのみ発現していると考えられる。*NUDT10* に SNP が存在しなかったためアレル特異的発現解析はできなかったが、*NUDT10* のプロモーター領域には DMR が存在し、この領域のメチル化状態が *NUDT10* の発現制御に関わっている可能性がある。その反面、結果から *NUDT10* の発現調節がプロモーター領域のメチル化によってのみ制御されているとは言えず、その他のエピジェネティックな修飾など複数の因子が関与している可能性がある。*NUDT10* は上記のインプリント遺伝子の存在が示唆されていた Xp11.23-Xq 領域内に存在している。*NUDT10* のコードするタンパクは、小胞輸送、ストレス応答、DNA 修復、アポトーシスに関与しており⁸²⁾、精巣や前立腺癌で発現が認められるが⁸⁹⁾、胎盤での発現の意義は不明瞭である。また、*NUDT10* はヒト胎盤においてはインプリント遺伝子であることが示唆されたが、体細胞を含めたその他の組織においては、インプリント発現をしているという報告は無く、この現象は胎盤特異的に起こっていると考えられる。KO マウスや、Turner 症候群の脳や胎盤の発現解析などから、*NUDT10* の未知の役割が解明されることだろう。また、*NUDT10* の発現は、父由来 X 染色体の不活性化度合いを反映することから、X 染色体不活性化状態を簡便に解析するためのマーカーとしても活用できると考えられる。例えば、Turner 症候群において由来する X 染色体の判定や、X 連鎖遺伝病の保因者に対する次世代へのリスク判定に応用されることが期待できる。

5. エスケープ遺伝子の同定

Turner 症候群の表現型の多くは、インプリンティングとは関係なく、不活性化されている X 染色体上から発現している遺伝子（エスケープ遺伝子）の発現量の減少に起因していると考えられている⁸⁴⁾。エスケープ遺伝子には胎盤形成や胎児成長、卵巣機能において重要な役割を果たしている遺伝子が含まれているとされ⁸⁴⁾、エスケープ遺伝子の一つである *SHOX* は Turner 症候群の低身長の原因遺伝子であることが報告されている⁸⁴⁾。

X 染色体のアリル特異的遺伝子の発現解析では、解析可能遺伝子の約 20% がエスケープ遺伝子と考えられた。本研究にて同定された 18 種類のエスケープ遺伝子のうち、16 種類の遺伝子は短腕に存在し、そのうち 7 種類の遺伝子は偽常染色体領域（PAR : pseudoautosomal region）に含まれていた。残る 9 種類の遺伝子のうち、*EIF1AX*, *EIF2S3*, *GYG2*, *HDHD1*, *SMC1A*, *STS*, *ZRSR2* は、既知のエスケープ遺伝子であった。さらに *YIPF6* はマウス胎盤幹細胞でエスケープ遺伝子として報告されている⁸⁶⁾。*LOC389906*, *CHM*, *TXLNG* は、ヒト胎盤特異的なエスケープ遺伝子であると考察される。また、*STS* 遺伝子は Escape gene として報告されている遺伝子で⁸⁷⁾、コードするタンパク steroid sulfatase (microsomal) isozyme S (*STS*) は、妊娠中に、ステロイド前駆体をエストロゲンに変換する酵素であり、胎盤⁸⁸⁾、特に栄養膜細胞⁸⁹⁾に高発現している。オスの胎盤に比べ、メスの胎盤では *STS* の活性が 2~4 倍強いと報告されており⁹⁰⁾、Turner 症候群での流産率の高さに関与しているかもしれない。

＜結 論＞

本研究では、まず胎盤の主要な機能を担う栄養膜細胞を高純度に精製し、次世代シーケンサーを用いて、各細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、EVT 細胞では母体組織への浸潤および母体免疫との相互作用に関与する遺伝子が、ST 細胞ではガス交換・ホルモン産生など、妊娠の維持および胎児の成長に重要な遺伝子が高発現していることが明らかとなった。さらに、CT 細胞では、細胞増殖や未分化維持を制御する遺伝子が特異的に発現していた。これらの遺伝子の発現は、栄養膜細胞の増殖・分化過程において厳密に制御されており、正常な胎盤形成に重要な役割を担うのではないかと考えられる。

次に、アレル特異的発現解析により、インプリント遺伝子の網羅的な探索および X 染色体不活性化状態の解析を行った。その結果、ヒト胎盤において、29 種類のインプリント遺伝子を同定した。これらインプリント遺伝子の発現は、主に母由来 DMR のメチル化によって制御されることが示唆された。また、新規に発見したインプリント遺伝子の一部は、正常な胎盤形成および妊娠高血圧症候群や胎児発育不全などの発症に関わる可能性が示唆された。

ヒト胎盤における X 染色体不活性化は、不完全なインプリント型制御をうけており、父由来 X 染色体が母由来 X 染色体に比べ不活性化されやすいことを見出した。さらに、父由来 X 染色体からのみ発現を示すインプリント遺伝子として *NUDT10* を同定した。このインプリント遺伝子は、Turner 症候群の表現型の多様性に寄与している可能性が示唆された。

以上より、本研究ではヒト胎盤におけるゲノムインプリンティングの全体像および X 染色体不活性化状態を明らかにした。本研究の成果はヒト胎盤の発生機構の理解のみならず、胎盤を原因とする妊娠合併症の発症メカニズム解明や治療法開発にも貢献することが期待される。

＜謝 辞＞

本研究の遺伝子解析にあたり、ご協力頂きました患者さまに深謝致します。

本研究は東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野の岡江寛明助教、樋浦仁助教、千葉初音助教、技術補佐員の宮内尚子さんのご協力を得て施行することができました。心より感謝申し上げます。胎盤収集に関しては、研究協力医療機関である五十嵐産婦人科（院長 五十嵐章先生やスタッフ）の皆様のご支援、およびご協力をいただきましたことに深く感謝致します。次世代シーケンス解析に関しては、東北大学大学院医学系研究科細胞増殖制御学分野の中山啓子教授、舟山亮助教をはじめスタッフの皆さまにご支援、ご指導をいただきましたことに深く感謝いたします。統計学的解析には東北大学病院臨床研究推進センター臨床研究ネットワーク部門の飯田溪太特任助教にご指導いただきましたことに感謝申し上げます。また、このような研究の機会を与えて下さいました婦人科学分野の八重樫伸生教授、情報遺伝学分野の有馬隆博教授をはじめ、ご協力頂いた諸先生方に深謝致します。

<参考文献>

- 1) Roberts JM et al. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. *Placenta* 2009; 30: 32–37.
- 2) Ghidini A et al. Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. *Obstetrical and Gynecological Survey* 1996; 51(6): 376–382.
- 3) Chernausek SD et al. Update: Consequences of Abnormal Fetal Growth. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012; 97(3):689–695.
- 4) Leiser R et al. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*. 1994; 102(3):122-34.
- 5) Georgiades P et al. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002; 23: 3–19.
- 6) Handwerger S et al. New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 323(1): 94–104.
- 7) Askelund KJ et al. Trophoblast deportation part 1: review of the evidence demonstrating trophoblast shedding and deportation during human pregnancy. *Placenta* 2011; 32: 716-723.
- 8) Martin K et al. Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in Genetics*. 2013; 4(190): 1-14.
- 9) Jones CJ et al. Ultrastructure of the normal human placenta. *Electron Microsc Rev*. 1991; 4(1): 129-78.
- 10) Apps R et al. Genome-wide expression profile of first trimester villous and extravillous human trophoblast cells. *Placenta* 2011; 32(1):33-43.
- 11) Reik W et al. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089–1093.

- 12) Peters J et al. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature Reviews Genetics* 2014; 15: 517–530.
- 13) Nelissen EC et al. Epigenetics and the placenta. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(3): 397-417.
- 14) Surani MA et al. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell*. 1986; 45(1):127-36.
- 15) Douglas CW et al. complete moles have paternal chromosomes but maternal mitochondrial DNA. *Human Genetics* 1982; 62(2): 145-147.
- 16) Kaneko-Ishino T et al. Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placentation and genomic imprinting in mammals. *Dev Growth Differ*. 2010; 52(6):533-543.
- 17) Babak T et al. Genetic conflict reflected in tissue-specific maps of genomic imprinting in human and mouse. *Nat Genet*. 2015; 47(5):544-9.
- 18) Okae H et al. Re-investigation and RNA-sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression *Human Molecular Genetics*, 2012; 21(3): 548–558.
- 19) Okae H et al. RNA-sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(4): 992-1001.
- 20) Lyon MF et al. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190: 372–373.
- 21) Deakin J et al. Unravelling the evolutionary origins of X chromosome inactivation in mammals: insights from marsupials and monotremes. *Chromosome Res* 2009; 17(5): 671–685.

- 22) Dupont C et al. Different flavors of X-chromosome inactivation in mammals. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25(3): 314–321.
- 23) Goto T et al. Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(1): 77-80.
- 24) Moreira de Mello JC et al. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PLoS One* 2010; 5(6): e10947.
- 25) Ropers HH et al. Preferential X inactivation in human placenta membranes: is the paternal X inactive in early embryonic development of female mammals? *Hum Genet* 1978; 43: 265–273.
- 26) Migeon BR et al. Complete reactivation of X chromosomes from human chorionic villi with a switch to early DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 2182–2186.
- 27) Migeon BR et al. Differential X reactivation in human placental cells: implications for reversal of X inactivation. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 355–364.
- 28) Harrison KB et al. Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 41: 163–168.
- 29) Harrison KB. X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 52: 37–41.
- 30) Mohandas TK et al. X-chromosome inactivation in cultured cells from human chorionic villi. *Somat Cell Mol Genet* 1989; 15: 131–136.
- 31) Looijenga LH et al. Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentas. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1445–1452.
- 32) Uehara S et al. X-chromosome inactivation in the human trophoblast of early pregnancy. *J Hum Genet* 2000; 45: 119–126.

- 33) Willemsen R et al. Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum Genet* 2002; 110: 601–605.
- 34) Zeng SM, Yankowitz J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta* 2003; 24: 270–275.
- 35) Dhara SK, Benvenisty N. Gene trap as a tool for genome annotation and analysis of X chromosome inactivation in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3995–4002.
- 36) Raefski AS et al. Identification of a cluster of X-linked imprinted genes in mice. *Nature Genetics* 2005; 37(6): 620-624.
- 37) Kobayashi S et al. Comparison of Gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. *Current biology* 2006; 16: 166-172.
- 38) Alvarez-Nava F et al. Effect of the parental origin of the X-chromosome on the clinical features, associated complications, the two-year-response to growth hormone (rhGH) and the biochemical profile in patients with turner syndrome. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2013; 2013(1):10.
- 39) Alexandre DB et al. Turner syndrome and metabolic derangements: another example of fetal programming. *Early Human Development* 2012; 88: 99–102.
- 40) Ergür AT et al. Paternal X could relate to arithmetic function; study of cognitive function and parental origin of X chromosome in Turner syndrome. *Pediatrics International* 2008; 50: 172–174.
- 41) Kesler SR et al. Effects of X-Monosomy and X-Linked Imprinting on Superior Temporal Gyrus Morphology in Turner Syndrome. *BIOL PSYCHIATRY* 2003; 54: 636–646.

- 42) Skuse et al. Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature* 1997; 387(6634): 705-708.
- 43) Hook EB et al. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* 1983; 64: 24-27.
- 44) Gravholt CH. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 657–687.
- 45) 日本超音波医学会用語診断基準委員会 超音波胎児計測の標準化と日本人の基準値. *日超医誌* 2003; 30(3): J415-J440.
- 46) Bae S et al. Triple ultrasound markers including fetal cardiac activity are related to miscarriage risk. *Fertil Steril* 2011; 96(5): 1145-1148.
- 47) Kliman HJ, et al. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986; 118: 1567-1582.
- 48) Bischof P, et al. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1-16.
- 49) Ellis SA, et al. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology*. 1986; 59(4): 595–601.
- 50) Dye JF, et al. Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta*. 2001; 22(1):32-43.
- 51) Khalfoun B, et al. Isolation and characterization of syncytiotrophoblast plasma membrane from human placenta. *Federation of European Biochemical Societies* 1985; 181(1):33-38.
- 52) Serke S, et al. Identification of CD71 (transferrin receptor) expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cytometry (MP-FCM): correlation to the quantitation of

reticulocytes as determined by conventional microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. *Br J Haematol.* 1992;81(3):432-9.

53) Shackelford DA, et al. Identification of lymphocyte integral membrane proteins as substrates for protein kinase C. Phosphorylation of the interleukin-2 receptor, class I HLA antigens, and T200 glycoprotein. *J Biol Chem.* 1986;261(18):8334-41.

54) Jae-Bum Bae, Perspectives of International Human Epigenome Consortium. *Genomics Inform* 2013;11(1):7-14.

55) Livak, KJ, et al. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001; 25(4): 402-408.

56) Huang DW et al. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 2009; 4: 44-57.

57) Langmead B, et al. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* 2012; 9(4): 357-359.

58) McKenna A et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research* 2010; 20(9): 1297-1303.

59) Rinn JL, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 2012; 7(3): 562-578.

60) Doak, SH, et al. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: technical considerations for gene expression analysis. *Methods Mol Biol*, 2012; 817: 251-70.

61) Varmuza S et al. What does genetics tell us about imprinting and the placenta connection? *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72(1):51-72

62) Yukun L et al. Etiology of spontaneous abortion before and after the demonstration of embryonic cardiac activity in women with recurrent spontaneous abortion. *Int J*

Gynecol Obstet 2015; 129: 128–132.

63) Wang X, et al. A survey for novel imprinted genes in the mouse placenta by mRNA-seq. *Genetics*. 2011;189(1):109-22.

64) Okae H et al. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet*. 2014; 10(12): e1004868.

65) Cotton AM et al. Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biology* 2013, 14: R122.

66) Penny GD et al. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 1996; 379: 131–137.

67) Bilban M et al. Identification of novel trophoblast invasion-related genes: heme oxygenase-1 controls motility via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Endocrinology* 2009; 150(2): 1000-1013.

68) Aronow BJ et al. Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. *Physiol Genomics* 2001; 6(2): 105-16.

69) Apps R et al. Genome-wide expression profile of first trimester villous and extravillous human trophoblast cells. *Placenta* 2011; 32(1): 33-43.

70) Edwards CA et al. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19(3):281-289.

71) Mohan KN et al. Cell and molecular biology of DNA methyltransferase 1. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013; 306:1-42.

72) Gascoin-Lachambre G et al. Cullins in human intra-uterine growth restriction: expressional and epigenetical alterations. *Placenta* 2010; 31: 151–157.

73) Arai T et al. Targeted disruption of p185 / Cul7 gene results in abnormal vascular morphogenesis. *PNAS* 2003; 100(17): 9855–9860.

- 74) Florian H et al. CYP2J2 Expression and Circulating Epoxyeicosatrienoic Metabolites in Preeclampsia. *Circulation* 2012; 126(25): 2990–2999.
- 75) Amos-Landgraf JM, et al: X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 493–499.
- 76) Calabrese JM et al. Site-specific silencing of regulatory elements as a mechanism of X-inactivation. *Cell* 2012; 151(5): 951–963.
- 77) Peñaherrera MS et al. Patterns of placental development evaluated by X chromosome inactivation profiling provide a basis to evaluate the origin of epigenetic variation. *Hum Reprod* 2012; 27(6): 1745-1753.
- 78) Wang X et al. Chromosome-wide profiling of X-chromosome inactivation and epigenetic states in fetal brain and placenta of the opossum, *Monodelphis domestica*. *Genome Res.* 2014; 24(1): 70-83.
- 79) Wang X et al. Paternally biased X inactivation in mouse neonatal brain. *Genome Biol* 2011; 11(7): R79.
- 80) Jiao B et al. Paternal RLIM/Rnf12 is a survival factor for milk-producing alveolar cells. *Cell* 2012; 149(3): 630-641.
- 81) Wang X et al. Random X inactivation in the mule and horse placenta. *Genome Res* 2012; 22(10): 1855-1863.
- 82) NUDT10 nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10 [Homo sapiens (human)] - Gene – NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/170685>
- 83) Hidaka K et al. An Adjacent Pair of Human NUDT Genes on Chromosome X Are Preferentially Expressed in Testis and Encode Two New Isoforms of Diphosphoinositol Polyphosphate Phosphohydrolase . *J Biol Chem* 2002; 277(36): 32730-32738
- 84) Blaschke RJ et al. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2006; 16(3): 233-239

- 85) Berletch JB et al. Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biology* 2010; 11:213
- 86) Yang F et al. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Research* 2010; 20: 614–622
- 87) Yen PH et al. Isolation of a new gene from the distal short arm of the human X chromosome that escapes X-inactivation. *Hum Mol Genet.* 1992; 1(1): 47-52
- 88) Suzuki T et al. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86(3-5): 449-454
- 89) Salido EC et al. Steroid sulfatase expression in human placenta: immunocytochemistry and in situ hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990; 70(6): 1564-1567.
- 90) Ugele B et al. Differential increase of steroid sulfatase activity in XX and XY trophoblast cells from human term placenta with syncytia formation in vitro. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 90(1-2): 40-46

<図の説明>

図1 ヒト胎盤を構成する細胞

胎盤は、微細な絨毛と呼ばれる分枝を形成しており、母体側の脱着膜へ浸潤している。絨毛は、細胞性栄養膜細胞（Cytotrophoblast：CT）、絨毛外栄養膜細胞（Extravillous trophoblast：EVT）、合胞体性栄養膜細胞（Syncytiotrophoblast：ST）、ストローマ細胞などで構成されている。

図2 インプリント遺伝子と DMR による発現調節

インプリント遺伝子の片親性発現の分子機構について模式図を示す。父由来アレルを青色、母由来アレルを赤色で示す。遺伝子上流に、父由来アレルで低メチル化、母由来アレルで高メチル化されている領域、DMR が存在し、そのため、母由来アレルからの発現は抑制され、父由来アレルから発現が優位となり、片親性発現を発揮する。このように、インプリント遺伝子の片親性発現には DMR が関与している。

図3 個体発生時期における DNA メチル化ダイナミクス

個体発生段階における全体の DNA メチル化の変化について概略を示す。縦軸にメチル化率、横軸に発生段階を示す。DNA メチル化は、始原生殖細胞で消去され、配偶子形成の過程において精子・卵子の各々の特異的なメチル化が確立される。DNA メチル化は受精後、胚盤胞期にゲノムワイドな脱メチル化を受けるが、着床後は再メチル化がおこる。一方、インプリント遺伝子の DMR のメチル化は、受精後の脱メチル化を受けず体細胞で安定に維持される。

図 4 ヒトにおけるインプリント遺伝子と関連疾患

ヒトにおける既知 DMR の分布と、関連する疾患について図示する。青色が父由来 DMR の遺伝子、赤色が母由来 DMR の遺伝子を示している。ゲノムインプリンティングの異常は、先天異常症や悪性腫瘍などの疾患発症に関与している。

図 5 研究概要

本研究の概要について図示する。胎盤より CT、EVT、ST 細胞を各々精製し、RNA-seq を行い、細胞間での発現比較や、インプリント遺伝子の発現解析を行った。その後、CT 細胞と、対応する母体血の DNA を用いて、アリル特異的遺伝子発現解析を行い、インプリント遺伝子および X 染色体不活性化状態の解析を行った。また、メチル化解析も行い、DNA メチル化からインプリント遺伝子の分子機構について解析を行った。

図 6 細胞精製の概略

細胞精製方法の概略を示す。CT 細胞および EVT 細胞は、胎盤組織細切後に、単一細胞に分離、細胞均一化の処理を経て、各々の表面抗原に対する抗体を用いた免疫磁気細胞分離によるポジティブセクションを行なった。一方、ST 細胞は胎盤の洗浄液中に遊離した細胞から、CT 細胞、EVT 細胞、ストローマ細胞、免疫細胞、赤血球を除くことによるネガティブセクションにて細胞を精製した。

図 7 アリル特異的遺伝子発現解析の模式図

アリル特異的遺伝子発現解析の概略を図示する。アリル特異的遺伝子解析には、SNP を用いて発現アリルを決定した。Exome-seq において CT 細胞でヘテロ (A/T)、母体血でホモ (A/A) の SNP を抽出した。SNP の A が母由来アリル、

T が父由来アリルと決定される。RNA-seq で同 SNP について Read 数を解析すると、母由来アリル (A) が 5reads、父由来アリル (T) が 1 read となる。遺伝子毎に母由来アリル発現率 ($A / (A+T)$) を求めた。

図 8 精製細胞のマーカー遺伝子発現

未精製の胎盤 (水色) の発現量を 1 として、各々の遺伝子発現の比を示す。CT 細胞 (青) では、CT 細胞マーカーである *ELF5* や *ITGA6* の発現が 5 倍程度に上昇していた。EVT 細胞 (赤) では、EVT 細胞マーカーである *HLA-G* が 10 倍以上の発現上昇を認めた。ST 細胞 (緑) では、ST 細胞マーカーである *SDCI* や *CGB* が保たれ、その他の細胞マーカー遺伝子の発現低下を認めた。ストローマ細胞 (紫) では、ストローマ細胞マーカーである *VIM* や *THY1* の発現が 5 倍以上上昇していた。

図 9 遺伝子発現に基づく系統樹

遺伝子発現に基づく系統樹を示す。Biological replicate 間で強い相関が得られた。また、栄養膜細胞に分類される CT 細胞、ST 細胞、EVT 細胞は未精製胎盤と同じ系統枝に分類され、胚体組織であるストローマ細胞は別の系統枝に分類された。ST 細胞は未精製胎盤と近い発現パターンを示し、CT 細胞と EVT 細胞が比較的近い発現パターンを示した。

図 10 分化に伴い発現が変動する遺伝子

CT 細胞と EVT 細胞、CT 細胞と ST 細胞との間で発現が変動した遺伝子の GO 解析結果を示す。CT 細胞に比べ EVT 細胞で発現が上昇した遺伝子は、妊娠、炎症反応、創傷治癒、生体防御、免疫反応の生物学的プロセスに関与する遺伝子が抽出された。EVT で発現が低下した遺伝子は GO term は抽出されなかった。

CT 細胞に比べ ST 細胞で発現が上昇した遺伝子は、ガス交換、ホルモン産生、酸素運搬、妊娠の生物学的プロセスに関与する遺伝子が抽出された。CT 細胞に比べ ST 細胞で発現が減少した遺伝子群は、細胞分裂や細胞周期に関わる生物学的プロセスに関与する遺伝子が抽出された。

図 11 アリル特異的遺伝子発現解析結果の一例

新規インプリント遺伝子候補の *CYP2J2* でのアリル特異的な発現解析を示す。縦軸をリード数、横軸を遺伝子配列とした。*CYP2J2* 遺伝子に存在する SNP は、母体血で G/G のホモ、CT で T/G のヘテロである。すなわち、CT では G が母由来アリル、T が父由来アリルである。CT 細胞の RNA シーケンス解析より、同 SNP は G:49 リード、T:978 リードであり、母由来アリルからの発現率は $[49 \div (978 + 49)] \times 100 = 4.8\%$ と算出された。

図 12 アリル特異的遺伝子発現の染色体マップ

母由来アリル発現率の分布について図示する。縦軸に母由来アリル発現率、横軸に染色体上の位置情報を示す。多くの遺伝子が 50%に近い母由来アリル発現率を示し、両アリルからほぼ同程度発現していることが確認された。母由来アリル発現率 65%以上のものを母由来アリル発現優位、35%以下のものを父由来アリル発現優位な遺伝子と定義し、既知のインプリント遺伝子 (×) の他、新規のインプリント遺伝子 (赤：母由来発現、青：父由来発現) が抽出された。

図 13 既知インプリント遺伝子の片親性発現

アリル特異的発現情報が得られた 43 の既知のインプリント遺伝子の母方アリル発現率を示す。縦軸に母由来アリル発現率、横軸に遺伝子名を示した。父由来アリル発現遺伝子として報告されている 23 のインプリント遺伝子は、いずれ

も父由来アリル発現を示すことが確認された。一方、母由来アリル発現遺伝子と報告されている 20 のインプリント遺伝子では、11 遺伝子が母由来アリル発現を示していたが、9 遺伝子は両アリル発現を示した。

図 14 新規インプリント遺伝子の同定

新規インプリント候補遺伝子の母方アリル発現率を示す。縦軸に母由来アリル発現率、横軸に遺伝子名を示した。母由来アリル発現率 65%以上のもの、および 35%以下のものを、各々母由来アリル発現、父由来アリル発現の新規インプリント候補遺伝子として抽出した。18 の父由来アリル発現遺伝子、11 の母由来アリル発現遺伝子、合計 29 のインプリント候補遺伝子が同定された。

図 15 *CUL7* の DMR による発現制御

新規インプリント遺伝子の DMR について図示する。縦軸を各組織でのメチル化率、横軸を染色体上の位置とした。*CUL7* は父由来アリル発現を示しており、その上流に卵子で高メチル化、精子で低メチル化、胚盤胞で中等度メチル化、そして CT 細胞にて中等度メチル化を示す DMR が存在した。この結果は、*CUL7* の父由来アリル発現が、卵子で獲得された DMR によって抑制されていることを示唆している。

図 16 インプリント遺伝子クラスター

インプリント遺伝子クラスターの例を図示する。縦軸を各組織でのメチル化率、横軸を染色体上の位置とした。*DNMT1* は既知の父由来発現インプリント遺伝子であるが、そのプロモーター領域に母由来 DMR が存在する。さらに上流には、母由来発現を示す新規インプリント遺伝子 *SIPR2* が位置しており、この遺伝子の母由来アリル発現性は *DNMT1* の DMR を介して間接的に調節されている

ことが示唆された。

図 17 X 染色体連鎖遺伝子アリル特異的発現解析の一例 (CT-3)

縦軸は母由来アリル発現率、横軸は染色体上の位置情報を示す。各点が各遺伝子に相当する。点が上にあればあるほど、母由来アリル発現率が高く、つまり、父由来 X 染色体が不活性化を受けていることを示している。X 染色体上の多くの遺伝子が母由来発現を示しており（赤点）、父由来 X 染色体が不活性化を受けていることが明らかとなった。また、*XIST*（青点）は父由来発現を示し、父由来 X 染色体不活性化現象に関与していることが示唆された。さらに、一部の X 染色体連鎖遺伝子は、母由来アリル発現率が 50%に近い値を示しており、これらは既知のエスケープ遺伝子（灰点）であった。

図 18 X 染色体連鎖遺伝子のアリル特異的遺伝子発現解析

縦軸を母由来アリル発現率、横軸をサンプル番号とした。各点が各遺伝子に相当する。また、□印はサンプルの母由来アリル発現率の平均を、エラーバーは標準偏差をそれぞれ示している。サンプルごとに異なる母由来アリル発現率の分布を示している。また、全体の母由来アリル発現率は 66.2%で、有意に 50%より高く、父由来 X 染色体が不活性化を受けやすいことが示唆された。

図 19 X 染色体連鎖遺伝子の母由来アリルの発現率

母由来アリル発現率のヒートマップを示す。横軸がサンプル、縦軸が X 連鎖遺伝子の染色体上の位置情報である。母由来アリル発現率が、100-80%（赤）、80-60%（橙）、60-40%（灰）、40-20%（水色）、20-0%（青）にそれぞれ色分けされている。常染色体上のインプリント遺伝子は、すべてのサンプルにおいて同様の母由来アリル発現率を示した一方で、X 染色体上の遺伝子は、XX サンプル

間で異なる母由来アリル発現率を示した。

図 20 不活性化アリルからの発現率算出法

父由来 X 染色体不活性化の細胞（母由来 X 染色体活性細胞）では、父由来アリルが不活性化されているので、父由来アリルからの発現率は I、母由来アリルからの発現は 100 となる。逆に、母由来 X 染色体活性化の細胞では、母由来・父由来アリルからの発現率は、おののお 100、I となる。個体内では、母由来 X 染色体活性化の細胞が D%、父由来 X 染色体活性化の細胞が 100-D% 存在することから、母由来・父由来アリル全体の発現量は、おののお $[100 * D + (100-D) * I]$ 、 $[D * I + (100-D) * 100]$ となる。この計算式より、この遺伝子の母由来アリル発現率 G は $100 * [100 * D + (100-D) * I] / [100 + I]$ と求められる。以上の式を変換すると、 $I = 100 * (100D - G) / (100D + G - 100000)$ となる。

図 21 X 染色体連鎖遺伝子の不活性化アリルからの発現率

縦軸に不活性化アリル発現量 (I)、横軸に X 染色体上の位置を示す。エスケープ遺伝子の多くは、X 染色体の短腕端に位置する偽常染色体領域にクラスターを形成して存在していた。

図 22 母由来アリル発現率の平均と *NUDT10* 発現量

サンプルごとの母由来アリル発現率の平均と *NUDT10* の発現量の相関関係を示す。縦軸に *NUDT10* 発現量、横軸にサンプルごとの母由来アリル発現率の平均値を示している。強い負の相関がみられる ($R^2=0.8448$)。

図 23 *NUDT10* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の解析

NUDT10 のプロモーター領域のアリル特異的なメチル化解析の結果を示す。母

由来アリルでは、*NUDT10* の発現量によらず、高メチル化であったことに対し、父由来アリルでは、*NUDT10* の発現量が増えるに従い、メチル化が低下した。

図 24 *NUDT10* 遺伝子の FPKM 値と qRT-PCR 値

縦軸に *NUDT10* 遺伝子の FPKM 値、横軸に RT-PCR 定量値 (*GAPDH* にて補正) を示す。両者に強い正の相関がみられた。

図 25 X 染色体の母由来遺伝子の活性化率

縦軸に平均・推定母由来アリル発現率、横軸にサンプルを示す。黒棒がアリル特異的発現解析により母由来アリル発現率を算出したサンプル、白抜き棒が RT-PCR から母由来アリル発現率を換算したサンプルである。サンプルごとにはばらつきがあるが、比較的母由来発現に偏った分布を示した。

図 26 X 染色体の母由来アリルの発現率の分布

縦軸にサンプル数、横軸に母由来アリル発現率を示す。母由来アリル発現率 75-62.5% にピークを認め、母由来発現に偏った分布を示した。

図 27 2 項分布モデル

横軸に母由来アリル発現率、縦軸に累積確率を示す。赤が実験から得られた分布、青が $n = 5.8 \pm 3.2$ 、 $p = 0.4$ の 2 項分布モデルである。 n は正規分布に従うと仮定すると、 $n = 5.8 \pm 3.2$ を中心とした分布、 $p = 0.4$ の 2 項分布モデルが最も実験データの分布に合致した。

表 1 ヒト胎盤における X 染色体不活性化に関する報告

ヒト胎盤における X 染色体不活性化に関する過去の報告の、著者、用いた標本、解析対象、解析遺伝子、解析手法、結論について記した。様々な標本を用いて、様々な解析が行われており、ヒト胎盤の X 染色体不活性化がランダム型か否かについては、一定の見解が得られていない。

表 2 サンプル一覧

本研究で用いたサンプルと、その臨床情報、細胞純度、次世代シーケンサーでのリード数について記した。妊娠 5 週から 10 週の胎盤を用い、細胞精製は 90% 以上を確保し、次世代シーケンサーでは十分なリード数を解析した。

表 3 遺伝子オントロジー解析

CT、EVT、ST 細胞にて発現が変化した遺伝子について遺伝子オントロジー解析を行った結果の一覧を示す。比較した細胞、GO term とその p 値、q 値、含まれる遺伝子数と遺伝子名について記した。赤字で示した遺伝子は、研究結果や考察で特に着目した遺伝子である。

表 4 既知インプリント遺伝子の細胞種ごとの発現量

既知インプリント遺伝子と、CT、EVT、ST 細胞での発現量を $\log_2(\text{FPKM}+1)$ で示した。黄色で色付けされた遺伝子は、CT 細胞で発現が上昇していた遺伝子である。

表 5 新規インプリント候補遺伝子の細胞種ごとの発現量

新規インプリント候補遺伝子と、CT、EVT、ST 細胞での発現量を $\log_2(\text{FPKM}+1)$ で示した。黄色で色付けされた遺伝子は、CT 細胞で発現が上昇していた遺伝子

である。

表 6 インプリント候補遺伝子と DMR

新規インプリント候補遺伝子と、その位置情報、および、アリル発現率、SNP の情報が得られたサンプル数、近傍の DMR の位置情報について記した。さらに、クラスターを形成する遺伝子についても付記した。父由来アリル発現遺伝子には、プロモーター領域に DMR を認めた。母由来アリル発現遺伝子は、クラスターを形成し、間接的に片親性発現の調節を受けていることが示唆された。

表 7 エスケープ遺伝子一覧

本研究で抽出されたエスケープ遺伝子について、遺伝子名、不活性化アリル発現率、過去の知見との比較について記した。不活性化アリル発現率が 10 以上の遺伝子をエスケープ遺伝子として抽出した。過去に報告されていない遺伝子も X 染色体不活性化をエスケープすることが示唆された。

表 8 動物種・細胞種間の X 染色体不活性化の違い

哺乳類における X 染色体不活性化の多様性について、動物種、細胞種ごとに、活性化状態を記した。有袋類では、胚体外組織・胚体組織ともにインプリント型不活性化を示し、真獣類の胚体組織ではランダム型の不活性化を示す。真獣類の胚体外組織での不活性化は、種間で、ランダム型、インプリント型、不完全インプリント型と多様性を示している。

図 1

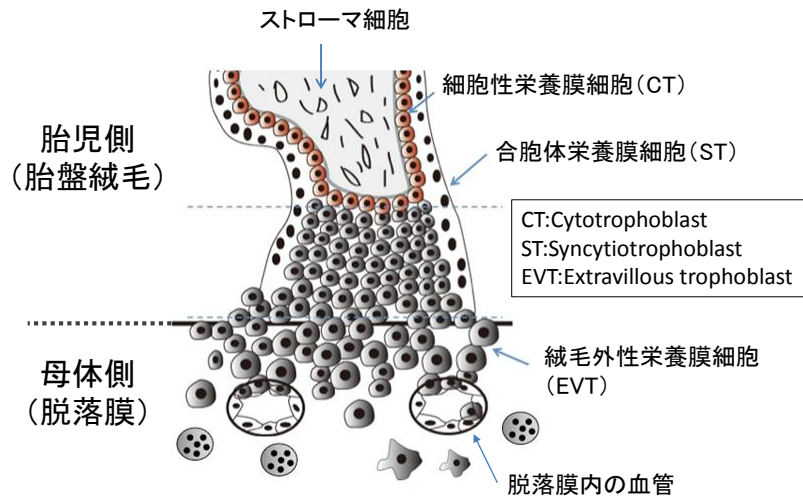


図 2

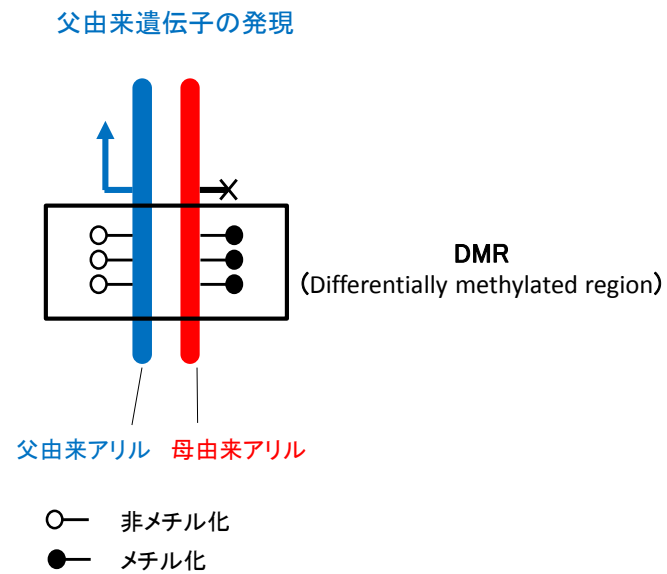


図 5

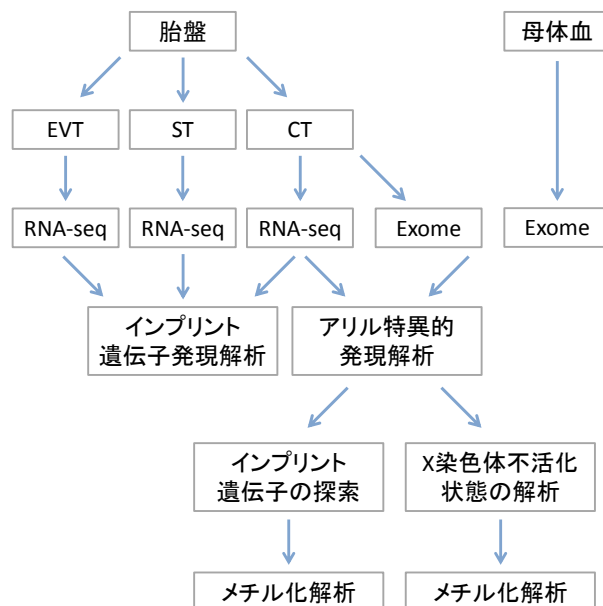


図 6

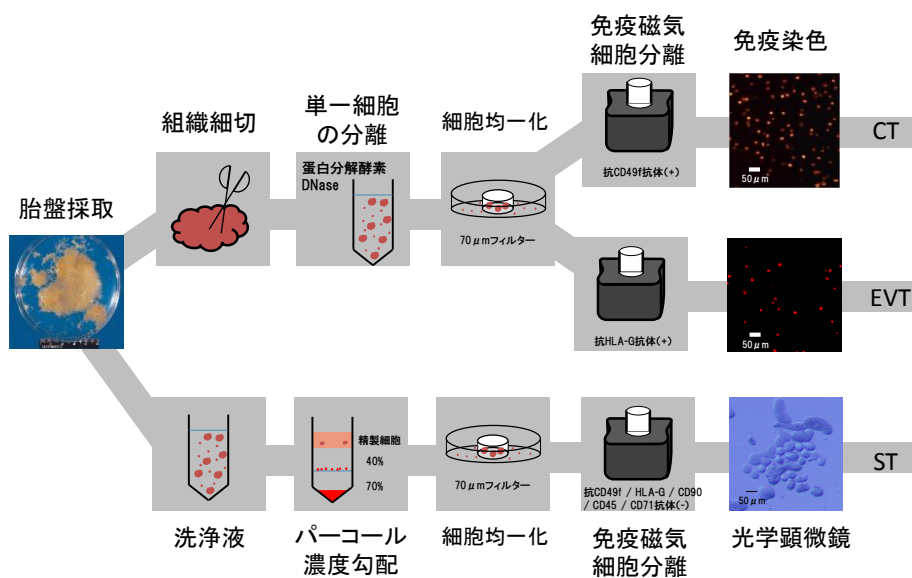


図 7

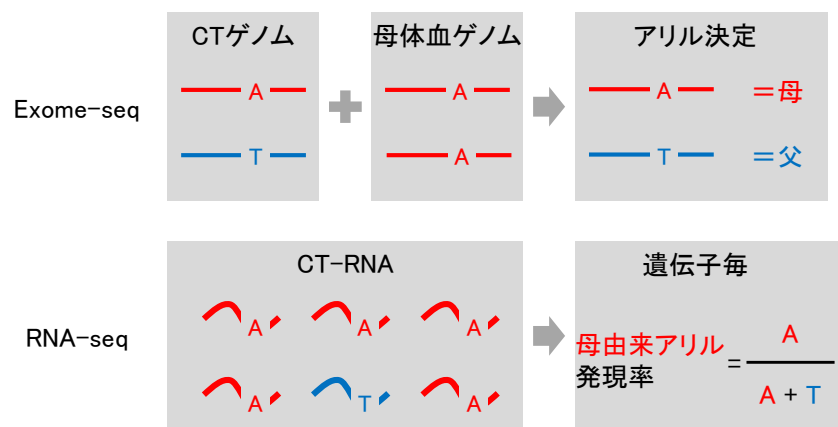


図 8

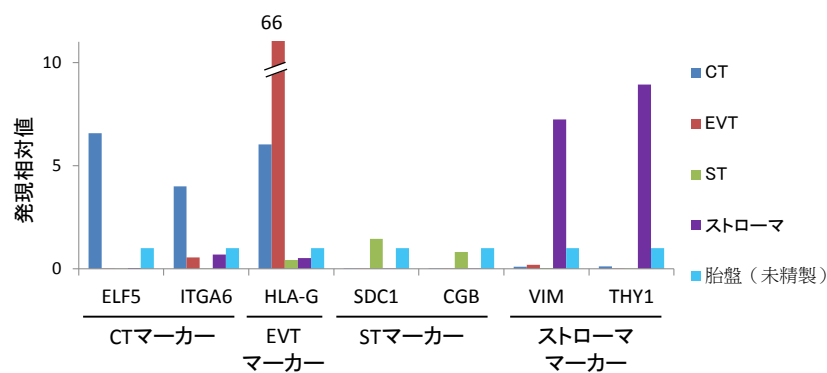


図 9

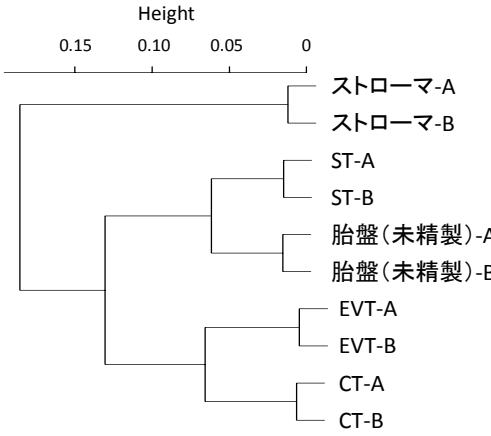


図 10

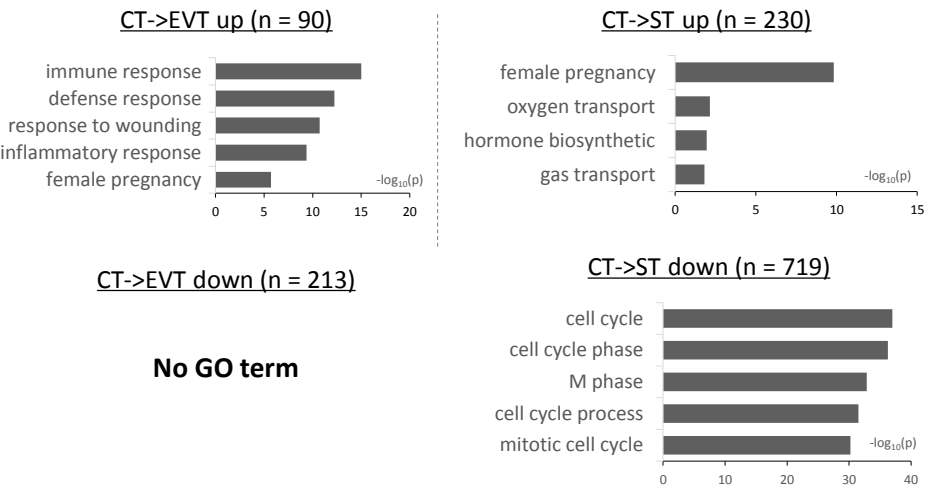


図 11

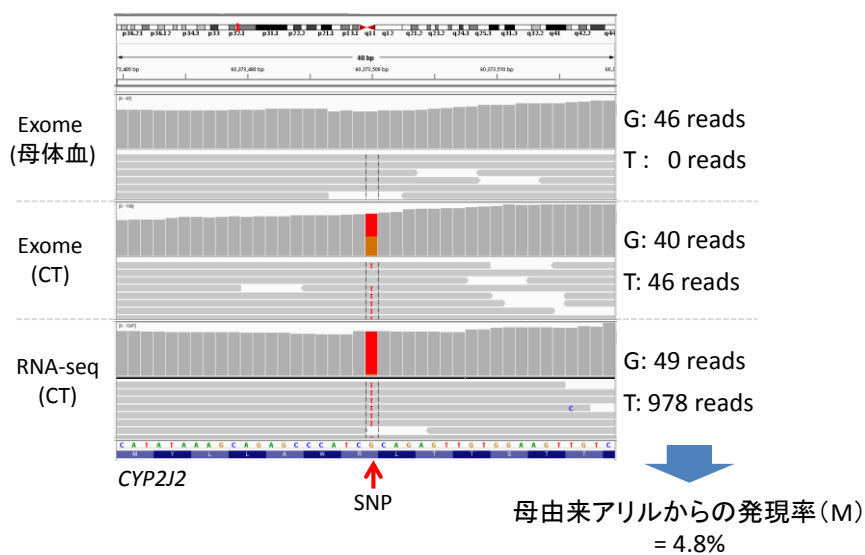


図 12

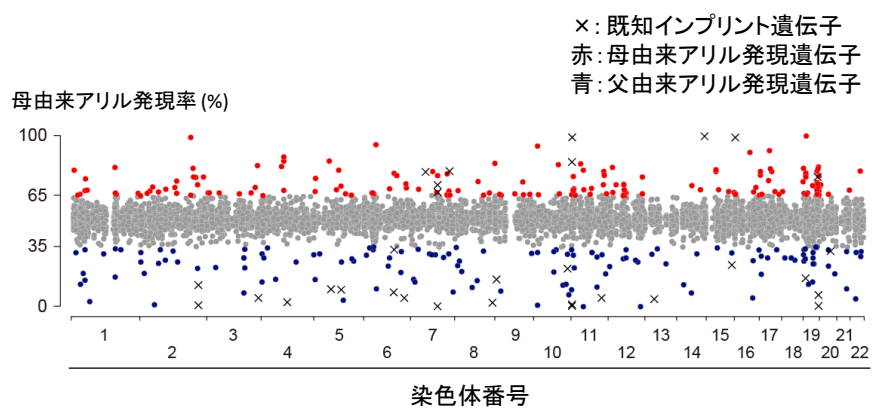


図 13

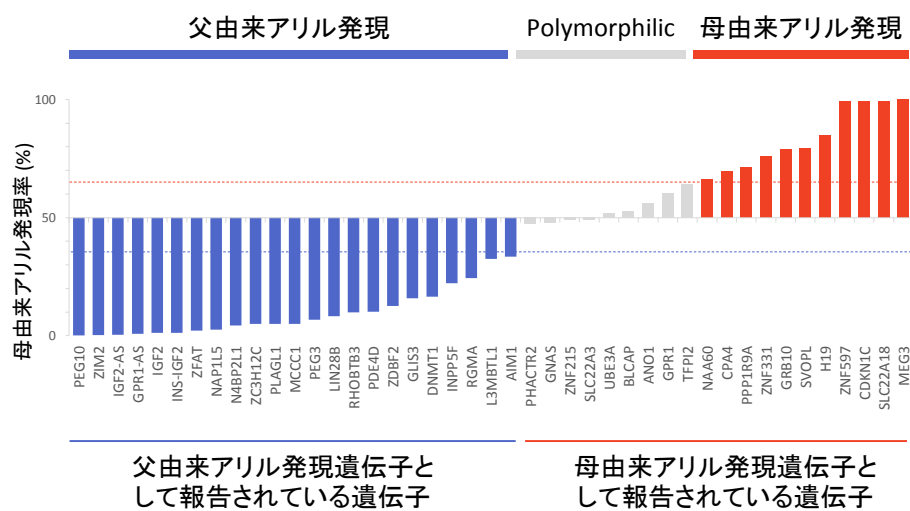


図 14

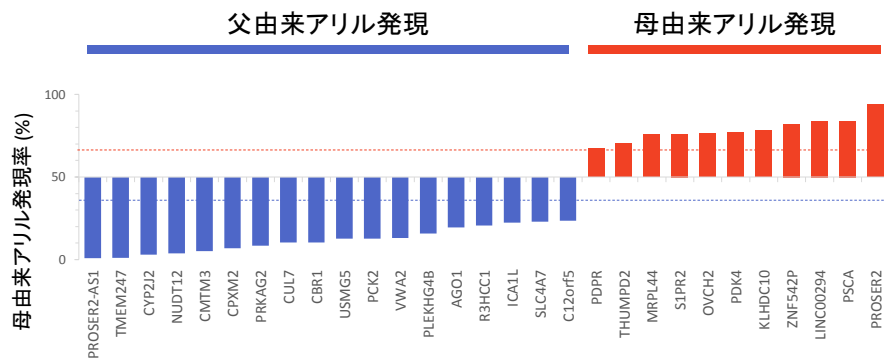


図 15

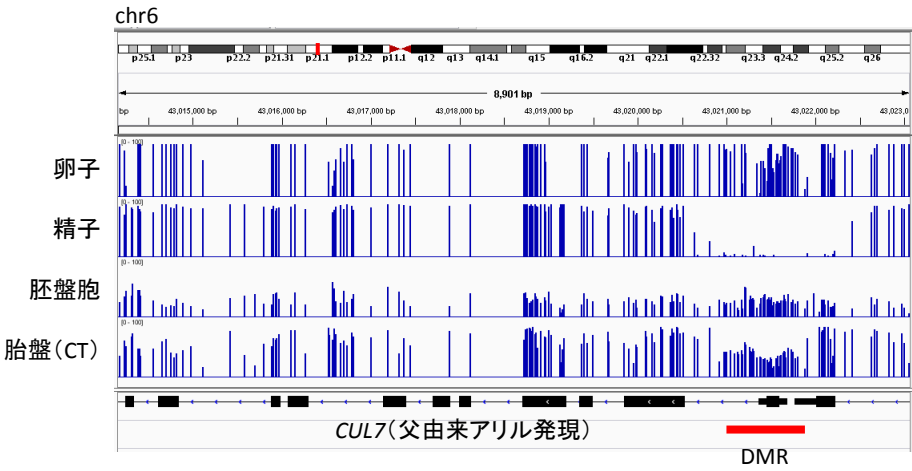


図 16

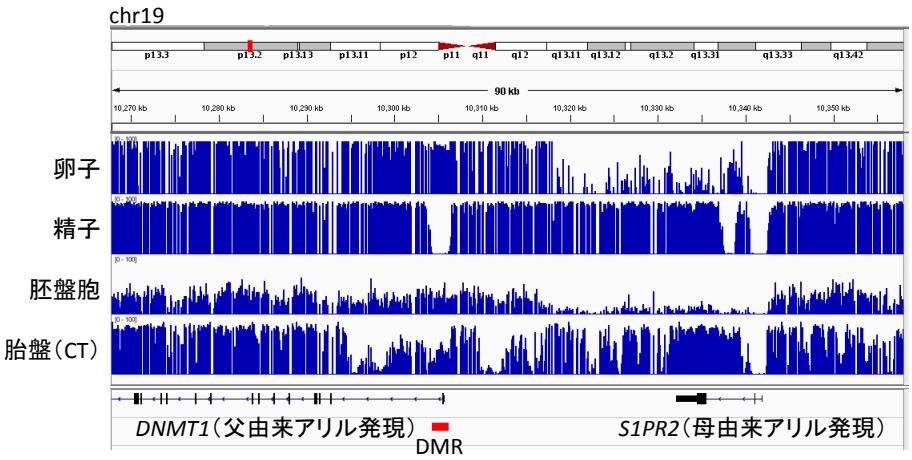


図 17

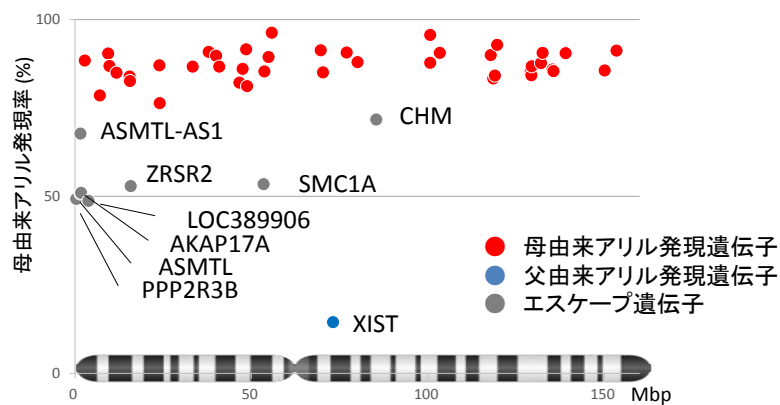
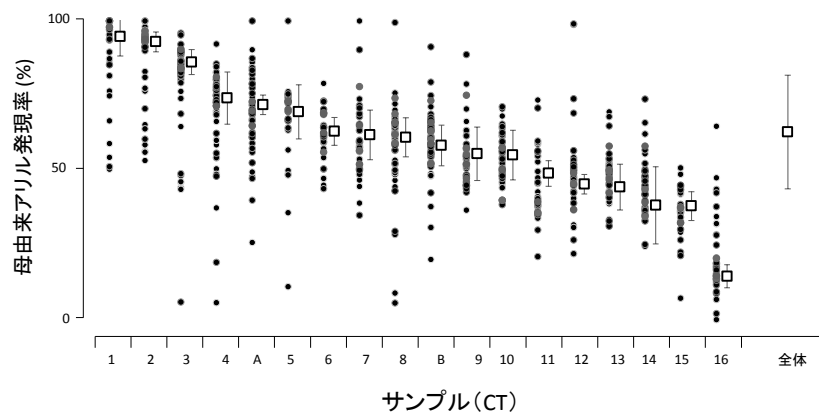
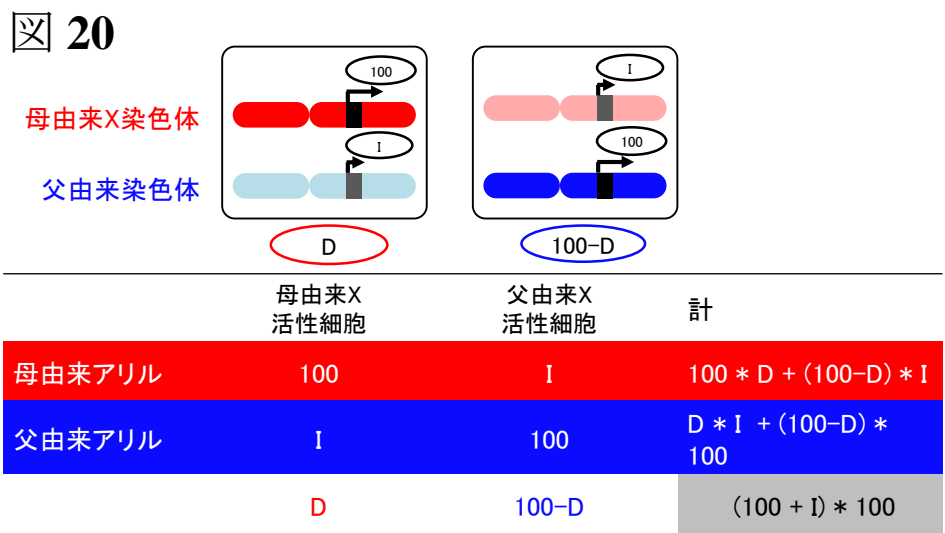
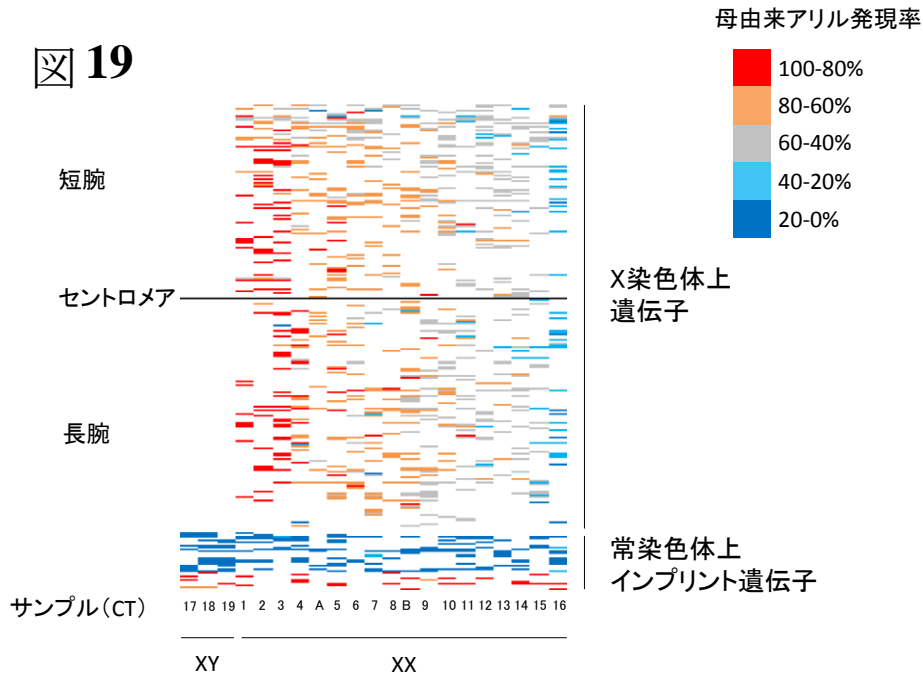


図 18





$$G = \text{母由来アリル} / (\text{両アリル}) * 100$$

$$= 100 * [100 * D + (100-D) * I] / [100 * (100 + I)]$$

$$I = 100 * (D-G) / [D + G - 100]$$

図 21

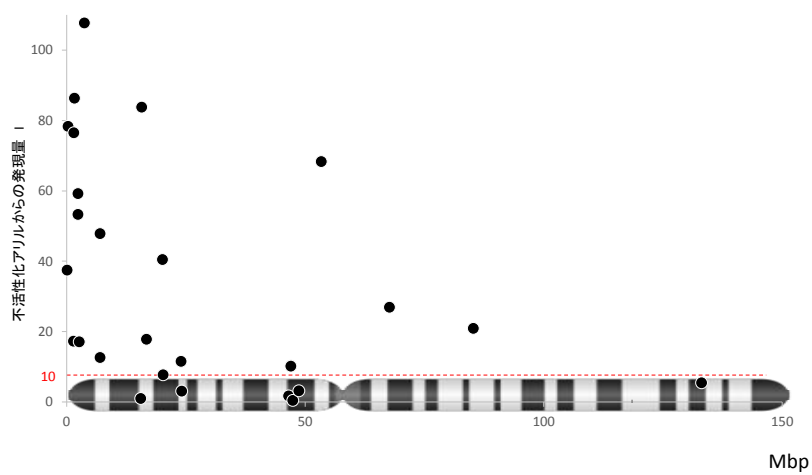


図 22

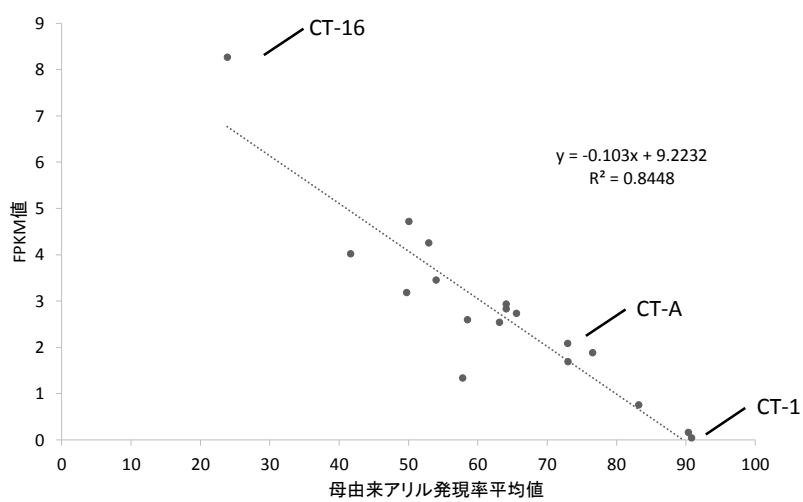


図 23

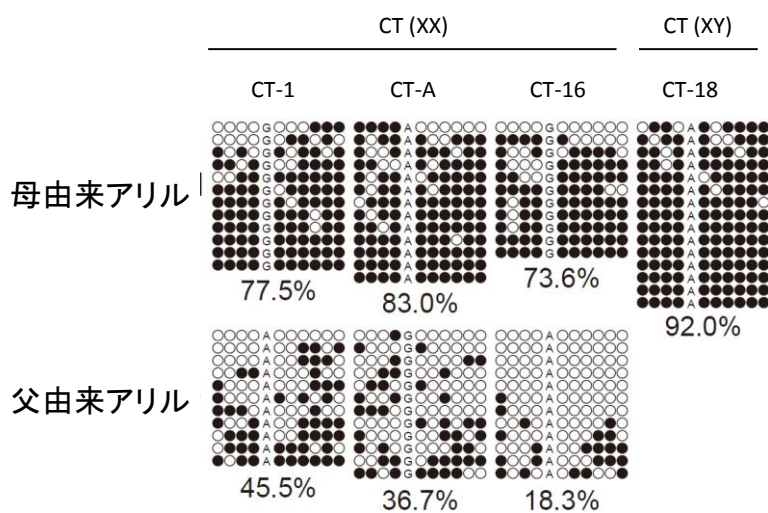


図 24

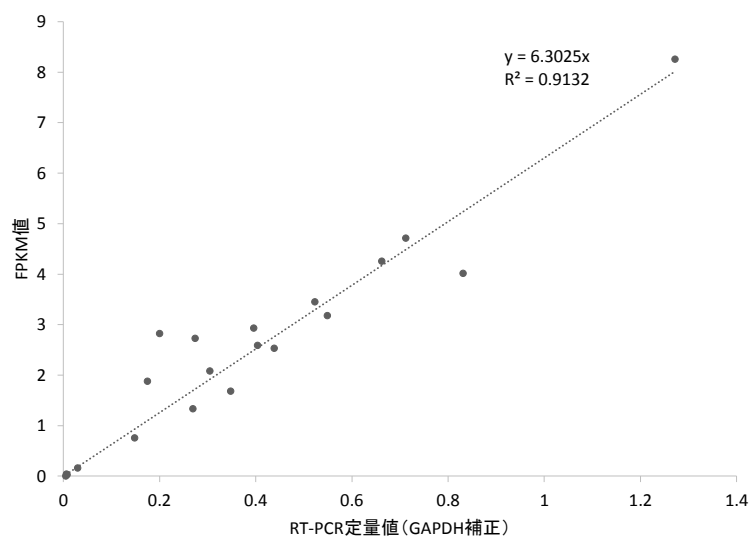


図 25

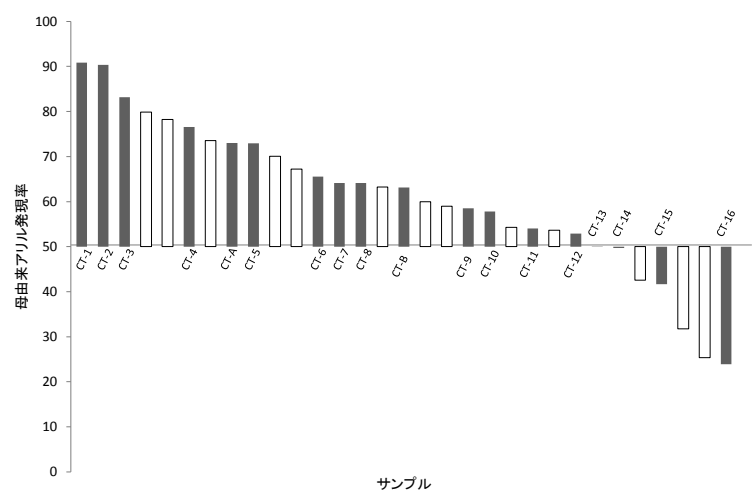


図 26

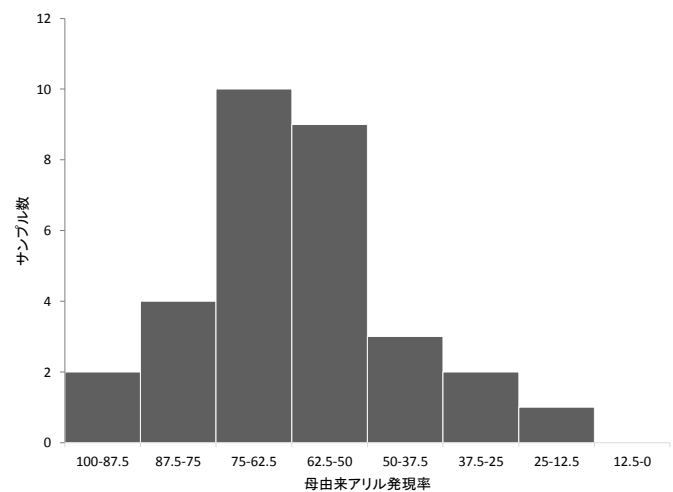


図 27

細胞数 $N = \mu \pm \sigma$ 、不活性化確率= p

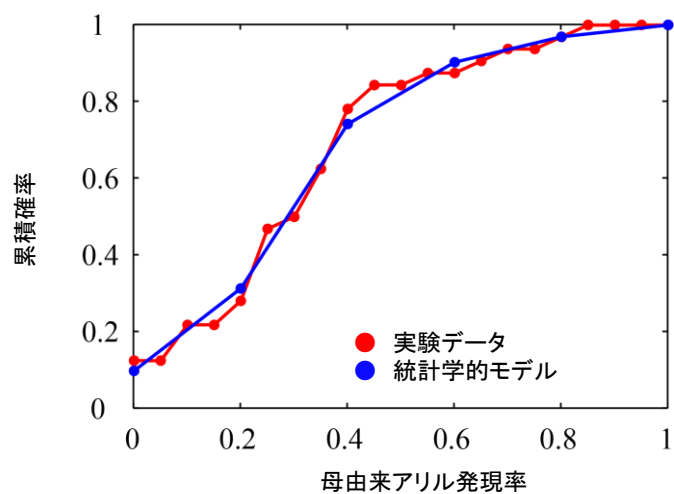


表 1 ヒト胎盤における X 染色体不活性化に関する報告

著者	標本	解析対象	遺伝子	解析手法	結論
Ropres et al. (1978) ²⁵⁾	満期胎盤	細胞破碎	<i>G6PD</i>	アイソザイム分析	Paternal X Inactivation
Migeon et al. (1978) ²⁶⁾	満期胎盤	絨毛	<i>G6PD</i>	アイソザイム分析	Random
Migeon et al. (1979) ²⁷⁾	流産絨毛		<i>G6PD</i>	アイソザイム分析	Random
Harrison et al. (1986) ²⁸⁾	満期胎盤	羊膜、絨毛、培養組織	<i>G6PD</i>	アイソザイム分析	Paternal X Inactivation
Harrison et al. (1989) ²⁹⁾	満期胎盤	培養 Cytotrophoblast	<i>G6PD</i>	アイソザイム分析	Paternal X inactivation
Mohandas et al. (1989) ³⁰⁾	中絶絨毛	絨毛 (培養含む)	<i>G6PD/HPRT</i>	アイソザイム分析	Random
Goto et al. (1997) ²³⁾	絨毛採取	Trophoblast	<i>AR</i>	メチル化	Paternal X inactivation
Looijenga et al. (1999) ³¹⁾	満期胎盤	組織片	<i>AR</i>	メチル化	Random
Uehara et al. (2000) ³²⁾	中絶絨毛	分枝絨毛、Trophoblast	<i>PGK1</i>	サザンブロット	Non random
Willemssen et al. (2002) ³³⁾	絨毛採取		<i>FMR1</i>	免疫染色	Random
Zeng et al. (2003) ³⁴⁾	中絶絨毛	Cytotrophoblast	<i>AR</i>	メチル化	Random
Dhara et al. (2004) ³⁵⁾	ヒト ES 細胞	Trophoblast 分化細胞	<i>FMR1</i>	RT-PCR	Non random
Moreira et al. (2010) ²⁴⁾	満期胎盤	組織片	22 遺伝子	RT-PCR	Random

表 2 サンプル一覧

サンプル名	妊娠 週数	性別	細胞 純度 %	リード数 reads		
				RNA-seq	Exome (CT)	Exome (母体血)
EVT-A	6	Female	95	43024597	-	-
EVT-B	8	Female	95	42583108	-	-
ST-A	7	Male	90	97888944	-	-
ST-B	8	Male	90	100327730	-	-
ストローマ-A	6	Female	93	46819022	-	-
ストローマ-B	8	Female	94	40603303	-	-
胎盤-A	10	Male	-	22267537	-	-
胎盤-B	8	Female	-	20515245	-	-
CT-1	8	Female	95	33634510	32092594	116704139
CT-2	7	Female	96	32465413	28583537	46777690
CT-3	7	Female	90	56396441	46156540	48179956
CT-4	7	Female	91	65101921	48532326	53169414
CT-A	8	Female	90	58458920	744507943	487228634
CT-5	9	Female	95	30076328	41381049	27592455
CT-6	5	Female	93	29795329	25386760	38826855
CT-7	7	Female	95	34449535	23023147	26963681
CT-8	8	Female	94	51287952	46267913	48479531
CT-B	7	Female	92	61880237	755547300	420993723
CT-9	8	Female	98	66187521	36201046	43103782
CT-10	9	Female	91	62755355	47299380	53028519
CT-11	9	Female	91	61808128	49515712	54641966
CT-12	7	Female	91	60413525	52224281	55917197
CT-13	8	Female	98	61113904	49390660	50121549
CT-14	8	Female	97	54277180	40418463	41681648
CT-15	7	Female	95	53825984	42974813	45114432
CT-16	7	Female	91	61213601	53191702	56340349
CT-17	8	Male	96	53740736	44536987	46202825
CT-18	8	Male	95	52063165	50875528	46816151
CT-19	7	Male	95	97940149	43509756	39045263

表 3 遺伝子オントロジー解析結果一覧

	遺伝子数	GO term	p 値	q 値	遺伝子数	遺伝子名
CT->EVT up	90	immune response	9.50E-19	1.00E-15	30	<i>OAS2, CD14, CD4, CD74, CD83, FCER1G, FCGR3A, FCGRT, GPR183, VSIG4, CCL2, CCL3, CCL4, CXCR4, C1QA, C1QB, C1QC, C5AR1, CYBB, IL1R2, IL1B, HLA-G, HLA-DQB1, HLA-DRA, PRG2, RGS1, HLA-DQA1, SPON2, TREM2, TNFSF10</i>
		defense response	1.10E-15	5.80E-13	26	<i>CD14, CD163, CD74, CD83, TYROBP, VSIG4, AIF1, CCL2, CCL3, CCL4, CXCR4, C1QA, C1QB, C1QC, C5AR1, CYBB, FN1, ITGB2, IL1B, HLA-G, HLA-DRA, PLA2G7, PSG3, PRG2, SPP1, STAB1</i>
		response to wounding	5.40E-14	1.90E-11	23	<i>CD14, CD163, CD36, VSIG4, AIF1, CCL2, CCL3, CCL4, CXCR4, F13A1, C1QA, C1QB, C1QC, CYBB, FN1, ITGB2, IL1B, LYVE1, NOG, PLA2G7, PLEK, SPP1, STAB1</i>
		inflammatory response	1.60E-12	4.30E-10	18	<i>CD14, CD163, VSIG4, AIF1, CCL2, CCL3, CCL4, CXCR4, C1QA, C1QB, C1QC, CYBB, FN1, ITGB2, IL1B, PLA2G7, SPP1, STAB1</i>
		female pregnancy	9.00E-09	1.90E-06	10	<i>FCGRT, PAPPA, CSH1, CSH2, HPGD, IL1B, PSG2, PSG3, SPP1, TAC3</i>
CT->EVT down	213	No GO term				
CT->ST up	230	female pregnancy	1.10E-13	1.50E-10	17	<i>ENDOU, PAPPA, CLIC5, CSH1, CSH2, CRH, FLT1, HSD11B2, LNPEP, PSG1, PSG11, PSG2, PSG3, PSG5, PSG6, PSG8, PSG4, PSG7, PSG9</i>
		oxygen transport	1.10E-05	7.10E-03	5	<i>HBA1, HBA2, HBE1, HBG1, HBG2, HBZ</i>
		hormone biosynthetic process	2.50E-05	1.10E-02	6	<i>CRH, HSD3B1, HSD11B2, HSD17B1, LHB, SCARB1</i>
		gas transport	4.50E-05	1.50E-02	5	<i>CRH, CGA, HSD3B1, HSD11B2, HSD17B1, LEP, LHB, SCARB1</i>

	遺伝子数	GO term	p 値	q 値	遺伝子数	遺伝子名
CT->ST down	719	cell cycle	4.00E-41	1.10E-37	124	<i>CKS2, CDC45, CHEK1, CHTF18, DBF4, DDX11, E2F1, E2F3, FBXO5, FANCD2, FANCI, GTSE1, H2AFX, HAUS1, HAUS8, HJURP, MAD2L1, MRE11A, NDC80, NEK2, NEK6, NUF2, OIP5, PBK, PSMC3IP, RAD51, RAD54L, RACGAP1, SKP2, SH3BP4, SPC25, STEAP3, TIPIN, TPX2, TTK, ZWINT, ANAPC4, ANLN, MKI67, AURKA, AURKB, BIRC5, BCAT1, BUB1, BUB1B, CDK1, CDC20, CDC25A, CDC6, CDCA2, CDCA3, CDCA5, CDCA8, CENPA, CENPF, CENPJ, CENPV, CEP55, CHAF1A, CHAF1B, CDT1, SKA3, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CCNE2, CCNF, CCNG1, CDK7, CDKN1C, CDKN3, CKAP2, DLGAP5, EXO1, FOXM1, GMNN, GADD45A, HSPA2, HELLS, MAPK3, INCENP, KPNA2, KRT7, KIF11, KIF23, KIF2C, KIFC1, KNTC1, MND1, MCM2, MCM3, MCM6, MCM7, MSH2, MYH10, NCAPD2, NCAPG, NCAPG2, NUSAP1, PTTG1, PLK1, PLK2, POLA1, POLD1, POLE, PSRC1, CHEK2, PKMYT1, PRC1, SPAG5, STMN1, ZAK, SMC2, SMC4, TET2, TRIP13, TIMELESS, TCF7L2, TFDP2, TACC3, UBE2C, UHRF1, MYC</i>
		cell cycle phase	4.00E-40	5.20E-37	90	<i>CKS2, CHEK1, DBF4, DDX11, E2F1, FBXO5, FANCD2, GTSE1, H2AFX, HAUS1, HAUS8, MAD2L1, MRE11A, NDC80, NEK2, NEK6, NUF2, OIP5, PBK, PSMC3IP, RAD51, RAD54L, SKP2, SPC25, TIPIN, TPX2, TTK, ZWINT, ANAPC4, ANLN, MKI67, AURKA, AURKB, BIRC5, BCAT1, BUB1, BUB1B, CDK1, CDC20, CDC25A, CDC6, CDCA2, CDCA3, CDCA5, CDCA8, CENPF, CENPV, CEP55, SKA3, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CCNF, CCNG1, CDKN1C, CDKN3, DLGAP5, EXO1, GADD45A, HSPA2, HELLS, INCENP, KPNA2, KRT7, KIF11, KIF23, KIF2C, KIFC1, KNTC1, MND1, NCAPD2, NCAPG, NCAPG2, NUSAP1, PTTG1, PLK1, POLA1, POLD1, POLE, PKMYT1, PRC1, SPAG5, STMN1, SMC2, SMC4, TRIP13, TIMELESS, TACC3, UBE2C</i>

	遺伝子数	GO term	p 値	q 値	遺伝子数	遺伝子名
CT->ST down	719	M phase	1.60E-36	1.40E-33	77	<i>CKS2, CHEK1, DDX11, FBXO5, FANCD2, H2AFX, HAUS1, HAUS8, MAD2L1, MRE11A, NDC80, NEK2, NEK6, NUF2, OIP5, PBK, PSMC3IP, RAD51, RAD54L, SPC25, TIPIN, TPX2, TTK, ZWINT, ANAPC4, ANLN, MKI67, AURKA, AURKB, BIRC5, BUB1, BUB1B, CDK1, CDC20, CDC25A, CDC6, CDCA2, CDCA3, CDCA5, CDCA8, CENPF, CENPV, CEP55, SKA3, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNF, CCNG1, DLGAP5, EXO1, HSPA2, HELLS, INCENP, KPNA2, KIF11, KIF23, KIF2C, KIFC1, KNTC1, MND1, NCAPD2, NCAPG, NCAPG2, NUSAP1, PTTG1, PLK1, PKMYT1, PRC1, SPAG5, STMN1, SMC2, SMC4, TRIP13, TIMELESS, TACC3, UBE2C</i>
		cell cycle process	4.50E-35	3.00E-32	98	<i>CKS2, CHEK1, DBF4, DDX11, E2F1, FBXO5, FANCD2, GTSE1, H2AFX, HAUS1, HAUS8, MAD2L1, MRE11A, NDC80, NEK2, NEK6, NUF2, OIP5, PBK, PSMC3IP, RAD51, RAD54L, RACGAP1, SKP2, SPC25, TIPIN, TPX2, TTK, ZWINT, ANAPC4, ANLN, MKI67, AURKA, AURKB, BIRC5, BCAT1, BUB1, BUB1B, CDK1, CDC20, CDC25A, CDC6, CDCA2, CDCA3, CDCA5, CDCA8, CENPA, CENPF, CENPJ, CENPV, CEP55, SKA3, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CCNF, CCNG1, CDKN1C, CDKN3, DLGAP5, EXO1, GADD45A, HSPA2, HELLS, INCENP, KPNA2, KRT7, KIF11, KIF23, KIF2C, KIFC1, KNTC1, MND1, MSH2, MYH10, NCAPD2, NCAPG, NCAPG2, NUSAP1, PTTG1, PLK1, POLA1, POLD1, POLE, PKMYT1, PRC1, SPAG5, STMN1, ZAK, SMC2, SMC4, TRIP13, TIMELESS, TCF7L2, TACC3, UBE2C, MYC</i>
		mitotic cell cycle	1.20E-33	6.20E-31	78	<i>CHEK1, DBF4, DDX11, E2F1, FBXO5, GTSE1, HAUS1, HAUS8, MAD2L1, NDC80, NEK2, NEK6, NUF2, OIP5, PBK, SKP2, SPC25, TIPIN, TPX2, TTK, ZWINT, ANAPC4, ANLN, AURKA, AURKB, BIRC5, BCAT1, BUB1, BUB1B, CDK1, CDC20, CDC25A, CDC6, CDCA2, CDCA3, CDCA5, CDCA8, CENPA, CENPF, CENPV, CEP55, SKA3, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CCNF, CCNG1, CDKN1C, CDKN3, DLGAP5, GADD45A, HELLS, INCENP, KPNA2, KIF11, KIF23, KIF2C, KIFC1, KNTC1, NCAPD2, NCAPG, NCAPG2, NUSAP1, PTTG1, PLK1, PLK2, POLA1, POLD1, POLE, PKMYT1, PRC1, SPAG5, STMN1, SMC2, SMC4, TIMELESS, UBE2C</i>

表 4 既知インプリント遺伝子の細胞種ごとの発現量

遺伝子名	発現量 $\log_2(\text{FPKM}+1)$			遺伝子名	発現量 $\log_2(\text{FPKM}+1)$		
	CT	EVT	ST		CT	EVT	ST
<i>H19</i>	11.9	13.4	8.2	<i>PHACTR2</i>	3.1	2.6	4.5
<i>PEG10</i>	10.2	3.3	4.0	<i>SLC22A18</i>	3.0	2.8	0.8
<i>IGF2</i>	9.7	10.7	6.8	<i>RB1</i>	2.8	3.7	0.6
<i>GNAS</i>	9.7	8.6	7.4	<i>GRB10</i>	2.7	4.5	1.5
<i>CDKN1C</i>	8.9	10.0	4.0	<i>ZDBF2</i>	2.5	3.0	2.0
<i>MEST</i>	8.4	4.3	4.2	<i>PLAGL1</i>	2.1	3.0	1.0
<i>PHLDA2</i>	8.1	7.6	4.2	<i>PPP1R9A</i>	2.1	0.1	1.3
<i>PEG3</i>	7.8	3.3	2.5	<i>NAP1L5</i>	2.0	0.7	0.9
<i>DNMT1</i>	7.1	3.8	1.3	<i>GPR1-AS</i>	2.0	2.4	1.4
<i>AIM1</i>	6.2	1.7	6.4	<i>ANO1</i>	2.0	0.6	4.9
<i>LIN28B</i>	6.1	5.8	4.1	<i>GPR1</i>	1.9	4.2	0.9
<i>BLCAP</i>	5.6	4.8	3.9	<i>ZNF215</i>	1.6	1.6	0.1
<i>ZNF331</i>	5.2	4.9	3.9	<i>MEG3</i>	1.6	1.1	0.4
<i>SGCE</i>	5.0	2.7	4.5	<i>FAM50B</i>	1.4	1.3	0.6
<i>UBE3A</i>	4.8	4.2	3.2	<i>SNURF</i>	1.4	1.7	1.0
<i>NAA60</i>	4.4	4.8	4.0	<i>MKRN3</i>	1.3	0.9	0.8
<i>COPG2</i>	4.2	3.5	2.6	<i>AXL</i>	1.2	1.8	0.2
<i>ZIM2</i>	3.8	0.6	0.3	<i>KCNQ1</i>	1.2	1.9	0.1
<i>TFPI2</i>	3.8	5.9	13.6	<i>NDN</i>	1.1	0.4	0.1
<i>INPP5F</i>	3.7	4.2	3.8	<i>DLK1</i>	0.5	1.4	0.3
<i>RHOBTB3</i>	3.2	4.5	6.7				

表 5 新規インプリント候補遺伝子の細胞種ごとの発現量

遺伝子名	発現量 log2(FPKM+1)		
	CT	EVT	ST
<i>PSCA</i>	1.7	1.7	7.5
<i>CPXM2</i>	2.2	0.1	6.2
<i>CBR1</i>	3.9	3.1	6.2
<i>PRKAG2</i>	2.9	4.3	5.0
<i>PDK4</i>	1.9	1.5	2.9
<i>TMEM247</i>	2.4	0.7	2.4
<i>OVCH2</i>	1.9	0.5	1.8
<i>C12orf5</i>	1.7	1.6	1.6
<i>PDPR</i>	2.7	2.3	2.3
<i>CUL7</i>	3.3	3.8	2.7
<i>ZNF542P</i>	1.3	1.1	0.5
<i>USMG5</i>	7.4	7.3	6.5
<i>VWA2</i>	1.1	0.0	0.0
<i>KLHDC10</i>	2.9	2.5	1.7
<i>THUMPD2</i>	2.8	2.2	1.4
<i>NUDT12</i>	1.9	1.4	0.5
<i>PCK2</i>	3.3	3.1	1.8
<i>AGO1</i>	2.7	1.9	1.2
<i>LINC00294</i>	2.2	3.3	0.6
<i>R3HCC1</i>	3.5	2.8	1.8
<i>PLEKHG4B</i>	1.9	0.8	0.0
<i>SLC4A7</i>	2.7	4.0	0.7
<i>PROSER2</i>	2.4	2.2	0.1
<i>MRPL44</i>	5.2	3.9	2.9
<i>PROSER2-AS1</i>	3.3	2.9	0.2
<i>ICA1L</i>	3.8	4.2	0.6
<i>CMTM3</i>	4.8	6.6	0.7
<i>S1PR2</i>	4.5	2.6	0.3
<i>CYP2J2</i>	5.8	0.6	0.8

表 6 インプリント候補遺伝子と DMR

染色体	Start	End	遺伝子名	発現			DMR			クラスター
				アリル	母由来アリル 発現率	サンプル数	Position	Start	End	
chr10	11891607	11936709	<i>PROSER2-AS1</i>	父	0.7	3	Promoter	11934845	11937713	PROSER2
chr2	46706704	46711564	<i>TMEM247</i>	父	1	4	-	-	-	
chr1	60358980	60392423	<i>CYP2J2</i>	父	2.9	3	Promoter	60392140	60392785	
chr5	102884556	102898502	<i>NUDT12</i>	父	3.7	7	Promoter	102897552	102898901	
chr16	66637935	66647795	<i>CMTM3</i>	父	5.1	6	Promoter	66637425	66639837	
chr10	125505152	125651500	<i>CPXM2</i>	父	6.9	10	Promoter	125650942	125651221	
chr7	151253201	151574316	<i>PRKAG2</i>	父	8.4	6	Promoter	151327824	151330524	
chr6	43005355	43021683	<i>CUL7</i>	父	10.2	7	Promoter	43020999	43021882	
chr21	37442222	37445475	<i>CBR1</i>	父	10.3	4	-	-	-	
chr10	105148809	105156270	<i>USMG5</i>	父	12.5	3	-	-	-	
chr14	24563340	24573341	<i>PCK2</i>	父	12.7	7	Promoter	24562609	24563883	
chr10	115999013	116054259	<i>VWA2</i>	父	13	3	Promoter	115999021	115999895	
chr5	140373	190087	<i>PLEKHG4B</i>	父	15.8	6	-	-	-	
chr1	36348810	36389899	<i>AGO1</i>	父	19.5	3	Promoter	36348629	36349903	
chr8	23145605	23153792	<i>R3HCC1</i>	父	20.5	6	Promoter	23145614	23146451	
chr2	203637873	203736708	<i>ICA1L</i>	父	22.4	10	Gene body	203638638	203639156	
chr3	27414212	27525911	<i>SLC4A7</i>	父	22.9	7	Gene body	27504162	27506728	
chr12	4430359	4469190	<i>C12orf5</i>	父	23.6	10	Gene body	4433379	4433928	

染色体	Start	End	遺伝子名	発現			DMR			クラスター
				アリル	母由来アリル 発現率	サンプル数	Position	Start	End	
chr16	70147529	70195184	<i>PDPR</i>	母	67.2	3	-	-	-	
chr2	39963200	40006416	<i>THUMPD2</i>	母	70.3	3	-	-	-	
chr2	224822121	224832431	<i>MRPL44</i>	母	75.9	5	-	-	-	
chr19	10332109	10341948	<i>S1PR2</i>	母	76.1	7	-	-	-	<i>DNMT1</i>
chr11	7711155	7727941	<i>OVCH2</i>	母	76.3	3	-	-	-	
chr7	95212809	95225925	<i>PDK4</i>	母	76.9	5	-	-	-	<i>KCNQ1</i>
chr7	129710349	129775560	<i>KLHDC10</i>	母	78	8	Gene body	129746868	129749725	
chr19	56879468	56891196	<i>ZNF542P</i>	母	82	7	-	-	-	
chr11	33097696	33101000	<i>LINC00294</i>	母	83.9	3	-	-	-	
chr8	143751726	143764145	<i>PSCA</i>	母	84	3	-	-	-	
chr10	11865397	11914276	<i>PROSER2</i>	母	94.2	3	-	-	-	<i>PROSER2-AS</i>

表 7 エスケープ遺伝子一覧

遺伝子名	不活性化アリル発現率	既知のエスケープ遺伝子 Cotton et al. ⁴⁵⁾	偽常染色体領域
<i>LOC389906</i>	107.6	-	-
<i>AKAP17A</i>	86.3	-	PAR1
<i>ZRSR2</i>	83.7	escape	-
<i>PPP2R3B</i>	78.3	escape	PAR1
<i>ASMTL</i>	76.4	escape	PAR1
<i>SMC1A</i>	68.3	variable escape	-
<i>ZBED1</i>	59.1	-	PAR1
<i>DHRX</i>	53.2	escape	PAR1
<i>HDHD1</i>	47.7	escape	-
<i>EIF1AX</i>	40.4	variable escape	-
<i>PLCXD1</i>	37.4	escape	PAR1
<i>YIPF6</i>	26.9	subject	-
<i>CHM</i>	20.9	subject	-
<i>TXLNG</i>	17.8	escape	-
<i>ASMTL-AS1</i>	17.2	escape	PAR1
<i>GYG2</i>	17.0	variable escape	-
<i>STS</i>	12.5	escape	-
<i>EIF2S3</i>	11.5	escape	-
<i>CDK16</i>	10.2	variable escape	-
<i>USP11</i>	10.1	subject	-

表 8 動物種・細胞種間の X 染色体不活性化の違い

	動物種	胚体外組織	胚体組織
真獣類	ウマ ウサギ サル	ランダム型	ランダム型
	ヒト	不完全 インプリント型	ランダム型
	ウシ マウス ラット	完全 インプリント型	ランダム型
有袋類	カンガルー オポッサム	完全 インプリント型	完全 インプリント型