

Title	母性発現遺伝子PLAC1による胎盤サイズと層構造の調節機能の解析
Author(s)	武藤, 真長
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56171
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

母性発現遺伝子PLAC1による
胎盤サイズと層構造の調節機能の解析

大阪大学薬学研究科

創成薬学専攻

武藤 真長

目次

略語一覧

第一編 緒論

第二編 本論

第一章 *Plac1* 欠損マウスの作製と表現型解析

実験方法

結果

第一節 *Plac1* 変異マウスの作製

第二節 *Plac1* 変異マウスの表現型解析

第二章 レンチウイルス (LV) ベクターを用いた胎盤特異的遺伝子導入による *Plac1* の機能解析

実験方法

結果

第一節 LV ベクターによる *Plac1* 変異マウスのレスキュー実験

第二節 LV-*Plac1* 導入による胎盤形成への影響

第三編 考察

第四編 結論

第五編 謝辞

第六編 主論文・参考論文リスト

第七編 参考文献

略語一覧

BSA	: bovine serum albumin
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
Dec	: decidua
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	: enhanced green fluorescent protein
ES	: embryonic stem
GlyT	: glycogen trophoblast
HBSS	: Hank's balanced salt solution
HCG	: human chorionic gonadotropin
HEK293T	: human embryonic kidney 293 with T antigen of SV40
HRP	: horseradish peroxidase
IgG	: immunoglobulin G
IKMC	: International Knockout Mouse Consortium
JZ	: junctional zone
KO	: knockout
KSOM	: K+ Simplex Optimization Media
LacZ	: β -galactosidase
LV	: lentiviral
MBS	: maternal blood sinus
mRNA	: messenger ribonucleic acid
PAS	: periodic acid-Schiff
PBS	: phosphate buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
Plac1	: placenta specific 1
PMSG	: pregnant mare serum gonadotropin
RT-PCR	: reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SpT	: spongiotrophoblast
TE	: trophectoderm
WT	: wild-type

第一編 緒論

胎盤は哺乳類の胚発生において初期に形成される臓器であり、母体にとって異物である胎児を免疫的に隔離し、さらにガスや栄養・老廃物の交換を介して、妊娠の維持や胎児の発生を進めるための重要な役割を担っている[1]。胎盤は層構造を形成しており、母体側の脱落膜、中間にある海綿状栄養膜細胞層 (junctional zone: JZ)、胎仔側の迷路部 (labyrinth zone: LZ) に分かれる。母体と胎仔の栄養交換は LZ における胎仔由来のトロホブラスト細胞と血管内皮細胞を介して、母体血と胎仔血が混ざることなく物質輸送を行う。胎盤形成の異常は、栄養供給の低下による胎仔の発育不良や、母体へ影響を及ぼす悪性因子の増加を引き起こすことも知られているため[2]、正常な胎盤形成の機構を理解することは非常に重要である。近年の遺伝子組換えマウスの作製技術により、胎盤形成の各ステップにおいて重要な機能を持つ遺伝子が数多く報告されてきたが[1]、胎盤発生に関わる分子メカニズムの全容は未だ明らかになっていない。

今回われわれは、ヒトを含む哺乳類において胎盤特異的な発現を示す *Plac1* 遺伝子に着目した。ヒト PLAC1 タンパク質はトロホブラスト細胞の膜表面に局在しており、母体と胎仔の相互作用に重要であることが示唆されている[3]。また、胎盤過形成を示す体細胞核移植クローンマウスの胎盤において、*Plac1* は過剰な発現を示すことが報告されている[4]。これらの知見から、*Plac1* 遺伝子は胎盤形成に関わっている可能性が示唆されているが、詳細な生理機能は未だ明らかになっていない。

本論文では、*Plac1* 遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析と、胎盤特異的な遺伝子導入法を用いた解析により、胎盤形成における *Plac1* の生理機能解析を行った。

第二編 本論

第一章 *Plac1* 欠損マウスの作製と表現型解析

マウス胚は、交配後約4日間で受精卵から胚盤胞となり、この時期に卵管から子宮に移動する。胚盤胞において外側の細胞は栄養外胚葉（トロホブラスト細胞）と呼ばれ、上皮性の構造を持ち、将来胎盤などの胚体外組織になる細胞である。栄養外胚葉に接している内部にある細胞の塊は内部細胞塊と呼ばれ、将来胎仔になる細胞である。胚盤胞が胎齢4.5日（E4.5）で子宮に着床した後、E8.5以降から胎盤が形成され始め、胎盤を介した胎仔への栄養供給が行われる（[Figure 1](#)）。

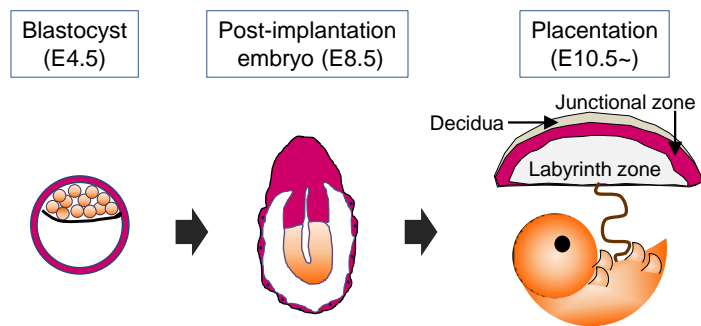


Figure 1. Diagram for fetal and placental development

E10.5以降に形成される胎盤は層構造を形成し、母体側の脱落膜（decidua: Dec）、中間にある junctional zone（JZ）、胎仔側の迷路部（labyrinth zone: LZ）に分かれる[1]（[Figure 1](#)）。JZには海綿状栄養膜（spongiotrophoblast: SpT）細胞から分化した、グリコーゲントロホブラスト（glycogen trophoblast: GlyT）細胞があり、主にこの2種類のトロホブラスト細胞で構成され、妊娠維持のためのホルモンを分泌するなどの機能を持つことが知られている[1]。LZには胎仔由来の3種類のトロホブラスト細胞と胎仔由来の血管内皮細胞を介して、母体血と胎仔血が混ざることなく物質輸送を行う[1]（[Figure 2](#)）。

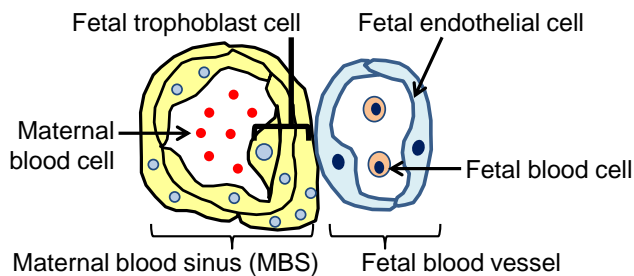


Figure 2. Structure of labyrinth zone in mouse placenta

ところで、X染色体には胎盤特異的な発現を示す遺伝子がいくつか

報告されており、胎盤形成に重要であることが示唆されている[5]。過去の研究では、X染色体上の *Hprt* 遺伝子周辺の領域を 200~700kb 欠損させたマウスは胎盤形成異常や、出生後に死亡する表現型を示すことが報告された[6]。この表現型は *Hprt* 遺伝子の欠損マウスの表現型と異なることから、周辺領域に胚発生に重要な遺伝子が存在することが示唆された[6]。その後、その領域に *Plac1* (placenta specific 1) という遺伝子が存在しており、胎盤特異的な発現を示すことが報告された[7]。また、胎盤を用いた *in situ hybridization* により、*Plac1* は *JZ* と *LZ* のトロホブラスト細胞に発現することが示された[7]。*Plac1* 遺伝子からコードされる PLAC1 タンパク質はシグナルペプチドと zona pellucida 3 (ZP3) という細胞外マトリクスに関連したドメインを有しており[8] (**Figure 3**)、ヒトではトロホブラスト細胞の膜表面に局在することが報告されていることから[3]、胎盤機能に重要であることが示唆されている。そこで、*Plac1* 欠損マウスを作製し、表現型を解析することで、マウス胎盤における *Plac1* の役割を検討した。

PLAC1 protein domains



SP : Signal peptide

Figure 3. Schematic model of PLAC1 protein domain

実験方法

Plac1 ノックアウトマウスの作製

IKMC (International Knockout Mouse Consortium, http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:1926287/L1L2_Bact_P/232212/) から、*Plac1* ターゲティングベクター (DPGS00170_A_E06) を入手した。AsiSI 消化によりベクターを直線化した後、当研究室で C57BL/6N 系統の雄マウスから樹立した ES 細胞 (EGR-G101) [9] へエレクトロポレーション法により導入した。ES 細胞は G418 の薬剤選択培地で約一週間培養後、薬剤耐性を示した ES 細胞コロニーをピックアップし、DNA を回収して PCR 法によりスクリーニングを行った。スクリーニングに用いたプライマー配列は以下の通りである (Figure 4A)。5'側、screening Primer 1 (sPr1) : 5'-CACAAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC-3' と sPr2: 5'-GTCTGGCCTGCTGTGGAGTTGAGAGTCTTG-3' のプライマーセット、3'側の検出には Pr3: 5'-ACCCAGGCACCAATGCTAGC-3' と sPr3: 5'-CAGACAGGACAGAAGCGGTTCTGCAGAG-3' のプライマーセット。PCR 法により相同組換えが確認できた ES 細胞クローンについて核型解析を行い、染色体数 (40 本) の正常率が 6 割以上のクローンを用いてキメラマウス作製を行った。ICR 系統マウスの 8 細胞期胚に ES 細胞をインジェクションし、胚盤胞まで培養した翌日に偽妊娠マウスへ胚移植した。その後、得られたキメラマウスの成熟を待って、B6D2F1 雌マウスと交配し、*Plac1* 欠損アレルを持つヘテロ変異雌個体を得た。さらに交配を続けることで、雌のヘテロおよびホモ欠損マウス (X⁻X⁻) と雄の欠損マウス (X⁻Y) を得た。PCR での遺伝子型決定では、野生型アレルの検出には Pr1: 5'-GTTCACTCAGATGATCTGAGGAAACCC-3' と Pr2: 5'-ACCCAGGCACCAATGCTAGC-3' のプライマーセットを、変異アレルの検出には Pr2 と Pr3 のプライマーセットを用いた (Figure 4A)。PCR 法の条件は、94°C; 30 秒-[94°C; 30 秒-65°C; 30 秒-72°C; 30 秒(×40)]- 72°C; 2 分-4°C で行った。

X-gal 染色

採取した胎盤を 4%パラホルムアルデヒドで 2 時間浸透固定し、10-30%ショ糖溶液中で段階的に浸漬した後、O.C.T. compound (Sakura Finetek U.S.A., Inc., CA) に包埋、凍結してクライオスタット (MICROM HM560 Micro Edge Instrument, Tokyo, Japan) で 10 μm の厚さに薄切し、スライドガラスに貼付した。 β -galactosidase 活性を検出するため、LacZ Tissue Staining Kit (InvivoGen, California, USA) を用いて X-gal 染色した。その後、0.3%エオジンに 2 分間浸漬し、70%、90%、100%のエタノールの希釈系列およびキシレンで脱水し、Entellan new (Merck, New Jersey, USA) で封入後、光学顕微鏡で観察を行った。

産仔数の計測

Plac1 X⁻X と X⁻Y の遺伝子型を持つマウスをそれぞれ野生型 B6D2F1 マウスと同居させ、自然交配による産仔数を計測した。

胚盤胞の回収と遺伝子型決定

野生型 B6D2F1 の雌マウスと、*Plac1* X⁻X マウスに 5 unit/mouse の pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を腹腔内投与し、48 時間後に 5 unit/mouse の human chorionic gonadotropin (HCG, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を腹腔内投与して過排卵処理を行った。HCG 投与後に雄マウスと同居させ、48 時間後に卵管を採取し、2 細胞期胚を回収した。2 細胞期胚を K⁺ Simplex Optimization Media (KSOM) で、37 度 5%CO₂ 条件で 2 日間培養して胚盤胞まで発生させた。胚盤胞を一つずつチューブに回収し、20 μl の lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, SDS 0.3%, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K) で溶解後、PCR を行った。*Plac1* の変異アレルの検出は、実験方法「*Plac1* ノックアウトマウスの作製」に記載した方法で行った。また、胚盤胞の雌雄判別には、

5'-TGGTCTGGACCCAAACGCTGTCCACA-3'と

5'-GGCAGCAGCCATCACATAATCCAGATG-3'のプライマーセットを用いることにより、X染色体上の *Uba1x* (211 bp) と Y染色体上の *Uba1y* (189 bp) を検出するバンドのサイズ差で判別した。

胎仔と胎盤の重量測定

Plac1 X-X と野生型雄マウスを交配させて、胎齢 12.5 日 (E12.5)、E14.5、E16.5 で胎仔と胎盤を採取し、重量を測定した。

組織学的解析

採取した胎盤を 4%パラホルムアルデヒドで浸透固定した後、50%~100%エタノールおよびキシレン中で段階的に脱水し、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックはマイクロトーム (MICROM HM325, Micro Edge Instrument, Tokyo, Japan) で 5 μ m の厚さに薄切し、スライドガラス (Matsunami adhesive silane (MAS) coated glass slides; MATSUNAMI, Osaka, Japan) に貼付した。パラフィン切片はキシレンおよび 100%、90%、70%のエタノールの希釈系列により脱パラフィンを施し、流水水洗した後、Periodic acid Schiff (PAS) 染色、または免疫組織染色に用いた。PAS 染色では、1% periodic acid (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 溶液、Schiff 試薬 (Wako, Tokyo, Japan) に浸漬し、流水水洗後、ヘマトキシリン溶液 (Wako, Tokyo, Japan) に浸漬して核染色をした。染色後の切片は 70%、90%、100%のエタノールの希釈系列およびキシレンで脱水し、封入後、光学顕微鏡で観察を行った。免疫組織染色では、切片を予め 3%過酸化水素水で内在性のペルオキシダーゼ活性を失活させてから、1%BSA (bovine serum albumin) /PBS に室温で 1 時間静置してブロッキングし、一次抗体として抗 Ki67 抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA)、または抗 Laminin 抗体 (#L9393, Sigma Aldrich, Missouri, USA) を室温一晩で反応させた。PBS で洗浄した後、各一次抗体の動物種の IgG

に対する HRP 標識された二次抗体を反応させた。HRP の検出には 3,3'-diaminobenzidine (DAB) を反応させて発色させ、核染色にはヘマトキシリン溶液を用いた。

統計解析

全ての値は平均値 \pm 標準偏差で示した。検定は最低でも 3 回の独立した実験を行った。統計解析は student の t 検定により行い、 $P < 0.05$ のときに有意差があるとした。

結果

第一節 *Plac1* 変異マウスの作製

Plac1 遺伝子は、X 染色体に存在しており、3 個のエキソンを有する。開始コドンは 3 番目のエキソンに存在するため、*Plac1* の第 3 エキソン部分をネオマイシン耐性遺伝子と *LacZ* レポーター遺伝子に置き換えるターゲティングベクターを用いた (Figure 4A)。直線化したターゲティングベクターをエレクトロポレーションで ES 細胞に導入し、G418 とジフテリア毒素 A フラグメント (DT) を用いたポジティブ・ネガティブ選択した後、48 個のコロニーをピックアップし、PCR スクリーニングにより、相同組換えを起こした ES 細胞を 14 クローン得た。そのうち 6 クローンの核型解析を行い、正常な染色体数を有した 4 クローンの ES 細胞を得た。そのうち 3 クローンを用いてキメラマウスを作製した。これらキメラマウスを B6D2F1 交雑系マウスと交配さ

せて *Plac1* 欠損アレルを持つヘテロ変異個体 (X⁻X) を得た

(Figure 4B)。さらにこのヘテロ変異マウスを野生型雄マウス

と交配させて、雄の変異マウス (X⁻Y) を得た (Figure 4B)。

これらマウスを交配させる場合、母方から変異が伝わる交配

(X⁻X × XY) で得られた次世代マウスを X^mX、X^mY とした。また、父方から変異が伝わる交配

(XX × X⁻Y) で得られた次世代マウスを X^pX、XY とした。

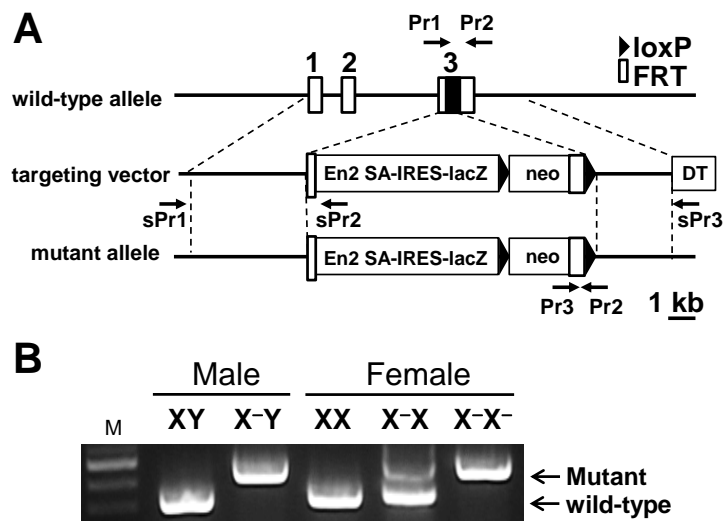


Figure 4. Targeted disruption of *Plac1* and insertion of the *LacZ* gene.

(A) Diagram of the targeting vector construct. *Plac1* ORF was replaced with *LacZ* gene. (B) Genotyping results.

第二節 *Plac1* 変異マウスの解析

X-gal 染色による *Plac1* の発現解析

作製した *Plac1* 変異マウスは *LacZ* レポーター遺伝子がノックインされているので、変異マウスの胎盤を用いて、X-gal 染色を行った。母方から変異が伝わった個体 (X^m) の E11.5 の胎盤では、*LacZ* 陽性細胞が染色され、胎盤の juncitonal zone (JZ) と labyrinth zone (LZ) に陽性細胞が検出された (Figure 5)。このことから、*Plac1* は JZ においては SPO 細胞と GlyT 細胞、LZ においてはトロホブラスト細胞または血管内皮細胞に発現する可能性が示唆された。一方で父方から変異

が伝わった個体 (X^p) の胎盤では、*LacZ* 陽性細胞がほとんど染色されなかった (Figure 5)。このことから、*Plac1* は母方アレル特異的に発現する遺伝子であることが確認できた。

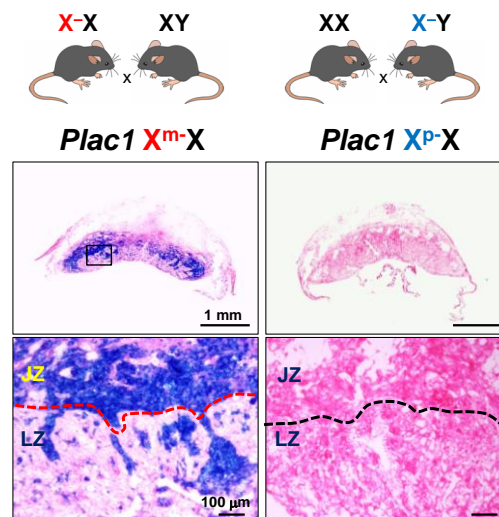
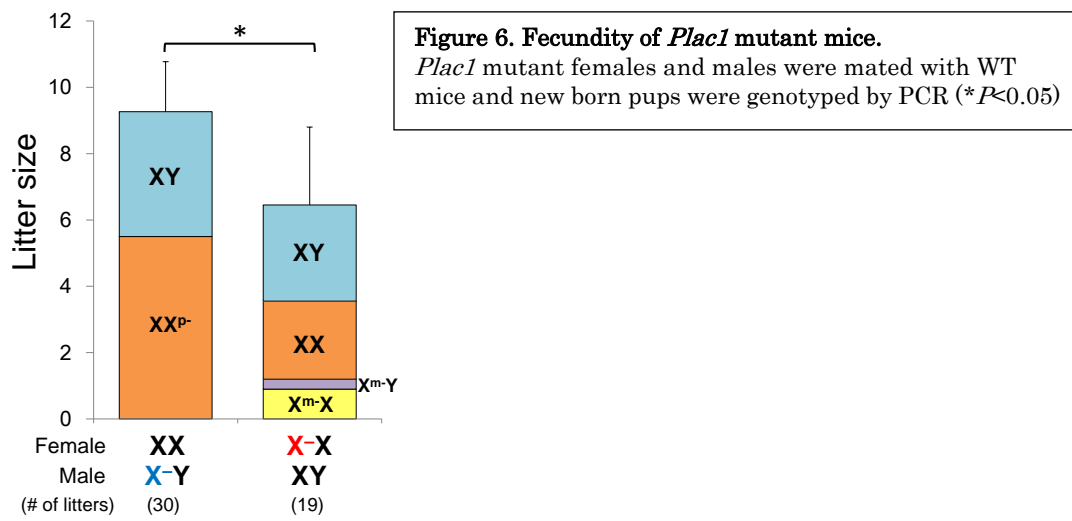


Figure 5. Characterization of *Plac1* gene expression by X-gal staining. *LacZ* positive cells appeared only in placental carrying the maternally transmitted mutant allele.

Plac1 変異マウスの妊孕性

Plac1 KO マウスの妊孕性を調べるため、 $XX \times X^pY$ と $X^mX \times XY$ の交配を行って、産仔数を調べた。父方から変異が伝わる交配では、産仔数は 9.3 ± 1.5 , $n=30$ であったが、母方から変異が伝わる交配では、産仔数が 6.5 ± 2.4 , $n=20$ となり、有意に減少することがわかった。また、各遺伝子型における新生仔の数を調べたところ、父方から変異が伝わる交配では、 $XY=3.8 \pm 1.3$, $n=30$, $X^pX=5.5 \pm 1.7$ と変異アレルを持つ個体が減ることはなかったが、母方から変異が伝わる交配では、 $XY=2.9 \pm 1.4$, $XX=2.4 \pm 1.3$, $X^mY=0.3 \pm 0.6$, $n=20$, $X^mX=0.9 \pm 1.2$ となり、変異マウスの

出生率が減少していた (**Figure 6**)。このことから、母方アレルから発現する *Plac1* が胚発生に重要であることが示された。



Plac1 変異マウスの着床前における表現型解析

Plac1 KO マウスの発生異常が起きる時期を特定するため、まず父方および母方から変異が伝わる交配で得られた胚盤胞の数を調べた。父方から変異が伝わる交配では、 $X^pX=58$, $XY=56$ 、母方から変異が伝わる交配では、 $XX=34$, $XY=31$, $X^mX=28$, $X^mY=27$ と、いずれもほぼ予想される比で胚盤胞を得た (Figure 7)。また、それら胚盤胞の形態学的な異常は見られなかったため、*Plac1* は着床前の発生には重要ではないことが示された。

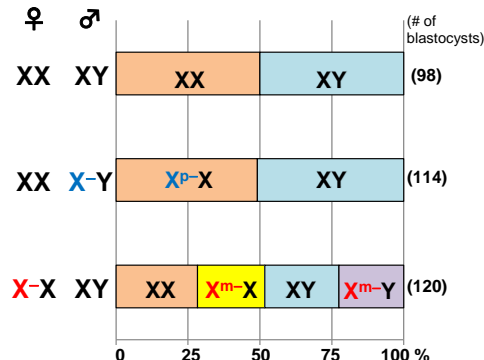


Figure 7. The proportion of *Plac1* mutant embryos at blastocyst stage. The blastocysts were genotyped and sexed by PCR. The mutant embryos were obtained at expected Mendelian ratio.

Plac1 変異マウスの胎仔と胎盤の表現型解析

次に着床後の胎盤形成の時期における表現型を解析した。まず胎仔重量と胎盤重量を E12.5、E14.5、E16.5 で測定した。母方から変異が伝わった胎仔 (X^m) には E12.5 と E14.5 では野生型と差が見られなかった (E12.5: WT; 83 ± 12 mg; $n=14$, X^m ; 70 ± 23 mg; $n=12$, E14.5: WT; 267 ± 42 mg; $n=16$, X^m ; 246 ± 38 mg; $n=20$) (Figure 8A)。しかし、E16.5 になると変異マウスの胎仔重量が減少した (WT; 770

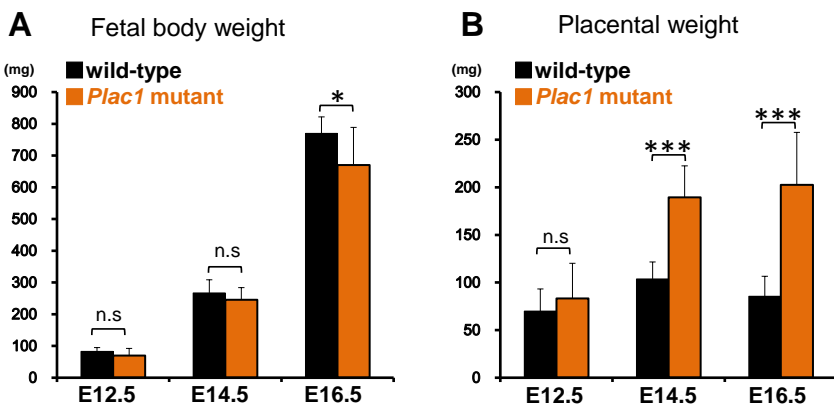


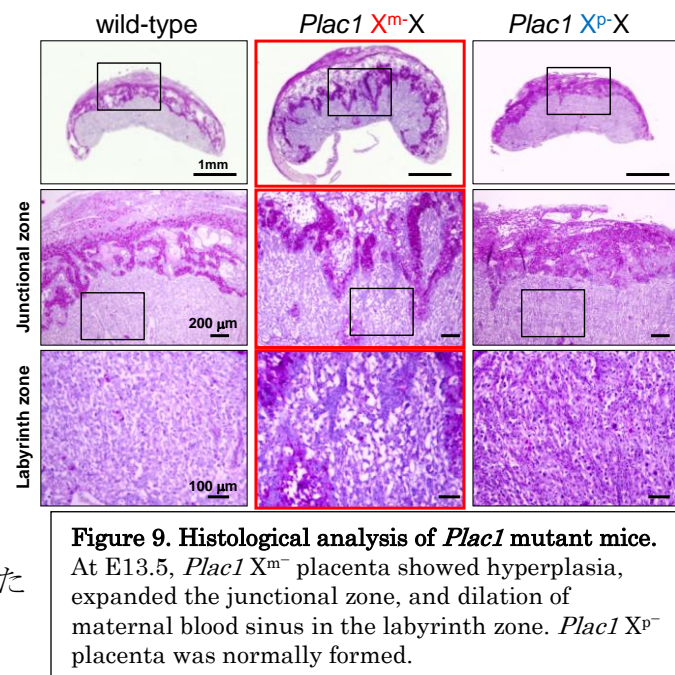
Figure 8. The weight of *Plac1* mutant fetus and placenta during E12.5 through E16.5. (A) Fetal weight of *Plac1* X^m mice was decreased at E16.5. (* $P<0.05$) (B) Placental weight of *Plac1* X^m mice was increased by E14.5 through E16.5. (***) $P<0.001$)

± 52 mg; $n=16$, X^m ; 670 ± 119 mg; $n=12$) (Figure 8A)。E12.5 の胎盤重量は野生型と X^m で差は見られなかったが (E12.5: WT 70 ± 23 mg; $n=14$, X^m 83 ± 37 mg; $n=12$)、E14.5、E16.5 の X^m は胎盤過形

成を示し、重量が約 2 倍と顕著に増加していた (E14.5: WT; 104 ± 18 mg; n=16, X^{m-} ; 190 ± 33 mg; n=20, E16.5: WT; 86 ± 21 mg; n=16, X^{m-} ; 203 ± 55 mg; n=12) (Figure 8B)。

Plac1 変異マウス胎盤の組織病理学的解析

PAS (Periodic acid Schiff) 染色により X^{m-} 胎盤の組織病理学的解析を行った。胎盤の JZ における SpT と GlyT 細胞はグリコーゲンを多く含んでいるため、PAS 染色により陽性となる [1]。E13.5 の X^{m-} 胎盤では、野生型に比べ胎盤過形成であり、JZ が LZ へ陥入している像が見られた。また、LZ の組織像が全体的に粗になっていた (Figure 9)。



胎盤過形成となる原因として、異常な細胞増殖が起きていることが考えられたため、細胞増殖マーカーである Ki67 の免疫組織染色を行った。 X^{m-} 胎盤では、野生型に比べ JZ で Ki67 陽性細胞が顕著に増加していた (Figure 10A)。胎盤の各層構造の面積を測定したところ、母体由来の脱落膜と LZ の層は野生型と比べて差は見られなかったが、JZ が顕著に拡張していた (Figure 10B)。これらのことから、*Plac1* 変異マウスでは、JZ における細胞過増殖により胎盤過形成が生じたと考えられる。

胎盤の LZ は母体と胎仔の栄養交換を行い、胎仔の発育に重要な機能を担っている (Figure 11A)。そこで X^{m-} 胎盤の LZ における形態異常について解析するため、血管内皮細胞の基底膜を特異的に染色することが知られているラミニンの免疫組織染色を実施し、陽性であれば血管、陰性であれば母体血洞とした。野生型と X^{m-}

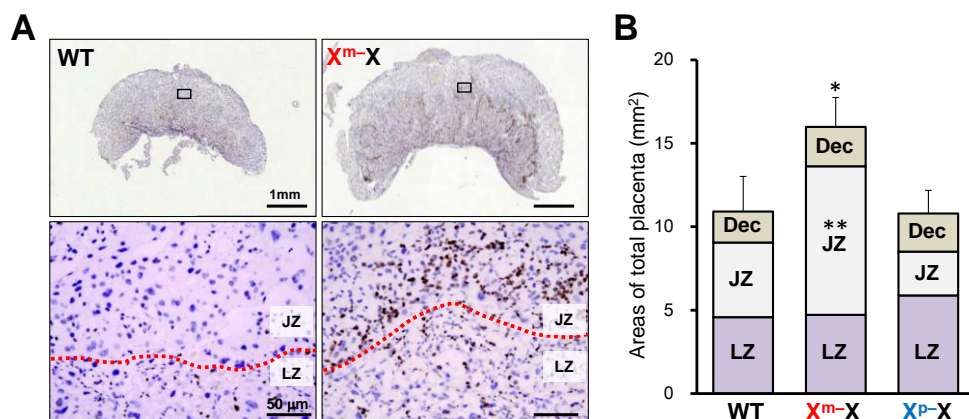


Figure 10. Cell proliferation ability in *Plac1* mutant placenta.

(A) Ki67 staining of placenta (DAB staining). Whereas the cells of junctional zone of WT placenta were not stained by Ki67 antibody, almost all cells in the junctional zone of *Plac1* X^{m-} placenta had Ki67 positive cells. Bars = 1 mm, 200µm, and 50µm, from the left, center, and right, respectively. (B) Morphometric analysis of placenta. The area of junctional zone significantly increased in X^{m-} mutant placenta at E13.5 ($n=3$ per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). The mutant placentas were compared with WT placentas, respectively.

胎盤のどちらでもラミニンが染色され、胎仔由来の血管構造は保たれていたが、 X^{m-} 胎盤では母体血が流れている血洞（maternal blood sinus: MBS）が有意に拡張していた（Figure 11B）。MBSの幅を測定したところ、野生型に比べて X^{m-} 胎盤では顕著に拡張していることがわかった（Figure 11C）。また、父方から変異が伝わった X^{p-} 胎盤では、胎盤過形成やMBSの拡張は見られなかったことから、母方アレルの*Plac1*欠損が母体血洞構造にも悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

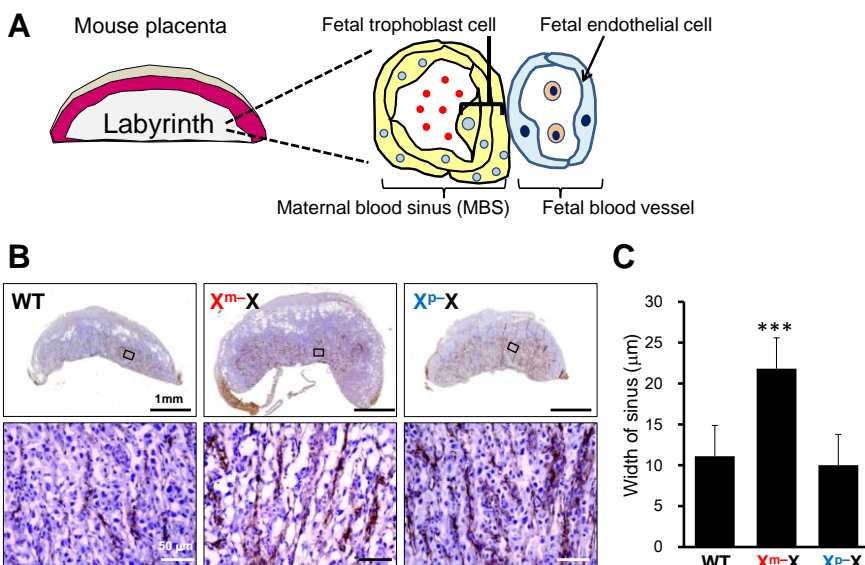


Figure 11. Histological analysis of labyrinth zone in *Plac1* mutant placenta.

(A) Structure of labyrinth zone in mouse placenta. (B) Laminin staining of placenta (DAB staining). Whereas fetal capillaries in the labyrinth zone were observed, adjacent maternal blood sinuses were dilated in *Plac1* X^{m-} placenta (E13.5). (C) Width of maternal blood sinus in the labyrinth zone ($n = 180$ from three placenta per group. *** $P < 0.001$). The mutant placentas were compared with WT placentas, respectively.

第二章

レンチウイルスベクターを用いた胎盤特異的遺伝子導入による *Plac1* の機能解析

生体内における遺伝子の機能解析をする上で、ノックアウト (KO) マウスを製作し、その表現型解析をすることは有用である。しかし KO マウスは胎盤のみならず胎仔の遺伝子も欠損させてしまうため、表現型が胎仔発育不全や胎生致死であった場合、胎盤に対する影響を正確に評価できない。実際に、p38 α KO マウスの胚性致死の原因は胎仔側の異常とされていたが[10]、実は胎盤の異常に起因することが示された例もある[11]。また、これまで胎盤異常となる KO マウスは 100 系統以上報告されており、その原因が胎盤そのものに起因するのか、二次的な影響によるものかは詳しく調べられていない[1]。

そこで、胎盤に限定した *Plac1* の機能解析を行うために、胎盤特異的な遺伝子導入技術を利用することとした。遺伝子導入用ベクターとして、広く利用されているレンチウイルス (LV) ベクター[12]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。また、murine leukemia virus (MLV) などの哺乳類 C 型レトロウイルス由来のベクター

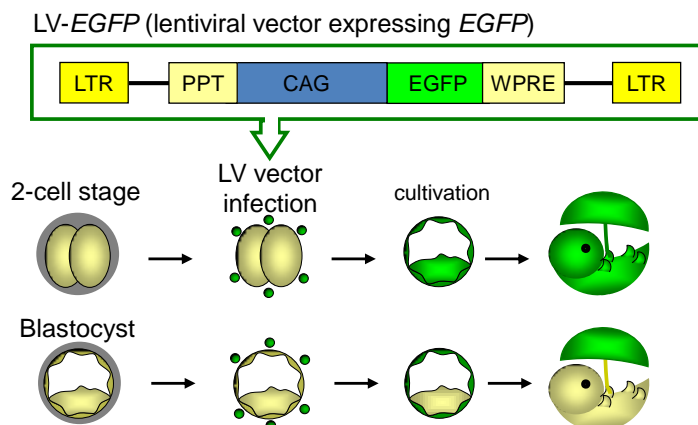


Figure 12. Diagram for the LV transduction of pre-implantation embryos.

Whereas embryo developed after transduction at the 2-cell stage expressed *EGFP* in fetus and placenta, transduction of blastocyst stage shows in placenta-specific expression.

により導入された遺伝子が発現抑制を受けやすいのに対し[13]、human immunodeficiency virus type 1 (HIV) に代表される LV をもとにしたベクターの場合は生体内でも安定した遺伝子発現が可能となる[14]。また、LV ベクターはマウス受精卵または 2 細胞期 (2-cell) 卵へ導入することにより、効率良くトランスジェ

ニックマウスを作製できる[12] (**Figure 12**)。最近では、2-cell 卵から発生が進んだ胚盤胞期胚（胚盤胞）へ LV ベクターを導入することで、外側の TE にのみ遺伝子が導入され、結果として胎仔には影響を及ぼさず、胎盤特異的な遺伝子導入が可能となったことが報告された[15] (**Figure 12**)。筆者はこの技術を利用することにより、胎盤過形成と胎仔発育不良を示した *Plac1* 変異マウスのレスキュー実験を考案した。

ところで、体細胞核移植クローン技術は、体細胞から個体の作出を可能にする唯一の生殖工学技術であるが、クローン産仔の作出効率は極めて低い[16]。これまでクローン産仔に起きる様々な異常がマウスを用いて解析されてきたが、最も定型的な異常として、胎盤過形成が観察される[17]。クローン胎盤の組織学的な特徴として、JZ 層の増大による LZ 層への陥入や、LZ 層の形態異常が観察され、これらの表現型は、前章で記述した *Plac1* 変異マウスの胎盤と非常に似た表現型を示す[17]。クローン胎盤が過形成となるメカニズムは未解明な部分が多いが、主に X 染色体における遺伝子発現の異常や[18]、インプリント遺伝子の発現異常が原因の一つだと言われている[19]。前章の変異マウスの結果から、*Plac1* も胎盤過形成の原因遺伝子の一つであることが予想されるが、一方で、クローン胎盤において *Plac1* mRNA の過剰発現が報告されている[4]。筆者は、胎盤において *Plac1* が過剰に発現しても胎盤過形成をきたす可能性があると考え、LV ベクターを用いて野生型胎盤に *Plac1* を導入し、表現型を解析することとした。これにより、*Plac1* 遺伝子が胎盤の構造や機能に与える影響を評価できると考えた。

実験方法

レンチウイルス (LV) ベクターの調製

胎盤組織を用いた Reverse Transcriptional PCR (RT-PCR) により、マウス *Plac1* の cDNA を生成した。プライマーは *Plac1* coding sequence の 5'末端に XbaI サイトを付加したもの (5'-ATCTAGAGCCGCCATGAACCTTCGCAAGTTCCTGGG-3') と、3'末端に EcoRI サイトを付加したもの

(5'-AGAATTCTTACATGCTCTTTTGATTGTAGACATAAGGTGG-3')を用いた。

XbaI-EcoRI 消化した *Plac1* cDNA のフラグメントを pLV ベクタープラスミドに挿入し、CAG プロモーター制御下で *Plac1* cDNA を発現するプラスミド (pLV-*Plac1*) を作製した。LV ベクター調製のために、10cm ディッシュにコンフルエント状態の HEK293T 細胞を 15cm ディッシュに 1:3 で継代し、5 時間後に約 70%コンフルエントになった状態で 4 種類のプラスミド (pLV-*Plac1* 22.5 µg、pMDL 14.6 µg、pRev 5.6 µg、pVSVG 7.9 µg) をトランスフェクションした。翌日に培地交換し、その 24、48 時間後に培養上清を回収した。培養上清を 0.45 µm のフィルターでろ過した後、超遠心機により濃縮した (SW-28 で 19,400 rpm、2 時間)。沈殿を 3mL の HBSS に懸濁した後、1mL の 20%スクロース液に重層して超遠心を行った (SW-55 で 21,000 rpm、2 時間)。ウイルスの最終濃度が培養上清液量から 1000 倍濃縮されるように、沈殿を HBSS で懸濁した。LV ベクターの一部を用いて p24 ELISA キット (Viro Quest, Osaka, Japan) により p24 量を測定し、LV ベクターの濃度を判定した。

LV ベクターによる胎盤特異的な遺伝子導入

胎盤特異的な遺伝子導入を行うに当たり、まずマウス胚盤胞を野生型マウス同士の交配及び、*Plac1* X-X と野生型雄マウスの交配から採取した。胚盤胞の栄養外胚葉層 (trophectoderm; TE) にレンチウイルスを感染させるために、胚盤胞を酸性タイロド (Sigma Aldrich, Missouri, USA) の中に 30~60 秒間存在させ、透明

帯を溶解した後に KSOM へ移した。透明帯が外れた胚盤胞は 4 個ずつ LV ベクターを含む KSOM 4 μL (1×10^3 ng p24/mL) の中で 4 時間培養した。LV ベクターを導入した胚盤胞は、20 個ずつ E2.5 の偽妊娠 ICR マウスへ移植した。

定量 RT-PCR 解析

マウス胎盤 (E16.5) の RNA を抽出し、逆転写キット PrimeScript RT Reagent Kit (Takara-Bio) によりトータル cDNA を合成した。各サンプルは、SYBR Premix Ex Taq II RR820S (Takara-Bio) と混合し、Thermal Cycler Dice TP800

(Takara-Bio) を用いて定量 RT-PCR に供した。内在性コントロールとして *beta-actin* (*b-actin*) の発現量から、各サンプルの *Plac1* 発現量を標準化して *Plac1* mRNA の相対定量を行った。*Plac1* cDNA を増幅するプライマーは 5'-GCGTTACCGAATGTGGCATC-3' と 5'-CAGCTGCAGTTGGGTTGTTC-3' のセットを用いた。*b-actin* cDNA を増幅するプライマーは 5'-AAGTGTGACGTTGACATCCG-3' と 5'-GATCCACATCTGCTGGAAGG-3' のセットを用いた。

胎仔と胎盤の重量測定

LV ベクターを導入した胚盤胞を偽妊娠 ICR マウスへ移植した後、E16.5 で解剖し、胎仔と胎盤を採取し、重量を測定した。

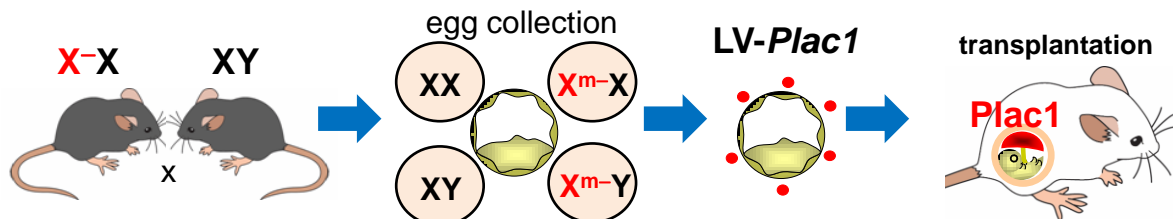
組織病理学的解析

前章と同じ方法で行った。

結果

第一節 LV ベクターによる *Plac1* 変異マウスのレスキュー実験

LV ベクターを導入した *Plac1* 変異マウスの表現型



Plac1 変異マウスの胎盤過形成の表現型が、胎盤において *Plac1* を欠損したことに起因するかを検証するため、 X^m を有する胎盤特異的に *Plac1* を発

Figure 13. Transgenic complementation of *Plac1* mutant mice by lentiviral vector-mediated placenta-specific *Plac1* gene transduction. *Plac1* X^m-X and X^m-Y blastocysts were collected from *Plac1* $X-X$ mothers. Zona pellucida-free blastocysts were transduced with a lentiviral vector expressing *Plac1* and transplanted into pseudo-pregnant mice.

現させるレスキュー実験を試みた。CAG プロモーター制御下で *Plac1* cDNA を発現するレンチウイルスベクター (*LV-Plac1*) を用いた。*Plac1* 変異が母方から伝わる交配で得られた胚盤胞に、*LV-Plac1* を導入して、偽妊娠マウスに移植し、表現型を解析した (Figure 13)。まず *LV-Plac1* を導入した胎盤の *Plac1* mRNA 量を定量 RT-PCR により測定したところ、コントロールとして *LV-EGFP* を導入した野生型の胎盤に比べて 5 倍程度増加したことが確認できた (Figure 14)。次に X^m -胎仔

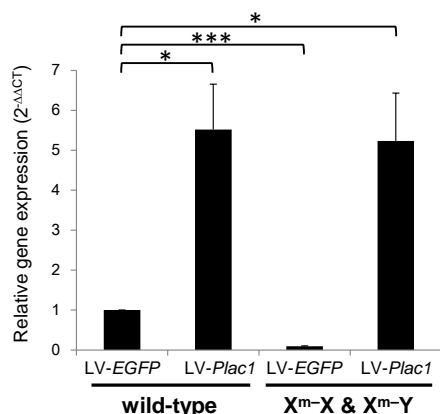


Figure 14. Relative amounts of *Plac1* mRNA in LV vector transduced placenta.

The expression level of the *Plac1* transgene was approximately five times more than endogenous gene. The *LV-Plac1* transduced WT and mutant, and *LV-EGFP* transduced mutant were compared with *LV-EGFP* transduced WT, respectively. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

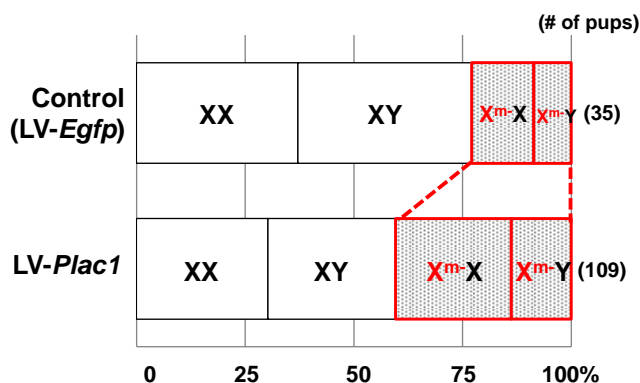
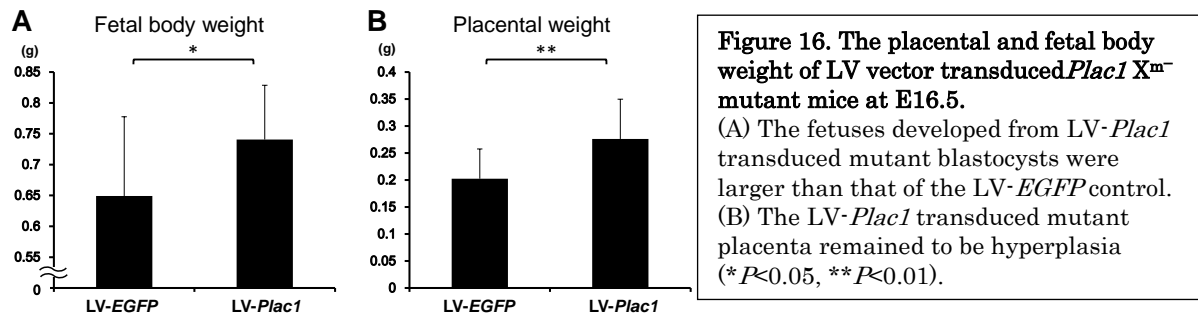


Figure 15. The proportion of *Plac1* mutant pups after *LV-Plac1* transduction. When we transduced the maternally *Plac1* mutant blastocysts with a *LV-Plac1*, the proportion was improved compared to that of the control *LV-EGFP*.

の出生率を調べたところ、LV-EGFPを導入した場合には 22.9%であったのに対し、LV-Plac1を導入した場合は 40.4%と出生率が改善した (Figure 15)。

次に E16.5 の胎仔の体重を測定したところ、コントロールである通常の X^m-胎仔は 649 ± 128 mg, n=19 であったが、LV-Plac1を導入した場合は 740 ± 88 mg, n=21 と有意に増加し、胎仔発育が改善された (Figure 16A)。一方で、胎盤の重量は、既に X^m-胎盤が 202 ± 55 mg, n=12 と過形成の表現型を示すのに対し、LV-Plac1を導入した場合は 276 ± 74 mg, n=15 とさらに過形成となった (Figure 16B)。



LV ベクターを導入した *Plac1* 変異マウス胎盤の組織病理学的解析

PAS 染色により組織病理学的解析を行ったところ、LV-*Plac1* を導入した X^{m-} 胎盤では JZ の層構造の乱れが観察されたが、LZ における maternal blood sinus の構造は野生型胎盤と同様の組織像が観察され、回復傾向にあった (**Figure 17A**)。

ラミニンの免疫組織染色により、LZ の構造を詳細に観察したところ、胎仔由来の血管構造が保たれていることが確認でき、MBS の異常な拡張も見られなかった (**Figure 17A**)。また、MBS の幅を測定したところ、LV-*EGFP*を導入した X^{m-} 胎盤に比べ、LV-*Plac1* を導入したものでは幅が狭くなり、異常な拡張が回復したことがわかった (**Figure 17B**)。

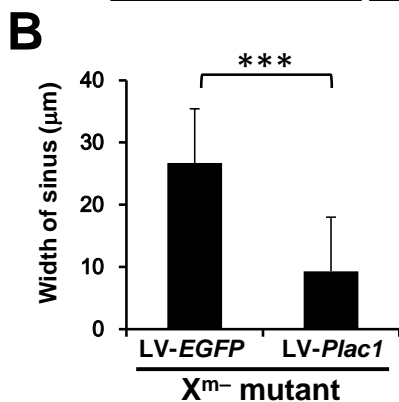
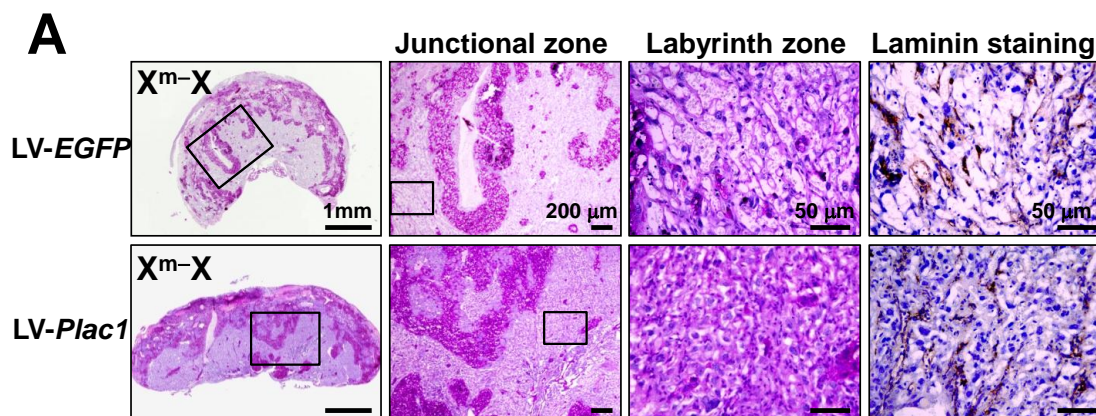


Figure 17. Histological analysis of LV-*Plac1* transduced mutant placenta.

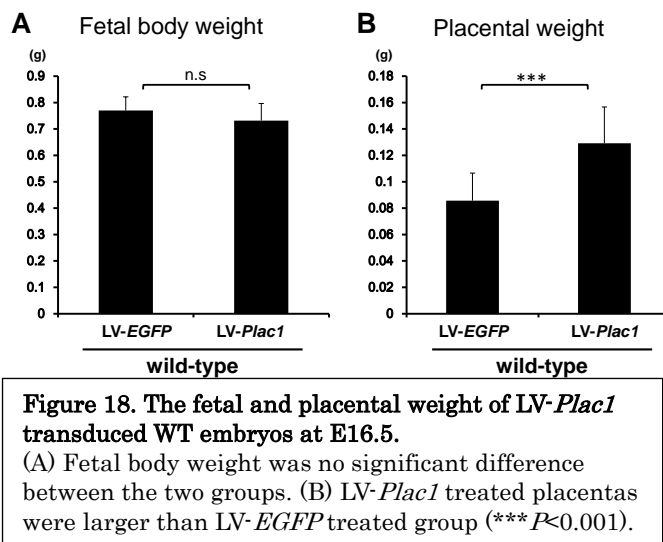
(A) PAS staining and laminin immunostaining of LV transduced placenta at E16.5. Hyperplastic junctional zone that encroached into the labyrinth zone was observed. The laminin immunostaining shows that dilation of MBS was improved in LV-*Plac1* transduced X^{m-} mutant placenta. Bars = 1 mm, 200 μ m, 50 μ m, and 50 μ m, respectively from the left.

(B) Width of MBS in the labyrinth zone of E16.5 LV-*Plac1* transduced X^{m-} mutant placenta (n = 180 from three placenta per group. *** $P < 0.001$). Dilation of MBS were restored in LV-*Plac1* transduced X^{m-} mutant placenta.

第二節 LV-Plac1 導入による胎盤形成への影響

LV ベクターを導入した野生型マウス胎盤の表現型解析

ところで、先行研究より、過形成となる核移植クローンマウス胎盤において *Plac1* mRNA の過剰発現が報告されているが[4]、その病理的意義は明らかにされていない。そこで、*Plac1* を胎盤特異的に導入した野生型マウスの表現型解析を行った。胎仔の体重を測定したところ、コントロールと LV-*Plac1* を導入したもので大きな差は見られなかった (LV-EGFP 導入個体; 770 ± 51.9 mg; n=16, LV-*Plac1* 導入個体; 732 ± 65 mg; n=24) (Figure 18A)。一方で、コントロールに比べて、LV-*Plac1* を導入した胎盤の重量は顕著に増加した (LV-EGFP 導入個体; 85.6 ± 21 mg; n=16, LV-*Plac1* 導入個体; 129 ± 27.5 mg; n=24) (Figure 18B)。



LV ベクターを導入した野生型マウス胎盤の組織病理学的解析

PAS 染色により組織病理学的解析を行ったところ、LV-*Plac1* を導入した野生型胎盤では、通常の X^m胎盤で見られたような JZ の層構造の乱れや、LZ における maternal blood sinus の異常な拡張は見られなかった (Figure 19A)。胎盤の各層構造の面積を測定したところ、母体由来の脱落膜はコントロールと差はなかったが、JZ と LZ が有意に大きくなっていた (Figure 19B)。このことから、胎盤における *Plac1* の過剰発現は、胎盤が全体的に大きくなるが、核移植クローンマウスの胎盤や *Plac1* 欠損胎盤で見られた表現型を示さないことがわかった。

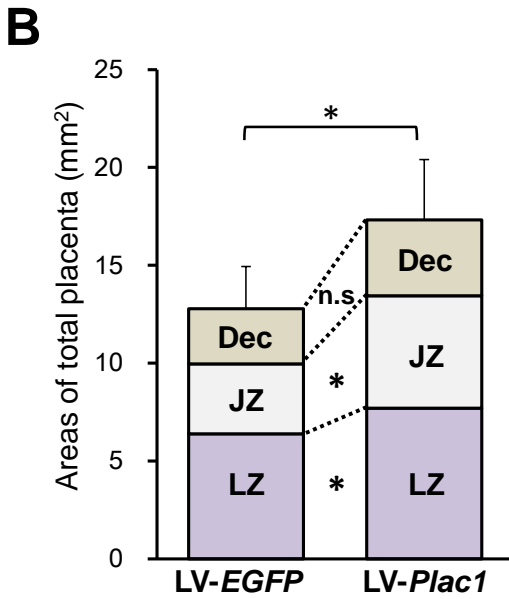
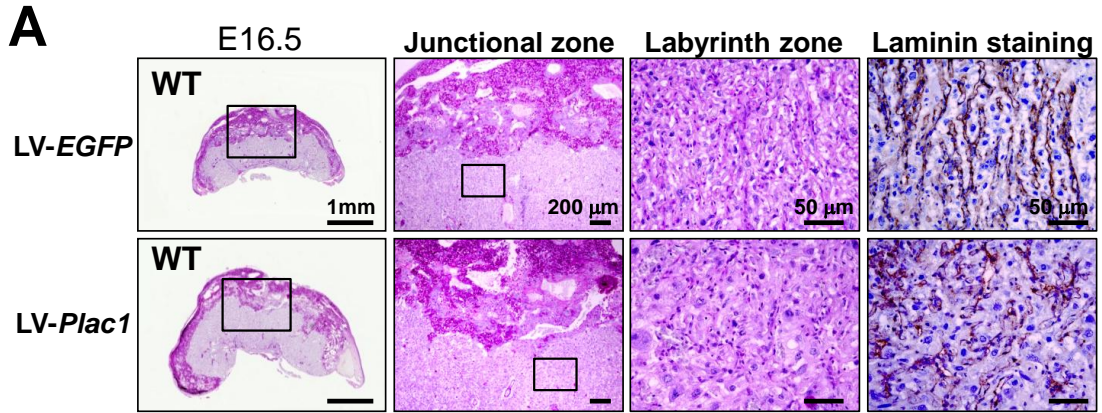


Figure 19. Histological analysis by PAS staining and laminin immunostaining of LV-Plac1 transduced WT placentas at E16.5.

(A) Although LV-Plac1 transduced placenta was larger than control, there was no apparent abnormality in the junctional and labyrinth zone. Bars = 1 mm, 200 μm, 50 μm, and 50 μm, respectively from the left.

(B) Morphometric analysis of placenta. The area of junctional and labyrinth zone significantly increased in LV-Plac1 transduced WT placentas at E16.5 (n=3 per group, * $P < 0.05$).

第三編 考察

胎盤形成における *Plac1* の機能

In situ hybridization (ISH) により *Plac1* は、胎盤の JZ および LZ のトロホブラスト細胞で発現することが報告されている[7]。本研究では、*Plac1* 変異マウスにノックインされている *LacZ* レポーター遺伝子を利用して、X-gal 染色を行ったところ、従来の ISH 結果と一致した。また、*Plac1* の変異が父方から伝わった胎盤では、*LacZ* 陽性細胞がほとんど観察されなかったことから、*Plac1* は母方のアレル由来の発現を示す遺伝子であることが確認できた。

Plac1 変異が母方から伝わった (X^m) マウスは、胎盤過形成をきたし、胎仔発育不良が見られた。 X^m 胎盤では、JZ が拡張しており、Ki67 陽性のトロホブラスト細胞が顕著に増加していた。このことから、*Plac1* は生理的にトロホブラスト細胞の増殖を抑制する機能を持つことが示唆された。PLAC1 は ZP3 ドメインを有しており、細胞膜上に局在することが知られている。一般的な ZP ドメインを持つタンパク質は、細胞膜上で他の ZP タンパク質と重合しフィラメント状の構造を形成することが報告されている。さらに、重合した ZP タンパク質は transforming growth factor (TGF- β) レセプターを認識し[8]、細胞増殖、分化、浸潤などの様々なシグナル伝達に関わっていることも知られている。PLAC1 タンパク質が胎盤においてフィラメント構造を形成することは未だ報告されていないものの、今後は、PLAC1 と相互作用するタンパク質の同定や、TGF- β レセプターを介したシグナル伝達との関わりを解析していくことで、トロホブラスト細胞における細胞増殖のメカニズムにより迫ることができると考えられる。

LZ における MBS では syncytiotrophoblast I, II (SynT I, II) 細胞と sinusoidal trophoblast giant (sTG) 細胞の三つの細胞が層を形成して、母体血と胎仔血の間で栄養交換を行う (Figure 2)。*Plac1* X^m 胎盤では、胎仔由来の血管構造は存在していたが、隣接する MBS が異常に拡張した。また、*Plac1* X^m 胎仔の体重も減少し

ていたことから、*Plac1* 欠損は MBS を介した栄養交換に影響を及ぼすことが示唆された。MBS を構成している SynT I, II 細胞の膜上には Syncytin A, B タンパク質が局在し、SynT 細胞同士の融合を行うことで正常な MBS を形成することが知られている[20]。可能性の一つとして、*Plac1* X^m 胎盤で異常に拡張した MBS では、SynT 細胞において重要な機能を持つ因子の発現や局在パターンが異常であることが考えられる。また、PLAC1 タンパク質は分泌されて細胞膜に局在することが知られているため[3]、MBS におけるトロホブラスト細胞の膜上で PLAC1 がタンパク質間の相互作用を介して、正常な MBS 形成に関与していることも考えられる。今後は *Plac1* X^m 胎盤で SynT I, II 細胞や sTG 細胞において重要な機能を持つ遺伝子の発現解析を通して、それぞれ正常に分化しているかを評価し、MBS における *Plac1* の役割について解析していく必要があるだろう。

クローンマウスの胎盤過形成と *Plac1* の関わり

LV ベクターにより *Plac1* 変異マウスの胎盤特異的に *Plac1* を導入することで、胚性致死や胎仔発育不全の表現型が改善された。しかし、胎盤過形成の表現型は改善せず、JZ 層も異常に拡張したままであった。ただし X^m 胎盤で見られた LZ 層の MBS の異常な拡張は改善したため、胎仔への栄養供給を行う機能が回復したと考えられる (**Figure 20**)。このことから、胎盤過形成となることだけで胎仔の発育に悪影響を与えるわけではないことが示された。

LV-*Plac1* を導入した X^m 胎盤の過形成が回復せず、さらに大きくなった原因として、そもそも *Plac1* の過剰発現が胎盤形成異常を起こしてしまう可能性が考えられた。また、クローン胎盤において *Plac1* mRNA の過剰発現が報告されていたため[4]、LV-*Plac1* を導入した野生型胎盤の表現型を確認したところ、胎盤過形成となったが、クローン胎盤や *Plac1* X^m 胎盤で見られた JZ 層の増大や、LZ 層の形態異常は示さなかった (**Figure 20**)。本研究で用いた LV ベクターは CAG プロモーター制御下で遺伝子導入している。そのため、LV-*Plac1* を導入した野生型胎盤の JZ と

LZ が拡張したことは、内在性 *Plac1* の発現量や局在を再現できていないことによる副次的効果の可能性もある。その一方で、特筆すべき点として、クローンマウスの胎盤過形成の表現型は、既報通りの *Plac1* 過剰発現だけでは説明できないことが示された。

最近、4倍体胚が胎盤へのみ寄与する特性を利用して、野生型4倍体胚と核移植クローンの2倍体胚を用いた凝集キメラマウスの作製を行っても胎盤過形成が回復しないことが報告された[21]。また逆の組み合わせで、野生型2倍体胚と核移植クローンの4倍体胚を用いた実験では、正常な胎盤が形成された[21]。このことから、胎盤過形成には胎仔由来の因子が関わっている可能性が強く示された。符号するよう、当初は胎盤特異的に発現する遺伝子と考えられていた *Plac1* が、胎仔の様々な臓器に発現することが報告されている[22]。今後は胎仔側にも *Plac1* の発現を補う実験を行うことで、胎仔由来の *Plac1* の機能解明に迫ることができるであろう。

以上のことから、PLAC1 は正常なサイズの胎盤層構造の形成と LZ 形成とに大切であり、胎仔由来の PLAC1 も胎盤形成に重要である可能性が示唆された (Figure 20)。

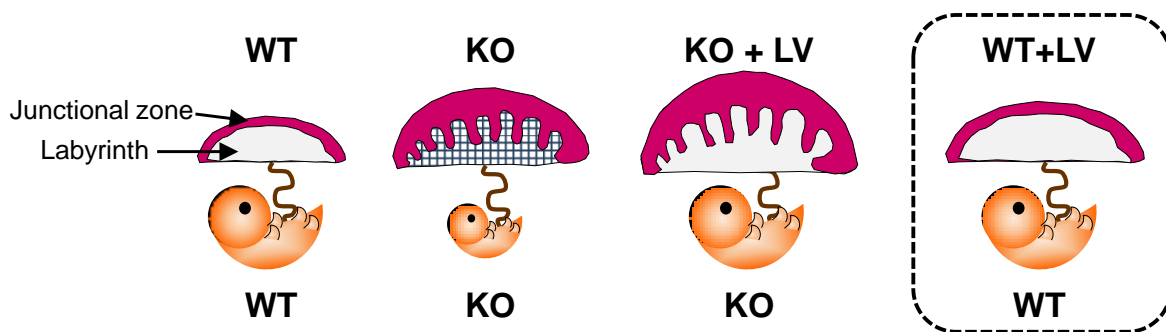


Figure 20. Summary of placental dysplasia found in *Plac1* mutant mice
Lentiviral vector mediated complementation restores placental function in *Plac1* mutant mice, but placental hyperplasia remains, implicating the importance of fetoplacental *Plac1* gene expression.

第四編 結論

- I. *Plac1* 欠損マウスの胎盤は過形成となり、胎仔の発育不良が見られたことから、*Plac1* は正常な胎盤形成と胎仔の発育に重要である。

- II. *Plac1* 欠損マウスの胎盤において、**JZ** の拡張による層構造の乱れと、**JZ** における maternal blood sinus の拡張が認められたことから、*Plac1* は **JZ** における細胞増殖性の制御と、**LZ** における正常な母体血洞形成に関与することが示唆された。

- III. レンチウイルス (LV) ベクターを介した *Plac1* 欠損マウスの胎盤特異的レスキュー実験では、胎盤過形成の表現型は回復せず、**JZ** の層構造の乱れも正常に戻らなかった。一方、野生型胎盤へ *Plac1* を遺伝子導入した場合でも胎盤過形成となったが、*Plac1* 欠損胎盤で見られた表現型は示さなかった。このことから *Plac1* 欠損マウスの胎盤が過形成となる原因は、胎仔側で *Plac1* の発現を欠損したことによるものだと考えられ、胎仔由来の *Plac1* の発現が胎盤形成に関与している可能性を提示した。

第五編 謝辞

本研究を行うに当たり、ご指導、ご鞭撻くださった、大阪大学微生物病研究所教授 伊川正人先生に心より感謝致します。

実験に関することで多くのご指導とご助言をいただいた大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野准教授 磯谷綾子先生、助教 藤原祥高先生、浄住大慈先生、佐藤祐公先生、宮田治彦先生、森雅志先生、特定研究員 野田大地博士、**Qian Zhang** 博士に深く感謝いたします。

第六編 主論文・参考論文リスト

主論文

Lentiviral vector mediated complementation restored fetal viability but not placental hyperplasia in *Plac1* deficient mice.

Biol Reprod. 2015, Nov 19. pii: biolreprod.115.133454. [Epub ahead of print]

Muto M, Fujihara Y, Tobita T, Kiyozumi D, Ikawa M.

参考論文

Elf5-centered transcription factor hub controls trophoblast stem cell self-renewal and differentiation through stoichiometry-sensitive shifts in target gene networks.

Genes Dev. 2015, Nov 19. [Epub ahead of print]

Latos PA, Sienerth AR, Murray A, Senner CE, Muto M, Ikawa M, Oxley D, Burge S, Cox B, Hemberger M.

Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive.

Science. 2015, 23;350(6259):442-5.

Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M.

The effects of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide- β -glucosidase.

Clin Biochem. 2015, pii: S0009-9120(15)00217-00219.

Yoneshige A, Muto M, Watanabe T, Hojo H, Matsuda J.

Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes.

Development Growth Differentiation. 2014, 56(1):122-129.

Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M.

第七編 参考文献

1. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001; 2:538-548.
2. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350:672-683.
3. Fant M, Barerra-Saldana H, Dubinsky W, Poindexter B, Bick R. The PLAC1 protein localizes to membranous compartments in the apical region of the syncytiotrophoblast. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:922-929.
4. Suemizu H, Aiba K, Yoshikawa T, Sharov AA, Shimozawa N, Tamaoki N, Ko MS. Expression profiling of placentomegaly associated with nuclear transplantation of mouse ES cells. *Dev Biol* 2003; 253:36-53.
5. Hurst LD, Randerson JP. An eXceptional chromosome. *Trends Genet* 1999; 15:383-385.
6. Kushi A, Edamura K, Noguchi M, Akiyama K, Nishi Y, Sasai H. Generation of mutant mice with large chromosomal deletion by use of irradiated ES cells--analysis of large deletion around hprt locus of ES cell. *Mamm Genome* 1998; 9:269-273.
7. Cocchia M, Huber R, Pantano S, Chen EY, Ma P, Forabosco A, Ko MS, Schlessinger D. PLAC1, an Xq26 gene with placenta-specific expression. *Genomics* 2000; 68:305-312.
8. Fant M, Farina A, Nagaraja R, Schlessinger D. PLAC1 (Placenta-specific 1): a novel, X-linked gene with roles in reproductive and cancer biology. *Prenat Diagn* 2010; 30:497-502.
9. Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. *Transgenic Res* 2013; 22:195-200.
10. Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 2000; 102:221-231.
11. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* 2000; 6:109-116.
12. Ikawa M, Tanaka N, Kao WW, Verma IM. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Mol Ther* 2003; 8:666-673.
13. van der Putten H, Botteri FM, Miller AD, Rosenfeld MG, Fan H, Evans RM, Verma IM. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:6148-6152.
14. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2140-2145.
15. Okada Y, Ueshin Y, Isotani A, Saito-Fujita T, Nakashima H, Kimura K, Mizoguchi A, Oh-Hora M, Mori Y, Ogata M, Oshima RG, Okabe M, et al. Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer. *Nat Biotechnol* 2007; 25:233-237.
16. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 2007; 39:295-302.
17. Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod* 2001; 65:1813-1821.
18. Nolen LD, Gao S, Han Z, Mann MR, Gie Chung Y, Otte AP, Bartolomei MS, Latham KE.

- X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev Biol* 2005; 279:525-540.
19. Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, et al. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum Mol Genet* 2014; 23:992-1001.
 20. Dupressoir A, Vernochet C, Bawa O, Harper F, Pierron G, Opolon P, Heidmann T. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:12127-12132.
 21. Miki H, Wakisaka N, Inoue K, Ogonuki N, Mori M, Kim JM, Ohta A, Ogura A. Embryonic rather than extraembryonic tissues have more impact on the development of placental hyperplasia in cloned mice. *Placenta* 2009; 30:543-546.
 22. Kong X, Jackman SM, Fant ME. *Plac1* (placenta-specific 1) is widely expressed during fetal development and is associated with a lethal form of hydrocephalus. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2013; 97:571-577.