



Title	ウシ胚盤胞期胚の新規培養系を用いた着床前胚細胞分化機構の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	秋沢, 宏紀
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第13923号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/77955">http://hdl.handle.net/2115/77955</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Hiroki_akizawa_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名

秋沢 宏紀

## ウシ胚盤胞期胚の新規培養系を用いた着床前胚細胞分化機構の解明

哺乳類の初期胚において、胚盤胞期という発生ステージに至る過程で最初の分化が起こる。すなわち、胚内で外側に位置する割球は将来主に胎盤を形成する栄養外胚葉 (Trophectoderm: TE)に、そして内側の割球は将来主に胎子本体を形成する内部細胞塊 (Inner Cell Mass: ICM)にそれぞれ分化し別々の細胞運命をたどる。続いて、ICM はさらに胚盤葉上層 (Epiblast: Epi)と原始内胚葉 (Primitive Endoderm: PrE)へと分化し、Epi が胎子を、PrE が卵黄嚢をそれぞれ形成する。したがって、TE、Epi、および PrE の3成分の形成が胚発生に必須であるが、分化メカニズムは不明点が多い。特に大家畜であるウシは、経済的、技術的な理由から分子生物学的解析がマウス等モデル動物と比べ進んでおらず、着床前期発生理解への障壁となっている。そこで本研究は、ウシ着床前胚の細胞分化を分子生物学的観点から解明することを目的とした。まず、ウシ胚において ICM/ TE 分化に関与する遺伝子の発現抑制を行い、マウス胚のモデルと比較検証した。次に、従来不可能だった胚盤胞期以降のウシ胚体外培養系を新規に構築し、TE の機能的成熟過程や、PrE/ Epi 分化過程を、分子マーカーを用い詳細に解析した。本研究により、ウシ初期胚発生過程における重要な発生イベントを体外培養系で観察することに初めて成功した。

### (1) *TEAD4* および *CCN2* 遺伝子が栄養外胚葉の発生に果たす役割

マウス胚盤胞期胚では ICM と TE の不可逆的な運命決定が完了しているが、それに先立つ桑実胚の後期では、既に内側と外側の割球で固有の遺伝子群が発現している。それを支配するのが細胞密度を細胞内シグナルに変換する Hippo 経路とされており、細胞密度が小さく Hippo 経路がオフになる外側割球において、転写因子 *TEAD4* が活性化され TE 固有の遺伝子発現が誘導される。体細胞では、*TEAD4* の下流において *CCN2* というマトリクスタンパク質の発現が亢進され、細胞増殖を制御する。しかし、ウシ初期胚の ICM/ TE 分化における Hippo 経路の関与は明らかにされておらず、また *TEAD4* による *CCN2* の制御が初期胚においても保存されているかどうかはマウスを含め哺乳類全体で不明であった。そこで本項では、ショートヘアピン (sh)RNA を用いてウシ胚における *TEAD4* および *CCN2* 遺伝子の特異的な発現抑制を行い、胚盤胞期における遺伝子発現や細胞数の比の変化について調べた。shRNA の注入により *TEAD4*、および *CCN2* の mRNA 発現は効果的に抑制され、タンパク質レベルにおける発現低下も確認された。*TEAD4* 発現抑制胚では、*CDX2* および *GATA2* といった TE 特異的遺伝子の発現抑制に加え、*CCN2* 遺伝子発現も顕著に抑制されていた。一方、*CCN2* 発現抑制胚においても *CDX2* および *GATA2* の発現が抑制され、さらに *TEAD4* 発現も顕著に低下していた。また、*CCN2* 発現抑制胚においては胚盤胞期における ICM 細胞数に対する TE 細胞数比が低下していた。これらより、ウシ胚盤胞期において *TEAD4* と *CCN2* は互いに発現を制御しあう関係にあり、TE 細胞の発生に重要な遺伝子の発現に役割を果たすことが初めて示された。

## (2) 気液境界面培養法の応用による透明帯脱出後ウシ胚盤胞期胚の延長培養

胚盤胞期胚の形成機構が哺乳類間で比較的保存されているのに対し、透明帯脱出後の発育過程および細胞分化は種間で全く異なる。したがって、胚盤胞期以降の発生機構を正確に理解するためには種ごとの解析が必要となるが、ウシを含め哺乳類は胚盤胞期までしか体外培養できないことが研究の大きな障壁となってきた。そこで本項では、古典的組織培養法である気液境界面培養法をウシ胚体外培養に応用することで、胚盤胞期以降に起こるウシ胚分化機構についての洞察を得る目的で解析を行った。結果として、血清代替物を多量に含む RPMI 培地を含んだアガロースゲルを培養基質として用いた新規培養法の適用により、ウシの胚盤胞期以降の生存性は飛躍的に向上した。この“ゲル培養”により作出された胚では、ICM の性質を損なうことなく TE の分化が完了し、また培養の継続により TE は特異的遺伝子の発現上昇、二核細胞の出現を含む機能的分化を示した。さらに、マーカータンパク質の局在に基づく ICM 細胞の経時的な観察により、ICM からの PrE/Epi 分化が達成されていることが初めて示された。しかし、ゲル培養を D10 以降も継続して行った場合、胚の生存性、特に、Epi の細胞数が急速に損なわれることが分かった。

## (3) ウシ胚盤胞期胚ゲル培養系の改良

前項において判明したゲル培養胚での問題点を解決すべく、培養条件における酸素分圧を通常の 21% から、一般的な子宮内酸素分圧に相当する 5% に変更した。その結果、胚の生存性および Epi の細胞数が劇的に向上し、ウシ胚の酸化ストレス感受性に細胞系列毎の違いがあることが示された。続いて、生体胚 TE において胚盤胞期以降に発現上昇することを見出した *WNT11*、*NRG2*、および *AREG* 遺伝子を、胚盤胞期胚の TE 特異的に強制発現させ、低酸素条件でゲル培養に供した。その結果、D12 における胚体外領域の発育および分化に必須の転写因子である、*SOX17* および *ETS2* の発現が強制発現非誘導のコントロールと比較して顕著に上昇した。これらより、胚盤胞期以降の体外培養には低酸素環境が必要であること、そして、胚体外領域の分化には *WNT11*、*NRG2*、および *AREG* の 3 遺伝子の発現が重要であることが示された。さらに、培養 10 日後の D10 胚を発情同期化した受胎牛に子宮内移植したところ、着床及び胎子形態形成の完了を確認したことから、ゲル培養系は少なくとも培養 10 日間は正常な発生能力を維持したまま生存を維持できることが証明された。

本研究より、ウシ胚における TE の増殖は、Hippo 経路の下流因子、TEAD4 および CCN2 の協調により制御されることが哺乳類胚で初めて明らかとなった。また、「ゲル培養法」はウシ胚の生存性を胚盤胞期の D8 から D12 まで延長し、TE の機能的成熟や ICM からの PrE/Epi 分化が効率よく再現されること、そしてウシ Epi には特異的なストレス感受性が存在することが示された。さらに、*WNT11*、*AREG*、および *NRG2* 遺伝子の胚盤胞期以降における発現が、胚体外領域の発生に重要な転写因子の発現を亢進することが明らかとなった。ウシ胚において、胚盤胞期周辺は人工授精後の胚死滅が最頻発する時期であり、これが、我が国のウシ受胎率が低調な主要因の一つとなっている。本研究で開発した新規ウシ胚盤胞期胚の培養系は、ウシ胚着床前期の発生においてこれまでブラックボックスとなっていた胚盤胞期以降の発生を制御する分子機構の解明に大きく貢献するものであり、世界で初めての成功となる。本培養系の更なる洗練化によって、ウシ着床前胚の生存に最適な条件を同定し、繁殖に応用することで畜産業における動物生産効率を大きく向上させるものと期待される。