



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 [全文の要約]
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	http://hdl.handle.net/2115/77956
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Hiroki_akizawa_summary.pdf



[Instructions for use](#)

博士論文の要約

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

背景

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、マウス等モデル動物とは全く異なる固有の発生過程を示すにもかかわらず、経済的および技術的な理由から分子生物学的解析が進んでいない。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。胚盤胞期以降に発生可能なウシ胚培養系を構築し、培養時の酸素分圧の操作や特定遺伝子の強制発現を行うことで、胚盤胞期以降のウシ胚生存に最適な条件の探索も行った。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

【目的】

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。

【材料と方法】

食肉検査場由来の卵巣から未成熟卵子を採取し定法に従い体外成熟、体外受精、体外培養を行った。受精から 12 時間後の胚から卵丘細胞を除去し、細胞質に shRNA 発現ベクターを顕微注入することによって標的遺伝子の発現抑制を行った。媒精 7.5 日後の胚盤胞期でサンプリングを行い、定量 PCR および免疫染色により目的遺伝子の発現低下を確認した。また、TE 関連遺伝子の発現動態の変化を定量 PCR、免疫染色により調べた。コントロールとしては、標的配列を持たない空ベクターを注入した胚を用いた。

【結果と考察】

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

【目的】

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。げっ歯類や霊長類を用いた先行研究より、体外培養の継続には培地を富栄養なものに切り替えること、そして効率的なガス交換を可能にするような環境の構築が有効であると示されてきた。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。

【材料と方法】

ウシ胚盤胞期胚の作出は、前項「*TEAD4* および *CCN2* 遺伝子が栄養外胚葉の発生に果たす役割」に従った。媒精後 8 日の胚盤胞期胚を、血清代替物を多量に含む富栄養な培地を満たしたアガロースゲル上に静置し培養を行い、24 時間ごとに実態顕微鏡で観察することにより生存率を推定した。また日数ごとにサンプリングを行い、マーカートンパク質の局在、遺伝子発現等を調べた。比較のため、過排卵誘起、発情同期化を行ってから人工授精したメスウ

シから、相同の日齢の生体胚を回収し、タンパク局在や遺伝子発現を同様に解析した。

【結果と考察】

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、マーカータンパク質の局在解析や遺伝子発現解析から、ICM の性質を損なうことなく TE の分化が完了したことが示された。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。また、培養の継続により、妊娠維持に重要なハイポブラスト層の形成が観察された。さらに、各日数におけるマーカータンパク質の局在パターンは相同な日齢の生体胚のものによく似ており、ゲル培養胚における細胞分化が概して生体を反映していることが分かった。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

【目的】

哺乳類の初期発生は子宮内で行われ、その平均的な酸素分圧は大気の酸素分圧よりも顕著に低い 5%前後と考えられている。生理的な酸素分圧から逸脱した培養条件下では、胚細胞の急速な分化や退行が起こることが分かっており、その影響は環境ストレスへの感受性が特異的に高い Epi において強く現れる。したがって、前項において判明した、ゲル培養胚で Epi 細胞数が急速に低下するという問題点は、培養時の酸素分圧が関与している可能性が考えられた。そこで、Epi 細胞数の減少を防ぐため、培養条件における酸素分圧の変更を行った。さらに、ゲル培養を利用した特定遺伝子の胚盤胞期以降の機能解析の可能性を探るべく、外来

遺伝子の強制発現胚のゲル培養も実施した。また体外培養系の信頼性を担保するためには、培養胚を母体の子宮に戻した時、発生が正常に進行することを確認するのが重要である。本研究においてもゲル培養胚の子宮移植を行い、着床の有無やその後の発生について調べることにした。

【材料と方法】

ゲル培養時の酸素分圧にかかわらず、胚盤胞期までの培養は 5%の酸素分圧下で行った。ゲル培養時は、酸素分圧を 5%にする区と 21%にする区を設定し、両方で生存率、総細胞数、マーカータンパク質の局在を比べた。また、当研究室で過去実施された RNA-seq (平成 27 年 定 修士論文)の結果から、胚盤胞期以降 TE で特異的に発現が上昇する遺伝子群を見出し、これら遺伝子を強制発現させたのちゲル培養に供することで、胚盤胞期以降の機能について精査した。子宮移植試験では、ゲル培養開始後 2 日目、すなわち媒精から 10 日目のゲル培養胚を、排卵から 9 日目の受胎牛に子宮移植し、その後一定の間隔を置き超音波法により妊娠鑑定を行った。

【結果と考察】

異なる酸素分圧下で培養を行ったゲル培養胚を比較することにより、5%の酸素分圧下では胚の生存性および Epi の細胞数が 21%酸素分圧下に対し劇的に向上し、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特定遺伝子を、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のうちいくつか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を示すとともに、胚体外領域の分化に役割を果たす遺伝子を同定した。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。

結論

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、特定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。