



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウシ胚盤胞期胚から単離した内部細胞塊の栄養外胚葉再生誘導系を用いた細胞分化モデルの証明〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	郡, 七海
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13926号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77951
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Nanami_kori_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 郡 七海

ウシ胚盤胞期胚から単離した内部細胞塊の 栄養外胚葉再生誘導系を用いた細胞分化モデルの証明

哺乳類初期胚発生は受精卵が卵割を繰り返して進行していく。ある一定の割球数に達すると、割球の相対的位置関係が認められ、3 次元的な立体構造を形成する。さらに発生が進行すると、胚内が液で満たされた胞胚腔と呼ばれる腔所を形成する胚盤胞期という発生ステージに達する。胚盤胞期胚は、将来胎子を形成する内部細胞塊 (inner cell mass; ICM)、および将来胎盤を形成する栄養外胚葉 (trophectoderm; TE) に分化する。この分化制御機構モデルとして、胚の立体構造において内側に位置する割球は ICM に、外側に位置する割球は TE に分化するという「内外モデル」が提唱されている。このモデルの検証方法として ICM の単離培養が知られており、単離 ICM を構成する割球は相対的位置関係が内側から外側に変化することになる。本研究では、単離後のウシ ICM における各々の割球が位置関係の変化を認識し、機能的 TE の再生能を有することを個体発生という視点で証明することを試みた。

(1) ウシ ICM 単離に伴う Hippo シグナル構成因子の発現動態の解析

マウス初期胚では、Hippo シグナルによって内外モデルが調節されていると考えられている。マウス胚盤胞期胚の外側に位置する割球ではシグナル下流の転写共役因子 YAP1 が転写因子 TEAD4 と相互作用して、TE マーカーである CDX2 発現を促す。一方、内側に位置する割球はリン酸化酵素 LATS1/2 が YAP1 をリン酸化し、その核内移行を阻害することで ICM へと分化する。本項では、ウシにおける YAP1-TEAD4-CDX2 軸がマウス同様であるかを確認した。単離した ICM を培養して胞胚腔を再形成した胚(腔再形成胚) において YAP1 および TEAD4 の共局在を観察した。そして、腔再形成胚において、YAP1 は CDX2 発現に先行して核内移行していた。さらに、ウシ体細胞における YAP1 および TEAD4 の相互作用を免疫沈降により調べた。以上より、ウシ単離 ICM の外側に位置する割球で、YAP1 および TEAD4 の相互作用を介して CDX2 発現が促進されていることが確認された。

(2) RHO-ROCK シグナルがウシ胚盤胞期胚の分化に与える影響

マウス胚で Hippo シグナルの上流に、GTP 加水分解酵素である RHO と RHO キナーゼである ROCK によるシグナル伝達 (RHO-ROCK シグナル) が関与することが知られている。そこで、ウシ単離 ICM の TE 再出現における RHO-ROCK シグナルの関与を調べた。RHO および ROCK の活性阻害剤として、C3 transferase および Y-27632 をそれぞれ用いた。対照区として、培養培地中に各阻害剤の溶媒である滅菌水を添加した。ウシ通常胚の RHO 活性阻害を行うと、YAP1 核内局在が阻害され CDX2 発現も抑制された。一方、ROCK 活性阻害を行うと、YAP1 核内移行が促進され CDX2 陽性細胞が増加し、マウス胚での ROCK 阻害による効果とは逆の効果がみられた。次に、ウシ腔再形成胚に対しても同様の実験を行ったところ、RHO の活性阻害により、YAP1 核内局在の阻害および CDX2 発現抑制が認められ

た。しかし、ROCK 活性阻害をした場合、YAP1 および CDX2 の発現に変化は認められなかった。これらの結果から、ウシ単離 ICM の腔再形成時における割球の位置関係が RHO を介して細胞分化を制御しているものの、ROCK とは別のエフェクター因子が関与していると考えられた。

(3) ウシ単離 ICM に由来する腔再形成胚における網羅的遺伝子発現解析

ウシ腔再形成胚と通常の全体胚とのトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現プロファイルの差異について調べた。まず、発現している全遺伝子について比較したところ、腔再形成胚と全体胚では相同な発現パターンを示していた。さらに、TE 優勢発現を示す遺伝子群に着目したところ、全体胚と類似した発現パターンを示す腔再形成胚が認められた。加えて、差次的発現を示す遺伝子群についてオントロジー解析による機能分類を行ったところ、代謝関連に含まれる遺伝子が多く検出された。これらのことから、腔再形成胚と全体胚との間で発現差がある遺伝子が検出されたものの、一部の腔再形成胚は TE の再生に伴い全体胚と同様の TE 優勢遺伝子群の発現を示すことが判明した。

(4) 単離 ICM に由来するマウスおよびウシ腔再形成胚における個体発生の検証

腔再形成胚における再生 TE の機能的正常性を証明する究極の手段は、受精卵移植により個体までの発生能を調べることである。そこで、ウシ腔再形成胚の受精卵移植を実施した。また、古くから ICM 単離実験に供されてきたマウス胚でも同様に腔再形成胚の受精卵移植試験を行い、ウシ胚と比較した。その結果、マウスでは個体までの発生は認められなかったが、ウシ腔再形成胚からは通常の妊娠期間を経て 1 頭の子ウシが誕生した。これらの結果から、腔再形成胚における再生 TE は、ウシでは機能的に正常な TE が再生されるものの、マウスでは個体発生を支持できない不完全な TE しか再生できないことが示唆された。この原因を探るべく、それぞれの種で単離された ICM の原始内胚葉マーカーである SOX17 について調べた。初期胚発生間における SOX17 の動態は、マウス胚では詳細に知られており、胎齢 3.75 日胚では胞胚腔に面して SOX17 陽性細胞が整列する。ウシ胚では、培養 6.5 日の初期胚盤胞期胚では ICM および TE の双方の割球で SOX17 陽性細胞が観察された。これらを踏まえて、それぞれの腔再形成胚における SOX17 局在を調べたところ、両種とも TE における SOX17 発現が観察された。ウシ腔再形成胚では通常胚と同様の発現パターンとなるが、通常のマウス胚では TE に SOX17 発現を示すことはないため、マウス腔再形成胚の TE における SOX17 発現は異所性の異常な状態を示している。これらの結果から、マウス腔再形成胚では SOX17 発現が TE で起こることで妊娠期間を全うできず、ウシ腔再形成胚では通常胚同様の発現パターンを示すので個体まで発生できたと考えられた。

本研究により、ウシ胚盤胞期胚から単離した ICM から機能的な TE を再出現させることが可能であることを示した。さらに、マウスおよびウシ ICM で TE 再形成能に違いが認められた。結論として、ウシ ICM の単離により割球の位置関係を変化させた場合、外側に配置された割球は TE 優勢な遺伝子発現パターンを獲得し機能的な TE を再出現することが示された。ウシ単離 ICM から誕生したウシは哺乳類初期胚発生における内外モデルの正当性を決定的に証明するものであり、発生生物学的に極めて重要な知見を与えるものである。さらに、TE を削除しても個体発生可能であることが示されたことから、TE 由来 DNA を分析して遺伝的能力を決定した後にウシ個体生産ができる可能性が示され、新しいウシ改良増殖技術の開発に大きく貢献するものと期待される。