



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（農学）

氏名 郡 七海

審査担当者	主 査	准 教授	川 原	学
	副 査	教 授	高 橋	昌 志
	副 査	教 授	上 田	宏一郎
	副 査	名誉教授	中 村	富美男 (北海道大学)
	副 査	助 教	唄	花子

学 位 論 文 題 名

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

本論文は 6 章からなり、図 44、表 5、文献 76 を含む頁数 146 の和文論文であり、別に参考論文 1 編が添えられている。

哺乳類初期胚を構成する細胞（割球）は、胚内に腔所（胞胚腔）が生じる胚盤胞期というステージで、内部細胞塊（ICM）および栄養外胚葉（TE）に分化し、それぞれ将来胎子および胎盤を主に形成する。マウス胚において、胚内で相対的に内側および外側に位置する割球がそれぞれ ICM および TE に分化するという、「内外モデル」が提唱されている。実験的には、胚盤胞期胚から ICM を単離することにより、ICM 外周の割球の相対的位置を内側から外側に変化させることができる。本研究では、ウシ単離 ICM の各割球が位置関係の変化を認識し、個体発生を支持する機能的 TE の再生能を保持していることを検証することで、内外モデルの証明を目指した。

(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 シグナルが ICM/ TE 分化を調節していると考えられている。シグナル下流の転写共役因子 YAP1 は外側割球において核内局在を示し、転写因子 TEAD4 と相互作用し、TE マーカーである CDX2 の発現を促す。一方、内側割球では YAP1 がリン酸化修飾を受け核内移行が阻害され、ICM へと分化する。本項では、ウシ単離 ICM における YAP1、TEAD4、および CDX2 発現様式について調べた。ウシ単離 ICM の外側割球では時間経過に従い TEAD4 陽性細胞における YAP1 の核内局在が進み、続いて CDX2 の発現が観察された。さらに、TE 細胞が再出現するとともに胞胚腔が再形成された（腔再形成胚）。また、ウシ体細胞を用いて YAP1 および TEAD4 の相互作用を検出した。以上より、ウシ単離 ICM の外側割球では、YAP1 および TEAD4 の相互作用を介して CDX2 の発現を促進していることが示された。

(2) RHO-ROCK シグナルがウシ胚盤胞期胚の分化に与える影響

マウス胚では、GTP 加水分解酵素である RHO と、RHO キナーゼである ROCK が Hippo シグナルの上流を制御している。本項では、ウシ ICM/ TE 分化においても RHO および ROCK が Hippo シグナルを制御するかどうか検証した。胚盤胞形成中の胚（通常胚）および単離 ICM を、RHO あるいは ROCK の阻害剤、もしくは溶媒のみを含む培地中で培養し、YAP1 および CDX2 の発現を観察した。RHO 阻害は通常胚と単離 ICM 両方で YAP1 の核内局在および CDX2 発現を抑制した。一方、通常胚における ROCK 阻害は YAP1 核局在化および CDX2 発現を促進し、マウス胚における ROCK 阻害とは逆の効果を示した。しかし、単離 ICM では通常胚と異なり両タンパク質発現様式の変化は観察されなかった。以上より、ウシ胚でも RHO や ROCK が Hippo シグナルの上流で ICM/ TE 分化を制御するが、ROCK による制御は通常胚と腔再形成胚で異なることが示された。

(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

前項までの結果から、通常胚における TE の分化と、単離 ICM からの TE の再出現が類似した機構により制御されることが示された。そこで、腔再形成胚と通常胚との遺伝子発現パターンの類似性をトランスクリプトーム解析により調べた。その結果、一部代謝関連遺伝子の発現レベルにはサンプル間で差はみられたものの、両者の TE 優勢発現遺伝子群の発現パターンは相同であることが確認された。

(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能の検証

単離 ICM から内外モデルに従い再出現した TE が個体発生支持能を有するならば、腔再形成胚は子宮内で胎盤を形成し、妊娠満期までの発生を完遂できるはずである。本項では、マウスおよびウシ腔再形成胚を仮親の子宮に移植しそれらの発生能を調べた。マウス腔再形成胚の生存胎子は認められず、ウシ腔再形成胚から一頭の出生個体が得られた。続いて、両種の通常胚と腔再形成胚において、ICM から派生する原始内胚葉のマーカーである SOX17 の局在を比較した。ウシ通常胚では、SOX17 は早期胚盤胞期の TE でも発現していたが、マウス通常胚では後期胚盤胞期で初めて発現し TE に局在することはほぼなかった。一方腔再形成胚では、いずれの種においても再出現 TE で SOX17 の発現が検出された。以上より、単離 ICM から再出現した TE の発生支持能には種間差があり、これは TE における SOX17 の局在の違いに原因があると考えられた。

本研究では、ウシ単離 ICM の発生支持能を示すことで、内外モデルの正当性を証明することに成功した。また、全 TE を削除した胚からも個体発生可能であることは、一つの胚から個体作出部分と、十分量の DNA 解析用部分を同時に得られることを意味しており、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。よって、審査員一同は、郡 七海が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。