



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 [全文の要約]
Author(s)	郡, 七海
Description	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。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/77952
Type	doctoral thesis
File Information	Nanami_kori_summary.pdf



博士論文の要約

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

背景

胚盤胞期はウシの受精卵移植に用いられる発生ステージであり、その分化メカニズムを解明することは効率的な動物生産を実現する繁殖技術の向上にとって非常に重要である。古典的な胚盤胞期胚の分化モデルとして内外モデルが提唱されており、胚の立体構造において外側に位置する割球が栄養外胚葉 (TE) に、内側に位置する割球が内部細胞塊 (ICM) に分化すると説明されている。ICM および TE への分化制御機構の研究は、現在、主にマウス胚を用いて進められており、いまだ未解明な点が多い。内外モデルの検証では、マウス胚盤胞期胚における ICM の単離実験が実施されている。もし ICM および TE への分化が内外モデルに従うのであれば、胚盤胞期胚における ICM は全て、それ以前の発生ステージにおいて胚の内側に位置していた割球に由来するということになる。ここで、胚盤胞期胚から TE を除去し ICM を単離することにより、ICM 表層に位置する割球の胚内における相対位置が内側から外側へと変化することになる。このことから、単離 ICM を継続的に培養することで TE が再出現するかどうかを調べることで、割球の運命決定が胚内での相対位置に依存することを証明できると考えられている。しかしこの「腔再形成胚」の検証は、TE マーカートンパク質の発現解析に留まっており、外側に再配置された割球が機能的に正常な胎盤を形成して個体発生を完了させられるかどうかは明らかになっていない。さらに、同じ哺乳類でもウシではこの手法を用いた内外モデルの検証例が全く報告されていない。近年の研究でウシおよびマウスで胚盤胞期

胚における分化のメカニズムが異なることが分かっていることから、ウシ初期胚を用いた検証は必要不可欠である。そこで本研究では、ウシ腔再形成胚の TE 分化関連因子の発現動態および個体発生能を検証することを目的とした。

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

【目的】

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。一方、ウシ胚における Hippo シグナルと ICM/TE 分化の関係を調べた研究報告例はマウス胚に比べると少ない。そこで本項では、内外モデルを検証するための手法のひとつである ICM の単離を用いて、単離した ICM の外側に位置する割球において YAP1 と TEAD4 の相互作用、ならびに YAP1-TEAD4 相互作用による CDX2 発現の誘導機構がウシ胚でも保存されていることを証明することを試みた。

【材料と方法】

本実験では、食肉検査場由来のウシ卵巣から卵母細胞を採取した。体外成熟させた卵母細胞を体外受精に供し、得られた受精卵を体外培養することで各発生ステージの初期胚を作出した。培養 6.5 日 (D6.5) の初期胚盤胞期胚を界面活性剤に浸漬後、ガラスキャピラリーによりピペティングすることで TE を除去して ICM を単離した (単離 ICM)。得られた単離 ICM を 24 時間体外培養培地で継続培養し、胞胚腔が認められた胚を腔再形成胚とした。YAP1、TEAD4、および CDX2 の発現動態を調べるために免疫染色を実施した。免疫染色の方法として、胚の固定、透過処理、ブロッキング処理、抗体反応、および核染色を行った。YAP1 およ

び TEAD4 の相互作用を検出するために、ウシ胎子由来線維芽細胞のタンパク質を免疫沈降およびウエスタンブロッティングに供試した。

【結果と考察】

はじめに、通常のウシ初期胚発生期間における YAP1、TEAD4、および CDX2 の発現動態を観察した。D5.0 初期桑実期胚において、外側に位置する割球で YAP1 の核特異的なシグナルが認められ始め、D5.5 後期桑実期以降では外側に位置するほとんどの割球において核特異的なシグナルが検出された。D5.0 初期桑実期で TEAD4 は核特異的な局在を示し、以降の発生ステージではほとんどの割球で、胚内での相対位置にかかわらず同様のシグナルが認められた。CDX2 について、D6.0 初期胚盤胞期以降において外側に位置する割球で核内に強いシグナルが認められた。つづいて、ICM の単離を行い、腔再形成過程におけるマーカータンパクの局在パターンの変化を調べた。腔再形成胚において YAP1 および TEAD4 の共局在を観察した。腔再形成胚形成過程において、CDX2 の発現開始に先行して YAP1 は核内移行していた。ウシ体細胞由来のタンパク質を免疫沈降およびウエスタンブロッティングに供した結果、YAP1 および TEAD4 両方のバンドを目的サイズ付近で検出し、両タンパク質の相互作用を確認した。これらの結果から、ウシ単離 ICM の外側に位置する割球で、時間経過に伴い 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と考えられた。

(2) RHO-ROCK シグナルがウシ胚盤胞期胚の分化に与える影響

【目的】

マウス胚は、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 Hippo シグナルを上流で制御することが知られている。RHO-ROCK シグナルは Hippo シグナルの活性化を抑制し、YAP1 を核内移行させて CDX2

の発現を促進する。一方ウシにおける RHO-ROCK シグナルと胚細胞の分化の関連についての知見は乏しい。そこで、ウシ胚盤胞形成時および単離 ICM の TE 再出現における RHO-ROCK シグナルの関与を調べた。

【材料と方法】

前項同様の方法でウシ初期胚および単離 ICM を得た。RHO および ROCK の阻害剤として、C3 transferase および Y-27632 をそれぞれ用いた。溶媒を培養培地に添加したものを Vehicle コントロールとして用いた。まず、ウシ胚の阻害剤処理がマウス胚と同様の効果を示すかどうか検討するために、D5.0 初期桑実期胚を 24 時間各阻害剤で処理し、YAP1 および CDX2 の免疫染色に供した。次に、ウシ単離 ICM を 12 時間各阻害剤で処理して同様の実験に供した。

【結果と考察】

D5.0 初期桑実期胚を C3 transferase で処理すると、Vehicle コントロールと比べて外側割球における YAP1 の核局在化および CDX2 発現が抑制され、RHO はマウス胚と同様に YAP1 の局在制御を介して CDX2 の発現に関与していることが示された。しかし、同時発生ステージの胚を Y-27632 で処理すると、反対に Vehicle コントロールと比べて YAP1 の核局在化および CDX2 発現が促進されるという、マウス胚とは逆の効果が観察された。続いて単離 ICM を C3 transferase 存在下で継続培養すると、Vehicle コントロールと比べて YAP1 の核局在化および CDX2 発現が抑制され、ウシ単離 ICM の TE 再出現における RHO の関与とが示唆された。一方、単離 ICM を Y-27632 の存在下で継続培養場合、YAP1 の局在および CDX2 の発現に Vehicle コントロールとの差がみられず、RHO による TE 再出現の促進に ROCK とは別のエフェクター分子が関与していると推察された。

(3) ウシ腔再形成胚における網羅的遺伝子発現解析

【目的】

前項で、腔再形成胚における TE 特異的マーカーである CDX2 の発現を確認した。しかし、CDX2 を発現していても胎盤形成不全により胎性致死になる例が報告されているため、単離 ICM からの TE 再出現を証明するにあたって CDX2 発現の確認のみでは不十分である。そこで本実験では、通常のウシ胚盤胞期胚と比較して、腔再形成胚の遺伝子がどのような発現パターンを示すのか RNA-seq により調べることにした。

【材料と方法】

前項までと同様の方法により、D6.5 初期胚盤胞期胚および腔再形成胚を作出した。本項では D6.5 初期胚盤胞期胚を全体胚とした。各胚由来の RNA から cDNA を合成および増幅し、RNA-seq に用いた。統計解析ソフトウェアを用いて得られたデータを処理した。

【結果と考察】

RNA-seq の結果をもとにした統計的解析から、腔再形成胚におけるグローバルな遺伝子発現パターンは、全体胚と類似していることが判明した。続いて、ウシ TE 特異的な遺伝子群の発現パターンを両者で比較したところ、全体胚と似た発現パターンを示す腔再形成胚が認められた。また、ジーンオンロジー解析による機能的分類の結果、差次的発現遺伝子には代謝関連機能の遺伝子が有意に多く含まれることが分かった。これらの結果から、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、グローバルな発現パターンには類似性があり、TE 特異的遺伝子に限った場合でも一部の腔再形成胚では通常の胚盤胞期胚に近い遺伝子発現パターン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能の検証

【目的】

単離 ICM の継続培養により再出現した TE 様細胞が、妊娠末期までの個体発生を支持する機能を備えているか否かを、胚移植により確かめた。一方、ICM は後期胚盤胞期において原始内胚葉 (PrE) およびエピブラストへと分化するが、種間でこの分化制御機構が異なると考えられており、それが腔再形成胚の個体発生能に影響する可能性がある。そこで、腔再形成胚における ICM の分化状態を、PrE マーカータンパク質の発現解析からウシ胚とマウス胚でそれぞれ検証した。

【材料と方法】

ウシ胚について、前項までと同様の方法で D6.5 初期胚盤胞期胚、単離 ICM、および腔再形成胚を作出した。発情同期化した、排卵 6 日目の受胚牛にウシ腔再形成胚を移植した。マウスでは、性成熟 (8~12 週齢) 以降の雌雄を用いて体外受精により作出した受精卵を、胎齡 3.75 日 (E3.75) 胚盤胞期まで体外培養した。胚盤胞期胚から、界面活性剤処理およびピペッティングにより単離した ICM を 24 時間体外培養培地で継続培養することで腔再形成胚を得た。胚移植では交配後 2.5 日の偽妊娠マウスを用いた。腔再形成胚の ICM の分化状態の種差を調べるために、本項では PrE マーカーである SOX17 の局在を免疫染色によりマウスとウシそれぞれで観察した。

【結果と考察】

マウス腔再形成胚を 120 個胚移植に供した結果、生存胎子はみとめられなかった。一方、4 個のウシ腔再形成胚を受胚牛に移植したところ、そのうち 1 個の胚から出生個体の作出に成功した。これらのことから、動物種間によって腔再形成胚の個体発生能に差があることが示された。過去の知見から、マウス E3.75 胚では SOX17 が ICM 特異的に発現していることが分かっている。一方ウシ着床前胚における、SOX17 発現動態不明であったため、D6.5 初期胚

盤胞期胚を用いて検証した。その結果、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、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 TE における SOX17 の発現は通常胚にも認められるものであるが、マウスでは通常の胚発生中、TE に SOX17 発現を示すことはなく、腔再形成胚 TE における SOX17 発現は異所性であると考えられた。これらの結果から、腔再形成胚 TE における SOX17 の発現はマウスでは異所性であり個体発生能を損なった一方、ウシでは通常の胚発生進行中にも認められるものであり、発生能力を損なうものではなかったと考えられた。

結論

本研究では、ウシ胚盤胞期胚から単離した ICM は個体発生を支持する TE を再出現させる能力を保持していることを示した。さらに、マウス ICM から生存胎子が得られなかったことから、ICM の TE 再生能力はマウスと比べてウシでより高いことが示され、それは ICM から PrE への分化メカニズムの違いによるものと考えられた。本研究で得られた成果の農学的意義として、ウシ単離 ICM から個体作出が可能であることは、育種技術への応用につながると考えられる。つまり、除去した TE 由来の DNA を検査に用いることで、正確な遺伝的能力の判定後に単離 ICM 由来の個体を得ることができるかもしれない。ICM の単離により、相対的位置関係を内側から外側へと変化させた割球が出現する。ウシ ICM は腔再形成過程で TE 特有の遺伝子発現パターンを獲得し、個体発生を支持する機能的な胎盤を形成する能力を保持していることが判明した。本研究の結論として、ウシ胚盤胞期胚から単離した ICM を用いて TE を再出現させることで、内外モデルを証明した。