



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13923号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77955
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_akizawa_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 秋沢 宏紀

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	西 邑	隆 徳
	副 査	教 授	小 川	英 彦 (東京農業大学)
	副 査	助 教	唄	花子

学 位 論 文 題 名

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

本論文は 5 章からなり、図 39、表 2、文献 171 を含む頁数 144 の和文論文であり、別に参考論文 3 編が添えられている。

哺乳類初期胚では子宮への着床までに、細胞の栄養外胚葉 (TE) と内部細胞塊 (ICM) への二極化と、ICM の胚盤葉上層 (Epi) と原始内胚葉 (PrE) への分けという二回の細胞分化を経験する。TE、Epi、そして PrE はそれぞれ主に胎盤、胎子本体、そして卵黄嚢を形成し、これら三成分が適切なバランスで存在することが胚発生に必須である。しかし、その分化メカニズムは不明点が多く、とくに大家畜であるウシでは詳細な解析が進んでおらず、哺乳類初期胚発生全容の理解を妨げてきた。そこで本研究では、ウシ着床前胚の細胞分化を分子生物学的観点から明らかにすることを目的とした。

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

マウス胚では ICM および TE への分化は Hippo 経路により制御され、下流の転写因子 *TEAD4* により TE 固有の遺伝子発現が誘導される。しかし、ウシ胚において Hippo 経路が ICM/ TE 分化に関わるかどうかは決定されていない。また、*TEAD4* に制御され体細胞の細胞増殖亢進に関与する *CCN2* 発現が、哺乳類初期胚においても *TEAD4* により制御されているかどうかは不明であった。そこで本項では、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うことでそれらの初期胚における役割を検証した。

ウシ胚における *TEAD4* あるいは *CCN2* の発現抑制により、*CDX2*、*GATA2* といった TE 特異的な遺伝子の発現が抑制された。また、ウシ *TEAD4* 発現抑制胚では *CCN2* の発現が低下し、*CCN2* 発現抑制胚では *TEAD4* の発現が顕著に低下した。一方、胚盤胞期における、*CCN2* 発現抑制胚の ICM 細胞数に対する TE 細胞数の比は顕著に低下していた。これらの結果より、ウシ胚盤胞期において *TEAD4* と *CCN2* は互いに発現を制御しあい、TE の細胞増殖に関与することが初めて明らかになった。

(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

胚盤胞形成以降に起こる発生イベントは、マウス胚とウシ胚で全く異なる。したがって、胚盤胞形成

以降の種に応じた詳しい解析が必要となるが、哺乳類胚は胚盤胞期までしか体外培養できず、これが研究の障壁となってきた。そこで本項では、胚盤胞期以降に起こるウシ胚の分化について洞察を得る目的で新規培養法の開発を試みた。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培養系により、ウシ胚盤胞期以降の胚生存性が顕著に高くなることが判明した。この「ゲル培養」により作出された胚では、上皮細胞化した TE に特有の遺伝子発現や形態的特徴が示されると同時に、ICM から PrE および Epi への分化も達成されていた。しかし、ゲル培養を培養 10 日後 (D10)以降も継続した場合、胚の生存性、特に Epi の細胞数が急速に損なわれた。

(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、培養時の酸素分圧を 21%から 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 *WNT11*、*NRG2*、および *AREG* 遺伝子を、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 強制発現誘導胚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、*SOX17*および *ETS2*の発現が強制発現非誘導胚と比較し顕著に上昇した。これらより、胚盤胞期以降の生存性や Epi 細胞数の維持には低酸素環境が必要なこと、胚体外領域の分化には本研究で発現誘導した分泌タンパクの存在が重要なことが示された。加えて、D10 胚を受胎牛に子宮内移植したところ、着床及び胎子形態形成が完了し、ゲル培養胚は少なくとも培養 10 日間は正常な発生能力を維持し続けられることが証明された。

本研究をまとめると、まず、ウシ胚における TE の増殖は、TEAD4 および CCN2 の協調により制御されることが明らかとなった。また、ゲル培養胚の解析から、ウシ胚生存性の胚盤胞期の D8 から D12 までの延長、ICM から PrE および Epi への効率的分化、および低酸素環境が生存性向上や Epi の維持に好適であると証明された。そして、胚盤胞期以降特異的に発現上昇する分泌タンパクが、胚体外領域の適切な分化に重要なことが明らかとなった。ウシ胚において、早期胚死滅は受胎率が低調な主要因となっている。

本研究により、これまで不明であった胚盤胞期以降のウシ胚発生機序が明らかにされたことは、胚生存の最適条件の決定に結び付く重要な知見といえる。本研究成果を家畜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。よって、審査員一同は、秋沢宏紀が博士（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。