HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the role of zona pellucida in pre- and post-implantation development of mouse embryos [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	范., 威宏
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15148号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87214
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Fan_Weihong_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　Weihong Fan

審査担当者　主査　教授　小池　聡
副査　教授　西邑隆徳
副査　准教授　川原　学
副査　助教　唄　花子
副査　教授　高橋昌志(国際食資源学院)

学位論文題名

Study on the role of zona pellucida in pre- and post-implantation development of mouse embryos

（マウス胚の着床前後の発生における透明帯の役割に関する研究）

本論文は英文 141 頁, 図 27, 表 4, 8 章からなり, 参考論文 2 編が付されている。透明帯（ZP）は、体内および体外の両方において、受精並びに初期胚発生における様々な重要な役割を担うことが知られる。一方、近年発展が著しい生殖技術の中で、ゲノム解析と組み合わせた双子や四つ子などの一卵性多子の作製、クローン動物、キメラ動物の作製、細胞質分裂胚の改良のための胚盤分離など、透明帯を除去(ZPR)した後の体外胚操作が広範囲で活用されている。加えて、母体子宮への胚移後の胚の着床や受胎率向上のためには、透明帯の存在は阻害的になるため、人為的な除去や軟化処置の必要性も多い。このように、生殖研究において ZPR が必要であるにもかかわらず、着床前の発生、分化および着床後の発生における ZP 除去の影響について未知な点が多い。そこで、本研究では、マウス胚の着床前および着床後の発生における ZP の役割を解析したものである。

1)透明帯除去マウス胚の最適体外培養系の確立

本章では、通常の平板微小的培養、ヒトおよびウシ胚で使用される市販の個別培養ウェルシステム Well of Well (WOW)、およびサイズの小さいマウス胚に適した小ウェルとしたカスタマイズ WOW（cWOW）との比較により、透明帯除去マウス胚発生のための最適体外培養系を明らかにした。平板微小的培養および市販 WOW と比較して、cWOW では、増殖した割球の平面配列が減り、胚盤胞への発生率が有意に向上した。このことから、ウシやヒト胚と比べて小型のマウス胚サイズに適したウェル内での培養環境によって、透明帯除去で失われた立体配置支持構造を再獲得した結果、分裂割球の発生と分化が促進されたことを考察しており、透明帯除去胚の代替培養系としての利活用が想定されることを述べている。

2)マウス胚の着床前発生と遺伝子発現に及ぼす透明帯除去の影響

本章では、着床前発生と遺伝子発現に及ぼす透明帯除去の影響を調べ、透明帯除去胚は、未除去胚に比べ、発生速度が速く、コンパクション速度が早いことが確認

された。内細胞塊（ICM）および栄養外胚葉（TE）それぞれに特異的な遺伝子発現解析により、透明帯を除去した桑実胚および胚盤胞の両方で ICM 関連遺伝子の発現増加と TE 関連遺伝子発現の低下がみられた。ICM 特異的タンパク質（OCT4）の増加および TE 特異的タンパク質（CDX2）の減少も透明帯除去胚における遺伝子発現と一致することが確認された。

3)着床後の発育に対する 透明帯除去の影響

本章では，着床後の発生に対する透明帯除去の影響を調べ、代理母マウスへの胚移植後、透明帯除去胚は未除去胚に比べて着床率が低く、生存胎仔数の減少が明らかにされた。これに対して、出生時の胎仔重量に差はなかった。しかし、透明帯除去胚の胎盤重量は未除去胚よりも有意に増加した。胎盤の RNA-seq 解析では生物学的プロセスに関連する合計 473 個の異なる発現変動遺伝子(279 増加、194 減少)が検出され、胎盤の細胞増殖に関わる遺伝子群の発現への影響を考察している。

4)発生初期の割球配置とその後の発生・遺伝子発現に及ぼす透明帯除去の影響

本章では，透明帯除去初期（4 細胞）胚の立体構造構築程度に伴った割球間接触が分化制御因子 Carm1 の遺伝子およびタンパク質発現とその後の発生に及ぼす影響について解析した。割球間接触部位の少ない(平面割球配置構造が多い)透明帯除去胚では、胚盤胞率および総細胞数が有意に減少した。Carm1 の遺伝子およびタンパク質の発現は、透明帯除去により有意に増加した。さらに、分化制御に必須な DNA メチル化関連遺伝子の発現も透明帯除去胚で有意に減少した。これらの結果から、透明帯除去により、早期の 4 細胞の時点において、胚割球構造の配置がその後の胚盤胞発生に影響するとともに、エピジェネティックな修飾機構への影響を及ぼすと考察している。

5) 透明帯除去胚の発生向上を目的とした新規除去法の確立とその有効性評価

透明帯除去には酸性タイロード液（ATS）やプロテアーゼが主に用いられるが、本処理による胚への毒性の可能性が懸念される。しかし、本懸念点に対する検討は国内外での未実施である。本章では、2 種の短時間処理ら併用した低毒性の透明帯除去プロトコルを検討し、その後の発生や胚の品質を評価した。2 段階 ZPR プロトコルと命名した本法は、ATS と PK 単独に比べ、除去時間の大幅な短縮、総細胞数の増加、アポトーシス細胞の減少を伴った胚盤胞率の向上を可能とした。本法の活用により、ヒトを含めた哺乳類胚の低毒性透明帯除去による生殖補助技術に有益であることを提案している。

結論として、透明帯の役割は、胚盤胞の構造を維持し発生させるだけでなく、着床前後の発生における遺伝子発現や分化に影響することを明らかにした。また、迅速で低毒性除去法や透明帯胚の発生向上に適した培養系の新たな開発により生殖補助医療技術の発展に寄与することが期待される。

よって審査員一同は，Weihong Fan 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。