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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13923
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94546
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_akizawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

北海道大学 大学院農学院
生物資源科学専攻 博士後期課程

秋沢 宏紀

目次

第一章 序論……1

第二章 *TEAD4* および *CCN2* 遺伝子が栄養外胚葉の発生に果たす役割

緒言……8

材料と方法……10

結果……20

考察……39

第三章 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

緒言……44

材料と方法……46

結果……50

考察……71

第四章 ウシ胚盤胞期胚ゲル培養系の改良

緒言……79

材料と方法……83

結果……89

考察……104

第五章 総括……110

謝辞……113

参考文献……114

付表……132

付図……140

第一章 序論

初期胚発生

有性生殖を行う哺乳類では、それぞれオスとメス由来の生殖細胞である精子と卵子が融合することで受精卵という一つの細胞となり、発生が開始される。受精卵における細胞分裂は「卵割」、そして卵割によって生じる娘細胞は「割球」と呼ばれる。卵割は、卵子特異的糖タンパク質から構成される「透明帯」の中で起こり、典型的な体細胞の分裂と二つの点で大きく異なる。一つ目は分裂周期が短いこと、二つ目は娘細胞 (割球)の体積の増大を伴わないことである。これら二つはどちらも、卵割の細胞周期は G1 期が極めて短いことによって説明できる。細胞周期の中でも G1 期は、細胞質分裂の後に娘細胞が体積を増加させ親細胞と同じ大きさになるために必要な期間である。体細胞では S 期に進入するために必要な因子の転写が Rb というタンパクにより抑制されることで、細胞のサイズが十分に大きくなるまで細胞周期は G1 期でとどまっている [1]。マウス初期胚はこの Rb タンパクの存在量が小さいため、G1 期における細胞周期の停止は起こらず、実質的に G1 期を経ずして M 期から S 期へ移行する [2,3]。結果として卵割を行うたび割球の体積は小さくなり、胚全体の体積は排卵時の卵子から一定に保たれる。卵割の繰り返しにより細胞数が一定以上に達すると、割球同士の接着が密になり、境界が不明瞭になるコンパクションという現象が起きる [4]。マウスではコンパクションの開始から 24 時間後には胚の外側の割球同士における密着結合が完成し、胚の内外における液体の移動が遮断されるとともに、細胞に極性が生じる [5]。このとき、胚の外側に位置する割球の基底側ではナトリウム/ カリウムポンプが局在し、浸透圧勾配により胚内に液が流入する [6]。こうして胚の内側に生じる腔所を胞胚腔、胞胚腔を満たす液を胞胚腔液と呼び、胞胚腔の拡張により体積の増大したこの時期の胚を特に胚盤胞期胚と呼ぶ。胚盤胞期胚はやがて透明帯から脱出し、子宮への着床を開始する。

胚盤胞期における細胞の二極化

哺乳類初期胚の特徴の一つは、発生のある時期まで割球が顕著な分化可塑性を持つことである。両生類や魚類等の未受精卵子では植物極側に特定の母性タンパク質が局在しており、これが卵割のたびに割球に不均一に分配されることで胚の分化が制御されている [7]。したがって、これらの動物種では受精前からすでに分化の方向性が決まっている。これに対し哺乳類卵子には動物極あるいは植物極に相当する分子や機構はみつかっておらず、一定回数の卵割を経てようやく割球間で運命決定のバイアスが生じ始めると考えられている。しかし、その正確な時期がいつかという議論には決着がついていない。最近の研究では、マウス 4 細胞期胚において、すでに特定の転写因子の発現量や標的領域への結合時間に割球間で差があり、この差に基づいて細胞運命の予測が可能であるとする結果が報告された [8,9]。これに対し、2 細胞期や 4 細胞期の割球を人為的に単離して生じた単一の割球だけでも個体発生を全うできることや、これら単一割球は他の胚と混合したときどの細胞系列にも寄与できることから、この時期における割球はすべて等価であるとする考え方もある [10,11]。いずれにせよ受精後 2 および 3 回目までの卵割で生じるマウス胚割球は胎盤を含むすべての細胞系列に寄与して一個体を形成できる全能性を保持しており、仮にある時点で運命決定のバイアスがかかっていても、人為的操作などの外的条件でそのバイアスがリセットされることは確かである [10,11]。マウスでは割球の持つこの全能性ないし分化可塑性は卵割のたびに急速に失われ、胚盤胞期には異なる二細胞系列、すなわち内部細胞塊 (Inner Cell Mass: ICM)および栄養外胚葉 (Trophectoderm: TE)への不可逆的な運命決定が完了している [12]。ICM と TE はそれぞれ固有の遺伝子発現を行い、それが各細胞系列に特有の機能や形態学的特徴を付与する。ICM を特徴づけるのは多能性であり、これは胎盤などの胚体外組織を除く、成体を構成する三胚葉すべての細胞に分化できる性質を意味している [13]。一方 TE は将来胎盤を形成する細胞系列として、胚盤胞期後期にはすでに上皮細胞様の形態学的特徴を獲得している [14]。胚全体では、胚盤胞期胚は胞胚腔を取

り囲む単層の TE と、TE の一方の内壁に緊密な細胞の塊として存在する ICM とが明瞭に区別でき、ICM が存在する胚部 (embryonic part)と、その反対側の非胚部 (abembryonic part)という胚の方向性が確立している。

後期胚盤胞期における ICM の分化

マウスでは着床に伴う子宮内膜との接着まで、TE は比較的均一な細胞集団として維持される一方、ICM は、着床までにさらに二つの細胞系列を生じる。すなわち、最終的に胚本体へと分化する多能性細胞集団の胚盤葉上層 (Epiblast: Epi)と、胚性卵黄嚢等の膜系組織を主に形成する細胞系列の原始内胚葉 (Primitive endoderm: PrE)とである [15]。着床直前のマウス胚において、Epi と PrE は空間的に分離されており、PrE は胞胚腔と接する ICM の表面に整列し、この PrE 層と、ICM に接している極 TE に挟まれるようにして Epi が位置する。この局在パターンに基づき割球をラベルし、異なる胚に注入しその運命を追跡するキメラ形成試験では、PrE は胚性系列には寄与しないことが示されている [16]。したがって、マウスでは着床前に TE、PrE、Epi という異なる 3 つの細胞系列への不可逆的な運命決定が完了しているといえる。PrE から形成される卵黄嚢と TE から形成される胎盤が、母体由来の栄養を Epi から形成される胚本体に供給する [17]。この基本設計を将来的に確立するため、胚盤胞期周辺において細胞分化が適切に行われることが胚の正常な発生にとって決定的に重要である。実際、ICM と TE の分化、あるいは PrE と Epi の分化に不全のある個体は、胚性致死という形で妊娠の早期に排除され出生に至らない [18–20]。

哺乳類初期胚発生における種間差

哺乳類の初期胚発生は、受精後数回の卵割を経て胚盤胞を形成するという概略は共通しているが、細部では多くの種間差が存在している。最も明確な違いは胚のサイズである。胚盤胞期までの初期胚の全体的な体積が卵割を経ても一定であることから、排卵時の卵子

の大きさの違いがそのまま胚の大きさの違いということができる。マウスでは平均的な卵子の直径が 60 μm であるのに対し、ウシでは 150 μm と、体積にすると実に 15 倍の違いがある。同一の発生ステージにおいてもウシのほうが割球当たりの表面積も大きく、このことは細胞表面分子の多寡にも影響し、それが種特異的な分化パターンに影響するのかもしれない。次に顕著な初期胚発生の種間差は胚発育のスピードである。マウスでは受精から 3.5 日 (Embryonic day 3.5: E3.5)で胚盤胞期に到達し、E5.0 には子宮への着床が開始される。これに対しウシでは、受精後 7 日 (Days 7 post insemination: D7)で胚盤胞期胚が形成され、胚が着床に至るのは D21 周辺と、これら二つの動物種では着床前発生のスピードに大きな開きがある [21,22]。また、分子生物学的な視点では、初期胚の分化を司る機構に種間差が存在するため、ウシ初期胚発生の時間的な長さは、マウス初期胚発生を単純に展延したものとは説明できない。生殖細胞形成、受精、胚ゲノム活性化、コンパクションといった、胚盤胞期以前の重要な発生イベントにおいても顕著な種間差が存在するが、ここでは細胞分化に焦点を合わせるべく、細胞の運命決定が顕在化する胚盤胞期周辺の種間差について論じる。

多くの細胞分化では段階的に細胞の運命が固定化されていくように、胚盤胞期胚における細胞の運命決定も段階的であるとともに、種特異性がみられる。例として、胚盤胞形成時における TE の運命決定のレベルは、マウス胚に比べウシ胚で著しく低いことが分かっている [23]。マウスは胚盤胞期胚が形成された時点で各割球の最初の運命決定がすでに完了しており、TE の細胞はもはや ICM に寄与することはない [12]。一方ウシでは、胚盤胞形成後の D7 の胚から TE 由来細胞を単離分散させて別の 8 細胞期胚に注入したところ、注入した TE 由来細胞の 3 分の 1 が ICM 近傍の位置に観察された [23]。また、ICM からの PrE および Epi への分化調節に関しても、マウスとウシでは異なる分子経路を利用していることが示唆されている [24,25]。胚盤胞期以降の初期胚発生はこれら動物種間でさらに異なる。マウスでは着床後、Epi が極性化し上皮様構造を形成し、同時に、Epi に接していた

極 TE は胚外外胚葉、次いで外胎盤錐と呼ばれる組織へと分化し、最終的に胎盤の実質組織を形成する [17]。これに対しウシでは、胚盤胞期胚の孵化後に壁 TE 細胞が指数関数的に細胞数、および体積を増大させ「伸長」と呼ばれるダイナミックな形態変化を示す [26]。その一方で Epi を覆っていた極 TE 細胞 (反芻動物やブタでは特に、Rauber 層と呼ばれる)が消失し、Epi は子宮液に直接曝露されるという、霊長類や齧歯類にはない特徴的な段階を経る。これと同期し Epi 細胞では極性化が進行し「胚盤」と呼ばれる固有の構造が形成され、原腸陥入は D17 付近で開始される [27,28]。D21 の着床までに胚発生はさらに進行し、神経期胚に至り、これはマウス胚の E7.0 の発生ステージに相当する [28]。

哺乳類初期胚の体外作出技術および発生工学的手法

初期胚の体外培養法の開発は、哺乳類初期発生の分化メカニズム解明に大きく貢献した。度重なる培養条件検討の結果、現在では、未成熟卵子の体外成熟、体外受精、そして受精卵の胚盤胞期までの体外培養がヒト、実験動物および産業動物において可能となっている [29,30]。これらの技術をまとめて体外胚作出 (*in vitro* production: IVP)と呼び、IVP 由来胚は子宮に戻すことで個体発生を完了できる [31]。この技術に加え、遺伝子組換えをはじめとする分子生物学的手法が発達し、哺乳類初期胚発生を制御する分子機構が詳細に調べられている。なかでもマウスは、妊娠期間が短く多胎なうえサイズも小さく、繁殖管理や飼育が容易なことから全世界で哺乳類の標準的なモデル動物として受け入れられ、研究の中心を成してきた。さらに、マウス Epi を胚性幹 (Embryonic stem: ES)細胞として体外で多能性を保持したまま長期にわたって維持培養する技術の普及により、マウス遺伝学は一変した [32,33]。マウス ES 細胞のもつ、胚盤胞期胚と混合したとき胚の発生に参加し、生殖系列にも寄与できるという性質を利用することで [34]、マウスにおける遺伝子組換え個体作出の効率、正確性、応用性が高まり、逆遺伝学の進展により個別の遺伝子機能の解明が飛躍的に進んだ。しかし、ES 細胞の生殖系列伝達が可能な動物種は現在のところマウ

ス、ラットに限られている [35–38]。このような事情により、哺乳類で初期胚分化機構を調べるときには、知見の集積量が圧倒的に多いマウスの情報を参考にすることが現実的である。しかし、哺乳類初期胚発生機構の全容の理解という観点から、マウスで提唱されているモデルや分子経路がウシ胚の分化にもそのまま当てはまるのか、という点は慎重に精査する必要がある。さらに、胚盤胞期はウシやヒトを含めた多くの動物種において子宮への移植が行われ、早期胚死滅が頻発する時期でもあることから、産業的にも種特異的な分化の詳細解明が望まれるステージである [36]。

当研究室では以前、ウシ固有の初期胚分化機構の解明を目指し、二つの網羅的遺伝子発現解析を行った。第一に、IVF で作出した D8 の胚盤胞期胚における ICM と TE の遺伝子発現比較を行った。この結果、ICM および TE 系列において特異的な発現を示す複数の遺伝子が同定され、その中にはマウス胚盤胞期胚における発現パターンと一致するものもあれば、全く異なる挙動を示すものもあった [39]。第二に、IVF 由来の D8 胚と生体 (*in vivo*)由来の D14 胚それぞれから TE 部分をサンプリングし遺伝子発現を比較した。この解析において発現上昇が確認されたリストの中には、胚盤胞期以降の TE の発生の指標となる遺伝子が含まれていたことに加え、反芻類およびブタに特有の現象である伸長現象への関与が予想される新規候補遺伝子も同定された [40,41]。

本研究の概要

哺乳類胚が分化可塑性を保持する意義は、割球が分化の方向性を柔軟に変化させることで環境ストレスや複製エラーを緩衝し、長期にわたる妊娠期間を経て完全かつ正常な個体発生を保障することにある。一方で発生の進行には、分化可塑性の喪失と引き換えに細胞固有の機能を発揮することが求められるが、胚全体における両者のバランスがどう保たれているかという疑問には ES 細胞を用いても答えることができず、究極的には胚そのもの

の解析が必須となる。本研究の目的は、ウシにおける胚盤胞期周辺の発生に伴い、細胞がどのように可塑性を喪失し特異的な機能を獲得するか解明することである。

本研究では、ウシ胚における TE、PrE、Epi という 3 細胞系列の確立について理解するため、胚盤胞形成時と、胚盤胞形成以降の 2 つの時期において解析を行った。まず第二章では、マウスにおいて胚盤胞形成の「内外モデル」の裏付けとなっている Hippo 経路がウシ胚においても活性化しているかどうか検証した [42,43]。ウシは時間的、経済的に発生工学的手法の適用に制限が多く、マウスのようにゲノムに直接介入するような手法を用いることは難しい。そこで本研究では、遺伝子発現を干渉するショートヘアピン (sh)RNA の注入により Hippo 経路を主導する特定遺伝子の発現を抑制しその後の胚発生を詳細に解析することで、Hippo 経路と ICM/ TE 分離の関係について調べた。続いて第三章では、胚盤胞形成の後に起こる、TE 細胞の運命決定、そして ICM からの PrE および Epi への分化について精査した。ウシに限らず一般的な哺乳類胚の体外培養では発生の限界が胚盤胞期であり、これ以降の発生を解析するには従来 *in vivo* 胚を母体から回収してくる手段しかなく、ウシ胚発生の分子機構の解析にとって大きな障害となっていた。そこで第三章ではまず、胚が生体内と同様の組織構造を保ったまま生存を続けられるような培養法を新たに開発することとした。この新規培養法により作出した胚を解析し、マーカー遺伝子の発現状態に基づいて生体における発生を反映していることを確認した。さらに、培養日数ごとの系列特異的マーカーの詳細な解析により胚盤胞期以降のウシ胚分化の詳細なタイムコースを初めて明らかにすることができた。第四章では、前述の網羅的遺伝子発現解析より同定した二つのウシ胚伸長関連候補遺伝子、*AREG* および *NRG2* の胚盤胞期以降における機能を、第三章で開発した新規ウシ初期胚培養法、および、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入法を組み合わせて解析した。

第二章 *TEAD4* および *CCN2* 遺伝子が栄養外胚葉の発生に果たす役割

緒言

胚盤胞期において胚全体を取り囲むよう配置される細胞集団が TE である。TE は ICM とは大きく異なる独自の転写ネットワークを有しており、特に転写因子である CDX2 の発現レベルによってその性質が規定される [44,45]。*Cdx2* 欠損マウス胚は、TE を維持できず着床できない [46,47]。また、マウス ES 細胞では、CDX2 の人為的な異所性発現により栄養膜幹 (TS)細胞様の性質が獲得される [45]。これらのことから、CDX2 は TE の特異化および維持において最も重要な因子の一つとされている。

マウス初期胚において CDX2 の発現を制御するのが転写因子 TEAD4 であり、CDX2 の発現が TE に限定されるのは、この TEAD4 の部位特異的な挙動による [43,48]。TEAD4 は転写コアクチベーターの YAP と協調することにより CDX2 などの発現を誘導するが、TEAD4 と YAP による遺伝子発現誘導には YAP が核内に局在し TEAD4 などと複合体を形成する必要がある [43]。卵割が進み細胞数が一定に達した胚においては、割球間で相対的な位置の違いが生まれる。すなわち、周りをほかの割球に囲まれる「内側」割球と、胚の中で外辺部に位置する「外側」割球とに区別できるようになる。マウス初期胚においては、YAP は外側の割球においては核内、内側の割球においては細胞質内に局在し、この特徴的な局在様式は Hippo 経路と呼ばれるシグナル伝達経路により制御される [43]。割球同士の位置関係が確立されると、内側の割球でのみ Hippo 経路が活性化する。Hippo 経路は、AMOT、LATS などのキナーゼを構成要素とするリン酸化カスケードであり、YAP はその最下流に位置し Hippo 経路活性化時にリン酸化修飾を受ける。リン酸化された YAP は核内への移行が阻害され、結果として内側に位置する割球では TEAD4 による下流遺伝子の誘導が行われず、ICM 系列へと分化する。対して、外側に位置する割球では Hippo 経路が活性化せず YAP は脱リン酸化状態にあり、核内に移行することで TEAD4 と協調し TE 関連遺伝子の発現が誘導されることで TE に分化する。

Hippo 経路は発生、疾病を含む様々な文脈において遺伝子発現調節、並びに、細胞増殖の調整に関与しており、その制御機構の解明が進められている [49]。一方、初期胚発生における Hippo 経路の挙動に関する研究は近年開始され、体細胞における制御機構との相同性、また、種間での制御機構の保存性など不明点が多い [43]。例えば、マウス体細胞では、分泌性タンパク質の一種である CCN2 が、TEAD4 による直接的な発現制御を受ける [50]。この TEAD4 による CCN2 の制御は Hippo 経路を介しており、CCN2 は多くの Hippo 経路研究において Hippo 経路活性化の指標として用いられる [51–53]。しかし、CCN2 が哺乳類初期胚においても同様に TEAD4 の制御を受けるかどうかはわかっていない。当研究室での過去の解析により、ウシ胚盤胞期胚において *TEAD4* および *CCN2* は TE 特異的に発現することが示され、両者が TE の分化もしくは発生に役割を果たすことが示唆された [39]。もし CCN2 が哺乳類初期胚においてもマウス体細胞と同様に TEAD4 の制御を受けることが分かれば、初期胚において Hippo 経路が、体細胞と同様の機構で活性化し、TE の形成に関与しているということが強く裏付けられる。

割球の相対位置が胚の運命決定を制御するという「内外モデル」は古くより提唱されてきたが、Hippo 経路はこのモデルの強力な分子的裏付けとなっている [43]。本章は、ウシ初期胚において Hippo 経路がマウス体細胞と同様の機構で活性化するかどうか、そして、それが胚盤胞形成時の細胞分化にどう関与するのかの解明を目的とした。はじめに、shRNA 媒介性の *TEAD4* 発現抑制 (KD)を行った。*TEAD4* KD 胚を胚盤胞期まで培養し、胚盤胞期までの発生率や、胚盤胞期における *CCN2* 等の TE 関連遺伝子の発現を解析することで、TEAD4 がマウス初期胚と同様ウシ初期胚においても胚盤胞形成に役割を果たすかどうか調べた。続いて、マウス体細胞で Hippo 経路を介した TEAD4 の主要下流因子の一つとして知られる CCN2 の発生ステージ別の発現動態や *CCN2* KD 胚の解析を行い、ウシ初期胚における CCN2 の役割を調べた。さらに、*CCN2* KD を行った胚盤胞期胚の細胞構成比を調べることで、*CCN2* KD による TE 関連遺伝子の発現低下の原因を探った。

材料と方法

本章の実験で使用した試薬および培地の組成は、付表 3 にまとめて記述した。

1. 体外培養または子宮灌流によるウシ胚の取得

体外成熟 (*in vitro* maturation: IVM)

株式会社 北海道畜産公社 道央営業所 早来工場早来食肉流通センターにおいてウシ卵巣を回収した。回収卵巣は 20°C で保存し、発泡スチロール容器に入れて研究室まで 2 時間以内に輸送した。卵巣から脂肪や卵管等の不要部分を切除し、生理食塩水 (0.85% (w/ v) NaCl)で 2 度洗浄した。採卵作業中の卵巣は乾燥を防ぐために 1000 mL 容のビーカー内で生理食塩水に浸して静置した。

採卵は 10 mL のシリンジ (Terumo、Tokyo、Japan)に 18G の注射針 (Terumo)を装着して行った。直径が 2 mm 以上 8 mm 以下の卵胞を選んで、その近傍に注射針を差し込んだ。シリンジを引いて内部を引圧にした状態で針の先を濾胞内に進め、引圧により卵胞液とともに卵丘細胞卵子複合体 (cumulus – oocytes complex: COCs)をシリンジの内部に吸引した。これを繰り返し、シリンジ内部の卵胞液がある程度たまった段階でこれを 10 mL のスピッツ管 (PP スピッツ、栄研化学株式会社、Tokyo、Japan)に移した。卵胞液吸引後、スピッツ管の底に沈殿した夾雑物の中に混じった COCs を、卵胞液とともにパスツールピペット (Pasteur Pipette、アズワン株式会社、Osaka、Japan)を用いて採取し、それを滅菌シャーレ (γ 滅菌 NE シャーレ、栄研化学株式会社)上に展開した。観察しやすくするために、ウォーターバス (RACOMACE HT100、アズワン株式会社)にて 38.5°C に加温しておいた PB1 (付表 3)で卵胞液を希釈した。続いて、35 mm のペトリ皿 (BECTON DICKINSON Labware、 New Jersey、USA)を PB1 で満たし、滅菌シャーレ上の COCs をキャピラリーにより吸い上げ、ペトリ皿の中に移した。なおキャピラリーは、ヘマトクリット管 (Heamatocrit capillaries、HIRSCHMANN LABORGERATE、Baden-Württemberg、Germany)をアルコールランプの炎で

あぶり、口径が 300 μm 程度になるよう手で引き伸ばしたものを使用した。

体外受精に供する卵子は、細胞質や卵丘細胞が変性していないか、3 層以上の卵丘細胞に覆われているかどうかを基準とし、選別を行った。次に、60 mm のペトリ皿 (BECTON DICKINSON Labware)の 9 か所に TCM199 培地 (付表 3)で 50 μL のドロップを作り、それを半分ほどパラフィンオイル (Nacalai tesque、Kyoto、Japan)で覆い、各ドロップにさらに 50 μL の TCM199 培地を添加し、ドロップが完全に覆われるまでパラフィンオイルを注ぎいれた。体外成熟培養には、このペトリ皿を 38.5°C、5% CO_2、湿度 100%に設定したインキュベーター (Forma Series II 3110 Water-Jacketed CO_2 Incubators、Thermo、Waltham、MA、USA)で 5 時間以上平衡化したものを使用した。COCs を 20 個/ 1 ドロップ (100 μL)の割合でドロップに移し、インキュベーター内で平衡化した。

体外受精 (*in vitro* fertilization: IVF)

体外受精にはジェネティクス北海道から分与していただいたホルスタインの凍結精液を使用した。水筒に 38.5°C の温水を用意し、凍結精液のストローを液体窒素から素早く取出して 20 秒温水に浸すことで融解した。あらかじめ濾過滅菌し、15 mL 試験管で平衡化した B.O.培地に 2.5 mM のテオフィリンを添加した、修正 B.O.培地 [54] (付表 3) 10 mL で、融解精液を希釈した。さらに 600 × *g*、7 分間室温で精子懸濁液を遠心し、上清を除去したのち新たに修正 B.O.培地を 510 μL 添加した。ピペッティングによる懸濁後に、ここから 10 μL の混合液をとり、990 μL の 3 %食塩水で希釈して、血球計算板 (エルマ販売株式会社、Tokyo、Japan)で精子濃度を測定した。終濃度が 5.0×10^6 cells/mL になるように混合液に B.O.培地を添加し、ペトリ皿作製までインキュベーター内で平衡化した。続いて 60 mm のペトリ皿に、修正 B.O.培地に 0.6% (w/v) Bovine serum albumin (BSA)および 0.015 mg/mL のヘパリンナトリウム (Nacalai tesque)を添加した BSA 添加 B.O.培地 (付表 3)で 50 μL のドロップを作った。これをパラフィンオイルで半分ほど覆い、さらにこのドロップに精子混合液を 50 μL 添加す

ることで 100 μL のドロップとした。ドロップが完全に覆われるまでペトリ皿内をパラフィンオイルで満たした。卵丘細胞が粘性を帯び、体積が著しく増大していることを確認した、体外成熟培養開始から 22 時間の卵子をキャピラリー操作により TCM199 培地から精子調整 B.O.培地に移し、38.5°C、5% CO_2、湿度 100%のインキュベーターで培養した。IVF を開始した時刻を D0 とした。

体外発生培養 (*in vitro* culture: IVC)

媒精から 6 時間後に、卵丘細胞をピペッティングにより除去した。除去が完了したら、100 μL のドロップ 1 個あたりに受精卵 20 個の割合で、あらかじめ 12 時間以上平衡化しておいた修正 SOF 培地 (mSOF 培地 [55]、付表 3)に移した。以後 7 日間インキュベーター内で体外培養を行い、胚盤胞期胚まで発生させた。

子宮灌流による D14 生体胚の取得

人工授精に供した日を Day 0 とし、Day -20 に 25 mg のプロスタグランジン (PGF2α) (Schering – Plough K. K.、Tokyo、Japan) を黄体期の供試牛に投与した。PGF2α を投与することで黄体を退行させ、黄体退行後に同調して排卵が起きてくることを利用して発情同期化を行った。その後 Day -9 に CIDR (黄体ホルモン徐放性製剤; 家畜改良事業団、Tokyo、Japan) を膣内に留置し、新たな卵胞発育の開始を阻止した。Day -5 に卵胞発育の開始を促進させるため 7 AU の卵胞刺激ホルモン (Follicle-Stimulating Hormone: FSH) (川崎三鷹製薬、Tokyo、Japan)を午前と午後の計 2 回筋肉内投与し、また Day -4 においても 6 AU の FSH を午前と午後の計 2 回筋肉内投与した。Day -3 の午前中に CIDR を抜去し、午前には 20 mg の PGF2α および 4 AU の FSH を筋肉内投与した。Day – 1 の午後に 200 μg のゴナトロピン (Gonadotropin releasing hormone: GnRH) (あすか製薬株式会社、Tokyo、Japan)を投与し、発情確認の 16 時間から 20 時間後にホルスタイン凍結精液を用いて人工授精を行った。卵巣に黄体が形成さ

れていることをエコーで確認し、Day 14 まで胚を母体内で発生させた。Day14 に、バルーンカテーテル法により左右の子宮角にそれぞれ別々にハルゼン液 (全薬工業、Tokyo、Japan)を流し込み胚の回収を行った。

2. 定量 PCR による相対発現定量

RNA 抽出

発生ステージ間での *CCN2* mRNA の発現量を比較するため、第二減数分裂中 (MII)期の卵子、2 細胞期胚、4 細胞期胚、8 細胞期胚、16 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞期胚からそれぞれ RNA 抽出を行った。MII 期の卵子は、体外成熟培養開始から 22 時間後の COCs をヒアルロニダーゼで処理し、卵丘細胞を取り除いたのち、第一極体の放出を視認できたものを供試した。各ステージの卵子および胚を 0.05% (w/v)のプロテイナーゼ K で処理し、さらに数回ピペッティングすることにより透明帯を除去した。これを 0.2% (v/v) polyvinilalcohol (PVA)入り PBS (–)で 3 回洗浄したのち、PBS (−)でさらに 3 回洗浄し、1.5 mL のチューブに 100 μL で分注した、1% (v/ v)トリグリセロール入りの BL Buffer に移し、次の操作までの間–80°C で保存した。卵子または胚 5 つにつき 1 サンプルとし、ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega、Madison、WI、USA)を用いてキットの推奨プロトコールに従って total RNA を 8 μL の Nuclease free water に抽出した。

cDNA 合成

抽出した RNA サンプル 8 μL を、高次構造を解除するために 65°C、5 分間加熱し直後に急冷した。ここに 2 μL の ReverTraAce qPCR RT MasterMix (TOYOBO、Osaka、Japan)を加え、全体の液量を 10 μL に調整したのち、37°C で 15 分間、50°C で 5 分間、98°C で 5 分間、サーマルサイクラー (GeneAtlas、astec、Fukuoka、Japan)でインキュベートすることにより逆転写反応を行った。逆転写反応により得られた cDNA 溶液は、使用時まで−20°C で保存した。

定量 PCR

氷上で、THUNDERBIRDTMSYBR®qPCR MIX (TOYOBO)を 5 μL、フォワードプライマーおよびリバースプライマー (付表 1. 参照) (5.0 μM)各 1.0 μL 、cDNA 溶液を滅菌水で 4 倍希釈したテンプレート溶液 1.0 μL、滅菌水 2.0 μL を混合し、96 ウェルプレート (Roche Diagnotics、Indianapolis、IN、USA)にアプライした。卓上遠心機 (Mini plate spinner centrifuge、Labnet、Edison、NJ、USA)で反応液をスピンダウンし、Light Cycler®480 System II (Roche、Basel、Swizerland)にプレートを挿入し反応を開始した。反応条件は、95°C 30 秒を 1 サイクル、95°C 10 秒、(プライマーごとのアニーリング温度)15 秒、72°C 30 秒を 60 サイクルで行い、最後に 95°C 10 秒で一度変性させてから 65°C 15 秒の後、95°C まで毎秒 0.19°C ずつ加熱することにより融解曲線を作成し、増幅産物の特異性を確認した。各遺伝子について 3 回独立したサンプルを使用し繰り返し実験を行い、得られた Ct 値から ΔΔCt 法による相対発現レベルの比較を行った。

3. 免疫染色

卵子および胚を 0.05% (w/ v)のプロテイナーゼ K で処理し、さらに数回ピペッティングすることにより透明帯を除去した。続いて、固定液 (4% (w/ v) パラホルムアルデヒド, 0.2% (v/ v) PVA/ PBS (−))に卵子および胚を移し、室温で一時間静置した。固定後の胚は 0.2% PVA/ PBS (−)で 3 回洗浄し、使用時まで 0.2% PVA/ PBS (−)に入れ 4°C で保存した。卵子および胚を透過液 (0.2% (v/ v) TritonX-100/ PBS (−))に浸し室温で 1 時間静置し、洗浄液 (0.1% (v/ v) TritonX-100, 0.3% (w/ v) BSA/PBS (−))にて室温、10 分間の洗浄を 3 回行った。PBST (0.05% (v/ v) Tween20 / PBS (−))で 5 倍希釈したブロッキングワン (Nacalai Tesque, inc)に卵子および胚を浸し、室温で 45 分間静置することによりブロッキングを行った。一次抗体の希釈は、PBST で 20 倍希釈したブロッキングワンで行い、CCN2 (rabbit polyclonal, ab6992, abcam, Cambridge, UK)は 300 倍、TEAD4 (mouse monoclonal, ab58310, abcam)は 1500 倍、CDX2 (rabbit

monoclonal, ab76541, abcam)は 200 倍に希釈した。一次抗体の反応条件は、CCN2 が 4°C で一晩、TEAD4 が室温で 2 時間、CDX2 が 37°C で一晩で行った。洗浄液で室温、10 分間の洗浄を 5 回行い、PBST で 20 倍希釈したブロッキングワンで 400 倍希釈した二次抗体 (Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG polyclonal (ab150082; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham MA, USA)または Alexa Fluor 488 goat anti- mouse IgG H&L (ab150113, Thermo Fisher Scientific, Inc.)) で室温、30 分間遮光条件下で抗体反応を行った。洗浄液で室温、10 分間の洗浄を 5 回行い、0.2% (w /v) PVA/ PBS (−)で 25 μg/ mL となるよう希釈した Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)で室温、5 分間核染色を行った。スライドガラスへのマウントは VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, inc., Burlingame, CA, USA)により行い、カバーガラスの縁をマニキュアで塗り固めることにより封入した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5II, Leica Microsystems, Welzlar, Germany.)により行った。

4. shRNA による *CCN2* および *TEAD4* の発現抑制 (KD)

shRNA 発現ベクターの構築

shRNA 発現ベクターの構築は、pBAsi mU6 Neo DNA vector (タカラバイオ株式会社、Shiga、Japan)の、mU6 プロモーター直下に位置するマルチプルクローニングサイト (Multiple cloning cyte: MCS)に、人工的に合成した二本鎖をライゲーションすることにより行った。

siDirect (http://sidirect2.rnai.jp/)によって、ノックダウンを行う遺伝子の標的配列を選択し、BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)で標的配列にオフターゲットが存在しないことを確認した。制限酵素 BamHI (和光純薬工業株式会社、Osaka、Japan)認識配列-標的配列の top strand-ヘアピンループ配列 (5′-CTGTGAAGCCACAGATGGG)-標的配列の bottom strand-ターミネータ配列-制限酵素 HindIII (和光純薬工業株式会社)認識配列によって構成される一本鎖 DNA を設計した。また、それに対して相補的な一本鎖 DNA も同様に設計した (付表 2)。これら一対の一本鎖 DNA をアニーリングし二本鎖 DNA を合成するため、10x ア

ニーリングバッファー (100 mM)、100 μM top strand オリゴ DNA、および 100 μM bottom strand オリゴ DNA それぞれ 2.0 μL を混合し、滅菌水で 20 μL に調製した。その後、サーマルサイクラー (PROGRAM TEMP COMTROL SYSTEM PC-815、ASTEC、Chattanooga、TN、USA)で 95°C 5 分間で直鎖状にし、30 分間かけて 25°C まで冷却することでゆるやかに二本鎖オリゴ DNA の合成を行った。合成後の二本鎖オリゴは、5′側と 3′側にそれぞれ BamHI、HindIII で生成されるものと同様の突出末端を持つ。合成後に 2% (w /v)のアガロースゲルで電気泳動し、オリゴ DNA の二本鎖形成を確認後、二本鎖オリゴ DNA 終濃度が 10 μM となるように滅菌水で調製した。アガロースゲルは、TBE (付表 3) 100 mL に、Agarose S (和光純薬株式会社) 2 g、10 mg/ mL のエチジウムブロマイド 1 μL を加えたものを電子レンジで加熱し、冷ましたものを使用した。

ベクター1 μg に対し、1 μL の BamHI、HindIII、および 2 μL の 10 x B Buffer を添加し、滅菌水で 20 μL に調整した。これを 37°C で一晩インキュベートすることによりベクターを直鎖化した。アガロースゲル電気泳動によりベクターの直鎖化を確認したのち、消化産物に等量のフェノール・クロロホルムを添加し、ボルテックスにより撹拌した。室温、10,000 × *g* で 5 分間遠心し、上清を回収、10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウムと、等量のイソプロパノールを添加し混和してから、4°C で一晩静置した。室温、17,400 × *g* で 20 分間遠心し、上清を除去したのち、75% (v / v) エタノールを 100 μL 添加し、軽く混和後、17,400 × *g* で 5 分間遠心し、上清を除去した。真空乾燥を 15 分間行い、10 μL の滅菌水に溶解した。

直鎖化したベクター30 ng、合成二本鎖オリゴ 1 μM、2 x Rapid Ligation Buffer 5.0 μL、T4 DNA Ligase (Promega) 0.3 μL を混合し滅菌水で総量 10 μL に調整し、4°C で一晩静置することによりライゲーションを行った。

ライゲーション反応液に、100 μL の JM109 (Promega)ケミカルコンピテントセルを加え、タッピングで穏やかに攪拌した後 30 分間氷冷した。続いて、42°C に加温したヒートブロックで 45 秒間加温し、直後に 2 分間氷冷した。ここに 1 mL の SOC 培地、10 μL の 2 M グル

コース、1 μl の 1 M $MgSO_4$ を加え、80 rpm で振盪しながら 37°C で 70 分間インキュベートした。培養後、3,000 rpm、3 分間で遠心して大腸菌を沈殿させ、上清を 1 mL 取り除いた。残った上清で大腸菌を懸濁し、LB 寒天培地に播種した。ガラス棒を変形させて作成したスプレッダーを火炎滅菌し、それを用いて懸濁液を培地上に十分に塗布した。その後 37°C で 16 時間インキュベートした。

LB 寒天培地に形成された白色の大腸菌コロニーのひとつを、滅菌済みのつまようじを用いて少量採取し、試験管 (9820 Test Tube without Rim、Corning、Corning、NY、USA)に加えた 3mL の LB 培地に移した。これを、37℃で 16 時間、45 度に傾けた状態で 180 rpm で振盪しながらインキュベートし、大腸菌を増殖させた。大量培養後、2 mL チューブ (Safe-Lock Tube 2.0 ml、eppendolf)に培養液を 2mL 回収し、EZgene EndoFree Plasmid MinipreII (BIOMIGA、San Diego、 CA、USA)により、キットのプロトコールに従いプラスミドの精製を行った。

構築したコンストラクトをシーケンスすることにより、変異の有無を確認した。シーケンス用 PCR は BigDye Terminator v1.1 (Applied Byosystem, Waltham, MA)を用いて行った。添付の 5×Sequencing Buffer 2.0μL、M13primer (forward) 0.5μL (表 3)を混合し、そこに 100 ng/ μL に調整したテンプレート 0.5 μL を加え、添付の Terminator Ready Reaction Mix を 0.25μL 加えた。なお、以上の作業は全て氷上かつ遮光条件下において行った。作製した PCR 反応液を直ちにサーマルサイクラー (PROGRAM TEMP COMTROL SYSTEM PC-815、ASTEC)にセットし、96°C、1 分間で熱変性させ、その後 96°C、 30 秒間の熱変性反応、50°C 15 秒間のアニーリング反応、60°C 4 分間の伸長反応を 25 サイクル繰り返し、目的配列を増幅した。続いて、PCR 産物に 3M 酢酸ナトリウム 1 μL、100% EtOH 30 μL を加え、タッピング、フラッシュを行ってから 15 分間室温で放置した。続いて 15,000 rpm、20°C で 20 分間遠心分離を行い、上清を除去したのち 70% (v /v)の EtOH 125 μL を加えた。次に、15,000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離を行い、上清を除去してから、20 分間真空乾燥器内で真空乾燥を行った。乾燥したペレットに Hi-Di Formamide (Applied Biosystems)を 20 μL 加え、チューブミキサー

(TOMY MICRO TUBE MIXER MT-360、株式会社トミー精工、Tokyo、Japan)で 3 分間混合した。続いて，サーマルサイクラー (PROGRAM TEMP COMTROL SYSTEM PC-815、ASTEC)を用いて、95°C で 2 分間熱変性させ、その後急冷した。以上の要領でテンプレートの DNA を増幅および抽出したのち、シーケンサ (310 Genetic Analyzer、Applied Biosystems)のプロトコールに従いシークエンスを行った。

ウシ 1 細胞期胚へのマイクロインジェクション

媒精終了後 10 から 12 時間後の受精卵より、卵丘細胞をピペッティングにより除去したものにインジェクションを行った。操作にはピエゾドライブ (Primetech LTD、 Ibaraki、Japan)を用いた。操作用ドロップとして 100 mm ディッシュのフタに 10 μL の PB1 (付表 3)微小滴を作製しオイルで覆ったものを使用した。目的配列の導入を確認したコンストラクトを 10 ng/μL の濃度になるよう 0.22 μm フィルターで滅菌済みの 5 mM Tris-0.1 mM EDTA 溶液 (pH7.4)で希釈しコンストラクト溶液とした。インジェクションには芯なしガラス管(G-1, Narishige、Tokyo、Japan)をプーラーで引き伸ばしたものを使用した。ピペットの後端から、マウスピースに接続したガラスキャピラリーを用いてフロリナート(FC-770、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)を約 2 μL 注入し、インジェクター (Cell Tram、Eppendolf、Hamburg、Germany)に接続されたピペットホルダーに装着した。インジェクターの陽圧でフロリナートをピペットの先端に移動させ、PB1 で 8% (w/ v)となるよう調整したフィルター滅菌済みの PVP (分子量 360,000、Sigma-Aldrich)を数回吸い吐きすることによりピペットの中を洗った。PVP を吐き切り、再びピペットの先端までフロリナートを移動させてから、コンストラクト溶液を吸い、操作用ドロップへ移動した。続いて胚をインキュベーターから 10〜20 個取り出し、操作用ドロップに移した。胚をホールディングピペットで固定し、インジェクションピペットの先端を透明帯に接触させた。この状態で、ピエゾドライブにより強度 4 のパルスをかけ、ピペットを透明帯に貫通させた。続いてピペットの先端を細胞質領域まで進め、

ピエゾドライブにより強度 2 のパルスを一度だけかけることによりピペットを細胞膜に貫通させた。細胞質全体がわずかに膨らむ程度の量コンストラクト溶液を注入し、ピペットを胚から迅速に引き抜いた。注入終了後、直ちにインキュベーター内で平衡化していた 100 μL の mSOF 培地微小滴へ移し、体外培養に供した。

結果

インジェクションにおけるコントロールの評価

TEAD4 KD 胚について解析を行う前に、標的配列を持たないプラスミド (空ベクター)を注入し、そのコントロールとしての妥当性を評価した。卵丘細胞の裸化後、インジェクションを行わずに直ちに体外培養に供試した胚 (Uninjected)、空ベクターをインジェクションした胚 (Empty)、そして *EGFP* (enhanced green fluorescent protein)配列を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚 (sh*egfp*)をそれぞれ胚盤胞期まで培養し、定量 PCR 法により *TEAD4*、*CCN2*、*CDX2*、*GATA2* および *GATA3* の相対発現レベルを比較した。Empty と sh*egfp* を比較することで、発現ベクターからの shRNA の発現自体が実験結果に影響を及ぼすかどうか知ることができる。Uninjected、Empty、および sh*egfp* の三区間で、解析を行ったすべての遺伝子について発現レベルに有意差はみられなかった (図 1)。したがって、これ以降の実験では、*TEAD4* KD 胚を含む KD 胚のコントロールとして空ベクターを採用した。

TEAD4 KD による、発生率および TE 関連遺伝子の発現レベルへの影響

TEAD4 KD 胚では、コントロールと比較して胚盤胞期における TEAD4 の発現が mRNA とタンパク質の両方のレベルで低下していた ($P < 0.05$、 mRNA レベルでコントロールに対し 34.5%) (図 2、3)。*TEAD4* KD 胚とコントロールで、卵割率および胚盤胞期までの発生率に有意差はみられなかった (表 1)。コントロール胚に比べ、*TEAD4* KD 胚においては *CDX2*、*GATA2*、*CCN2* mRNA の相対発現レベルが有意に低下していたが、*GATA3* mRNA の相対発現レベルには有意差はなかった ($P < 0.05$、 コントロールに対し *CDX2*: 60.0%、 *GATA2*: 56.2%、 *CCN2*: 9.2%、 *GATA3*: 94.4%) (図 4)。*TEAD4* KD 胚においては、胚盤胞期における CCN2 タンパク質の発現がコントロールと比べ低下していた (図 5)。

発生ステージごとの、*CCN2* mRNA およびタンパク質発現レベル

TEAD4 KD による発現の変化が最も大きかった CCN2 に着目し、初期胚発生における CCN2 の発現動態について調べた。はじめに、MII 期卵子と、2、4、8、16 細胞期、桑実期、胚盤胞期の各ステージの胚について定量 PCR 法により *CCN2* mRNA の相対発現定量を行った。*CCN2* mRNA は解析を行ったすべての発生ステージにおいて検出された (図 6)。*CCN2* mRNA 発現レベルは、16 細胞期以降に、8 細胞期以前と比べて有意に低下していた ($P < 0.05$)。また、胚盤胞期に比べ、D14 の伸長期胚においては *CCN2* mRNA の発現レベルが有意に上昇していた ($P < 0.05$、図 7)。続いて、免疫染色法により CCN2 タンパク質の局在を、各発生ステージにおいて解析した。mRNA と同様、CCN2 タンパク質も解析したすべてのステージにおいて発現していた (図 8)。CCN2 タンパク質は、全ステージにおいて細胞質と核の両方において検出されたが、核におけるシグナルは桑実期胚と胚盤胞期胚において強くなった (図 8)。

***CCN2* KD による、発生率および分化関連遺伝子の発現レベルへの影響**

CCN2 mRNA を標的とするコンストラクトをインジェクションした胚 (*CCN2* KD 胚)では、コントロールと比較して CCN2 の胚盤胞期における発現が mRNA とタンパク質の両方のレベルで低下していた ($P < 0.05$、 コントロールに対し 12.2%) (図 9、10)。*CCN2* KD 胚とコントロールで、卵割率および胚盤胞期までの発生率に有意差はなかった (表 2)。コントロール胚に比べ、*CCN2* KD 胚においては *CDX2*、*GATA2*、*TEAD4* mRNA の相対発現レベルが有意に低下していたが、*GATA3* mRNA の相対発現レベルには有意差はなかった ($P < 0.05$、 コントロールに対し *CDX2*: 43.6%、 *GATA2*: 70.2%、 *TEAD4*: 41.7%、 *GATA3*: 98.6%) (図 11)。*CCN2* KD 胚においては、胚盤胞期における TEAD4 タンパク質の発現がコントロールと比べ低下していた (図 12)。

CCN2 KD による、ICM/ TE 細胞構成比への影響

胚盤胞期において CDX2 の免疫染色を行い、CDX2 陽性細胞を TE、陰性細胞を ICM と判定して細胞数を計測した。ICM および TE の細胞数および総細胞数には *CCN2* KD 胚とコントロール間で差がなかったが (図 13)、ICM に対する TE の比は、*CCN2* KD 胚で有意に低下していた ($P < 0.05$) (図 14)。

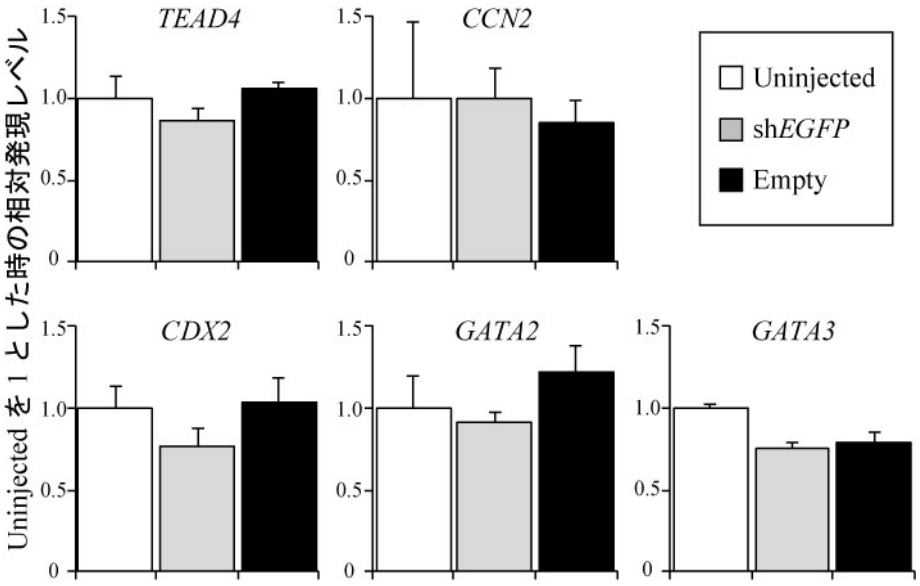


図 1. インジェクションおよび標的配列の有無が遺伝子発現に与える影響

インジェクション操作を行わずに培養に供した胚 (Uninjected)を 1 とした時の、空ベクターをインジェクションした胚 (Empty)、EGFP 配列を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚 (sh*egfp*)の、胚盤胞期における各遺伝子の相対発現レベルの平均値を表す。エラーバー: S.E.M.

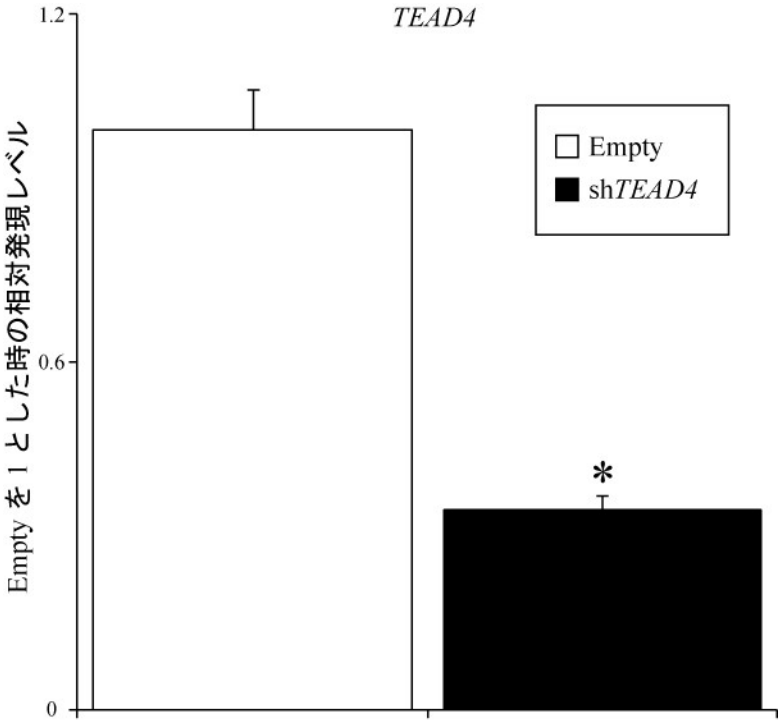


図 2. *TEAD4* KD による、*TEAD4* mRNA 発現への影響

空ベクターをインジェクションした胚 (Empty)を 1 とした時の、*TEAD4* を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚 (sh*TEAD4*)における *TEAD4* mRNA の相対発現レベルの平均値を表す。エラーバー: S.E.M. *$P < 0.05$

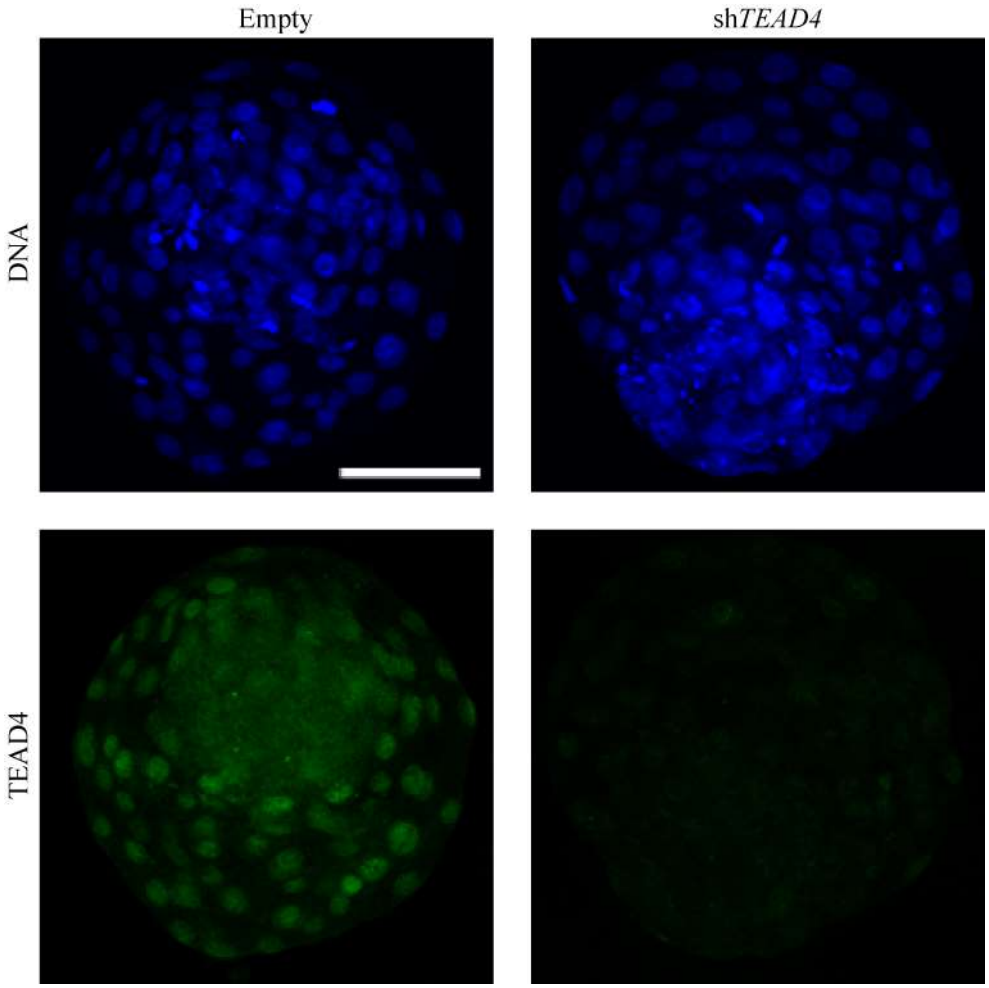


図 3. *TEAD4* KD による、TEAD4 タンパク質発現への影響

DNA: Hoechst による核染色像、TEAD4: TEAD4 の免疫染色像。Empty: 空ベクターをインジェクションした胚、sh*TEAD4*: *TEAD4* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚。スケールバー: 100 μm.

表 1. *TEAD4* KD による卵割率および胚盤胞期までの発生率への影響

処理	供試胚数	卵割率 (% ±S.E.M.)	胚盤胞期率 (% ±S.E.M.)
Uninjected	105	75 (71.4 ± 9.8)	32 (30.5 ± 10.8)
Empty	111	66 (59.5 ± 4.5)	22 (19.8 ± 1.8)
sh*TEAD4*	172	102 (59.3 ± 2.3)	40 (23.3 ± 2.2)

Uninjected: インジェクション操作を行わず培養した胚。Empty: 空ベクターをインジェクションした胚。sh*TEAD4*: *TEAD4* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚。

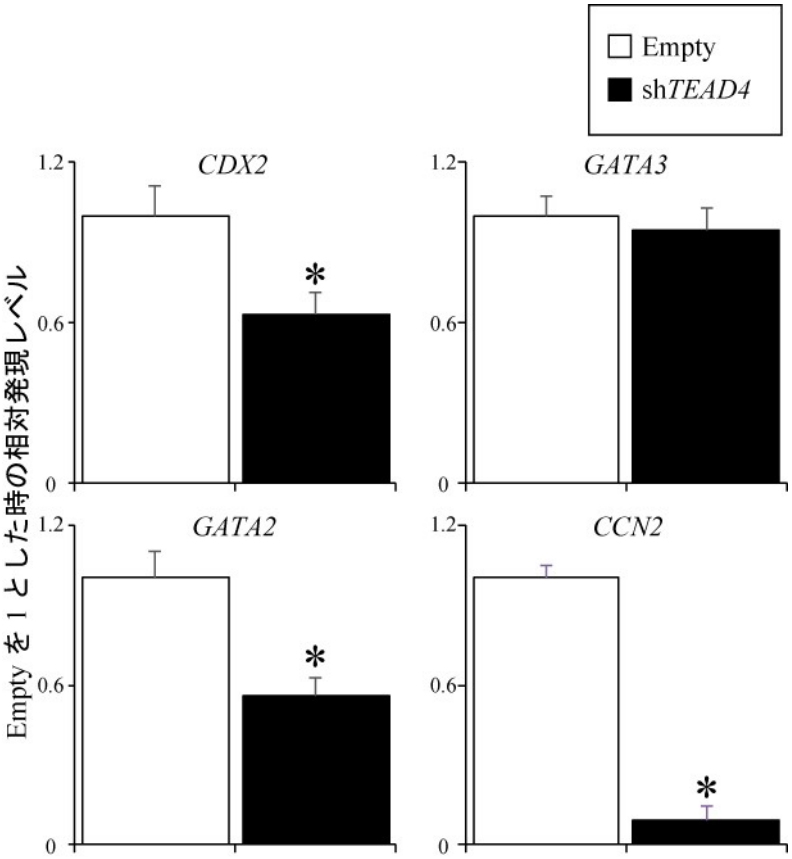


図 4. *TEAD4* KD による TE 関連遺伝子発現への影響

空ベクターをインジェクションした胚 (Empty)を 1 とした時の、*TEAD4* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚 (sh*TEAD4*)の、胚盤胞期における各遺伝子の相対発現レベルの平均値を表す。エラーバー: S.E.M. *$P < 0.05$.

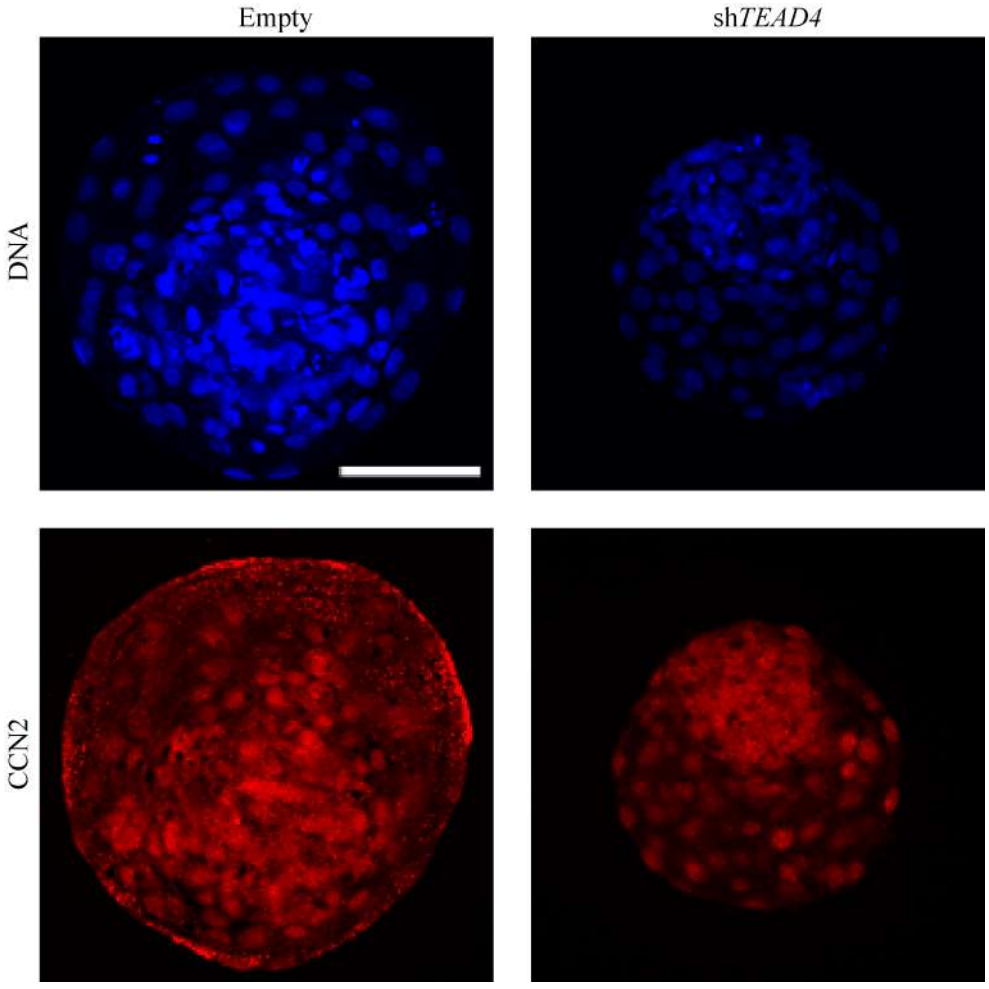


図 5. *TEAD4* KD による CCN2 タンパク質発現への影響

DNA: Hoechst による核染色像、CCN2: CCN2 の免疫染色像。Empty: 空ベクターをインジェクションした胚、sh*TEAD4*: *TEAD4* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚。スケールバー: 100 μm。

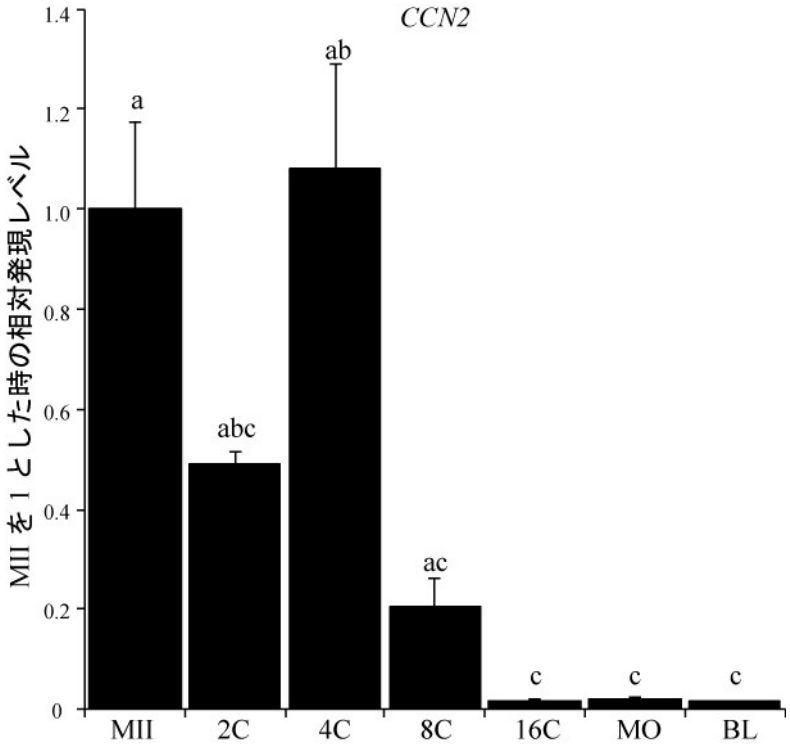


図 6. 発生ステージごとの *CCN2* mRNA 相対発現レベル

MII 期卵子を 1 とした時の、各発生ステージにおける *CCN2* mRNA の相対発現レベルの平均値を表す。MII: MII 期卵子、2C: 2 細胞期胚、4C: 4 細胞期胚、8C: 8 細胞期胚、16C: 16 細胞期胚、MO: 桑実胚、および BL: 胚盤胞期胚。エラーバー: S.E.M. $^{a\text{-}c}$ 異文字間に有意差あり ($P < 0.05$)。

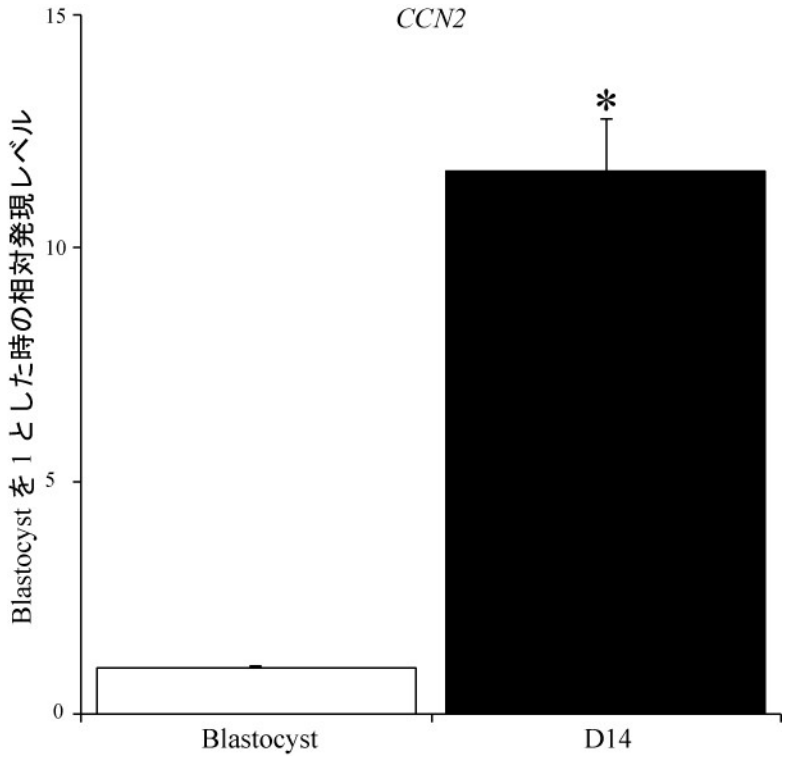


図 7. 胚盤胞期および D14 伸長期胚における *CCN2* mRNA 相対発現レベル

胚盤胞期胚 (Blastocyst)を 1 とした時の、D14 の伸長期胚 (D14)の *CCN2* mRNA の相対発現レベルの平均値を表す。エラーバー: S.E.M. **P* < 0.05。

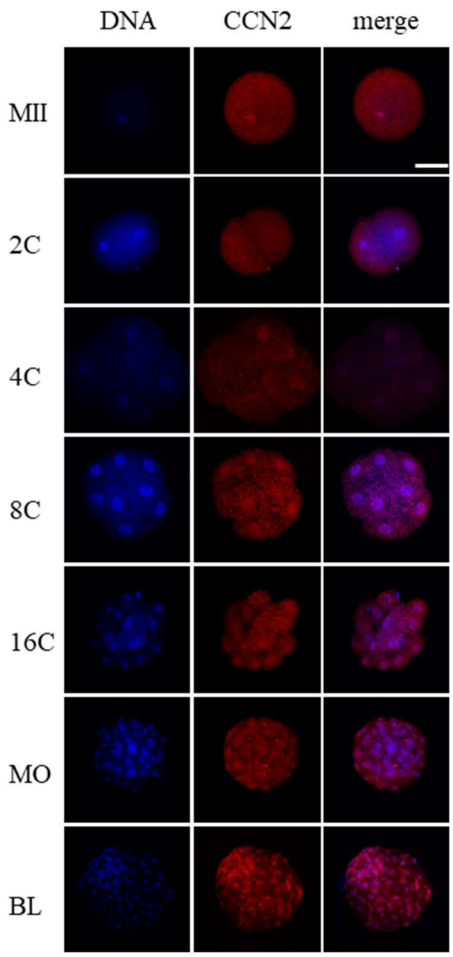


図 8. 発生ステージごとの CCN2 タンパク質の局在

DNA: Hoechst による核染色像、CCN2: CCN2 の免疫染色像、merge: 核染色と免疫染色の合成画像。MII: MII 期卵子、2C: 2 細胞期胚、4C: 4 細胞期胚、8C: 8 細胞期胚、16C: 16 細胞期胚、MO: 桑実胚、BL: 胚盤胞期胚。スケールバー: 100 μm。

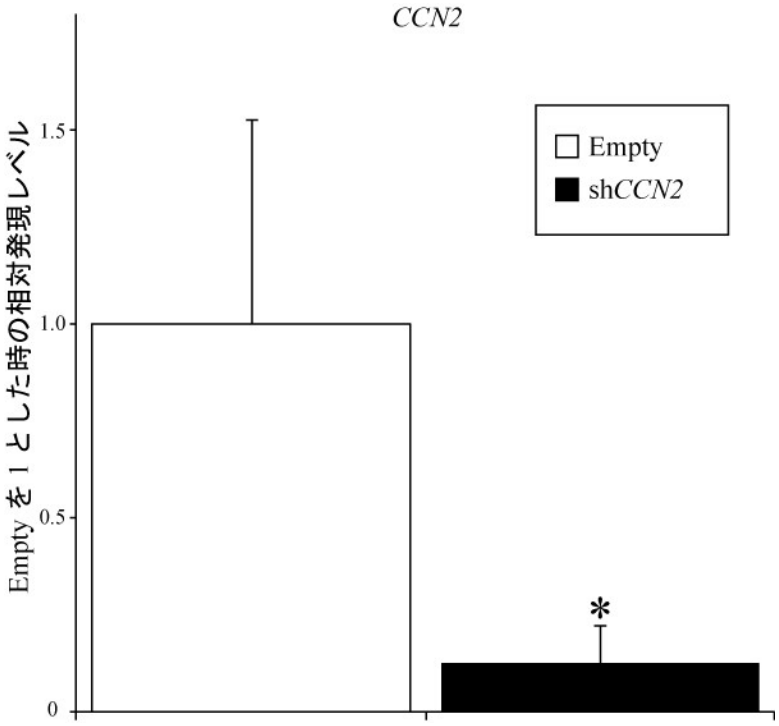


図 9. *CCN2* KD による、*CCN2* mRNA 発現への影響

空ベクターをインジェクションした胚 (Empty)を 1 とした時の、*CCN2* を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚 (sh*CCN2*)における *CCN2* mRNA の相対発現レベルの平均値を表す。エラーバー: S.E.M. *$P < 0.05$。

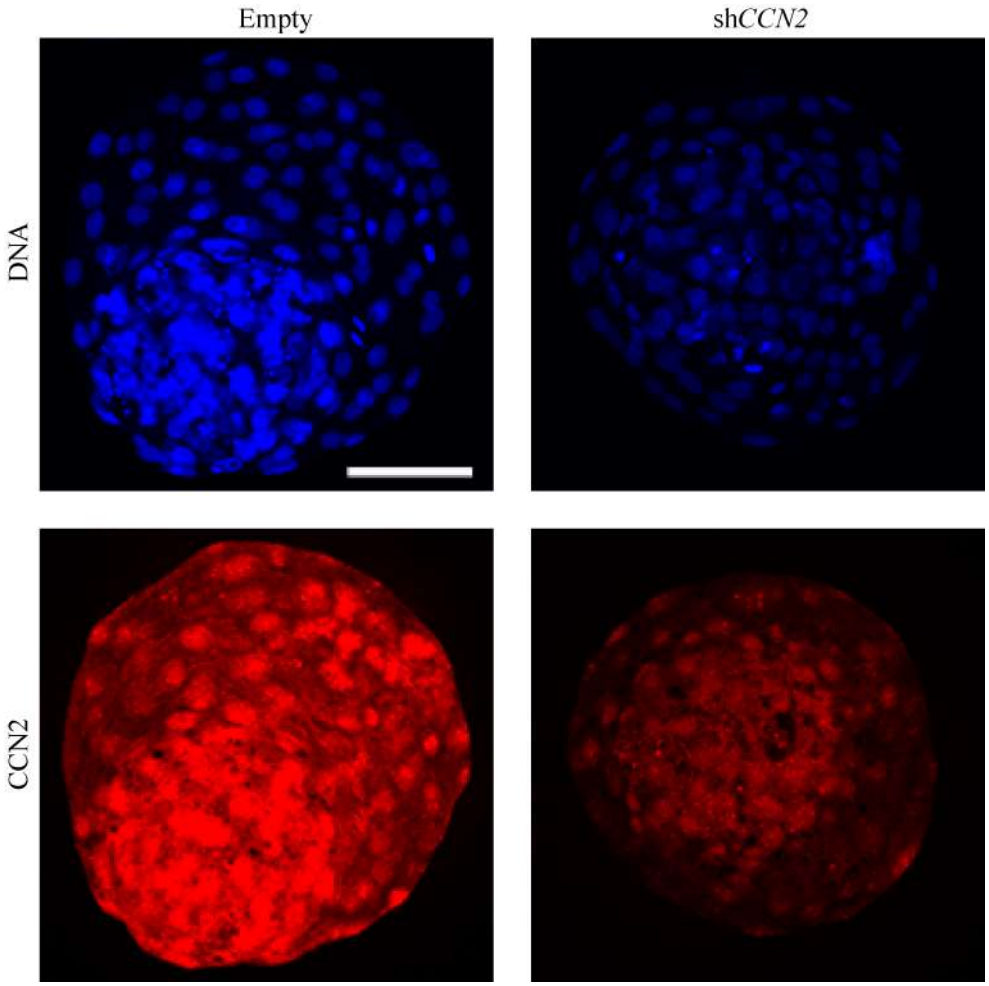


図 10. *CCN2* KD による、CCN2 タンパク質発現への影響

DNA: Hoechst による核染色像、CCN2: CCN2 の免疫染色像。Empty: 空ベクターをインジェクションした胚、sh*CCN2*: *CCN2* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚。スケールバー: 100 μm。

表 2. *CCN2* KD による卵割率および胚盤胞期までの発生率への影響

処理	供試胚数	卵割率 (%±S.E.M.)	胚盤胞期率 (%±S.E.M.)
Uninjected	171	129 (75.4±9.1)	45 (26.3±7.4)
Empty	182	143 (78.6±5.8)	41 (22.5±2.1)
sh*CCN2*	331	251 (75.8±7.4)	83 (25.1±5.1)

Uninjected: インジェクション操作を行わず培養した胚。Empty: 空ベクターをインジェクションした胚。sh*CCN2*: *CCN2* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚。

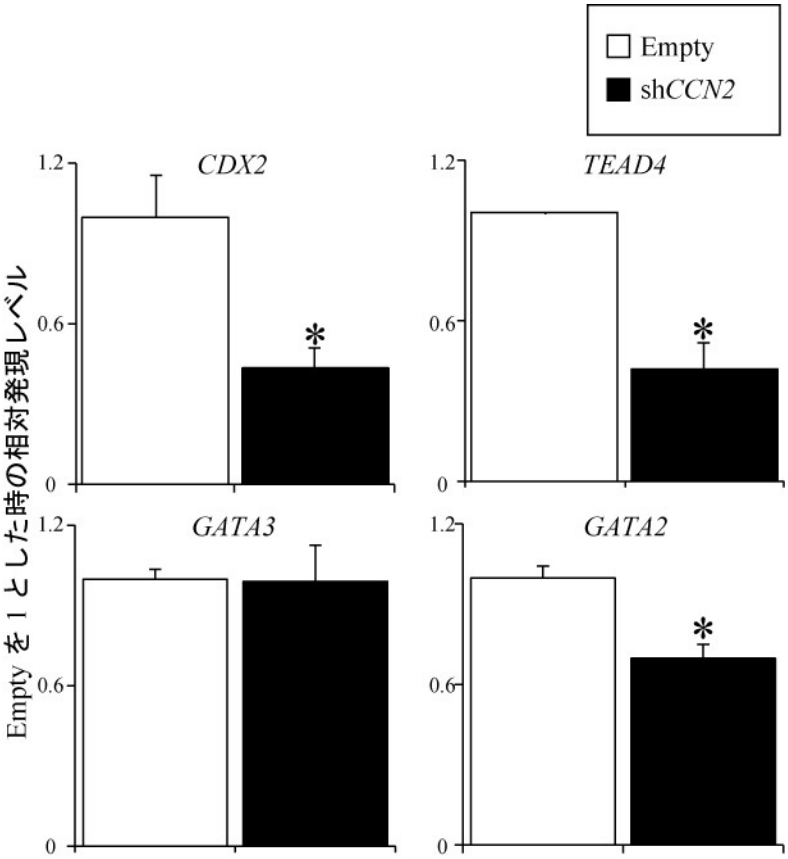


図 11. *CCN2* KD による TE 関連遺伝子発現への影響

空ベクターをインジェクションした胚 (Empty)を 1 とした時の、*CCN2* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚 (sh*CCN2*)の、胚盤胞期における各遺伝子の相対発現レベルの平均値を表す。エラーバー: S.E.M. **P* < 0.05。

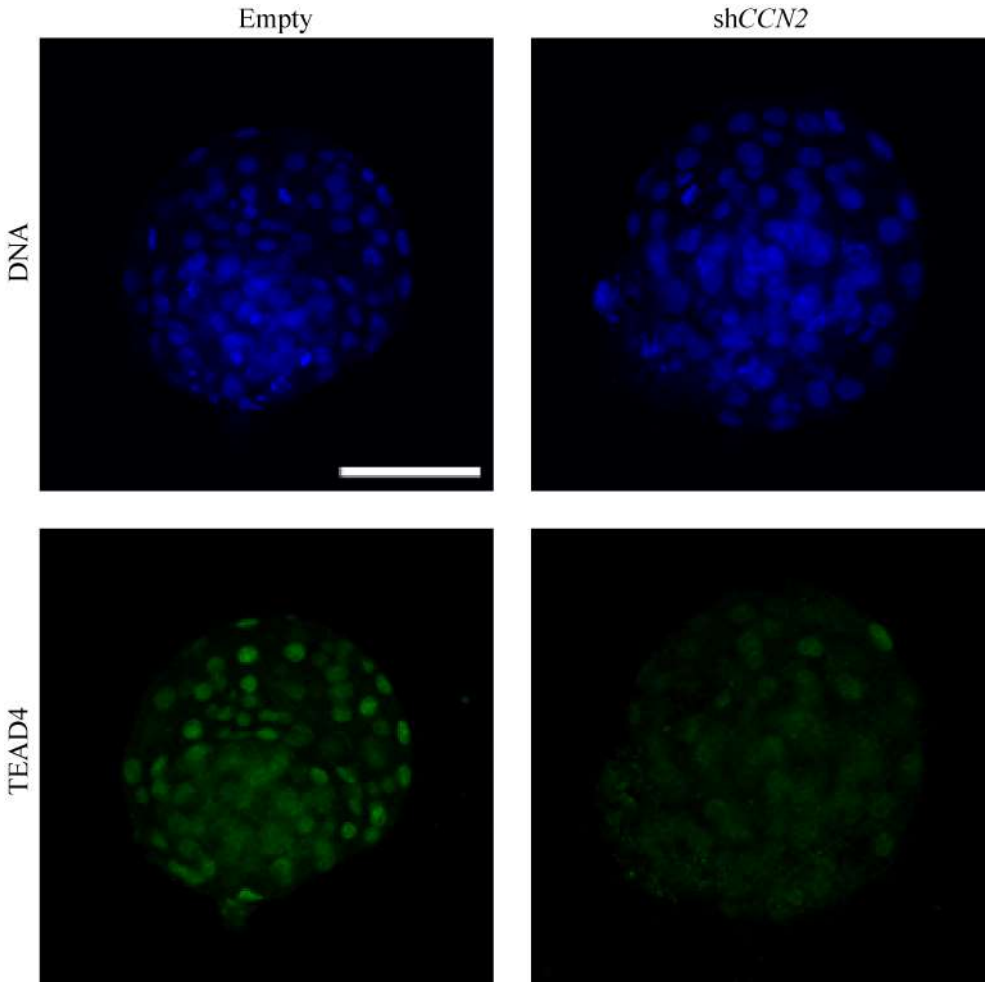


図 12. *CCN2* KD による、TEAD4 タンパク質発現への影響

DNA: Hoechst による核染色像、TEAD4: TEAD4 の免疫染色像。Empty: 空ベクターをインジェクションした胚、sh*CCN2*: *CCN2* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚。スケールバー: 100 μm。

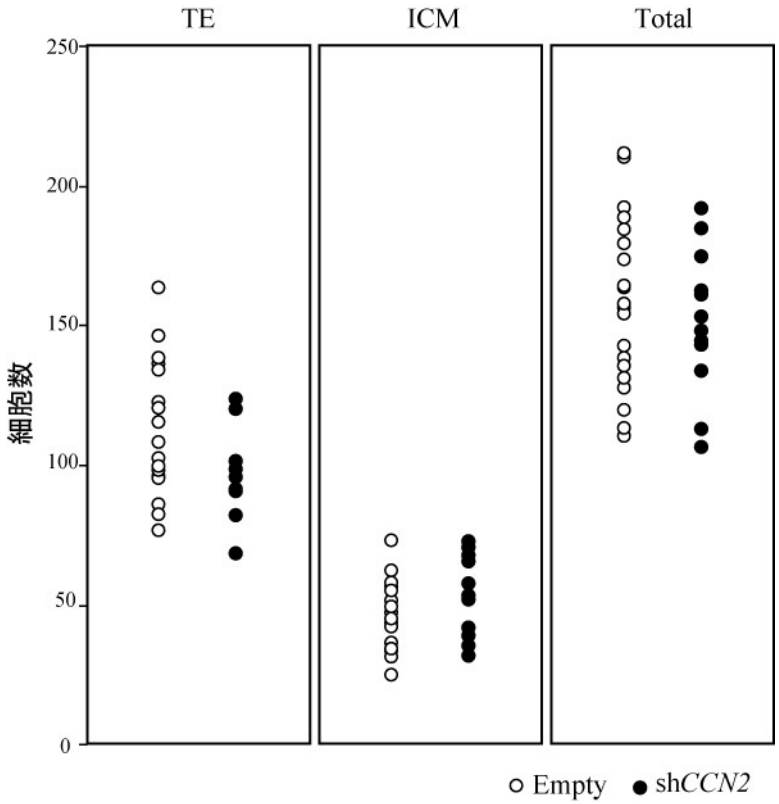


図 13. *CCN2* KD が、TE 細胞数、ICM 細胞数、および総細胞数に及ぼす影響

白丸は空ベクターをインジェクションした胚における細胞数、黒丸は CCN2 を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚における細胞数を表している。

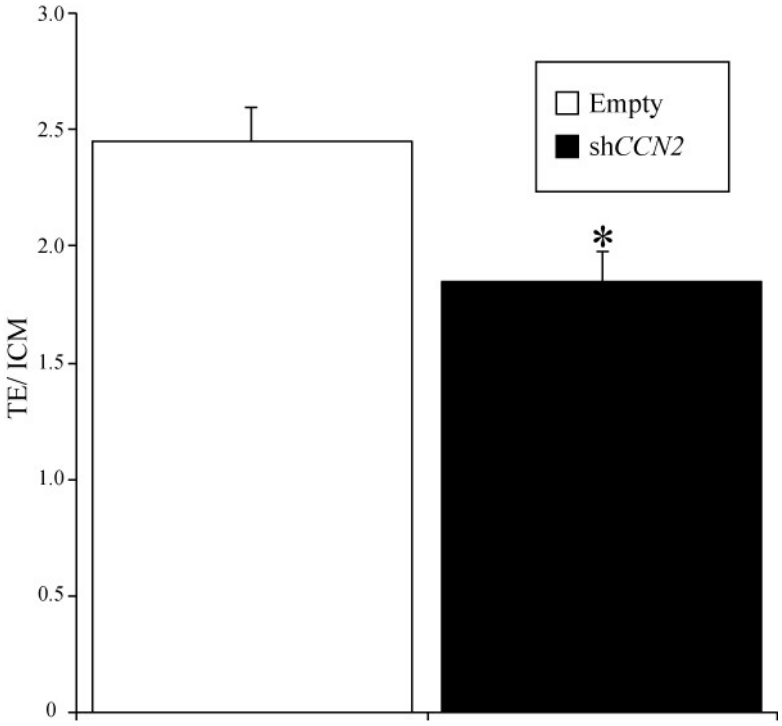


図 14. *CCN2* KD が、ICM に対する TE の比に与える影響

TE 細胞数を ICM 細胞数で割ったものの平均値を表す。Empty: 空ベクターをインジェクションした胚。sh*CCN2*: *CCN2* mRNA を標的としたコンストラクトをインジェクションした胚。エラーバー: S.E.M. *$P < 0.05$。

考察

マウス胚発生において、TEAD4 および CCN2 それぞれが果たす役割については、これまでに詳しく調べられてきた。TEAD4 はマウス胚において、CDX2 を制御するのと並行し、TE 系列の特異化に重要な転写因子 GATA3 をはじめ複数の遺伝子の発現を制御する [56]。そのため、*Tead4* 欠損マウス胚の表現型異常は *Cdx2* および *Gata3* それぞれ単独の欠損胚のそれと比べ深刻で、胞胚腔が形成されない [48]。一方 *Ccn2* 欠損マウスは通常のメンデル比で出生し、出生直後に致死となることから着床前発生に必須でない [57]。これらのことから、胚発生における CCN2 の研究では、主に発生後期の、軟骨形成などに焦点が合わせられ、着床前胚における知見は最も解析の進んでいるマウスでさえ乏しく、ウシにおける知見はさらに僅少であった [57–59]。また、初期胚発生における TEAD4 と CCN2 の関係性という視点から研究が行われることは哺乳類全体においてこれまでになかった。

本章ではまず、*TEAD4* KD 胚の解析を行った。*TEAD4* KD 胚の卵割率、および胚盤胞期までの発生率はコントロールと差がなかった。これは、他のグループが行った *TEAD4* KD ウシ胚における結果と一致している [60]。また、過去にはウシ初期胚における *CDX2* の発現抑制も行われているが、同様に胚盤胞期までの発生には変化がなく、透明帯からの脱出も可能であった [61]。これらの結果は、マウスにおいて *Tead4* や *Cdx2* をノックアウトすると、TE 形成不全により胚盤胞期周辺で発生が停止するという観察とは異なる [46,48]。このような結果の違いがもたらされた理由として一つ目に考えられるのは、RNA 干渉による発現抑制では一定量の mRNA 発現が残存し、これが胚盤胞期までの発生には十分だったということである。実際、*Tead4* ヘテロ欠損マウス胚は野生型と同様に胞胚腔を形成し、野生型と同程度の割合で出生に至る [48]。二つ目は、マウスとウシの胚盤胞形成時における分化レベルの種特異的な違いが表現型の違いに結び付いたということである。マウスでは、E3.5 の胚盤胞期において CDX2 と OCT4 はそれぞれ TE および ICM で完全に排他的な発現を示し、この時点において TE と ICM という二系統への分化は完了している

[44,62]。一方ウシでは、D7 ないし D8 の胚盤胞期胚では OCT4 が TE、ICM の区別なく発現しており、TE 細胞はこの時点においては ICM 系列へ寄与する能力を保持している [23]。これらのことから、胚盤胞期においてウシ胚はマウス胚と比べて相対的に未分化の状態にあるといえる。ウシにおいて TE 系列と ICM 系列への不可逆的な分離が完了するのは早くとも D9 以降であり[23]、ウシ胚で TE 細胞の維持に TEAD4 が必須となるのは本実験で調べた D7.5 以降のステージなのかもしれない。最近、ウシと同じ大家畜であるブタの胚において *TEAD4* KD を行い、胚盤胞期までの発生率が著しく低下したという結果が報告された [63]。この研究では、KD 胚における多能性関連遺伝子の発現が調べられており、*SOX2* mRNA の発現レベルがコントロールと比べ有意に低下していることが示された。胚盤胞期までの発生率に関して本研究と異なる結果が得られた理由は、KD による標的遺伝子発現低下の度合いが極めて大きいことにあると予想される。ブタ KD 胚における *TEAD4* mRNA の発現レベルは多くともコントロールの 5%以下であり、ほとんど標的遺伝子破壊と同程度の効果が得られている。したがって、胚盤胞期までの発生に与える影響も本研究と比べ深刻となったのかもしれない。また本研究では *TEAD4* KD 胚における多能性関連遺伝子の発現解析は行っていないが、種間における機能差を明らかにするため今後の詳細な解析が望まれる。

TEAD4 KD により *CCN2* の発現レベルが低下したことは、Hippo 経路による下流因子の制御機構が、体細胞と初期胚発生間で保存されていることを示唆している。マウス胚の ICM と TE の分離が Hippo 経路により誘導されるという仮説は有力であるが [43]、今後は初期胚において Hippo 経路下流因子まで含めた制御機構の解析が可能になるかもしれない。これまで、初期胚における Hippo 経路の活性状態は、転写コアクチベーターである YAP の細胞内における局在などを指標に評価されてきた [43]。本研究より、ウシ初期胚における Hippo 経路の活性状態の変化が、実際に *CCN2* という下流遺伝子の発現にかかわっている可能性が示され、今後は CCN2 の発現状態を精査することにより Hippo 経路の活性

状態を評価することができるかもしれない。

TEAD4 KD 胚では、コントロールと比較し、マウス胚において TEAD4 による発現制御を受ける [48]、*CDX2* および *GATA2* の発現が低下していた。したがって、TEAD4 が持つ、TE 関連遺伝子の発現制御を介し TE 分化を促進する働きは、マウスとウシで保存されていると考えられる。一方、マウスにおいては TEAD4 の主要な下流因子の一つである *GATA3* [56]の発現レベルは、*TEAD4* KD 胚とコントロールの間で差がなかった。このことは、ウシ初期胚における *GATA3* の発現維持に、TEAD4 以外の因子が関与していることを示している。例えばマウスでは、TFAP2C や EOMES といった因子が、TEAD4 とは独立に *Gata3* の発現を直接的に制御する [64]。実際にどのような因子がウシ胚における *GATA3* 発現を制御しているのか、今後調べることでウシ胚固有の発現調節システムの存在が示されるかもしれない。

本章では続いて、*TEAD4* KD 胚において発現の低下が最も大きかった CCN2 に着目し、ウシ初期胚発生における役割を調べるため、発生ステージごとに mRNA とタンパク質の発現を調べた。*CCN2* mRNA は MII 期卵子から胚盤胞期胚まで一貫して発現していたが、その発現レベルは 16 細胞期に低下し、それ以降は胚盤胞期まで比較的低レベルで推移した。ウシにおいては、胚のゲノム DNA からの転写が開始する胚ゲノム活性化 (Zygotic genome activation: ZGA)が 8-16 細胞期に起こる [65]。これ以前のステージでは、卵子形成時に蓄積された mRNA やタンパク質が胚発生における主要な役割を担う。ZGA が起こる 16 細胞期以降に *CCN2* の発現が上昇せず、むしろ低下していることは、胚盤胞期において発現している *CCN2* が母性因子である可能性を示唆している。

蛍光免疫染色の結果から、CCN2 タンパク質は mRNA と同様、MII 期の卵子から胚盤胞期胚まで継続的に発現していることが分かった。CCN2 タンパク質は 8 細胞期までは核と細胞質の両方で均一に発現していたが、16 細胞期以降に核での発現が強まり、胚盤胞期においては細胞質より核で強いシグナルが検出された。CCN2 は分泌タンパク質であり、一

般的にはゴルジ体などの細胞小器官に局在する [66]。しかし、特定の細胞種において CCN2 はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リン酸化修飾を受けたのち核内に移行し、RNA 転写活性に影響を与える [67]。ウシ初期胚における CCN2 タンパク質の局在の制御機構は不明であるが、母性因子であり、胚盤胞期周辺で核局在化を示すという点が分化調節因子の Yap1 と類似しており、両者の比較により新たな洞察が得られるかもしれない [68]。今後はステージ特異的な局在パターンと局在部位における機能との関係性についての研究が望まれる。

続いて *CCN2* KD を行い、胚盤胞期までの発生と胚盤胞期における TE 関連遺伝子発現に与える影響を調べた。胚盤胞期までの発生率において、*TEAD4* KD 胚と同様に *CCN2* KD 胚とコントロールとの間に有意差はみられなかった。この結果は、*CCN2* 欠損マウスが、野生型と同等の割合で出生することと合致する [57]。また、*CCN2* KD 胚では、コントロールと比べ、*CDX2*、*GATA2* 遺伝子の発現レベルが有意に低下していたが、*GATA3* の発現レベルはコントロールと差がなかった。加えて、*CCN2* KD 胚では、*TEAD4* の発現がコントロールと比べ有意に低下していた。*TEAD4* KD 胚と *CCN2* KD 胚では胚盤胞期における遺伝子発現の変化が似ており、このことは、*CCN2* KD による TE 関連遺伝子発現の変化が、*CCN2* の直接的な影響のみならず、*TEAD4* の発現低下を介するものである可能性を示唆している。

TEAD4 が CCN2 の発現を制御することは体細胞の研究では広く知られているが [50]、反対に CCN2 が TEAD4 の発現を制御するかどうかは体細胞を含め検証されていない。そこで本研究では、*CCN2* KD による *TEAD4* の発現低下が、CCN2 タンパク質による *TEAD4* の直接的な転写レベルでの制御を示すのか、あるいは CCN2 タンパク質が TE 特異的な細胞増殖の促進に貢献しており、全体に占める TE の割合が減ったために見かけ上の発現レベルが低下したのかどうかを確かめるため、*CCN2* KD 胚における ICM と TE それぞれの細胞数を調べた。その結果、ICM および TE それぞれの細胞数には *CCN2* KD 胚とコント

ロールで差がなかったが、ICM に対する TE の比は、*CCN2* KD 胚において有意に低下していた。したがって、胚全体に占める TE の割合が 30%低下したことが TE 関連遺伝子の見かけ上の発現が低下したという可能性は排除できない。しかし、*CDX2* の低下は 50%減と大きいため、TE 割合減少という細胞構成比の変化だけでは説明できない。以上のことから、CCN2 はウシ胚盤胞期において、直接または間接的に TE 関連遺伝子の発現に転写レベルで関わることが示唆された。

第三章 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

緒言

ウシ着床前胚において、TE と ICM への分化を「第一の」細胞分化とするならば、ICM からの PrE および Epi の確立は「第二の」細胞分化と捉えることができる。第一の細胞分化に比べ、第二の細胞分化の詳細な制御機構は理解が遅れている。その原因は、現在のウシ胚体外培養における胚の生存が胚盤胞期までに制限されていることにある。ウシ胚は、マウス胚とは発生進行のスピードが異なり、胚盤胞期では「第一の」細胞分化が完了しておらず、したがって「第二の」細胞分化は胚盤胞期以降に起こると考えられる [23]。

胚体外培養では、過排卵誘起や卵子の体外成熟、そして体外受精技術を組み合わせることにより、発生開始のタイミングを同期させたうえで多数の胚を一度に扱うことができる。また、培養液および培養基質が透明であることから培養を中断することなく継時的に観察することが可能である。これらの実験的利点から胚盤胞期までの発生機構は時空間的に細部まで調べられてきた [69]。これに対し、ウシを含めマウスおよびヒトを除く全ての哺乳類胚の胚盤胞期以降の発生は従来の体外培養では再現できず、解析を行うには生体から目的の発生ステージの *in vivo* 胚を回収してくるしかなかった。マウスは繁殖が容易でありかつ胚移植や胚回収が日常的に行われる技術であること、一匹当たりの値段が安く匹数を扱えることから、胚盤胞期以降の発生についても比較的解析が進んでいる。一方、大家畜であるウシは妊娠期間が長く単胎であることに加え、経済的、時間的な理由から *in vivo* 胚を用いた研究は極めて制限されている。また、母体の栄養状態や飼養環境、季節や気温といった様々な要因が子宮内環境に影響するため、同一の日齢において回収した胚でも発生の進行には大きなばらつきが存在する [70]。したがって、ウシにおける胚盤胞期以降の胚発生の詳細な解析は困難が大きく、他の動物種の知見を頼りに類推しなければならない部分が多かった。ウシ胚における PrE / Epi 細胞分化に関する知見は限られているものの、マウス胚との相違が見出されており、この発生段階における種特異的な解析が必要なこと

は明白である [24,25]。以上の背景から、胚盤胞期以降の発生ステージに安定的に発生させることができる体外培養系を構築することができれば、ウシ胚独自の細胞分化の理解に大きく貢献することができると期待されている。

過去にも、培地組成や培養基質の改良により体外におけるウシ胚培養の発生限界を胚盤胞期以降へ延長する試みが行われてきた [70–76]。なかには、胚が従来法の限界である D8 を大きく超えて生存したものもあった [77]。しかしこれらの知見では、Epi の細胞がネクローシスを含む細胞死により急速に失われるなど、胚としての性質は保たれず、*in vivo* での発生の再現度は低かった [77]。一方、近年のマウスおよびヒト胚を用いた研究では、胚盤胞期胚を基質に接着させることで着床後の発生を再現できた例がある [78,79]。しかし、ウシでは胚盤胞期以降、神経期胚までの発生が着床を経ることなく起き、基質への尚早な接着は細胞の急速な終末分化を招きその時点で胚としての性質は失われてしまう [80]。したがって、胚盤胞期胚が透明帯脱出後すぐに子宮への着床を開始するマウスやヒトといった動物種で用いられる、接着依存性の体外培養法は不適切であると考えた。

そこで本章では、体外培養におけるウシ胚の生存性の向上を目的に、培養液を含んだ寒天 (ゲル)基質上でのウシ胚体外培養を新たに試みた。本法は、基質との接着を避けつつ、気相との直接的な接触により効率的なガス交換が行われることを狙った培養法であり、古典的な組織培養法の一つである「気液境界面培養法」をウシ胚用に最適化したものである。本章では、新規培養法により作出した胚についてマーカー遺伝子の発現解析から分化状態を決定し、相同な日齢の *in vivo* 胚と比較を行うことによって、胚盤胞期以降の細胞系列分離を効率よく再現できていることを示した。また、新規培養法で作出した D12 胚の代理母への移植を行い、着床能についても確認した。

材料と方法

試薬、培地の組成は、付表 3 にまとめて記述した。

アガロースゲル上でのウシ胚盤胞期胚の培養 (ゲル培養)

ウシの体外成熟、体外受精及び胚盤胞期までの体外培養は第二章材料と方法の「体外受精によるウシ胚の作出」に従った。

培養に用いるゲルの作製は、体外受精後 7 日目 (D7)に行った。ビーカーに 20 mL のミリ Q 水を注ぎ、そこに 0.3 g のアガロース (Agarose-I、同仁化学研究所、熊本、日本)を加え 121°C で 20 分間オートクレーブした。オートクレーブ完了後およそ 60°C まで温度が低下したところで全量を 10 cm ディッシュに注ぎ、室温で固化させた。滅菌水にくぐらせて濡らした乾熱滅菌済み薬さじを使いゲルを 1 cm 角の賽の目状に加工し、無菌的に、Nunc™4 well プレート (Thermo Scientific)のウェル 1 つにつき 1 つとなるよう移した。ここに、ゲル培地 (付表 3)を 500 µL 注ぎ、38.5°C、5% CO_2 のインキュベーターで一晩平衡化させた。D8 の午前に、ウェルから培地を除去し、新鮮な TE 培地 300 µL を注ぎ、再び平衡化させた。D8 の午後に、拡張胚盤胞期胚を TE 培地で 3 回洗浄してから、ミネラルオイルを持ち込まないよう注意しながら、一つのゲルに 5 胚となるようガラスキャピラリーを用いて移した。培養は 38.5°C、5% CO_2、湿度 100%のインキュベーターで行った。この際、胚どうしの距離は互いに 3 mm 以上離れるように注意した。この新規培養法を、本論文では便宜上「ゲル培養」と呼ぶこととした。

胚盤胞期以降の胚の平均および最長生存日数の算出

培養時におけるアガロースゲルの有無、および培養液の違いが胚盤胞期以降の胚の生存日数に与える影響を調べた。アガロースゲルを用いない場合、60 cm ディッシュ (Corning、NY、USA)上に作製しミネラルオイルで覆った、培養液 100 µL よりなる微小滴

中に、ガラスキャピラリーを用いて胚を移し培養に供した (drop 法)。一方アガロースゲルを用いる場合、培養液で一晩馴化したアガロースゲル上にガラスキャピラリーを用いて胚を置き培養に供した (gel 法)。従来法の IVC で作出した D8 の胚盤胞期胚のうち ICM と TE が明瞭に分離し、胚全体の体積の増加により透明帯が薄化しているものを選び各条件で培養を行った。胚の生存は実体顕微鏡による形態的観察から判定した。独立した 2 回の IVF で、一つの区につき合計 10 個の胚盤胞期胚を供試し、24 時間ごとに胚の生存を調べた。

免疫染色

免疫染色および共焦点レーザー顕微鏡による画像の取得は、第二章材料と方法の「免疫染色」に準じて行った。使用した抗体および希釈倍率は第二章で用いたものに加え、OCT4 (1:400, goat polyclonal, ab27985; abcam)、NANOG (1:10000, rabbit monoclonal, 500-P236; Peprotech)、SOX2 (1:1500, rabbit monoclonal, ab92494, abcam)、SOX17 (1:1500, AF1924; R&D systems)、Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG H&L (1:400, ab150129: abcam)であり、一次抗体の反応条件はいずれも、4°C で一晩、二次抗体は室温で 30 分間反応させた。使用した二次抗体は第二章と同一である。

定量 PCR

D8 の従来法で作出した胚盤胞期胚、および D10、D14 のゲル培養胚から、ICM 領域をマイクロブレードにより機械的に除去した TE 領域のみを RNA 抽出および cDNA 合成に供試した。D8 の胚盤胞期胚は 20 胚分、D10 のゲル培養胚は 5 胚分、そして D14 のゲル培養胚は 2 胚分でそれぞれ 1 サンプルとした。RNA 抽出、cDNA 合成および定量 PCR は第二章の材料と方法に従い、用いたプライマーは付表 1 に示した。

準超薄切片の作製、トルイジンブルー染色

ゲル培養胚をグルタルアルデヒド固定液 (付表 3)中で 4°C、2 時間前固定したのち、滅菌水で 2 倍希釈し終濃度 0.1M とし、0.2% (w / v)PVA を添加した PB (付表 3)で 3 回洗浄し、酸化オスミウム溶液 (付表 3)中で 4°C、2 時間さらに固定した。PB で 3 回洗浄し、50%、70%、90%、99.5%、および 100%のエタノール系列に表記順に 10 分間ずつ浸し脱水を行った。なお、99.5%と 100%エタノールによる脱水はそれぞれ 2 回ずつ行った。プロピレンオキサイド (Nisshin EM Co, Ltd.、Tokyo、Japan)に 2 回浸漬することでエタノールを除去してから、Epon 溶液にて包埋した。Epon 溶液は、ディスポビーカー (Nisshin EM Co, Ltd.)に、Epon (TAAB Epon812、Nisshin EM Co, Ltd.) 5.26 g、DDSA (Nisshin EM Co, Ltd.) 1.11 g、MNA (Nisshin EM Co, Ltd.) 3.63 g、DMP-30 (Nisshin EM Co, Ltd.) 0.2 g をこの順で加え、気泡ができないようスターラーで撹拌することにより、都度調整した。固化した試料ブロックをグラインダーでピラミッド様にトリミングし、回転式ミクロトーム (RM2255；Leica)で余分な樹脂を取り除いた。ウルトラミクロトーム (ULTRACUT N；Reichert Inc.、Buffalo、 NY)に取り付けたガラスナイフ (Leica)により切削し切削面を鏡面状に仕上げた。ガラスナイフに替え、厚さ 500 nm となるように切片を作製した。切片をスライドガラスに載せ、60°C で加熱乾燥した。続いて、0.3%トルイジンブルー染色液 (1% (w / v)ホウ酸ナトリウム水溶液に、0.3% (w / v)となるようトルイジンブルーの粉末を添加したもの)を数滴垂らし、60°C で加熱しながら 3 分間染色した。スライドガラスを RO 水で洗浄し、乾燥させたのち、エンテランニュー (Merck、Darmstadt、Germany)で封入した。スライドガラスの観察および画像の取得は、光学顕微鏡 (DMi8、Leica)により行った。

超薄切片の作製、電子染色および透過型電子顕微鏡観察

試料ブロックの成型までは準超薄切片の作製と同様に行った。ウルトラミクロトームに取り付けたダイヤモンドナイフ (EM Japan Co.,Ltd.、Tokyo、Japan)により 80 nm の厚さになるように切削を行い、銅グリッド (Nisshin EM Co, Ltd.)で掬い取った。乾燥後、超純水

で 5 倍希釈し、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌した TI ブルー溶液 (Nisshin EM Co, Ltd.) に 30 分間浸漬した。超純水を満たした 100 mL のビーカーの中に、ピンセットでつまんだグリッドを入れて軽く振ることを 3 回繰り返した。続いてクエン酸鉛に 3 分間浸漬した。クエン酸鉛は、超純水 30 mL に硝酸鉛 1.33g とクエン酸ナトリウム 1.76 g を溶解させたのち、1N の NaOH を 8 mL 加えることによって無色透明にしてから、全量が 50 mL になるよう超純水を加えることで調整した。TI ブルーと同様、100 mL の超純水にて 3 回洗浄してから乾燥させ、透過型電子顕微鏡 (JEM-2100、JEOL Ltd、Tokyo、Japan)で観察を行った。

ゲル培養 D10 胚の、代理母への子宮移植

受胚牛の発情同期化は、7 日間の膣内への CIDR (膣内留置型黄体ホルモン製剤) (InterAg, Hamilton, NZ)の留置により行った。CIDR の挿入時と抜去時にそれぞれ 2 mg の安息香酸エストラジオール (Fuji Pharma Co., Ltd.、Tokyo、Japan)と PGF2α 製剤 (ジノプロスト; Fuji Pharma Co., Ltd.)を投与した。CIDR の抜去後、超音波診断による排卵の確認を毎日行った。排卵から 9 日目に、それぞれ D10 のゲル培養胚を受胚牛に移植した。

統計解析

生存確率の算出では、24 時間ごとの形態学的観察により胚の死滅 (イベントの発生)が確認された場合、その胚は観察直前まで生存していたと仮定し、Kaplan-Mayer 法による生存時間分析を行った。すべての観察期間はイベントの発生により終了したため打ち切りのない完全データとして扱い、経験分布による推定法を適用した。生存時間分析および生存曲線の描画は統計解析ソフトの R を用い、「survival」パッケージにより実行した。

定量 PCR では、⊿⊿Ct 法により算出した相対発現量の平均値を用いて、D8 と D10、および D8 と D14 のそれぞれ 2 者間で Student の t 検定を行い、$P < 0.05$ となるものを有意とした。検定は、統計解析ソフト R の標準パッケージである「t.test」を用いて行った。

結果

培養条件の違いが胚の生存日数に与える影響

初めに、培地の組成の違い (mSOFai またはゲル培地)およびアガロースゲルの有無 (gel または drop)が胚盤胞期以降の胚の生存日数に与える影響を調べた。いずれの条件においても、延長培養により胚細胞が基質に接着することはなかった。長生存日数および平均生存日数は IVF の開始時を 0 日目とすると、mSOFai/ drop で 13 および 11.8 日、mSOFai/ gel で 11 および 10.8 日、ゲル培地/ drop で 12 および 10.8 日、そしてゲル培地/ gel で 16 および 13.3 日となった (図 15)。これ以降の実験では、ゲル培地/ gel の条件で培養を行い、これを「ゲル培養」と呼ぶことにした。

ゲル培養における総細胞数、長軸長の推移

D8 の胚盤胞期胚および各培養日数のゲル培養胚の DNA を Hoechst で染色し総細胞数を調べた。平均細胞数は D8 で 181.4、D9 で 268.5、D10 で 408.4、D11 で 606.8、D12 で 1081.1 であった (繰り返し回数は 1 回)。また、人工授精後 12 日目に子宮灌流により回収した *in vivo* 胚の平均細胞数は 1308.8 であった (繰り返し回数は 1 回、図 16)。各日において光学顕微鏡により、ゲル上に静置された状態のゲル培養胚の明視野像を撮影し、画像から胚の長軸長を推定したところ、平均長軸長は培養日数の増加に伴い直線的に増加することが分かった (図 17)。平均長軸長の範囲は 409.135 μm から 823.185 μm であった。

アガロースゲル培養が TE における多能性関連遺伝子の発現に与える影響

続いて、ゲル培養が TE 細胞の分化を誘導するかどうか調べた。まず、D8 の IVF 胚および D10、D14 のゲル培養胚をマイクロブレードにより分断し、ICM を含まない部分をサンプリングし RNA 抽出、cDNA 合成を行い、定量 PCR により *OCT4*、*SOX2*、および *NANOG* の相対発現量を調べた。D8 の IVF 胚と比較し、D10 および D14 において *OCT4* お

よび *SOX2* の相対発現量は有意に低下した ($P < 0.05$、図 18)。

次に、免疫染色により D8、D9 および D10 における OCT4、NANOG、および SOX2 タンパク質の局在を調べた。OCT4 タンパク質は D8 では ICM と TE の区別なくほとんどの割球で発現していたが、D9 においては TE における陽性細胞数が減少し、D10 では TE における陽性細胞がほとんど観察されず、ICM に限局することが分かった。一方、NANOG および SOX2 タンパク質は D8 において ICM に限局しており、続く D9 および D10 でも ICM 特異的発現を継続していた (図 19)。

アガロースゲル培養胚における TE の機能的分化

ゲル培養胚 TE 細胞の機能的分化について決定するため、D8、D10 および D14 の TE サンプルの相対遺伝子発現を定量 PCR で調べた (図 20)。D8 の胚盤胞期胚において ICM と比べ TE で優勢に発現する遺伝子として、平成 25 年長友の博士論文を参考に *IFNT*、*CDX2*、*GATA3*、*GATA2*、*TEAD4*、*CCN2*、*ZFX*、*ATF3*、*ELF3*、*DLX4* を、また D8 と比較し D14 の伸長期胚において発現が有意に増加する遺伝子として、平成 27 年定の修士論文を参考に *ETS2*、*ID2*、*GJB1*、*MYL3*、および *ASCL2* を選んだ [40,81]。これらのうち、*IFNT*、*ETS2*、*ID2*、*CCN2* の発現は、D8 と比較し D10 あるいは D14 で有意に増加した。一方、*GJB1*、*MYL3*、*ASCL2* は D8 においては検出限界を下回ったが、D10、D14 で発現が検出された。

続いて、反芻動物の着床前の TE において出現し、子宮内膜との融合に役割を担う二核細胞がゲル培養胚の TE にも存在するかどうかを調べるため [82]、生体において着床が起こる時期まで培養した D21 胚を用いて作製した TE 細胞の切片を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察したところ (図 21)、一つの細胞の中に核を二個包含した典型的な二核細胞の形成を確認した。さらに、ウシにおいて二核細胞のマーカー遺伝子として知られる *SSLP1* 遺伝子の相対発現量を定量 PCR により調べたところ、D8 と比較し D10 および D14 で発現が

有意に増加していることが分かった (図 20)。免疫染色により、各培養日数のゲル胚における TE 細胞分化に重要な転写因子である CDX2、TEAD4 および GATA2 タンパク質の局在を調べた。いずれのタンパク質も、D8 から D12 まで一貫して、TE 細胞の核において発現が維持されていることが分かった (図 22)。

D10 ゲル培養胚の代理母への子宮移植

ゲル培養胚の着床能を調べて TE 細胞の機能性の評価を決定するため、発情同期化を行ったホルスタインのメスの黄体側の子宮角に、D10 胚 2 個を移植した。移植から 26 日後および 42 日後に、エコーにより妊娠鑑定を行った (図 23)。妊娠 26 日目の診断では、二つの胚が着床したことが確認された。また妊娠 42 日目の診断ではこのうちひとつの胎子の心拍動が確認され、外生殖器の形態からオスであると判断された。妊娠 200 日ごろの検査により流産が確認された。

ゲル培養胚における胚盤葉上層 (Epi)と原始外胚葉 (PrE)前駆細胞の空間的分離

ゲル培養胚の各日数における、胚盤葉上層 (Epi)および原始内胚葉 (PrE)前駆細胞の ICM 内における局在を、SOX2 および SOX17 タンパク質の免疫染色により調べた (図 24)。ゲル培養を始める前の D8 の胚盤胞期胚においては、SOX17 は ICM のほとんどの細胞において発現していたが、SOX2 は一部の細胞においてのみ発現しており、その分布は ICM 内でランダムであった。また、SOX2 陽性細胞のほとんどは、SOX17 を共発現していた。ゲル培養開始から 24 時間が経過した D9 の胚では、SOX2 を単独で発現する ICM 細胞の数が増加し各前駆細胞におけるマーカーの排他的発現が促進されていたが、SOX2 陽性細胞と SOX17 陽性細胞の局在はモザイク状であった。D10 の胚では、SOX17 陽性細胞は ICM の中でも胞胚腔と接する側に限局しており、SOX2 陽性細胞との空間的な分離が促進され、SOX2 と SOX17 を共発現する細胞はほとんど見られなくなった (図 24)。人工授精後灌流

により回収した D10 の *in vivo* 胚においても同様に免疫染色を行い、ゲル培養胚と同様の局在パターンが観察された (図 24)。

ゲル培養胚におけるハイポブラストの出現

ウシ胚における PrE およびその派生物である胚盤葉下層(ハイポブラスト)のマーカー遺伝子を選抜するために、当研究室で以前実施した RNA-seq のデータを利用した [40,41]。この RNA-seq では、IVF 由来の D8 胚盤胞期胚の壁 TE と、子宮灌流により得られた D14 の伸長期胚の壁 TE および TE を裏打ちするハイポブラストを含む細胞から RNA をサンプリングし比較している。したがって、D8 から D14 にかけて発現の上方制御が確認された遺伝子の中には、必然的に PrE あるいはハイポブラスト優勢に発現する遺伝子が含まれていると考えられる。本研究では、RNA-seq における差次的遺伝子発現解析の結果 D8 と比較し D14 において発現が有意に 3 倍以上上昇し、なおかつマウス、あるいはウシにおいて PrE における特異的な発現や機能が報告されている *SOX17*、*GATA4*、*HNF4A* および *PDGFRA* をウシにおける PrE/ ハイポブラストマーカーとした (図 25)。さらに、D8、D10 および D14 の胚体外領域におけるこれら 4 種のマーカー遺伝子発現を定量 PCR により比較した。これら 4 遺伝子の発現はいずれも、D8 においては検出限界を下回っていたが、D10 および D14 にでは検出された (図 26)。

次に、ゲル培養胚における PrE 前駆細胞の局在の変化を観察するために、培養日数別に SOX17 の免疫染色を行った。なお、TE 細胞との区別を行うために、CDX2 を対比染色した。D8 から D12 までのいずれの培養日数においても、SOX17 と CDX2 はそれぞれ別々の細胞において発現しており、SOX17 の胚当たりの陽性細胞数は D10 から 1 日ごとに増加していた (図 27、28)。また、SOX17 陽性細胞は D10 まで ICM に限局していたが、D11 には ICM に近い側の TE 近傍で陽性細胞が観察され始め、D12 では胚全体に伝播していた (図 27)。

ゲル培養胚においてハイポブラストが出現するかどうかを調べるために、D12 において切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い光学顕微鏡により観察した (図 29)。D12 のゲル培養胚においては、単層の TE 細胞の内側に ECM を挟んで独立した細胞層が観察され、ハイポブラストの形成が示された。

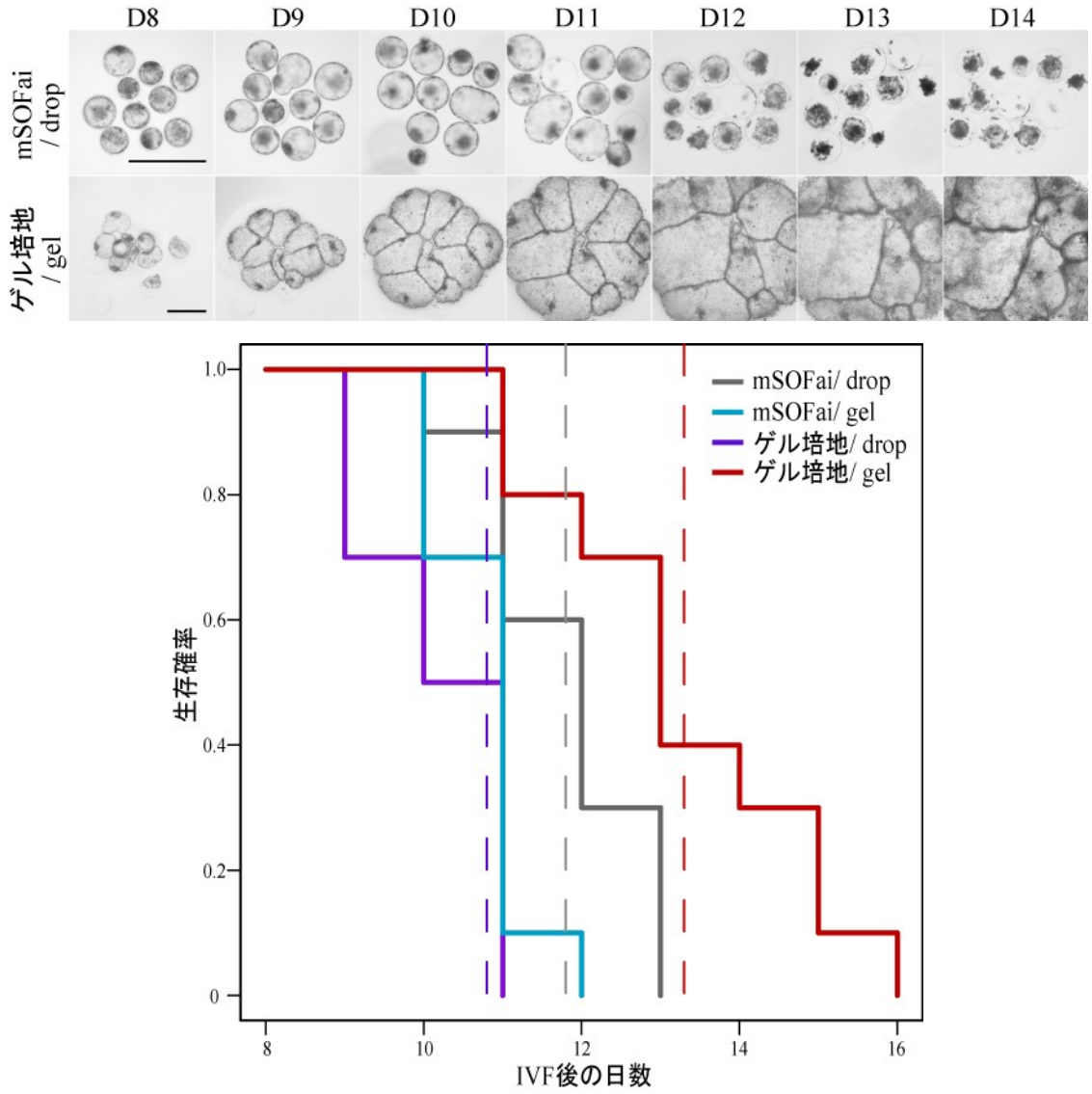


図 15. 培養条件の違いが胚の生存日数に及ぼす影響

(上) それぞれ良質な胚盤胞期胚 10 個ずつを供試し、24 時間ごとに撮影した明視野像。スケールバー: 500 µm

(下) D8 から 24 時間ごとに観察を行い、各日数における生存確率を Kaplan-Mayer 解析により算出した。平均生存日数は IVF の開始時を 0 日目とすると、mSOFai/ drop で 11.8 日、mSOFai/ gel で 10.8 日、ゲル培地/ drop で 10.8 日、そしてゲル培地/ gel で 13.3 日となった。破線: 平均生存日数。

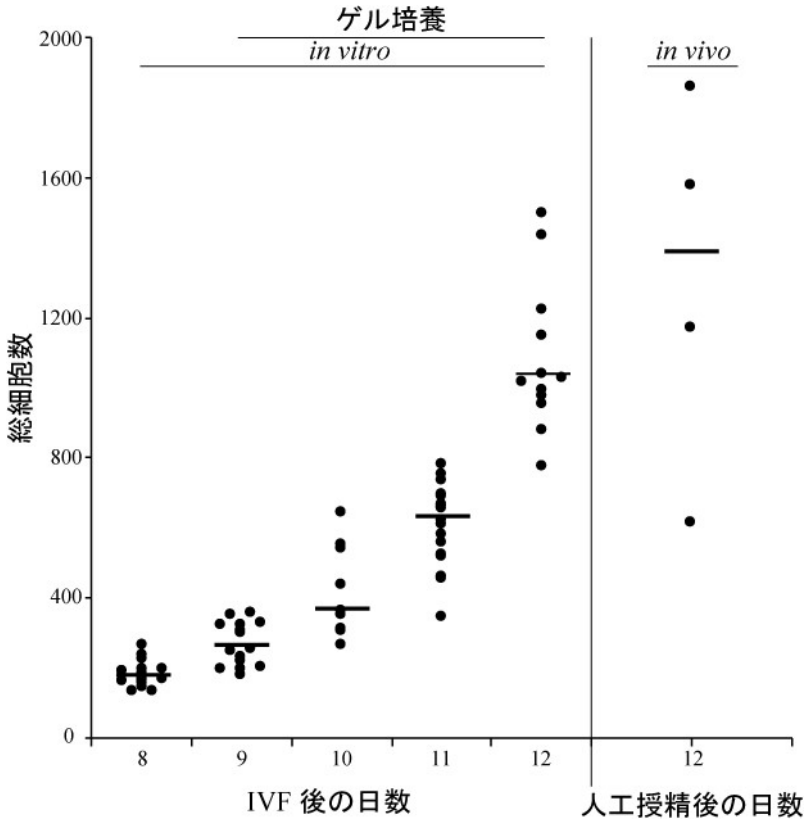


図 16. ゲル培養胚における総細胞数の推移

細胞数は Hoechst 染色した画像から手動でカウントした。水平方向の直線は当該培養日数における平均細胞数を示す。

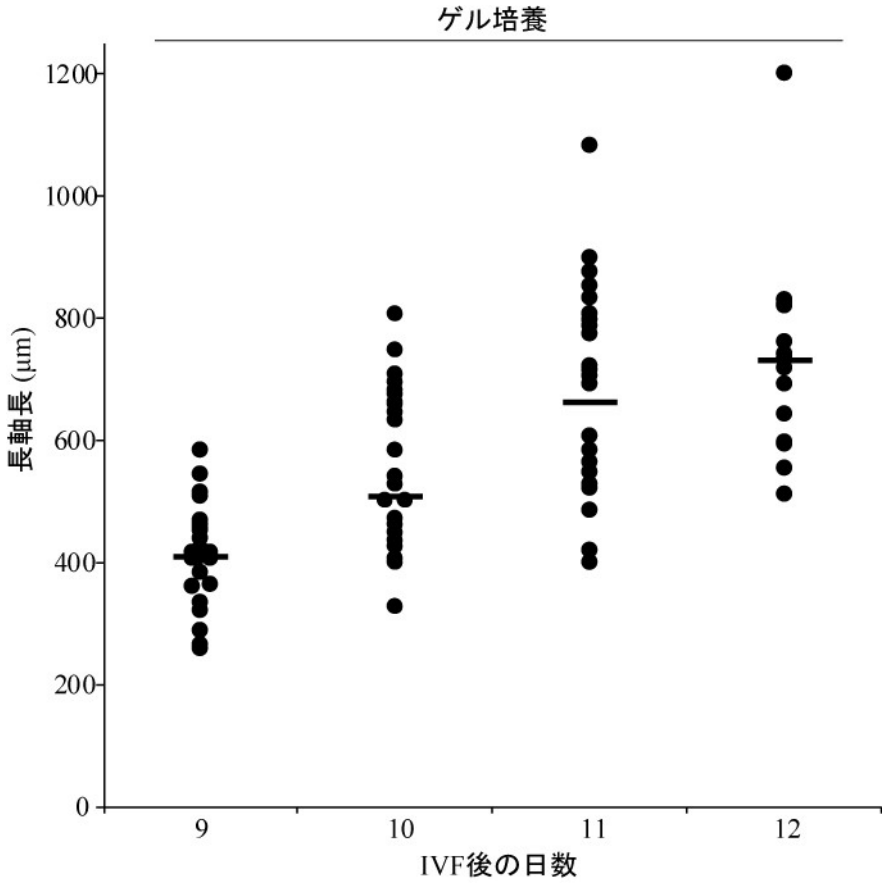


図 17. ゲル培養胚における長軸長の推移

ゲル培養胚の明視野像から距離が最も大きくなる直線の長さを推定し長軸長とした。水平線は各日の平均長軸長を表す。

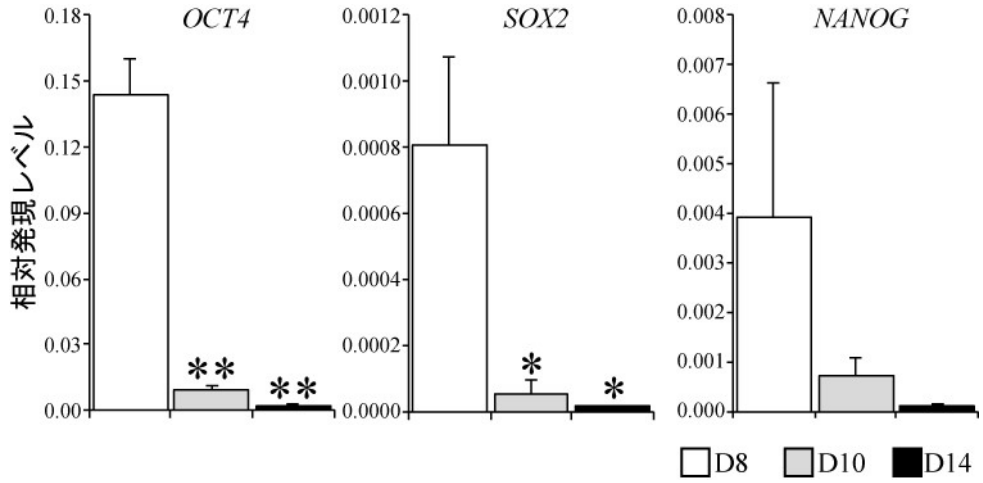


図 18. ゲル培養が TE における多能性遺伝子の発現に及ぼす影響

IVF の D8 胚および D10、D14 のゲル培養胚から、ICM を機械的に除去し胚体外部分のみを定量 PCR に供した。バーは、*GAPDH*、*ACTB* および *H2AFZ* 遺伝子の発現量の幾何平均で正規化した値を用いて⊿⊿Ct 法により算出した平均値を示す。エラーバー: ±S.E.M.、**$P < 0.01$、*$P < 0.05$ (Student の t 検定)。

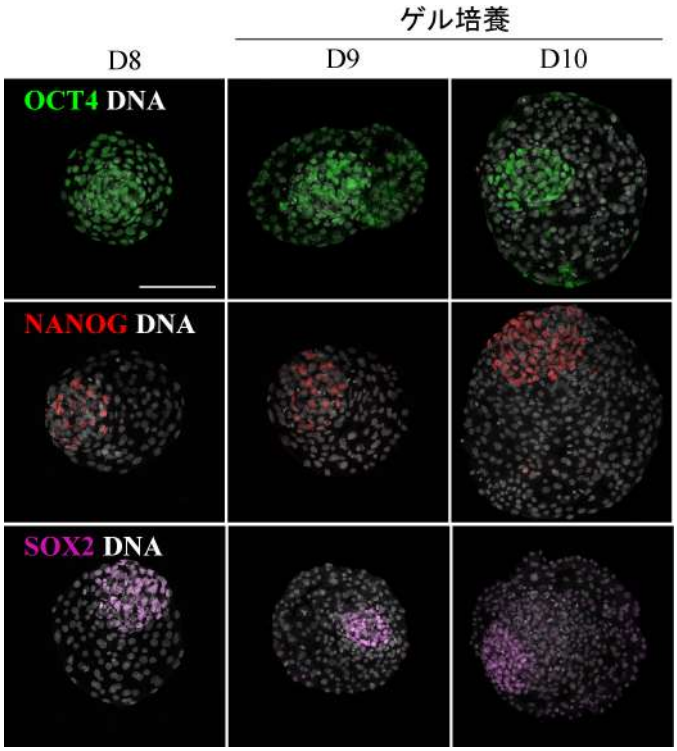


図 19. ゲル培養による、多能性因子のタンパク質局在の変化

D8、D9、および D10 における典型的な共焦点レーザー顕微鏡像を示した。Hoechst で核を対比染色した (白色)。スケールバー: 200 μm

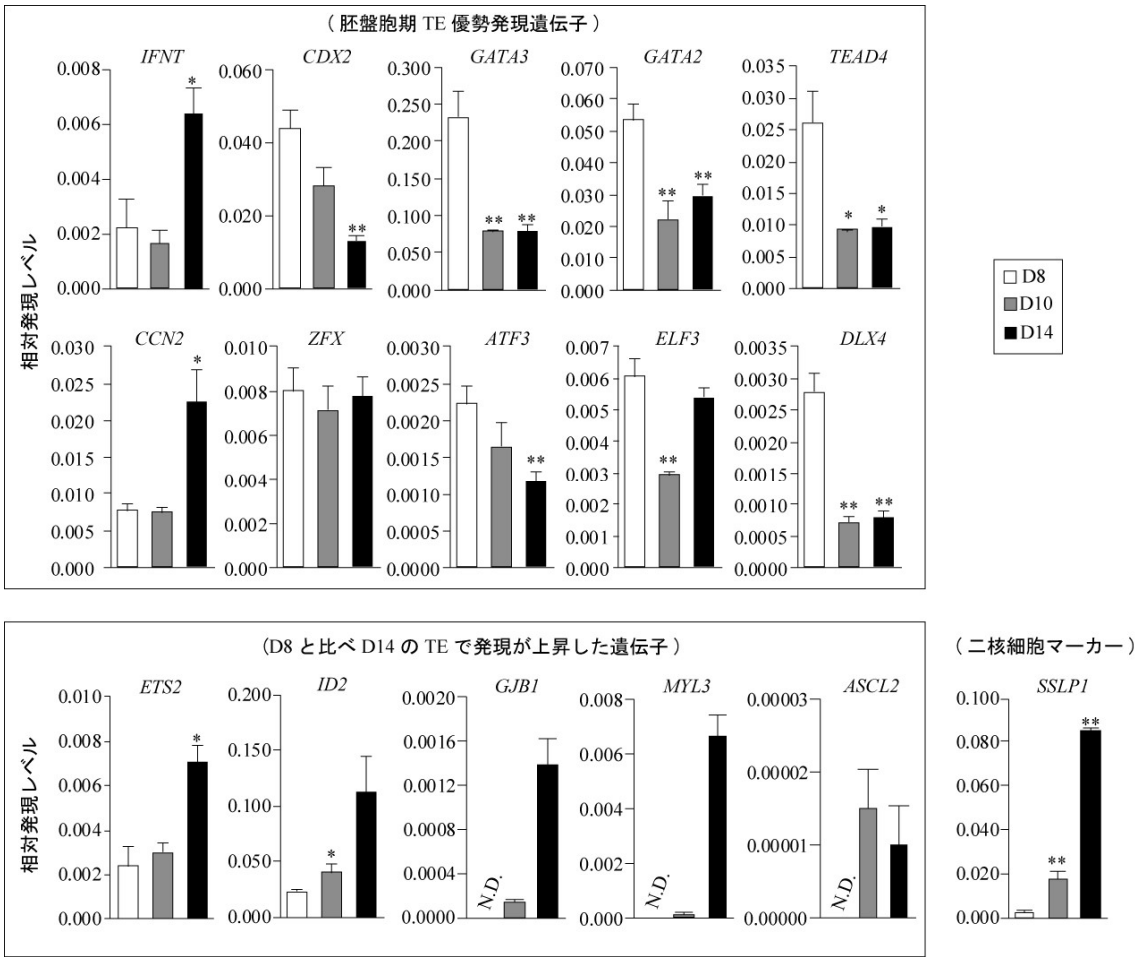


図 20. ゲル培養における TE 遺伝子発現の変化

IVF の D8 胚および D10、D14 のゲル培養胚から、ICM を機械的に除去し胚体外部分のみを定量 PCR に供した。バーは、*GAPDH*、*ACTB* および *H2AFZ* 遺伝子の発現量の幾何平均で正規化した値を用いて⊿Ct 法により算出した平均値を示す。エラーバー: ±S.E.M.、**$P < 0.01$、*$P < 0.05$ (Student の t 検定)。

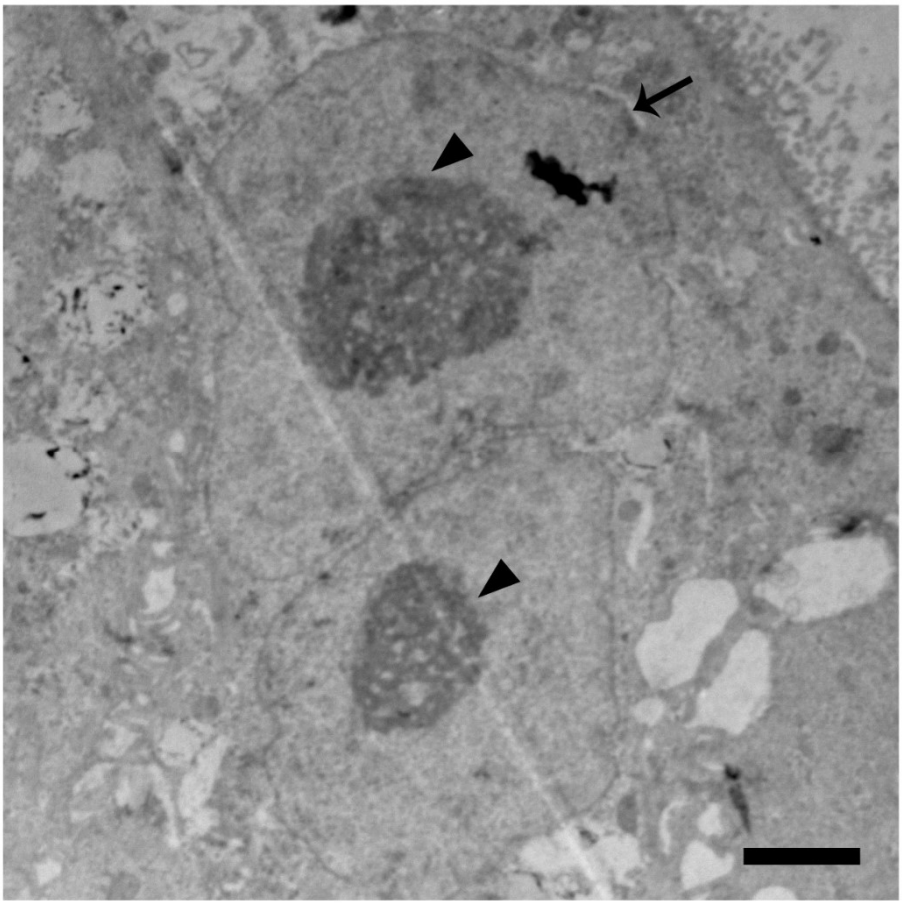


図 21. 透過型電子顕微鏡によるゲル培養 TE における二核細胞の観察

D21 のゲル培養胚を固定し作製した 80 nm の超薄切片の TEM 観察像。単一細胞内において、凝縮した染色質(矢尻)をもち、明瞭な核膜 (矢印)に囲まれた 2 つの核が確認された。スケールバー: 2 μm

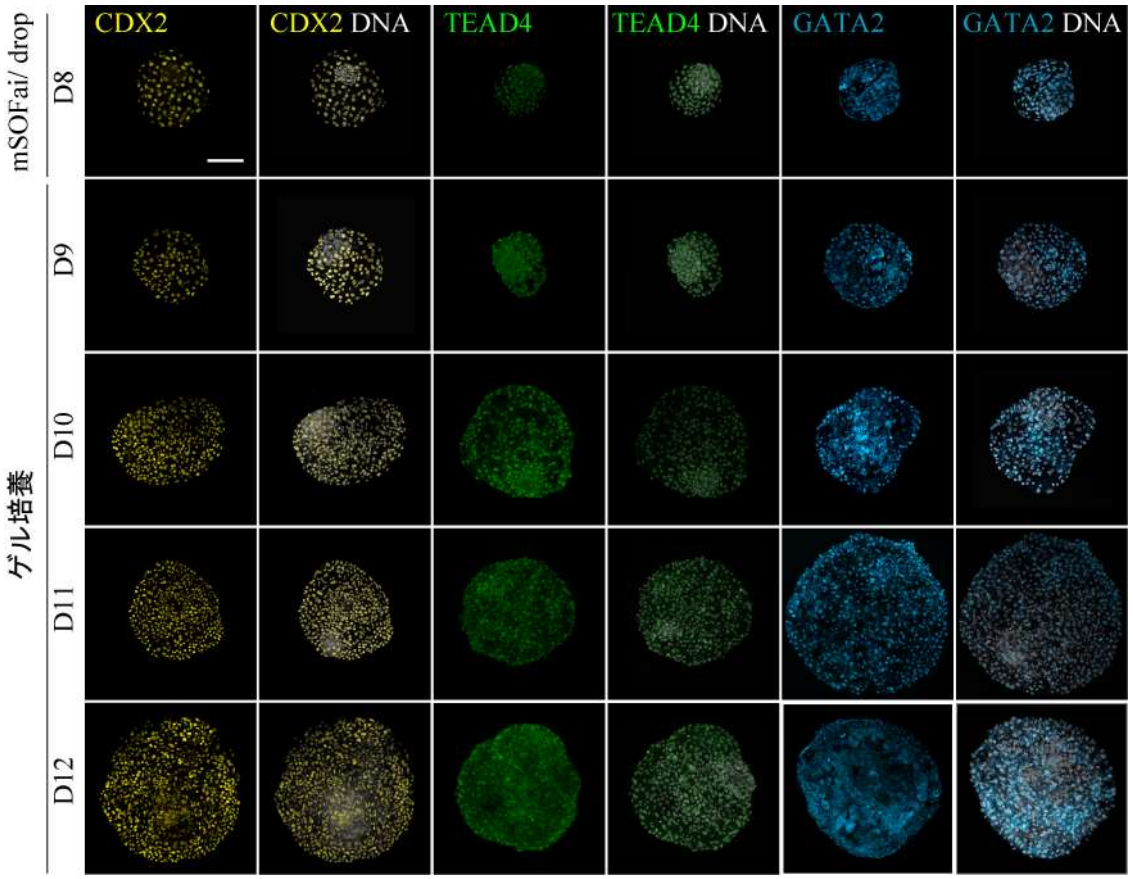


図 22. ゲル培養における TE 遺伝子の局在変化

各日の典型的な共焦点レーザー顕微鏡像を示した。Hoechst で核を対比染色した (白色)。スケールバー: 200 µm

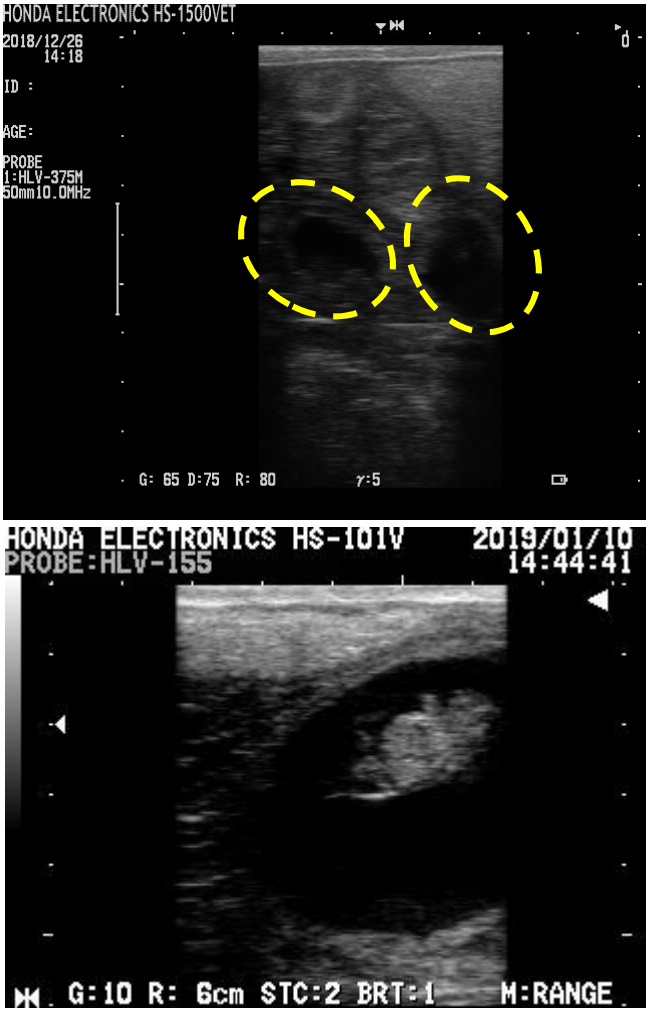


図 23. D10 のゲル培養胚の着床能

発情同期化を行った排卵から 9 日目の受胚牛に移植した、D10 のゲル培養胚のエコーによる妊娠診断。上段: 妊娠 26 日目、下段: 妊娠 42 日目。妊娠 42 日目のエコー診断では胎子の心拍動が確認され、外生殖器の形態からオスであると判断された。

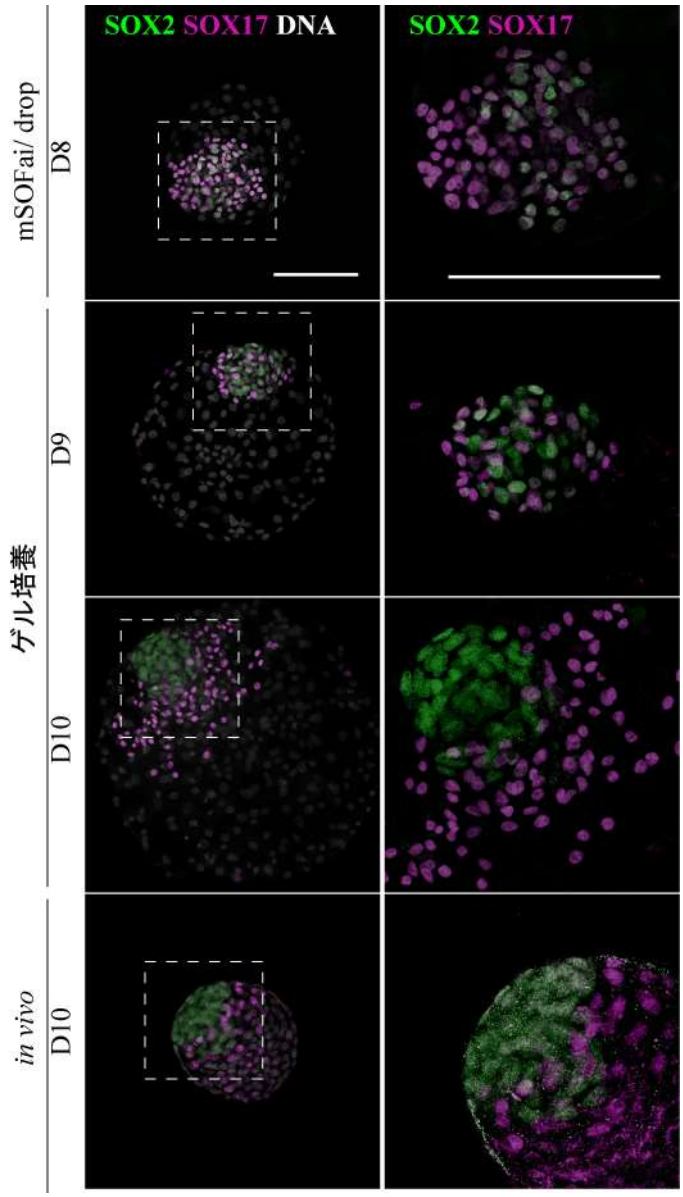


図 24. ゲル培養による Epi および PrE マーカーの局在変化

共焦点顕微鏡により撮影した、Epi マーカー (SOX2: 緑)および PrE マーカー (SOX17: マゼンタ)の免疫染色像。Hoechst で核を対比染色した (白)。右列は、左列の点線部分の拡大画像。下段は、人工授精後灌流により採取した *in vivo* 胚の免疫染色像。スケールバー: 200 μm。

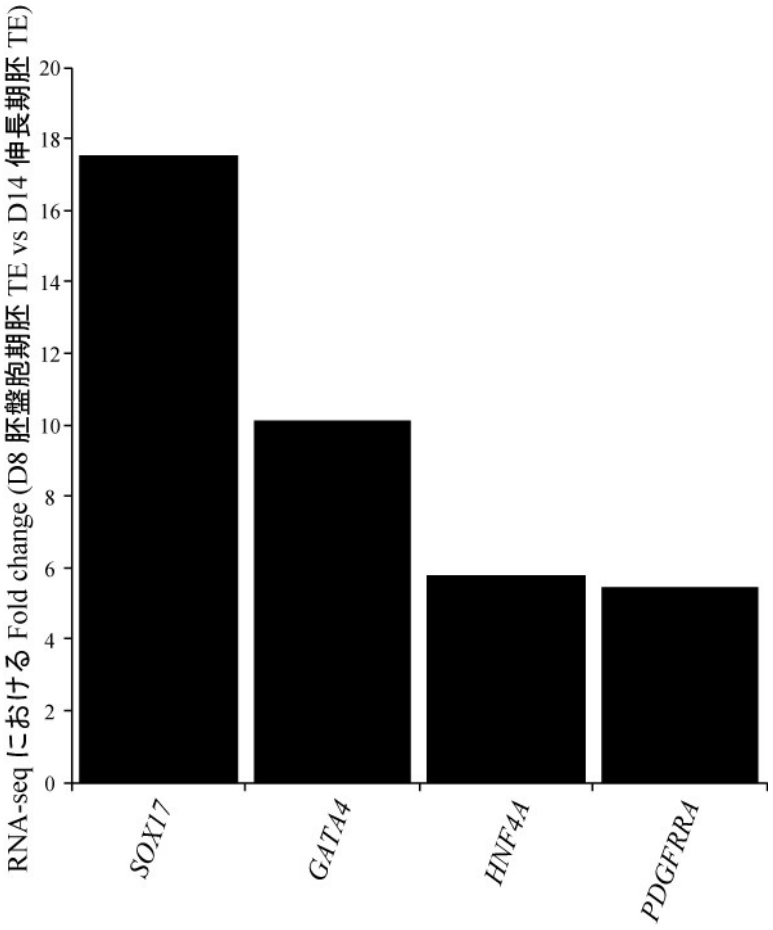


図 25. RNA-seq による PrE マーカー候補遺伝子の相対発現比較

平成 27 年度定修論を参考にした。重複を除いたリードカウントを用いて edgeR test により発現量比較を行い、胚盤胞期胚と比べ伸長期胚の TE で発現量が何倍になったかをバーで表した。

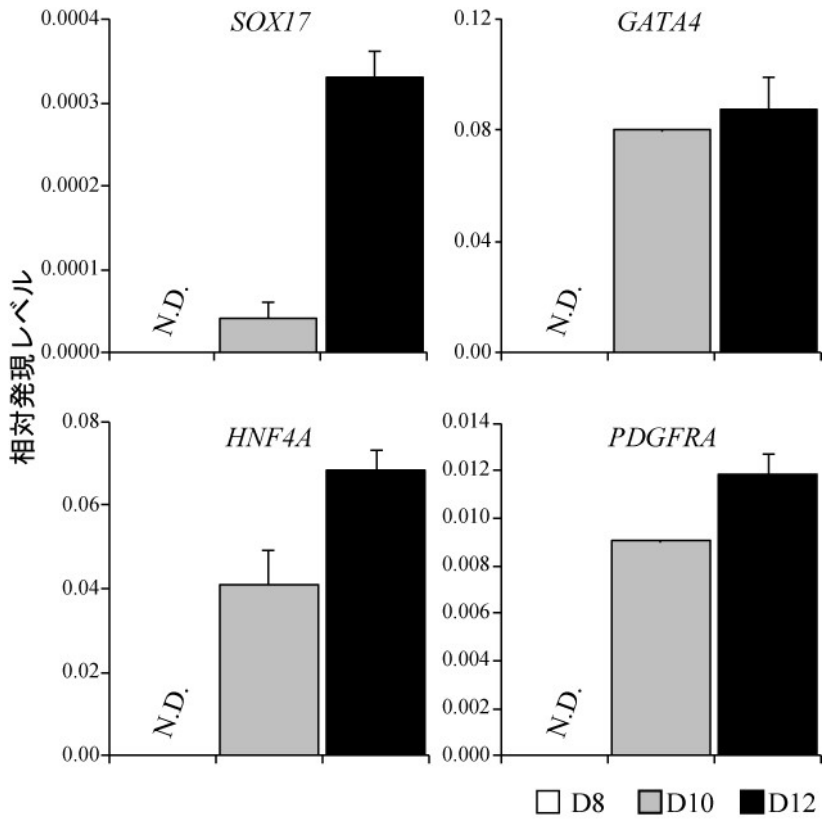


図 26. ゲル培養による PrE マーカー遺伝子の発現変化

IVF の D8 胚および D10、D14 のゲル培養胚から、ICM を機械的に除去し胚体外部分のみを定量 PCR に供した。バーは、*GAPDH*、*ACTB* および *H2AFZ* 遺伝子の発現量の幾何平均で正規化した値を用いて⊿⊿Ct 法により算出した平均値を示す。N.D.: 検出限界以下。エラーバー: ±S.E.M. $^{**}P < 0.01$、$^{*}P < 0.05$。

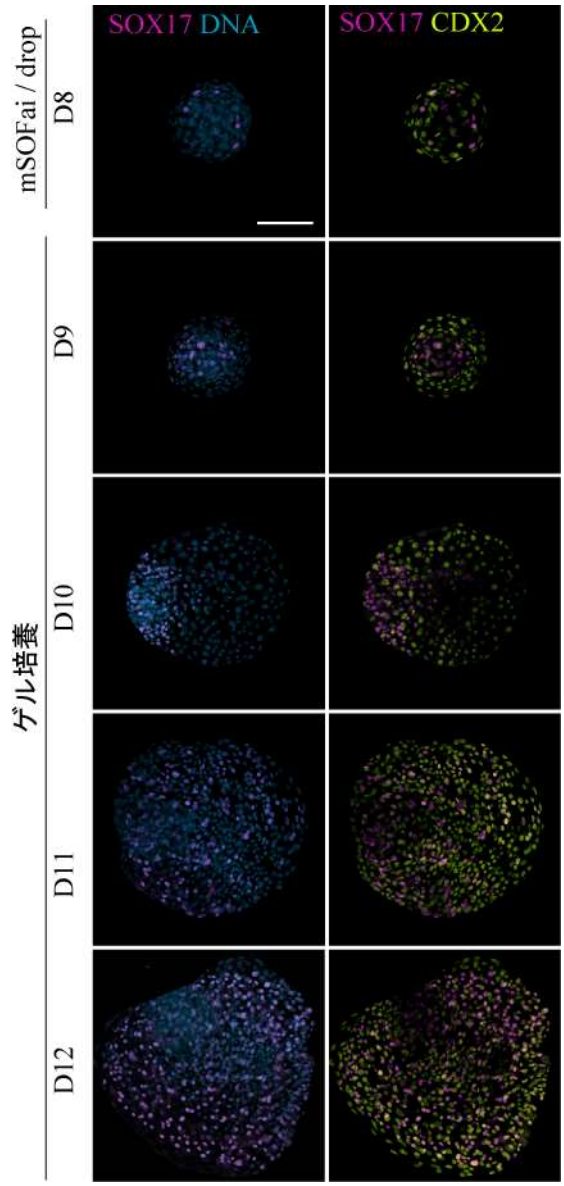


図 27. ゲル培養による SOX17 の局在変化

共焦点レーザー顕微鏡により撮影した、PrE マーカー (SOX17: マゼンタ)および TE マーカー (CDX2: 黄色)の免疫染色像。Hoechst (シアン)で核を対比染色した。スケールバー: 200 μm。

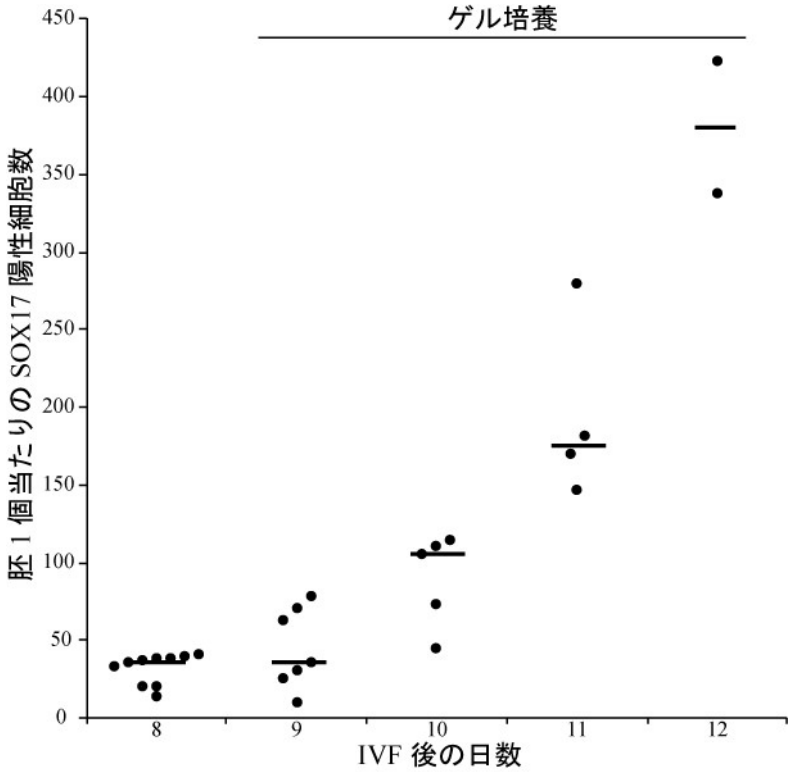


図 28. ゲル培養による SOX17 陽性細胞数の変化

細胞数は SOX17 の免疫染色像から手動でカウントした。水平方向の直線は当該培養日数における平均細胞数を示す。

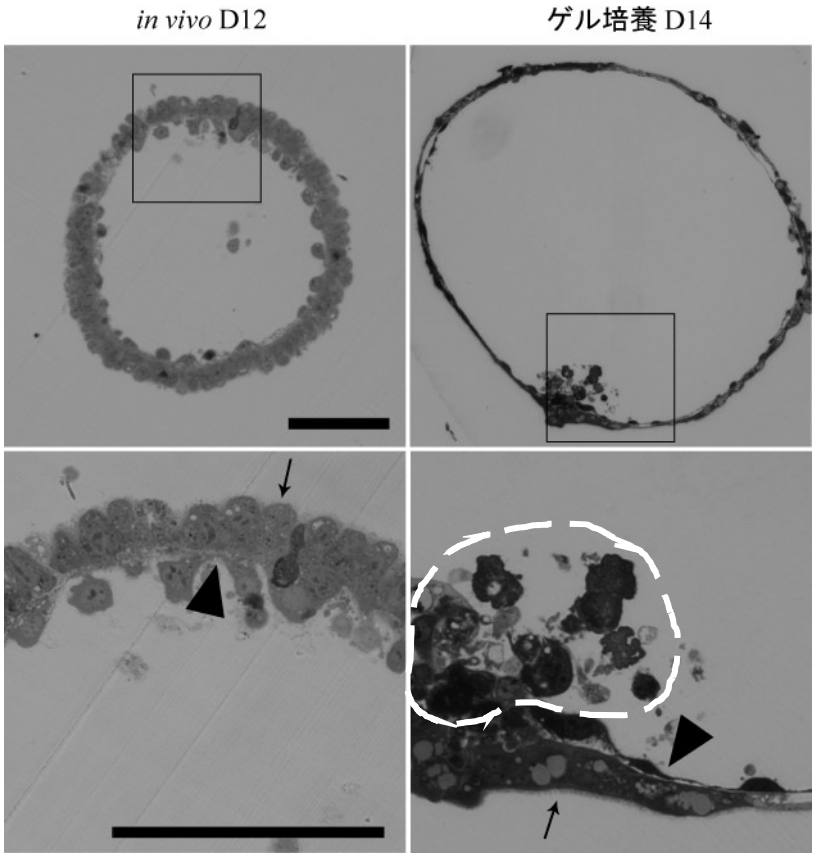


図 29. ゲル培養胚におけるハイポブラスト様層の出現

D14 のゲル培養胚および灌流で回収した D12 *in vivo* 胚の切片観察像。トルイジンブルー染色を行った。下段は、上段において四角で囲んだ部分の拡大図。矢印: TE の頂端側に局在する微絨毛。矢尻: TE を裏打ちする単層のハイポブラスト層。破線は、Epi 細胞領域を示す。スケールバー: 100 μm。

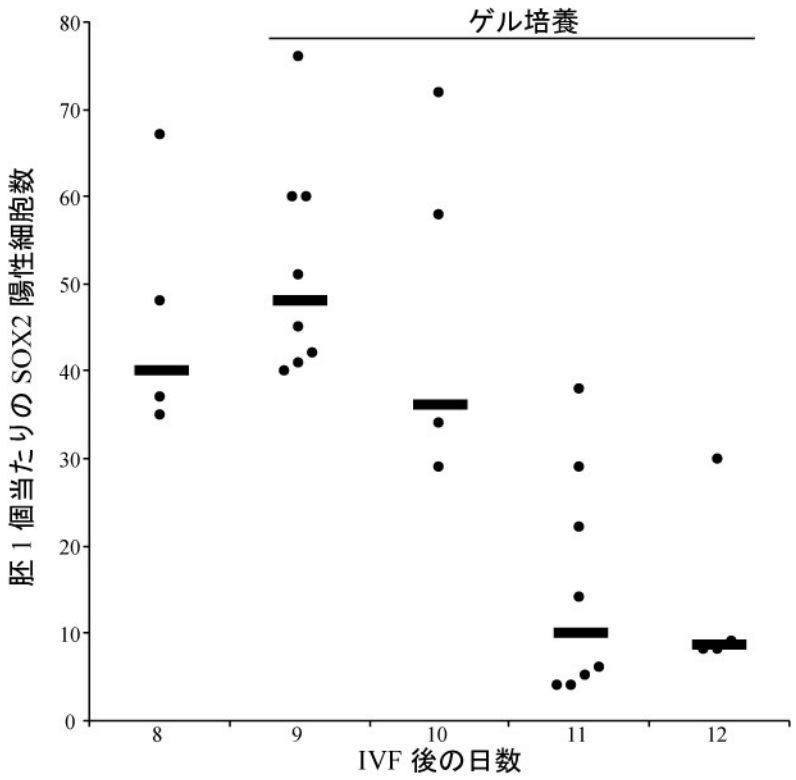


図 30. ゲル培養による SOX2 陽性細胞数の変化

細胞数は SOX2 の免疫染色像から手動でカウントした。水平線は平均細胞数を示す。

考察

本章では、古典的な組織培養法の一つである気液境界面培養法 [83]をウシ胚盤胞期胚の延長培養に応用することで、体外培養における胚の生存性を大幅に向上できることを示した。胚盤胞期以降の胚の体外培養は、マウス、ヒトにおいて、それぞれ母体組織に依存しない方法で達成されている [78,84]。これらの方法では、透明帯脱出後の胚盤胞期胚を基質に接着させ、高品質の血清を高い割合で含む培地中で培養することで、マウスでは着床後の E5.5 胚に相当する、「卵筒期」までの発生が再現された。実際には、体外で作出された卵筒期胚がその後個体発生を遂げるかどうかは不明であり、体内発生を完全に反映しているかどうかは決定されていないが、分化マーカーの発現や形態学的な解析から再現度は高いとされている。マウスおよびヒトの胚盤胞期胚は、透明帯脱出から間もなく子宮内膜への接着が行われる。この、浮遊状態から接着状態への移行が胚発生を胚盤胞期の次の段階に進めるために必要と考えられたため、これら動物種の延長培養では胚を積極的に基質へ接着させる方法が用いられた [85]。一方ウシは、透明帯脱出から着床までに 2 週間の期間があり、この間子宮への接着を経ずして初期胚発生が進行する。そのため、体外培養でウシの胚盤胞期以降の発生を再現する場合は、マウスやヒトで行われたような接着を促すプロトコールは不適切であると考えた。そこで本研究では、胚が基質に接着することを避けつつ培養を継続することを可能にする方法として、マウス新生子の精細管切片の体外培養により精子形成を行った知見を参考に [86]、アガロースゲルを用いた気液境界面培養法を採用した。本法は、過去にウシの延長培養法として行われてきた、アガロースゲルの中央に細長い空洞を設け、その中に胚盤胞期胚を置く「トンネル法」とは方法も実験結果も大きく異なる [71,77]。トンネル法では一定数の胚が D20 付近まで生存を延長し、体積も増大したが、Epi 細胞は急速なネクローシスによって失われ、またハイポブラスト様層も TE 層から脱落し胚としての組織構造を保つことができなかった [77]。トンネル法と、本研究において行ったゲル培養法は、IVF および従来法の IVC により胚盤胞期胚を作出するこ

と、培養基質としてアガロースゲルを用いていること、そして透明帯脱出が起こる D8 周辺の胚盤胞期胚を供試している点などが共通している。一方、これら二つの方法で決定的に異なるのは、トンネル法では胚表面のほとんどすべてがゲルに接するのに対し、ゲル培養法では胚の一部が直接気相と接することである。胚発生において代謝の副産物として生じるアンモニアやフリーラジカルなどは細胞に有害であるが [87,88]、トンネル法における胚表面とアガロースの接触面ではこれら有毒ガスの排出がうまく行われず、結果環境ストレスに敏感な Epi 細胞でのネクローシスに結び付いたのかもしれない [77]。ゲル培養胚は直接気相と触れることからガス交換の効率が良いと考えられ、そのため急速な Epi の損失が起こりにくかったと推察される。またトンネル法とゲル培養法では培地組成も異なり、トンネル法では 10%の FBS が添加されているのに対し、ゲル培養法では血清代替物である KSR を 30%の濃度で添加した。胚盤胞期以降の胚発生では、それ以前のステージと比べ多くの栄養素を必要とするようになる [89,90]。FBS はタンパク質等の栄養成分を豊富に含むため、胚盤胞期以降の培養において培地に添加することで胚の生存を高めることが知られている [91,92]。一方、FBS を含む培地での胚盤胞期以降の培養はヒトさい帯血清などを使用したときと比べ TE の自発的な分化を誘導しやすいという特徴がある [85,93]。胚が全体的な組織構造を維持したまま生存を続けるには、TE、Epi、ハイポブラストといった各種細胞がバランスよく存在しなければならない。主要な栄養源として FBS を用いているトンネル法では Epi やハイポブラストといった細胞系列に比べ TE 細胞の割合が異常に増えてしまい、結果として胚としての構造を保てなかったのかもしれない [76,77]。一方、多能性幹細胞の安定的な維持培養に多用される KSR はロット間で組成のばらつきが少なく、また自発的な分化を促進するようなモルフォゲンやタンパク質の含有も少ないと考えられる [94]。そのためゲル培養では、単に胚の生存性を延長しただけでなく、特定の細胞系列への分化バイアスを避けることで、以下に考察するように、胚盤胞期以降成体で起こる重要な分化イベントを再現できたと考えられる。

ゲル培養がどの程度 *in vivo* でのウシ胚発生を再現できているかどうか調べるため、まずゲル培養胚 TE の性質を解析した。マウス胚の TE では、胚盤胞の形成直後から、TE マスター制御因子の一つである CDX2 が特異的に発現している [47]。CDX2 は、ICM の多能性を規定する転写因子 OCT4 と相互に発現を抑制しあう関係にあり、マウス TE では OCT4 の発現レベルは低く抑えられている [45,95]。OCT4 発現の抑制には、*Oct4* 遺伝子上流領域の CDX2 結合部位 (CR4)が重要な役割を果たす [23]。OCT4 の発現が、CDX2 を含めた TE 特有の転写ネットワークの確立を妨げることから、OCT4 の発現低下は TE 機能的分化の必須要件であり、その点でマウス TE の細胞運命は胚盤胞形成直後に既に高度に制限されている [45]。これに対しウシゲノムには、CR4 に相当する領域が存在しないため、D7 の TE でも高いレベルの OCT4 が発現しており、細胞運命の制限の程度は低い [23,96]。当研究室の以前の研究の結果、IVF で作出した D8 の胚盤胞期胚において、代表的な多能性因子のうち *NANOG* や *SOX2* は既に ICM 優勢に発現していたが、*OCT4* の発現レベルは ICM と TE で明確な差異は検出されなかった [39]。ウシの *in vivo* 胚では、OCT4 の発現が TE で十分に低下するまでには、胚盤胞が形成される D7 からさらに 2〜3 日の期間を要し、マウス胚における発現パターンとは全く異なる [23]。ゲル培養胚の胚体外部分における定量 PCR の結果、培養日数の進行に伴い *OCT4*、*NANOG*、および *SOX2* の mRNA 発現レベルが大幅に低下していることが分かった。免疫染色によりタンパク質レベルでも、SOX2 と NANOG は D8 から D10 まで一貫して ICM に限局していたのに対し、OCT4 は D8 では ICM と TE の両領域で発現し、D9 および D10 と発生が進行するにつれて TE でのシグナルが弱まり、D10 では ICM に限局することが分かった (図 19)。ウシ胚やウシ ES 細胞を用いた研究から、OCT4、SOX2 および NANOG はいずれも ICM の多能性を維持するために必要であることが示されている [37,97]。ゲル培養胚 TE において OCT4 の発現が劇的に抑制された一方、ICM でこれら 3 因子が一貫して発現を続けていたことは、ICM の多能性は維持されたまま TE における細胞運命の決定が達成されたことを示している。

TE では細胞分化および特異的機能の獲得に伴い、グローバルな遺伝子の発現パターンが大きく変化する。ウシ胚においても近年解析が進められているものの、知見の蓄積はいまだ十分でない。そこで当研究室では以前、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析により、ウシ TE における D8 胚盤胞期から D14 伸長期にかけての遺伝子発現状態の変化を調べた [40,41]。この結果に基づき本研究では、D14 伸長期における発現の増加が特に顕著だった *GJB1*、*MYL3*、および *ASCL2* 遺伝子について定量 PCR で解析し、ゲル培養の進行に伴う発現の変化を調べた。なお、個々の遺伝子の役割としては以下のことが判明している。*GJB1* はコネキシン 43 とも呼ばれ、反芻動物の胎盤で特異的に発現するギャップ結合形成タンパクの一つである [98]。また、*MYL3* は胎盤の機能にとって重要な、ミオシン線維束の滑り運動に役割を果たすクロスブリッジの形成に必要である [99]。さらに、*ASCL2* は *MASH2* とも呼ばれる胎盤特異的なインプリント遺伝子の一種で、栄養膜細胞の細胞増殖等に関与している [100,101]。これら遺伝子のウシ TE における発現は、D8 では検出限界以下であったが、ゲル培養を行うことによって発現が検出されるようになった (図 20)。これは、ゲル培養胚において、胚盤胞期以降の発生ステージで起こる TE 特有の遺伝子発現の変化が誘導されたことを示している。加えて、ウシ TE は、日齢の進行に伴い①細胞増殖、②インターフェロンタウ (IFNT)の分泌を担う単核細胞の形成、そして、③子宮内膜との融合や胎盤性ホルモンの産生に必要な二核細胞の形成が特徴的に起こる [102]。IFNT は母体の黄体退行を抑制することから、反芻動物の妊娠成立に必須のサイトカインである [103]。定量 PCR で、ゲル培養胚における *IFNT* および二核細胞特異的遺伝子 *SSLP1* の上方制御が示され [104]、また電子顕微鏡観察によっても二核細胞の出現が直接的に証明された。これらの結果は、ゲル培養胚 TE の発達が、遺伝子発現の観点のみならず、形態学的観点からも体内発生に近似していることを強く支持している。さらに、免疫染色および定量 PCR から、TE 関連遺伝子がゲル培養胚 TE において安定して発現を継続していること、D10 の移植胚が母体に着床し初期の形態形成が完了できたこともあわせて、ゲル培養

胚 TE は機能的な完全性を保持していることが示された。しかし、ゲル培養における培養日数をどれだけ延長しても、TE の「伸長」は観察されなかった。TE の伸長はブタや反芻動物の着床前胚に特有の、指数関数的な細胞増殖に伴った体積の著しい増大であり、この結果着床直前には胚全体として最終的には紐状の形態になる[26]。伸長を経ずしては胚の着床は起こりえないため、TE の伸長メカニズムを解明することはこれら動物種の着床前発生の理解にとって重要な課題である。現在のところ、伸長のきっかけが何であるかはほとんどわかっていないが、ヒツジを用いた研究から子宮腺を欠失した子宮内では胚伸長が起こらないことが示されており、伸長における子宮からの分泌物の役割が指摘されている[105]。一方ブタでは、インターロイキン-1β と呼ばれるサイトカインを欠失させた胚では伸長の程度が著しく減少することが判明している [106]。これらのことから、伸長には子宮由来、胚由来両方の因子が役割を果たすと予想されるため [107,108]、今後はゲル培養法の応用によりこれら因子の詳細について精査することが望まれる。

ゲル培養胚 TE の評価に続き、ゲル培養胚における第二の細胞系統分離、すなわち ICM 内で起こる Epi と PrE の分離についても評価した。遺伝子改変マウスを用いた一連の研究から、Epi / PrE 分離の不備が早期の胚発生停止につながることが示されているものの[19,20,109,110]、その詳細な分子メカニズムは未解明である。ICM と TE の分離が胚内における割球の位置関係という比較的単純なモデルで説明されるのに対し、Epi と PrE の分離を明快に説明できるモデルは決定されておらず、議論が続けられている。現在有力視されているモデルは、割球間および割球内のシグナル伝達の不均衡により運命決定因子の存在量に濃淡が生まれ、確率論的に細胞運命が決定されるというものである [111,112]。このモデルによれば、第二の細胞系統分離においては、ICM 割球内で、転写因子であり互いに抑制関係にある NANOG と GATA6 のどちらが多く存在するかが重要であり、NANOG を高レベルで発現する割球は Epi、GATA6 を高レベルで発現する割球は PrE としての運命をたどる。胚盤胞形成直後には多くの ICM 割球で NANOG と GATA6 が共局在しているが、発

生の進行に伴い各割球でこれら転写因子の排他的発現が強化される [111]。NANOG と GATA6 のどちらの発現が優勢になるかは割球の相対位置ではなく確率論に従い、そのため NANOG 優勢細胞と GATA6 優勢細胞の ICM 内での分布はランダムであると考えられている。その様子が調味料の“塩コショウ (Salt and Pepper distribution)”に例えられるように、Epi および PrE 前駆細胞は分化中の ICM 内で斑上に存在する [111]。マウス胚においては、後期胚盤胞期に Epi および PrE 前駆細胞ではそれぞれ NANOG および GATA6 のタンパク質発現が排他的となり、その後各前駆細胞は空間的に分離され、着床直前の E4.0 には PrE が胞胚腔に接する ICM 表面に整列し、その PrE と極 TE に挟まれるようにして Epi がクラスターを形成し、第二の細胞分化が完了する。ウシではこれまで、評価システムの欠如のため第二の細胞分化における時空間的詳細は不明であった。本研究では、ゲル培養法により胚盤胞期以降の Epi および PrE 前駆細胞の様子を初めて詳しく観察することに成功し、これら細胞系統の分離がマウスで提唱されている Salt and Pepper モデルと同様であることを明らかにした。すなわち、D8 の胚盤胞期胚においては、SOX2 を発現する Epi 前駆細胞のほとんどが、PrE マーカーである SOX17 を同時に発現していた。D9 では、SOX2 と SOX17 の発現は割球間において相互排他的となり、SOX2 優勢細胞と SOX17 優勢細胞の ICM 内における配置はモザイク状になった。さらに、D10 においては SOX17 陽性細胞が胞胚腔に面して整列することが確認された。この局在パターンが、灌流により回収した D10 の *in vivo* 胚と同様であったことは、ゲル培養がウシにおける第二の細胞系統分離を再現できたことをさらに裏付けている。このように、マウスとウシで第二の細胞分化における空間的分離の類似性は示されたが、それを駆動する分子的基盤には種差が存在する。例えば、当研究室や他グループの過去の解析では、マウス胚とウシ胚で、PrE 前駆細胞の分化における Fgf シグナリングへの依存度に違いがあることが示された [24,25]。マウス胚では、Epi 前駆細胞から分泌される FGF4 が PrE 前駆細胞の表面で発現する FGFR に結合し、その下流で活性化される MAPK が GATA6 等の PrE マーカー遺伝子の発現を強化すること

で PrE 細胞の分化が促進される [111,113–115]。これを裏付ける実験として、薬剤処理による MAPK の阻害が割球の PrE への分化を抑制し、薬剤が高濃度になると ICM 内の全割球が NANOG 陽性の Epi 前駆細胞となることが知られている [113]。一方、ウシ胚盤胞期胚で同様の薬剤処理を施しても、GATA6 陽性の PrE 前駆細胞は依然として ICM 内に残り続ける [24]。これと一致して、ウシ胚における *FGFR2* 遺伝子の shRNA による KD は、胚盤胞期胚における *GATA6* の発現レベルに影響を及ぼさないことが突き止められている [25]。これらの知見より、ウシ胚における PrE 前駆細胞での GATA6 発現の FGF シグナリングへの依存度は、マウスと比べ非常に小さいと推察される。また、マウス胚において Epi / PrE 分離開始の後に発現が高まる GATA4 は、ウシ胚では胚盤胞形成直後において、TE と ICM で同レベルに発現している [24]。マウス胚盤胞期胚では、胚盤胞が形成される E3.5 から着床直前の E4.5 の 24 時間の間で、Epi および PrE 前駆細胞の空間的分離が迅速に達成される。一方、ウシでは、胚盤胞の形成からこの空間的分離の達成までおよそ 3 日間を要することが本研究の観察により初めて示された (図 24)。今後は、ゲル培養法と、蛍光タグの付加などといった遺伝子工学的手法の組み合わせにより、この 3 日間におけるより詳細な時空間的動態を決定していく必要がある。

ゲル培養胚では、第二の細胞分化の完了後にも培養を継続することで、PrE 由来のハイポブラスト層の形成が認められた (図 29)。ウシ胚においては、ハイポブラスト層の形成は TE の伸長に先立って行われ、正常な発生の進行に不可欠な胚体外膜の二重構造の確立にとって重要である [28]。過去にもウシ胚盤胞期胚の延長培養によりハイポブラスト層が出現したという報告があるが、マーカー遺伝子 *SOX17* の発現が誘導されておらず、ハイポブラスト層形成を裏付ける論拠が脆弱であった [76]。そしてこれまでは、ハイポブラスト層形成を正確に検証するために不可欠な信頼性の高いハイポブラストマーカーが、ウシ胚では *GATA6* や *SOX17* に限られていた。この問題を解消するために本研究では、過去の RNA-seq のデータを用いて、ウシハイポブラストマーカー候補遺伝子の探索を行った。決定さ

れたウシ胚ハイポブラストマーカー候補遺伝子、すなわち *SOX17*、*GATA4*、*HNF4A* および *PDGFRA* について、定量 PCR 解析を行ったところ、ゲル培養胚の胚体外領域では発生の進行に伴って発現レベルが顕著に上昇することが示された (図 26)。なかでも転写因子 *SOX17* は、RNA-seq における発現変動比が 4 遺伝子の中で最も大きく、マウス胚でも PrE 細胞分化に重要な役割を果たすことが示されているため、信頼性の高いマーカー遺伝子と考えられる [116,117]。mRNA のみならずタンパク質レベルでも、ゲル培養胚の発生の進行に伴い SOX17 陽性細胞数が直線的に増加していたため、ICM から分化した PrE、そしてその派生物であるハイポブラスト層の形成が強く裏付けられた (図 28)。加えて、切片画像の観察により TE を裏打ちするハイポブラスト層も確認され (図 29)、ゲル培養胚でのハイポブラスト層形成能が立証された。

第四章 ウシ胚盤胞期胚ゲル培養系の改良

緒言

前章で新たに開発したゲル培養法により、ウシ胚盤胞期胚の体外培養における生存性が顕著に上昇し、*in vivo* 胚と同様、TE、Epi、および PrE への細胞分化が再現できることが示された。しかし、Epi マーカーである SOX2 タンパク質の免疫染色の結果からは、Epi/ PrE 分化完了後の D10 を境として、ゲル培養胚における Epi 細胞数が大きく減少することが分かった (図 30)。さらに、生存時間分析の結果からは、D11 以降ゲル培養胚の生存率が急激に低下することが示された (図 15)。生体では、Epi/ PrE の分化が完了して PrE からハイポブラスト層が形成されると、Epi では細胞数が増加するとともに極性化が起こり、胚盤を形成する [118]。そして、TE では伸長が起こり胚全体の体積が指数関数的に大きくなる [28]。したがって、ゲル培養胚で観察された Epi 細胞数の減少は生体内での実際の胚発生と相反するものであり、ゲル培養系において胚が完全性を保ったまま生存できる限界が D10 周辺であることを示唆している。本章では、前章で開発したゲル培養系に対し、培養時の酸素分圧を下げること、および胚発育に重要と推測される外来遺伝子を強制発現させること、以上二つの改変を試し、D10 以降の胚の培養条件の改良を目指した。

酸素分圧の操作は、Epi 細胞数の減少を防ぐ目的で行った。ゲル培養法は気液境界面培養法の応用により胚が気相と効率的に接触できることが大きなメリットである反面、酸化ストレスの原因となる酸素への直接的な曝露による負の影響も受けやすいと考えられる。体外培養において酸化ストレスは胚発生に負の影響を与え、培養時の酸素分圧を低下させることで改善されることがある [119]。また、Epi に近似した ES 細胞においても、培養時の酸素分圧を 21%から 5%に変更することにより、自発的細胞分化による細胞数の減少が阻止された [120]。これらのことから、ゲル培養法における培養時の酸素分圧を下げることで酸化ストレスの回避が期待され Epi 細胞数の減少を防ぐと予想した。そこで、酸素分

圧を、大気と同様の 21%、および一般的な哺乳類の子宮内と同様の 5%の 2 通りに設定しゲル培養を行い、両者で生存率および Epi 細胞数の変化を比べた。

続く外来遺伝子の強制発現は、胚体外領域における細胞分化を促進させる目的で行った。先行研究で行ったトランスクリプトーム解析により、胚盤胞期以降 TE では遺伝子発現パターンが変化し、なかでも細胞外領域に分泌されるタンパク質をコードする mRNA の発現は顕著に上昇していた [40,41]。データベース解析などの結果から、特に *AREG*、*NRG2*、および *WNT11* といった液性因子発現の顕著な増加が胚盤胞期以降の胚発生に何らかの役割を果たすことが示唆されたものの、ウシ胚発生における先行研究が乏しく詳細は不明であった。

NRG2 および AREG の二つのタンパク質はいずれも、発生ステージのあらゆる場面で重要な役割を果たす上皮成長因子 (epidermal growth facter: EGF)ファミリーに分類される成長因子である [108,121,122]。AREG および NRG2 は、共に EGF 様ドメインという保存された領域でレセプターチロシンキナーゼのリン酸化を行い、細胞内にシグナルを伝達する [121,123,124]。これまでに知られている生理的な役割として、AREG は乳腺や骨組織、および卵子の発達への関与があげられる [125]。また、NRG2 はノックアウトマウスに顕著な表現型異常が見出されなかったため長い間その役割は不明とされてきたが、近年、成体の脳におけるニューロン間の相互作用への関与が示されている [126–128]。AREG、NRG2 ともに、着床前胚発生における役割はマウスを含め哺乳類胚において調べられていない。AREG、NRG2 を含め現在同定されている 10 種類の EGF ファミリー分子間で、EGF 様ドメインの保存性は高いものの、わずかなアミノ酸残基の違いが標的細胞への異なる作用を生み出す。特に、NRG ファミリー分子は同一の遺伝子から多くのスプライシング変異体が発現し、それぞれ異なる機能を持つ [129]。以上のことから、特定の細胞における EGF ファミリー分子の働きを推測するためには、EGF 様ドメインを含めタンパク質の構造を正確に把握しておく必要がある。

また、WNT11 は、Wingless-type MMTV integration site (WNT)ファミリーに属する分泌性糖タンパクの一種である [130]。マウスおよびヒトでは 19 種類の WNT ファミリーリガンド分子が同定されており、これらに対応する受容体は異なる種類同士でヘテロダイマーを形成し機能を発揮する [130]。マウス *Wnt11* は、ファミリー分子のうちでも *Wnt5a* と構造が特によく似ており、胚発生における機能も一部重複している [131,132]。そのため、*Wnt11* 単独欠損マウス胚の一部は出生に至るものの [133]、*Wnt11* と *Wnt5a* の二重欠損マウス胚は心形成不全、前後軸の伸長の異常など様々な表現型異常を示し E10.5 周辺で致死となる [131,132]。この二重欠損マウス胚では E8.0 より前のステージにおける顕著な表現型異常は見出されていないものの [132]、*in situ* hybridization や蛍光タグを用いた遺伝子マッピングでは、原腸陥入時の E6.5 胚の胚体外領域および Epi における *Wnt11* 発現が検出されており、初期の形態形成における役割が指摘されている [134,135]。一方ウシにおいては、胚盤胞期において *WNT11* が発現していること [136]、培地への WNT11 組換えタンパクの添加により体外培養胚の胚盤胞期までの発生が上昇することが報告されており [137]、JNK キナーゼのリン酸化等を介した細胞極性の制御を通じ胚発生に関わっている可能性が示唆されている [137]。

前章で行った定量 PCR 解析により、トランスクリプトームで顕著な上昇が確認された TE マーカー遺伝子は、ゲル培養により効率的に発現誘導されることを示したものの、*AREG* および *WNT11* の発現レベルは検出限界以下であり、また、*NRG2* の発現レベルは D8 の胚盤胞期胚と差がなかった (図 31)。ゲル培養法は単純なシステムゆえに、再現性が高く容易であるという利点がある一方で、子宮内という動的に変化する複雑な環境を胚に提供することはできない。胚盤胞期以降に役割を果たす遺伝子の中には、子宮内という特異的な環境の作用を上昇のきっかけとするものがあり [138]、子宮内環境を体外培養系で完全再現することは不可能であるためゲル培養胚における TE の分化も不完全となるのかもしれない。さらに、培養液中に組換タンパク質を添加して影響を調べるアプローチも考

えられるが、機能ドメインの構造や糖鎖などの修飾状態が微妙に異なる市販の大腸菌由来の組換えタンパク質を用いることは正当な生体反応を評価する上で適当ではない。そこで本章では、ウシ由来の *AREG*、*NRG2*、および *WNT11* をクローニングして、TE において直接的に強制発現させたときのゲル培養胚 TE の分化のレベルを評価して、TE 分化に必要な胚側の要因について考察することとした。特に *NRG2* 遺伝子についてはデータベースの登録情報がゲノム配列から機械的に予測したもので、開始コドンより前の配列はすべて不明であり、CDS 全長の取得の障害となっていた。そこで、未知配列決定手法の一つである RACE 法を行い、全長配列を改めて決定した。

材料と方法

ウシ体外培養胚の作出

第二章「材料と方法」に従った。また、クローニングやレンチウイルスベクターの作製に用いたプラスミドベクターのベクターマップと特徴を、「付図」にまとめた。

異なる酸素分圧下でのゲル培養

ゲル培養時の酸素分圧の違いに関わらず、胚盤胞期胚の作出までは全て前章と同様の培養条件、および手順で行った。第三章では、ゲル培養時の気相条件を 38.5°C、5% CO_2、21% O_2 (大気中の酸素分圧)、湿度 100%で固定していた。これと同様の条件における培養を「21% O_2 区」とした。一方、「5% O_2 区」は、酸素分圧を 5%にし、その他の条件は 21% O_2 区と同一とした。これら二つの気相条件で培養を行ったゲル培養胚それぞれの生存確率を、第三章材料と方法の「胚盤胞期以降の胚の平均および最長生存日数の算出」に従って推定した。また、D10、および D12 のゲル培養胚をサンプリングし、第三章材料と方法の「免疫染色」に従い免疫染色に供した。

Rapid Amplification of cDNA End (RACE)法による、*NRG2* 遺伝子の UTR 配列の決定

NRG2 遺伝子はラットやマウスの小脳で高発現を示すことを参考に [121,124]、食肉検査場由来の妊娠ウシから摘出した推定日齢 60 日の胎子の小脳から、IsogenII (ニッポンジーン)を用いて総 RNA を抽出した。この総 RNA 約 90 μg から、Magnosphere™ UltraPure mRNA Purification Kit (Takara)を用いて、キット添付のマニュアルに従って mRNA を単離精製した。mRNA 約 600 ng を用いて SMARTer® RACE 5'/3' Kit (Takara)のマニュアルに従い 5'および 3' RACE 用の cDNA を合成し、キット付属のユニバーサルプライマーと、「NRG2 5_RACE 2018R」および「NRG2 3_RACE 1902F」プライマー (付表 1)を用いて 5'および 3' RACE PCR を行い、キット付属の pRACE ベクターへサブクローニングした。次に、人工

授精後 18 日目に子宮灌流により回収した伸長期胚の栄養膜細胞部分を用いて同様に RNA 抽出、mRNA 精製、逆転写を行い RACE PCR により 5'および 3'側の非翻訳領域 (Untranslated region: UTR)を含む *NRG2* mRNA の配列を決定した。

ヒト胎児腎臓由来細胞株 (HEK293FT)の維持

HEK293FT 細胞 (293FT Cell Line, Invitrogen)の凍結ストックを 10 cm ディッシュ (TR4200、日本ジェネティクス、Tokyo、Japan)1 枚あたり 5.0×10^6 の細胞数となるよう、10%の FBS を添加した高グルコースの DMEM (富士フイルム和光、Osaka、Japan)10 mL で播種し、5% CO_2、37.0°C、湿度 100%のインキュベーター内で培養した。位相差顕微鏡により細胞の観察を行い、ディッシュ底面の 6 割から 7 割程度を覆うまで細胞が増殖した段階 (60 から 70%コンフルエント)で培養期間 3 から 4 日ごとに継代を行った。継代時には培地を除去してから 2 mL の PBS (−)を注ぎディッシュ全体にいきわたらせてから除去することで洗浄を行ったのち、0.017% (w/v) Trypsin、0.0067% (w/v) EDTA を含む PBS (−)を 1 mL 加えてディッシュ全体にいきわたらせてからインキュベーターに戻した。およそ 1 分後に検鏡し大部分の細胞がディッシュから剥がれていることを確認してから、10% FBS を含む培地 200 µL を加えてトリプシンの反応を止め、9 mL の PBS (−)を加えて全量を 15 mL の遠沈管に移して回収した。室温で 5 分間、100 × *g* で遠心し上清を除去したのち、新鮮な 10% FBS/ DMEM 1 mL を注ぎ穏やかにピペッティングすることで懸濁してから、トリパンブルー染色により生細胞数をカウントした。ディッシュ当たり 1.0 から 2.0×10^6 細胞となるよう 10 mL の 10% FBS/ DMEM とともに播種しインキュベーターに戻した。HEK293FT 細胞は非常にはがれやすい細胞であるため、培地や試薬は室温あるいは 37°C に温めてから使用し、ディッシュに注ぐ際は常に壁面を伝わらせゆっくりと滴下するよう努めた。

レンチウイルスベクターの作製および濃縮

レンチウイルスベクター作製の際は、融解後 2 回以上継代を行った、総継代数 20 以内の HEK293FT 細胞を使用した。PBS (−)で 100 μg/ mL になるよう溶解しフィルター滅菌した Poly - D – Lysine (Sigma-Aldrich)を PBS (−)でさらに 5 倍希釈し、2 mL を 10 cm ディッシュに注ぎ、クリーンベンチ内で UV を照射しながら 30 分から一晩静置することにより底面をコーティングした。PBS (−) 2 mL で 2 回洗浄を行った後、正確に 7.0×10^6 の細胞数になるよう、また、ディッシュ全体に細胞が均一にいきわたるよう注意しながら HEK293FT 細胞を継代した。翌日の午前検鏡し、70%から 80%コンフルエントになっていることを確認してから培地を除去し、抗生物質を含まない 10% FBS/ DMEM 10 mL を新たに注いだ。続いて、PureYield™ Plasmid Midiprep System (promega)を用いて精製を行い超純水に溶解したパッケージングベクター (pCAG-HIVgp)、修飾遺伝子ベクター (pCMV-VSV-G-RSV-Rev)およびトランスファーベクター各 2.7 μg を、2 mL のチューブ (Safe-Lock Tubes, 2.0 mL, Eppendorf)内で、予め室温に戻しておいた Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)で希釈し総量を 760 μL とした。ここに、予め室温に戻し穏やかに転倒混和した viafect (promega)を 40 μL 添加し、全体を穏やかに混和してから室温で 15 分間静置したのち、10 cm ディッシュに注ぎ全体に均一にいきわたらせインキュベーターに戻した。翌々日の午前に、ウイルス粒子を含む培養上清 (ウイルス液)を 50 mL の遠沈管に回収し、抗生物質を含まない 10% FBS/ DMEM 7.5 mL を新たに注いだ。その翌日の午前に再びウイルス液を回収し、ウイルス液全量を室温、100 × *g* で遠心した。遠心後の上清を再生セルロース製のメンブレンフィルター (ミニザルト RC25、Sartorius)でろ過し、ろ液を超遠心用チューブ (25PC アツチューブ、日立工機、Tokyo、Japan)に移し、アングルローター (S50A、日立工機、Tokyo、Japan)にて 4°C、50,000 × *g* で 2 時間超遠心機 (cs120GX、日立工機、Tokyo、Japan)を用いて超遠心処理した。上清をデカントで除去し、チューブに 400 μL の Opti-MEM を注ぎ、1 分間ボルテックスを行った後イエローチップで 30 回ピペッティングした懸濁液を小容量の超遠心用チューブ (4PC チューブ、日立工機、Tokyo、Japan)に移し、アングルローター

(S110AT、日立工機、Tokyo、Japan)再度 4°C、50,000 × *g* で 2 時間超遠心を行った。デカントで上清を除去し、チューブ当たり 30 μL の Opti-MEM を注ぎ、ボルテックス、ピペッティングにてペレットを溶解した。濃縮ウイルス液は 0.6 ml チューブに 5 μL ずつ分注し、−80°C で凍結保存した。

HEK293FT 細胞への感染によるウイルスタイターの確認

レンチウイルスベクターに GFP をはじめとする蛍光タンパク質のコード配列が組み込まれている場合、感染の成否は感染細胞の蛍光観察により容易に判定することができる。本研究で用いたトランスファーベクターのプロモーター下には IRES 配列が存在し (付図 CSII-EF-MCS-IRESII-Venus を参照)、下流の Venus (GFP の変異体)タンパク質が MCS 直下の外来遺伝子とは独立に翻訳される。このことを利用し、Venus タンパク質の蛍光観察により目的の外来遺伝子の発現量を簡易的に推定した。HEK293FT 細胞に感染させ蛍光観察することで簡易的にウイルスタイター (力価)を推定した。HEK293FT 細胞が 60%コンフルエントになった時点で培地を除去し、18 μg/ mL のポリブレン溶液 (Nacalai tesque)を含む 10% FBS/ DMEM で任意の濃度に希釈した上記濃縮ウイルス液を、通常の維持培養で注ぐ培地の半分の量だけ、ディッシュあるいはウェルに注いだ。感染開始後 22 時間目に培地交換を行い、さらに 1 日培養を行ってから蛍光観察を行い、蛍光タンパク陽性細胞数と総細胞数の比からウイルスの力価を推定した。例えば、感染時の細胞数が 1×10^5 となるよう調整し 6well プレートに HEK293FT 細胞を播種し、100 倍希釈したウイルス溶液を 100 μL 添加することで感染を行い、50%の細胞で蛍光シグナルが観察できた場合、希釈前のウイルス溶液の生物学的力価は

$$\frac{\text{感染時細胞数}\times\frac{\text{陽性細胞割合}(\%)}{100}}{\text{感染に用いたウイルスの液量}(\mathrm{mL})}\times\text{希釈倍率}=\frac{(1\times10^5)\times\frac{50}{100}}{100\times\frac{1}{1000}}\times100=5\times10^7[\mathrm{IFU/mL}]$$

となる。なお、哺乳類胚へのレンチウイルスベクターによる遺伝子導入では通常、1×10^9

IFU / mL 程度の高い力価を持つウイルス液が使用される [139,140]。

囲卵腔への濃縮ウイルス液注入によるウシ胚への遺伝子導入

胚への遺伝子導入では、原液換算で少なくとも 300 倍以上に濃縮したウイルス液を用いた。マニピュレーションは第二章、材料と方法の「ウシ 1 細胞期胚へのマイクロインジェクション」と同様に行った。インジェクションピペットの先端が詰まることを防ぐため、濃縮ウイルス液は使用前に 4°C、15,000 rpm で 1 分間遠心することにより不純物を沈殿させ、上清だけをインジェクションに用いた。インジェクションは IVF 開始から 6.5 日後の早期胚盤胞期胚に対して行った。ウシ胚は透明帯と細胞質間の空間 (囲卵腔)が小さく十分量のウイルス液を注入するのに不都合であったため、操作培地として 0.1 M のスクロースを含む PB1 を用いることにより浸透圧で細胞質を収縮させ囲卵腔を広げた状態で注入を行った。急激な浸透圧の変化による胚への悪影響を避けるため、0.025 M、0.05 M、0.075 M とスクロース濃度を段階的に高くした PB1 をそれぞれ用意し、順番に十数秒間処理胚を浸漬することで徐々に囲卵腔を広げた。マニピュレーションが終了したあとは、逆の順番で高張な PB1 から低張な方に段階的に処理胚を移し、最終的に mSOFai 培地に戻した。

ウイルス感染ウシ胚における遺伝子型解析

レンチウイルスが感染後宿主のゲノムに外来遺伝子を挿入することを利用し、胚の遺伝子型を解析することでウイルスによる遺伝子導入の成否を判定した。CMV プロモーター下で、ミトコンドリア局在シグナルを有する Venus タンパク質を発現するカセットをゲノムに挿入する、CSII – CMV – Venus – Mito – IRES2 – Bsd (理研 BRC)をトランスファーベクターとして用いレンチウイルスベクターを作製し、超遠心法により 1,000 倍濃縮したウイルス液を 1 細胞期胚の囲卵腔に注入し、体外培養に供した。DNA 量を確保するためサンプリングは胚盤胞期に行った。滅菌水 10 μL を 0.6 mL のチューブに入れ、蒸発を防ぐためミ

ネラルオイルを重層した。透明帯がついたままの胚盤胞期胚 1 個を、PBS で 4 回、続いて滅菌水で 5 回洗浄したのち、ガラスキャピラリーを用いてチューブの中の滅菌水に入れた。チューブにフローターを装着し、沸騰水に浮かべ 5 分間保持した。チューブを氷冷し、使用時まで−20°C にて凍結保存した。サンプルを解凍後、10 秒間ボルテックスを行うことで混和した溶液から 2 μL を分取し、ここに 2 x Gotaq green master mix (promega) 5 μL、フォワードおよびリバースプライマー (各 5 μM、付表 1 参照)各 1 μL、滅菌水 2 μL を添加し合計 10 μL とし PCR を行った。温度条件は、94°C 4 分間で変性を行った後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分間を 40 サイクル行い、さらに 72°C で 10 分間、最終伸長を行った。PCR 産物を 2% (w/v)のアガロースゲルにアプライし電気泳動を行い、バンドの有無から遺伝子導入の成否を判定した。

RT-PCR および定量 PCR

マニュピレーション操作を行わずゲル培養に供した「uninjected」、外来遺伝子を導入せず Venus タンパク質のみを発現するようなトランスファーベクターを用いて作製した「空ウイルス」を感染させゲル培養に供した「empty」、および目的遺伝子を導入したトランスファーベクターを用いて作製したウイルスを感染させゲル培養に供した「infected」の 3 区を設け、それぞれ D12 でサンプリングを行った。ひとつのサンプルにつき 2 胚を供試し、RNA 抽出、cDNA 合成および定量 PCR は第二章の材料と方法に従い、用いたプライマーは付表 1 に示した。

結果

低酸素条件での培養がゲル培養胚に与える影響

ゲル培養における胚の生存率は D10 を境に減少することが示された (図 15)。さらに、胚当たりの SOX2 陽性細胞数も、D11 から減少し、最終的に D13 では検出されなくなった (図 30)。これらは、D10 周辺における生存性の低下および Epi の品質低下を示している。そこで、インキュベーターの気相における酸素の分圧を、大気と同様の 21% (高酸素)から生体と同等の 5% (低酸素)まで低下させ培養を行った。低酸素条件における胚の平均生存日数および最長生存日数はそれぞれ 16.5 日および 22 日 (サンプリングによる打ち切り)となり、高酸素条件と比べ有意に延長した (log-rank 法、P <0.05, 図 32)。また、ゲル培養胚における総細胞数も、D10 においては酸素分圧による差がなかったが、D12 においては高酸素条件と比べ低酸素条件において有意に増加していた (図 33)。D12 における SOX2 陽性細胞数は高酸素条件と比べ低酸素条件において有意に (P < 0.05)多く、低酸素条件の D12 胚の中には SOX2 陽性細胞数が 60 以上のものも観察された (図 34)。また、胚全体における SOX2 と SOX17 タンパクの局在パターンは、D12 のゲル培養胚と灌流により回収した D12 の *in vivo* 胚で類似していた (図 35)。

ウシ D18 胚で発現する *AREG* および *WNT11* mRNA の配列

AREG および *WNT11* 遺伝子におけるスプライシング変異体の存在は報告されていない。ウシ *AREG* は 2007 年、*WNT11* は 2008 年、いずれも Moore らにより、6 か月齢メスウシ肝臓由来 cDNA ライブラリーを用いた配列決定が行われており、UTR を含むコーディング配列 (Coding Sequence: CDS)全長の配列が登録されている (Accession no. *AREG*: GenBank: BC142081.1, *WNT11*: BC133627.1)。ウシ初期胚においても実際に同一の mRNA が発現していることを確認するため、データベースの配列情報を参考にプライマーを設計し PCR を行い、UTR を含む CDS の全長をクローニングした。シーケンスの結果、*AREG* CDS は全長

にわたりデータベースに登録されている配列と完全に一致していた。一方 WNT11 は、CDS 中 4 か所 (開始コドンの A を 1 番目とした時、1166 番目の A→C、1205 番目の T→C、1332 番目の C→T、1384 番目の C→T)に一塩基置換が検出された。

ウシ胎子小脳で発現する *NRG2* mRNA の配列

RACE 法により、UTR を含む *NRG2* mRNA の配列を、5'側と 3'側で別々に決定した。小脳では、1 種類のスプライシング変異体を検出し、その CDS は、2019 年 9 月 27 日現在、NCBI のデータベースに登録されている Bos taurus neuregulin 2 (NRG2), transcript variant X1, mRNA (XM_003586310.5)と完全に一致していた。

ウシ D18 伸長期胚栄養膜細胞で発現する *NRG2* mRNA の配列

灌流により回収した D18 の伸長期胚についても胎子小脳と同様に *NRG2* mRNA の配列決定を行った。本研究では 4 種類のスプライシング変異体が検出され、いずれの配列も小脳で検出された変異体とは異なり、また 2019 年 9 月 27 日現在 NCBI のデータベースに登録されている 3 種類の変異体のいずれとも一致しなかった。伸長期胚において新たに検出された 4 つの変異体をそれぞれ、embryonic NRG2: eNRG2 a, b, c および d と名付け、既知のタンパク質ドメインの予測に基づきそれぞれを比較した (図 36, 37)。eNRG2 c は 4 つのバリアントの中で最もサイズが大きく、完全長の Immunogloblin domain、EGF 様ドメイン、NRG conserved region を有していた (図 37)。EGF 様ドメイン周辺の配列のみが transcription variant X1 の配列と大きく異なっており、その他の部分の配列は両者で完全に一致していた (図 36)。また、eNRG2 a, b,および d はそれぞれ、eNRG2 c の Immunogloblin domain の 5` 領域に一部と NRG conserved domain の 3`領域の一部、Immunogloblin domain と EGF 様ドメイン全体、および Immunogloblin domain と EGF 様ドメイン全体と NRG conserved regionno の 5`領域の一部をそれぞれ欠損した配列を有していた (図 37)。

ウイルスベクターを用いたウシ初期胚への遺伝子導入

初めに、胚盤胞期胚の遺伝子型解析を行うことで、濃縮ウイルス液の注入により実際にウシ胚に外来遺伝子が導入されていることを確認した。卵割率および胚盤胞期までの発生率は、注入を行っていないコントロールとウイルス注入胚で差がなかった (7 /10 vs 28/ 36, 3/10 vs 13/36)。遺伝子型解析により、サンプリングを行った 12 個のウイルス注入胚全てにおいて、外来遺伝子のゲノムへの導入が確認された。

続いて、遺伝子導入に用いる外来プロモーターの評価を行った。マウスにおいて外来遺伝子を人為的に強制発現させる場合、広範な組織で高い発現量が期待されるサイトメガロウイルス由来の CMV プロモーターが最頻用される。しかしこのような非哺乳類由来の配列は、動物種や細胞種によってはゲノムに挿入した際シトシン塩基のメチル化などのサイレンシングを受けることがあり、ウシでも外来プロモーターとして CMV を用いることが最適かどうかはわからない。そこで、CMV に加え、ヒト由来のユビキチン C (UbC)および伸長因子 (EF1α)プロモーターの下流で GFP の変異体である Venus を発現するレンチウイルスベクターを作製し、ウシ胎子線維芽細胞に感染させた。この結果、同様の力価を持つウイルスを感染させた場合、CMV および UbC プロモーターと比べ、EF1α プロモーターの下流で Venus を発現するウイルスで細胞の蛍光強度が最も高くなった (図 38)。したがって、以降の実験では、ウシ初期胚への遺伝子導入においては外来プロモーターとして EF1α を用いることとした。

***AREG*、*NRG2*、および *WNT11* ウイルス混合液の胚盤胞期胚囲卵腔注入による遺伝子発現への影響**

胚盤胞期以降の TE において特異的に発現が上昇する *AREG*、*NRG2*、および *WNT11* 遺伝子を、TE 特異的に強制発現させるため、D6.5 の早期胚盤胞期胚の囲卵腔に、各遺伝子を別々に発現するウイルスの濃縮液の等量混合物を注入した。注入後、24 時間 SOF 培地

を用いた従来法で体外培養を継続したのち、低酸素条件でゲル培養に供した。コントロールとしては、Venus のみを発現するウイルスを感染させた胚を用意した。D12 において生存が確認された胚に、サイズを含む形態的な違いはなかった。これらをサンプリングし定量 PCR による相対遺伝子発現解析を行ったところ、ウイルスによる導入を行った 3 遺伝子のうち、*AREG*、および *NRG2* の発現は、Venus のみを発現するウイルスを感染させたコントロールと比較し高かったが、*WNT11* の発現には変化がなかった (図 39)。Epi マーカーである *OCT4* および *NANOG* の発現量は外来遺伝子導入区とコントロールとの差はみられなかったが、PrE マーカーである *SOX17* の発現は 3 遺伝子導入胚で高かった (図 39)。また、TE マーカー遺伝子のうち、*CDX2*、*IFNT*、*GATA3*、および *ID2* の発現レベルは外来遺伝子導入胚とコントロールで差がみられなかったが、*ETS2* の発現は外来遺伝子導入胚で高かった (図 39)。

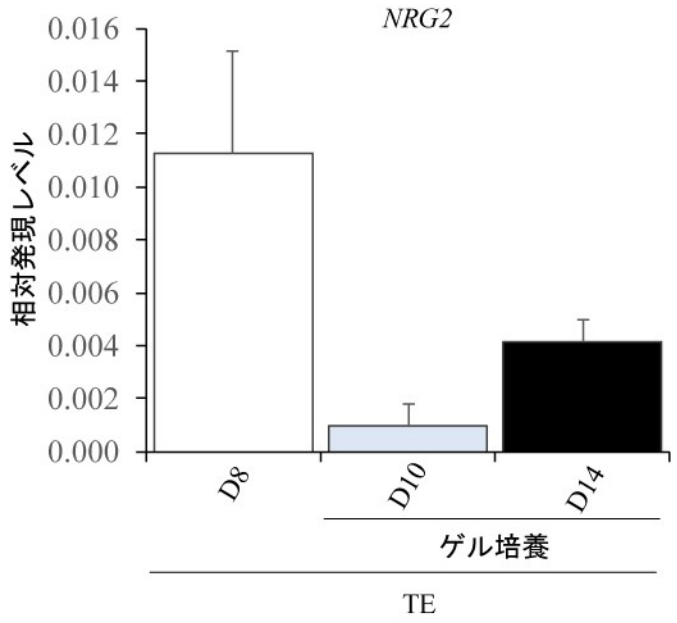


図 31. ゲル培養胚における *NRG2* 遺伝子発現量の変化

IVF の D8 胚および D10、D14 のゲル培養胚から、ICM を機械的に除去し胚体外部分のみを定量 PCR に供した。バーは、*GAPDH*、*ACTB* および *H2AFZ* 遺伝子の発現量の幾何平均で正規化した値を用いて⊿⊿Ct 法により算出した平均値を示す。エラーバー: ±S.E.M.。

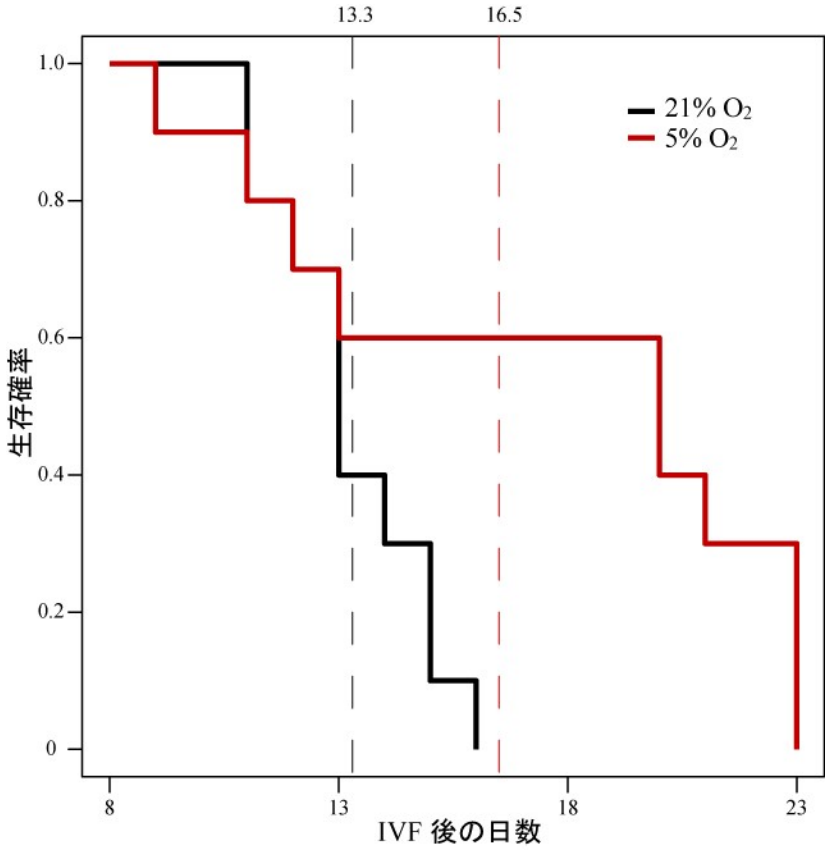


図 32. 低酸素培養がゲル培養胚の生存率に与える影響

D8 から 24 時間ごとに観察を行い、各日数における生存確率を Kaplan-Mayer 解析により比較した。破線は、各条件における平均生存日数を表す。

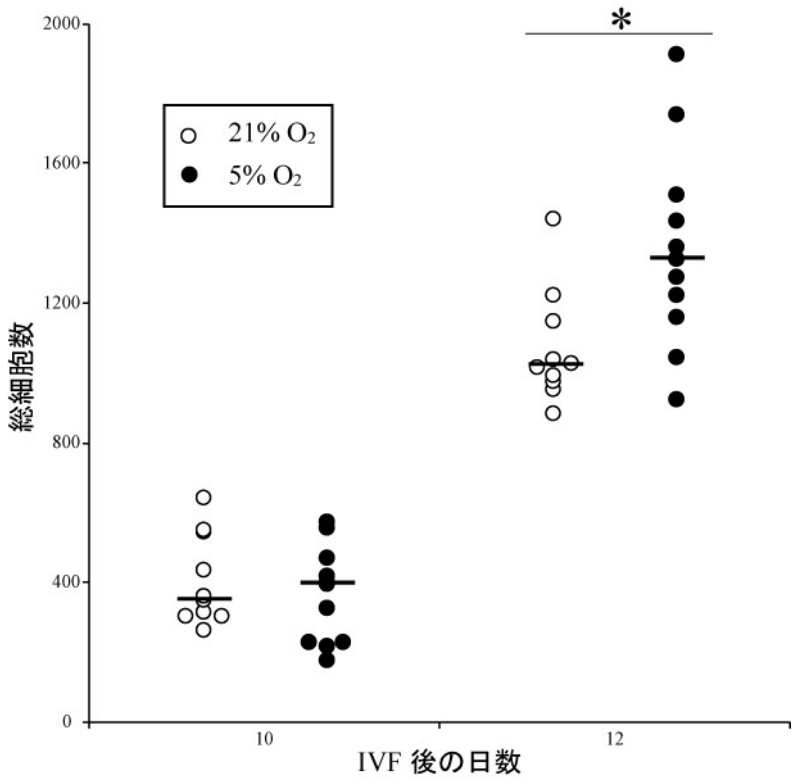


図 33. 低酸素培養がゲル培養胚の総細胞数に与える影響

総細胞数は Hoechst 染色した画像から手動でカウントした。水平線は各日の平均総細胞数を表す。D10 では酸素分圧による総細胞数の差はなかったが、D12 では高酸素条件と比べ低酸素条件で総細胞数が有意に増加していた。 $^{*}P < 0.05$。

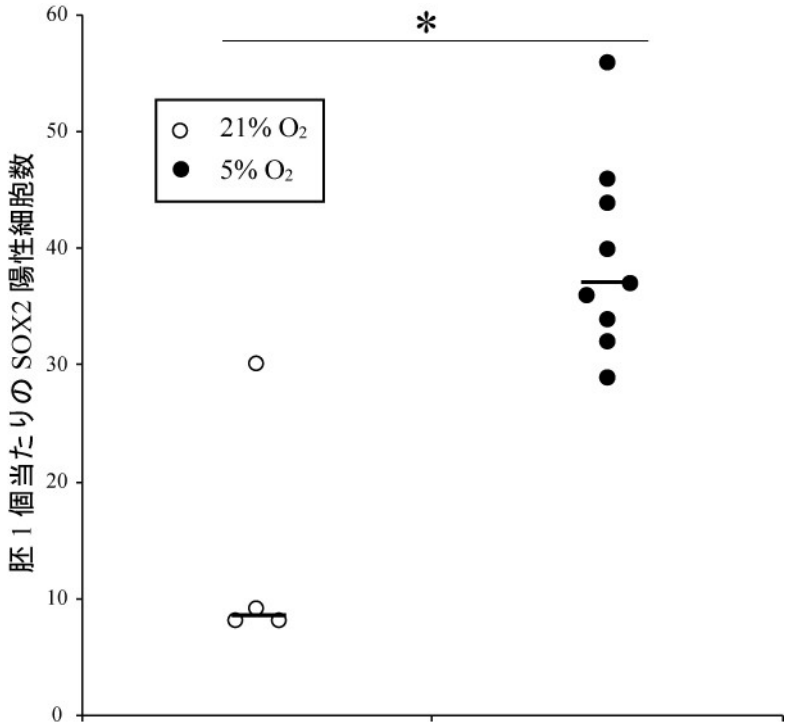


図 34. 低酸素条件がゲル培養胚の SOX2 陽性細胞数に与える影響

細胞数は SOX2 陽性細胞数をカウントして比較した。水平線は平均細胞数を示す (*$P < 0.05$)。

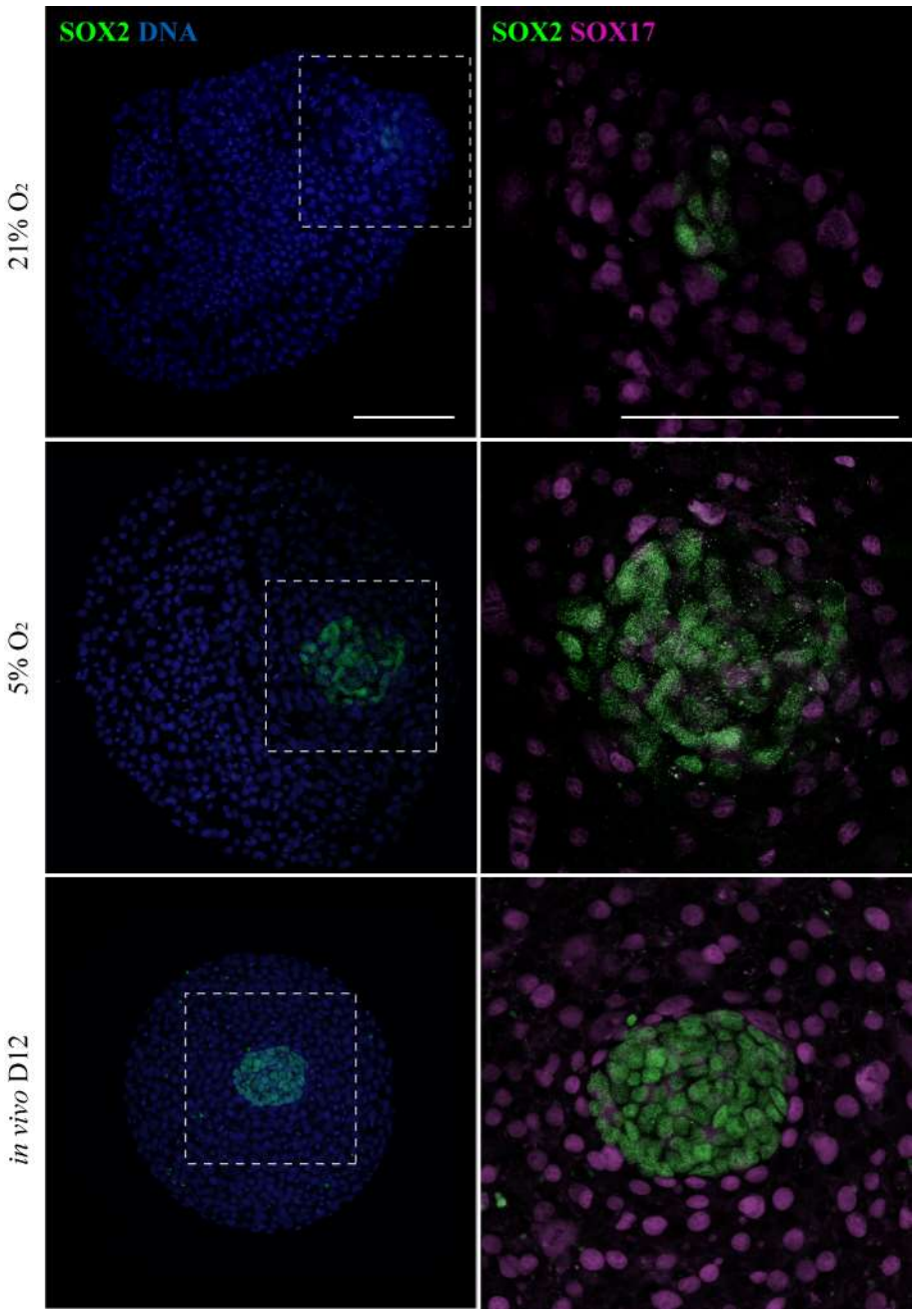


図 35. 低酸素条件がゲル培養 D12 胚のマーカータンパクの局在に与える影響

共焦点レーザー顕微鏡により撮影した、D12 のゲル培養胚における Epi マーカー (SOX2: 緑)および PrE マーカー (SOX17: マゼンタ)の免疫染色像。Hoechst で核を対比染色した(シアン)。右列は、左列の点線部分の拡大画像。下段は、人工授精後灌流により採取した *in vivo* 胚の免疫染色像。スケールバー: 200 μm。

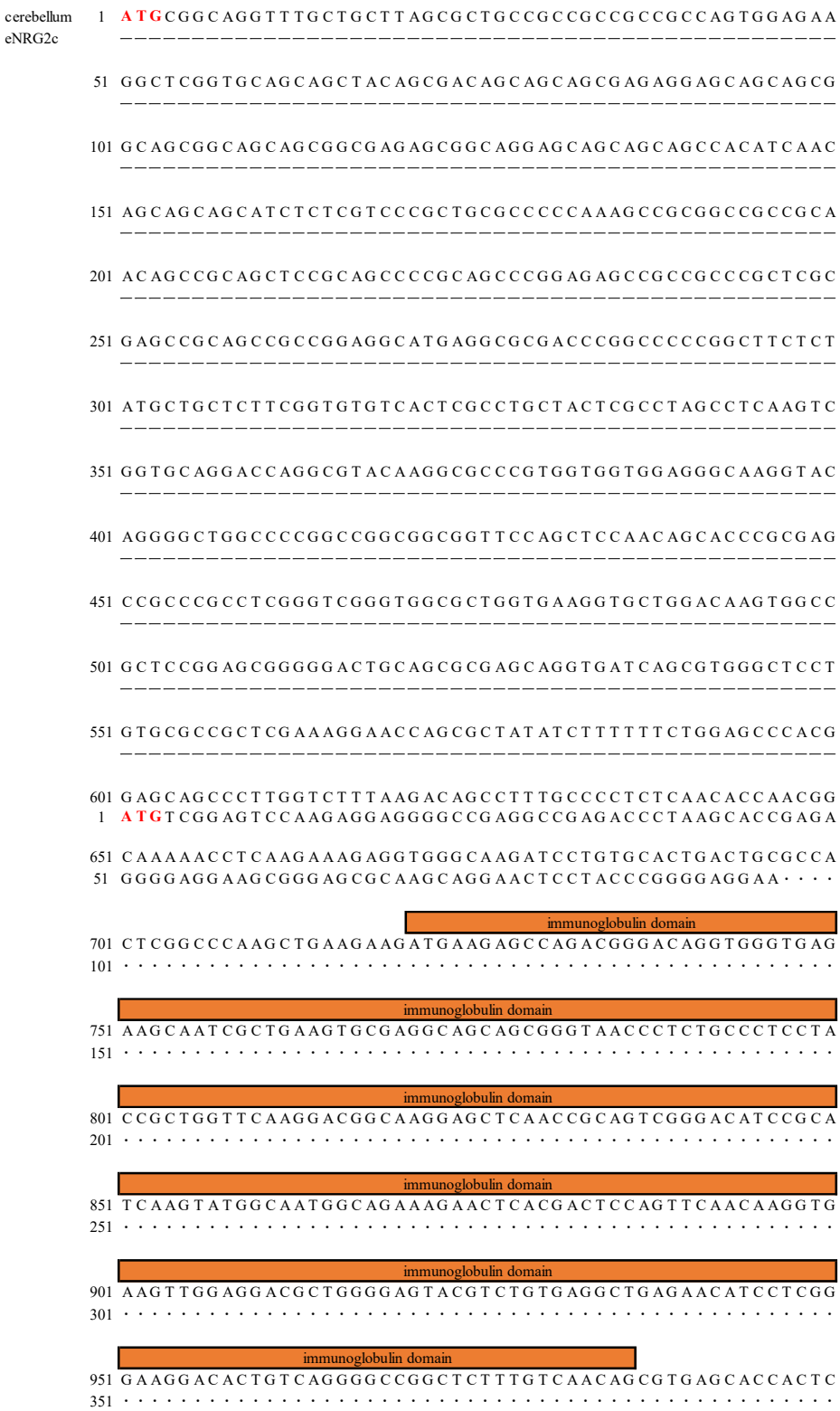
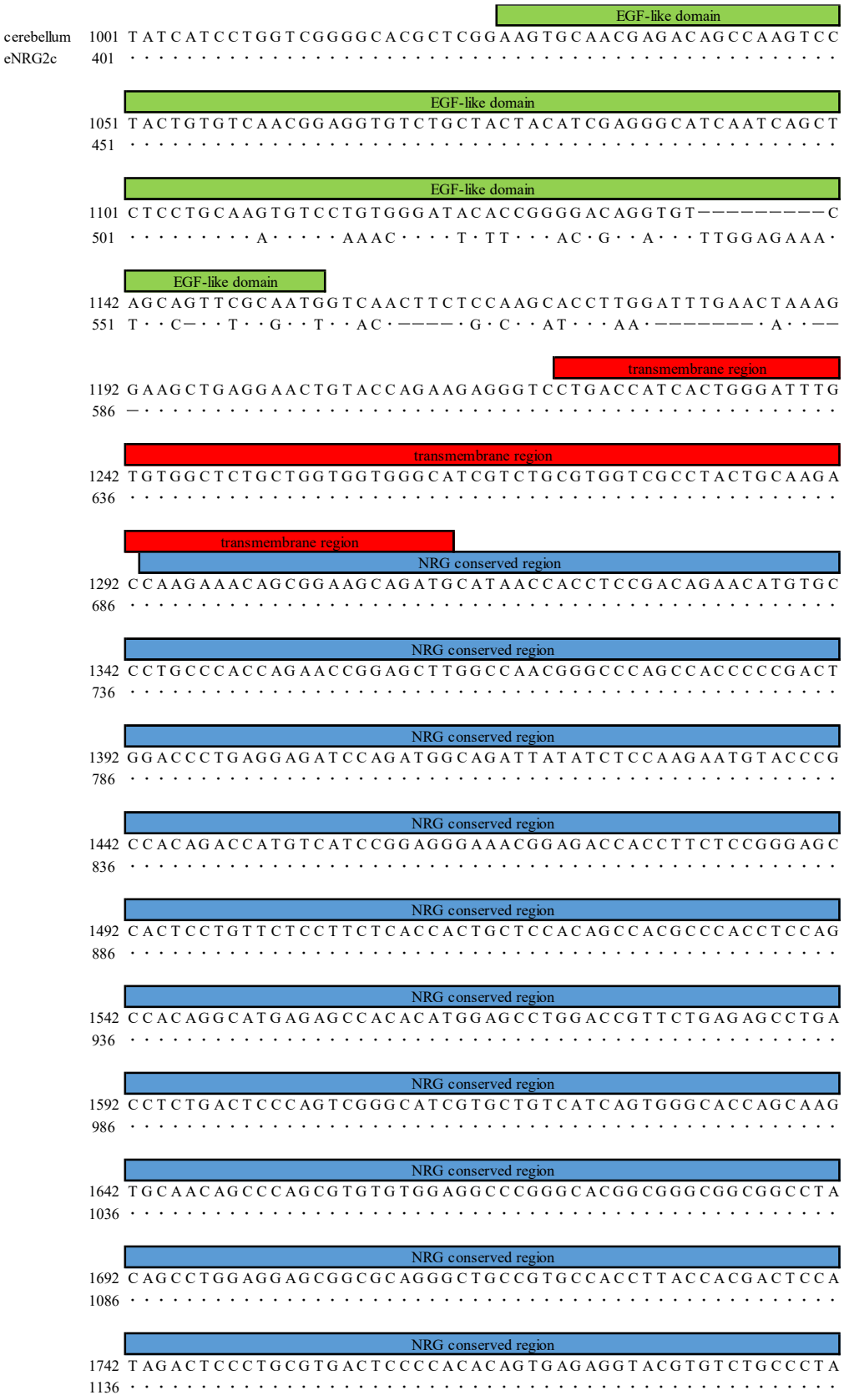
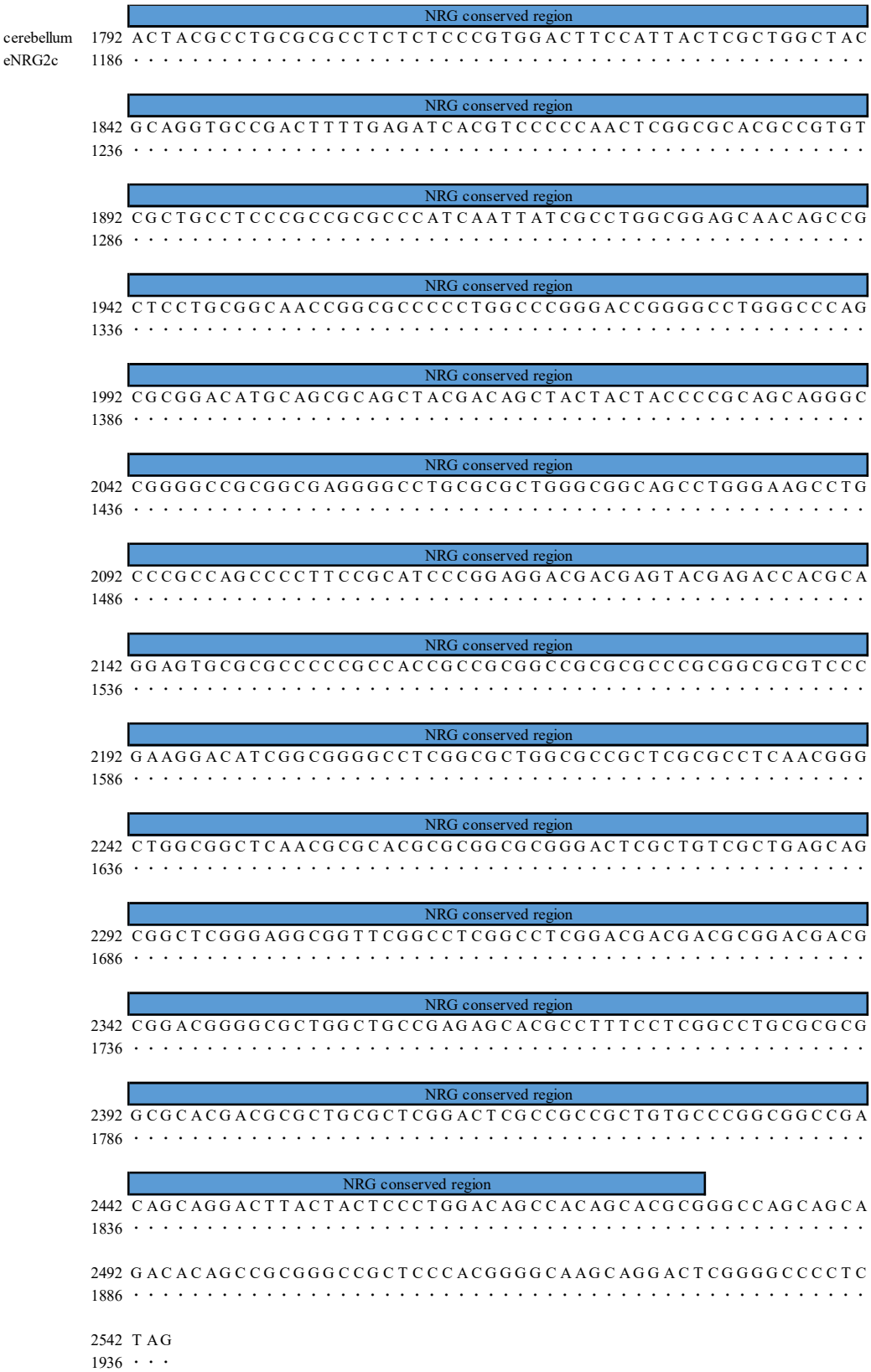


図 36. ウシ胎子小脳および伸長期胚 TE で発現する *NRG2* 変異体 CDS の配列

cerebellum: ウシ胎子小脳の変異体、eNRG2c: 伸長期胚 TE の変異体。

赤太字は予測開始コドン、・は相同な塩基、—は欠失 (挿入)を表す。


EGF-like domain
cerebellum 1001 T A T C A T C C T G G T C G G G G C A C G C T C G G A A G T G C A A C G A G A C A G C C A A G T C C
eNRG2c 401 · · ·


NRG conserved region
cerebellum 1792 A C T A C G C C T G C G C G C C T C T C T C C C G T G G A C T T C C A T T A C T C G C T G G C T A C
eNRG2c 1186 · · ·

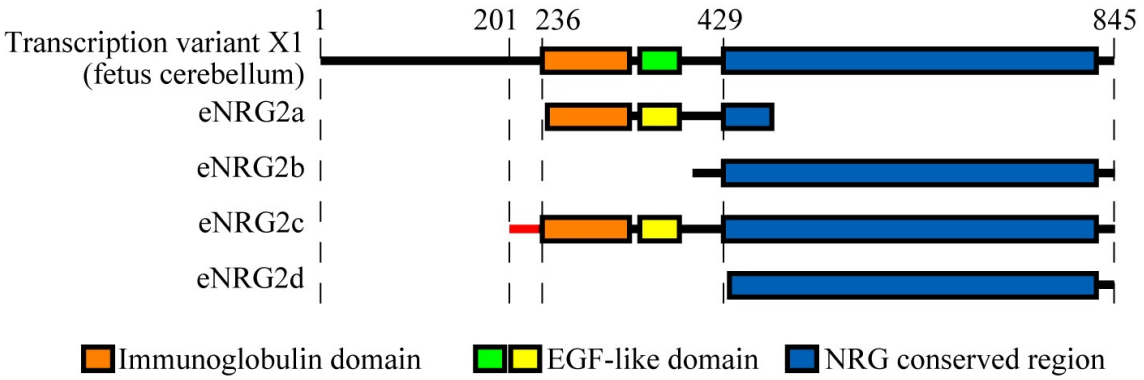


図 37. eNRG2 a, b, c および d のタンパク質ドメイン比較

比較のため、本研究により小脳で発現していることが明らかになった *NRG2* mRNA から予測されるアミノ酸配列のドメイン解析の結果を一番上に表示した。

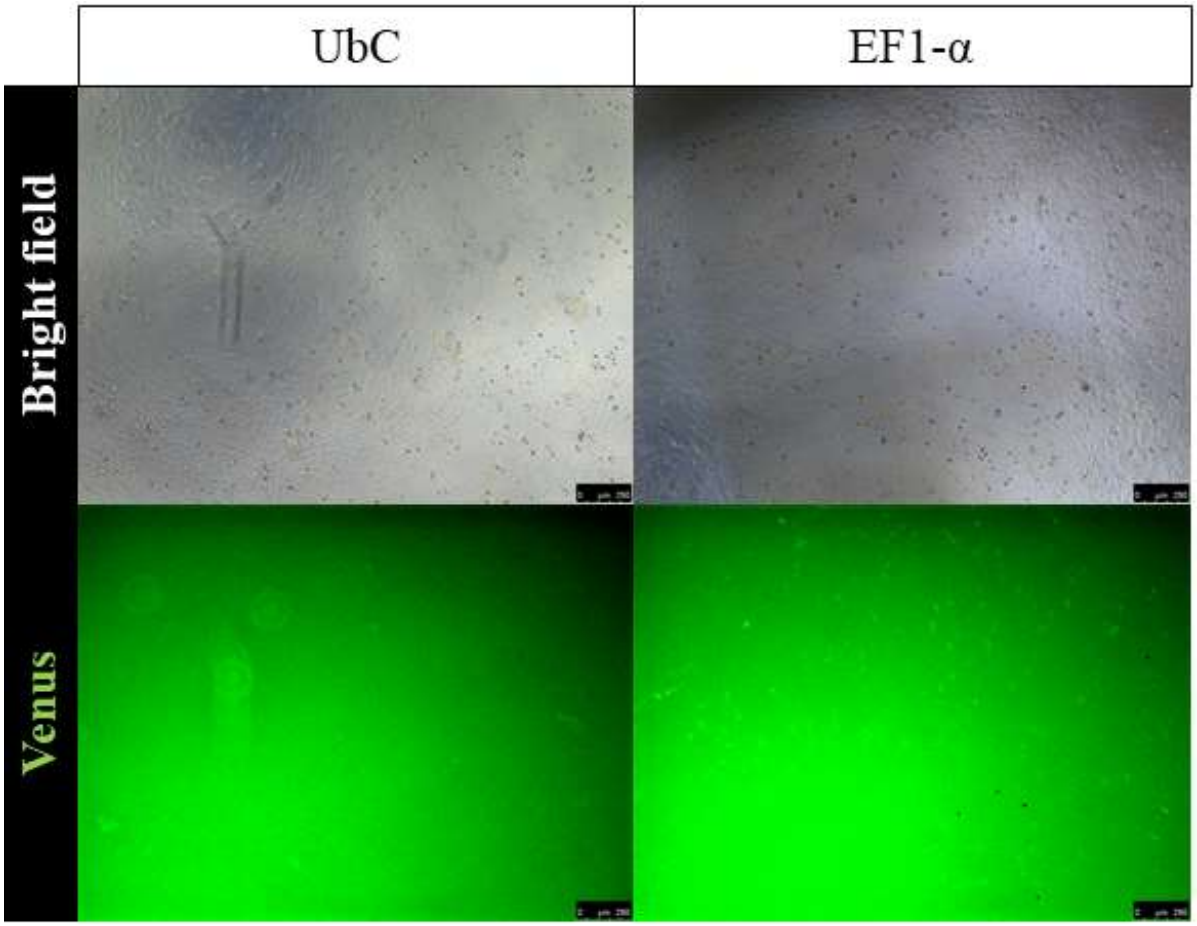


図 38. プロモーターの違いによる、ウイルス感染ウシ胎子線維芽細胞 (Bovine embryonic fibroblast: BEF)における外来蛍光タンパク質 (Venus)の発現の違い

UbC: ユビキチンプロモーター、EF1-α: EF1-α プロモーター。各プロモーター下で Venus を発現するトランスファーベクターを用いて作製したレンチウイルスを、BEF に感染させ、感染 24 時間後に撮影した蛍光画像。バー: 250 μm。

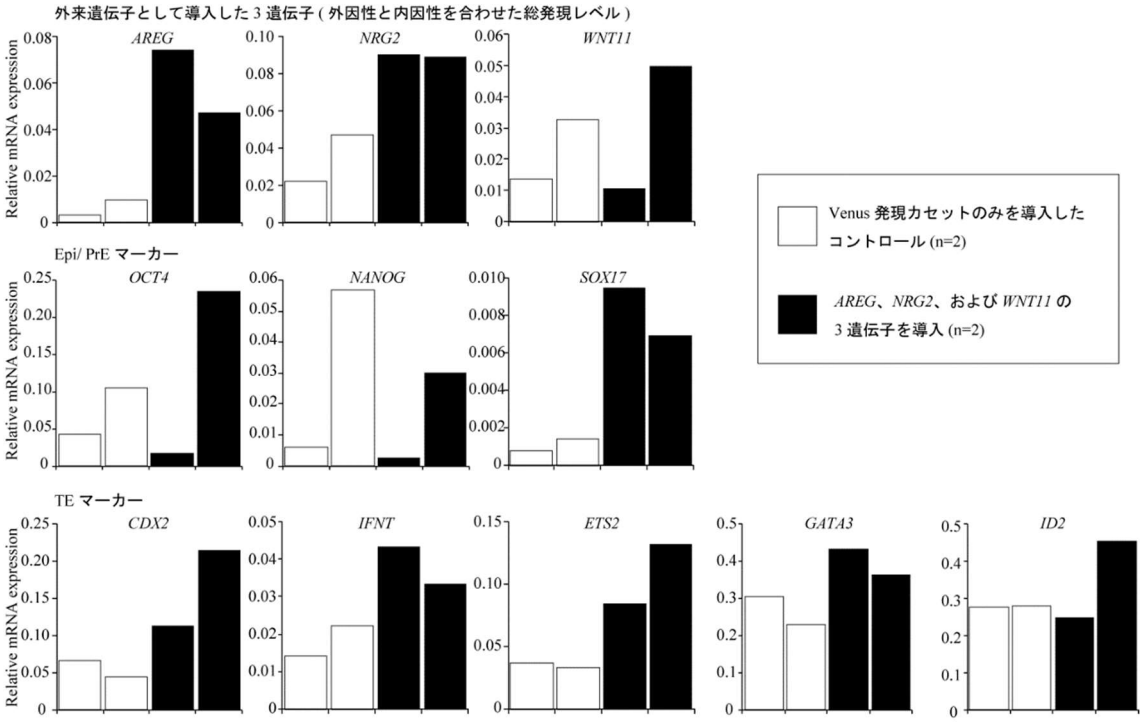


図 39. 外来遺伝子の導入による D12 ゲル培養胚における遺伝子発現の変化

IRES 配列の上流に外来遺伝子を持たず Venus のみを導入する「空ウイルス」あるいは、IRES 配列上流に *AREG*、*NRG2*、および *WNT11* の外来遺伝子を持つ 3 種類のウイルス混合液を感染させゲル培養を行った D12 胚の全体を定量 PCR に供した。相対発現量は *H2AFZ* 遺伝子の発現量を内部標準として用い⊿⊿Ct 法により算出した。

考察

前章で開発したゲル培養には、培養期間が D10 を超えると Epi の細胞数が顕著に減少し、それに伴い胚生存率も大きく低下するという問題点があった。本章では、まず低酸素培養および外来遺伝子の強制発現によりこれらの問題の克服を試みた。ゲル培養における酸素分圧を 21%から 5%に低下させることで、生存日数、および総細胞数が改善されることが分かった (図 33、34)。多くの哺乳類胚において、培養時の高い酸素分圧は活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS)の産生量を増大させ、これが DNA への損傷などを通し発生に悪影響を及ぼす [141]。この酸素毒性は低酸素条件の適用により緩和が可能で、ウシ胚を用いた過去の研究では、体外培養における酸素分圧を 21%から 5%に低下させることで、胚盤胞期までの発生率が上昇し、DNA への損傷も有意に減少することが示されている [142]。酸素毒性を受けやすいゲル培養胚では D10 以降、21%酸素分圧による悪影響が顕在化したものの、5%の低酸素条件の適用によりその悪影響は低減され、生存率の向上および総細胞数の増加に結び付いたと考えられる (図 32、33)。

低酸素条件においては生存率の向上に加え、Epi 細胞数の増加も観察された (図 34, 35)。Epi は胚本体を形成する細胞集団であり、TE や PrE といった出生後発生に関与しない細胞系列と比べて、変異細胞を積極的に排除し個体の完全性を担保する必要性が高い [143]。そのため、着床周辺期のマウス Epi では一定の割合でアポトーシスによる細胞死が起こり、これは発生の進行に必須である [112,144]。また、着床前 Epi と性質がよく似た ES 細胞は、Bax 等アポトーシス誘導因子の構成的発現により、アポトーシスを起こしやすいこと [145,146]、そして、マウス Epi 細胞は環境ストレスに対する感受性が他の細胞系列よりも高いことが知られている [147]。Epi 細胞の環境ストレスに対する高感受性がウシ胚でも同様かは不明だが、本研究の結果から、少なくとも高酸素によるストレスに対する感受性は Epi で特異的に高いと考えられる。Epi の細胞数は、21% O_2 条件の D12 においては 10 個を下回るものが多く (図 34)、生存率は続く D13 から急激に低下し始めた (図 15)。こ

れに対し 5% O_2 条件では D12 の Epi 細胞数の平均は 39.3 となり、これは 21% O2 条件でゲル培養胚が良好な生存を保つ D8 から D10 までの Epi 細胞数と近い値である (図 15)。したがって、胚が高い生存性を保つことと Epi 細胞数が一定以上に保たれることには何らかの相関があるかもしれない。

ウシ胎子小脳および伸長期胚 TE を用いた cDNA クローニングにより、これらの組織において異なる *NRG2* 変異体が発現していることを明らかにした (図 36, 37)。*NRG2* の小脳および着床前胚における発現と、変異体の存在を検出したのは本研究が初めてである。配列比較から、小脳で発現する変異体と、伸長期胚 TE で発現する変異体は EGF 様ドメインの構造が異なることが分かった (図 37)。EGF 様ドメインは、受容体のチロシンキナーゼをリン酸化し細胞内にシグナル伝達を行うことから、NRG ファミリー分子における実質的な機能部位といえる [129]。マウス NRG は、発生中の胸部で発現する変異体と脳で発現する変異体とでは EGF 様ドメインの構造が異なり、前者の EGF 様ドメインを特に α 型、後者を β 型と呼ぶことがある [129,148]。概して、α 型 EGF 様ドメインは間葉系細胞の発達、β 型は神経系細胞の発達に役割を果たすと考えられている [129,148]。本研究で決定した配列をマウス *Nrg2* 配列と比較した結果、ウシ胎子小脳および伸長期胚 TE それぞれで発現する *NRG2* 変異体の EGF 様ドメインはそれぞれ β 型および α 型であると予測された。これら EGF 様ドメインの違いが、ウシにおいても NRG2 の異なる生理活性を生むかどうかは今のところ不明であるが、今後は、本研究で取得した *NRG2* CDS 全長配列を利用した強制発現試験を通して機能的な差異の検証を行っていくことが望まれる。

続いて、胚盤胞期胚においてレンチウイルスベクターを囲卵腔注入することにより、TE 特異的に外来遺伝子を強制発現させる試みを行った。本研究では、ウシ胚に対する目的遺伝子の強制発現の手段として、レンチウイルスベクターによるゲノムへの発現カセットの挿入という方法を用いた。ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus: HIV)をはじめとするレンチウイルスは分裂細胞と非分裂細胞の別を問わず感染し、長い末端反復

(Long terminal repeat: LTR)と呼ばれる保存された反復配列を利用し、感染細胞の宿主ゲノムにウイルス自身のゲノムを挿入する [149]。本研究で用いたレンチウイルスベクターは、I型 HIV を改変したゲノムを、強い感染力を持つ水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV)の G タンパクでパッケージングしたものであり、初期胚を含めた多くの哺乳類細胞への遺伝子導入に用いられている [150–152]。レンチウイルスベクターには、外来遺伝子が宿主ゲノムのどの位置に、何コピー挿入されるかを制御できないという問題点があるものの、発現プラスミドの前核への注入に代表される古典的な遺伝子導入法と比べ格段に導入効率が高いというメリットがある [139]。そのため、多数の受精卵を得ることが難しい霊長類や大家畜への遺伝子導入において威力を発揮する手法である [140,153]。また、ICM を除く TE 領域特異的な遺伝子操作を行うためには、一般的に胎盤付近へのアデノウイルス液の直接的な注入 [154]、変異細胞の胎盤への外科的な注入 [155]といった複雑な手順を踏まなければならないが、レンチウイルスを用いれば、胚盤胞期胚の囲卵腔にウイルス濃縮液を注入するという簡単な方法で達成することができる [156]。ウシにおいては、レンチウイルスベクターを用いて初期胚に外来遺伝子を発現させたという報告は複数存在するものの [140,157,158]、胚体外領域特異的な遺伝子導入を試みた例はいまだない。本研究で用いた第三世代のレンチウイルスベクターは、自己複製遺伝子を欠損させてあるため、感染細胞から新たにウイルス粒子が産生され二次感染が起こることがない [150]。そのため、胚盤胞期 TE 特異的にウイルス感染を行った場合、発生が進行した胚において外来遺伝子を持つ細胞は TE 由来細胞と考えられる。ウシ胚盤胞期胚の ICM/ TE の分化完了度は低いといえ、自然状態では TE 細胞が ICM 系列に寄与することはなく [23]、ゲル培養 D12 胚においても外来遺伝子は TE 細胞特異的に発現していると考えられる。このことをより積極的に証明するには、マイクロブレードを用いた機械的分断 [39]、あるいは界面活性剤処理 [159]、などにより胚を細胞系列毎に分割し、個別に遺伝子型を決定していく必要がある。

定量 PCR 解析の結果から、ウイルスによる外来遺伝子導入 D12 ゲル培養胚では、コントロールと比較し、*ETS2* および *SOX17* の二つの転写因子の発現が顕著に上昇していることがわかった。修士課程の研究で実施した RNA-seq より、*ETS2* および *SOX17* 遺伝子の TE における発現は、D8 と比べ D14 で顕著に上昇することが分かっている [40,41]。このうち *ETS2* は、Ets 転写因子ファミリーに属し、種間で保存された Ets winged helix-turn-helix DNA binding domain により下流遺伝子の転写を制御する [160]。マウス *Ets2* の発現は着床周辺期の E5.0 で検出され始め、その後 E6.75 までは胎盤の基底層を形成する外胎盤錐および胚外外胚葉特異的に発現する [161]。原腸陥入開始後の E7.75 では胚外外胚葉に加え原始線条においても発現し、形態形成後の発生過程では肢芽、胎子皮ふを含む多様な組織において発現する [161,162]。ノックアウトマウスの解析から、*Ets2* は外胎盤錐の細胞増殖やメタロプロテアーゼの発現 [163]、Epi における前後軸の決定 [161]、前後軸の伸長 [164]、および栄養膜幹細胞の自己増殖性の維持に必須であることが示されており [165]、*Ets2* ホモ欠損胚は胚外外胚葉の形成不全により E9.5 で胎性致死となる [161,163]。一方、ウシ *in vivo* 胚における *ETS2* 発現レベルは、マウスと異なり胚体外領域と Epi とで同程度であり、どちらの領域においても胚盤胞期後の D12 から D17 まで漸増することが示されている [166]。さらにウシ ETS2 は、*IFNT* のプロモーター領域に結合し、同じく転写因子である DLX3 と協調することで時期特異的な *IFNT* の高発現を制御する [167]。以上の知見から、マウス、ウシを問わず、着床周辺期に *ETS2* の発現が上昇することが、TE が適切に分化し機能を発揮するために重要であると考えられ、ゲル培養胚において導入した 3 遺伝子の影響によりより *ETS2* の発現が上昇したことは、TE の分化の成熟を示している。胚において、*ETS2* の直接的な上流分子はわかっていないため、今後は導入した 3 遺伝子のうち、どの遺伝子がどのように *ETS2* 発現上昇に関与したのかを明らかにしていくことが、ウシ胚 TE 分化の仕組みを深く理解していくことに繋がると考えられる。

ウイルスにより TE 特異的に 3 遺伝子を導入することにより、*SOX17* の発現が上昇し

た。*SOX17* は転写因子であり、PrE のマーカー遺伝子としても知られている [117]。この結果については、外来遺伝子の発現の影響により TE 細胞における *SOX17* の転写が直接的に亢進されたという解釈と、TE において発現した外来遺伝子が細胞外に分泌されパラクラインに PrE あるいは Epi 細胞に感作し、間接的に SOX17 の発現を上昇させた、という解釈の二通りが考えられる。

先行研究から、ウシ胚はマウス胚と異なり、早期胚盤胞期胚の TE 細胞において SOX17 が発現していることが示されている [159]。この TE における SOX17 発現がどのような役割を持つのか、そしてどのような分子機構により制御されているのかは今のところ不明であるが、前者の解釈が正しいとするならば、胚盤胞期以降の TE 細胞においても、SOX17 は発現することが可能なのかもしれない。一方、導入した 3 遺伝子の一つ、*Areg* のノックアウトマウスを用いた研究では、AREG 発現細胞から分泌された AREG タンパクが、隣接する AREG 非発現細胞にパラクラインに感作し細胞増殖を促進することが知られている [168]。後者の解釈が正しいならば、この例のように、TE から分泌された外来遺伝子由来タンパク質が PrE 細胞の増殖を促し、PrE 細胞数が増加したことにより間接的に *SOX17* 遺伝子の発現量が上昇したのかもしれない。これら二つの仮説のうちどちらが正しいかを検証するには、少なくとも 3 遺伝子導入胚における TE における SOX17 発現の有無を確認する必要がある。PrE 細胞数の増加が刺激されたと仮定すると、3 遺伝子のうちいずれかがウシ胚におけるハイポブラストの発達に必要な因子である可能性も考えられる。今後は、単一あるいは組み合わせを変えて発現誘導遺伝子各々の役割を、ゲル培養系を用いて精査していく必要がある。

本研究では、低酸素条件および外来遺伝子の導入によりゲル培養胚の生存性は向上し胚体外領域の分化も促進されたものの、胚盤様の構造形成は観察されなかった。通常、ウシ胚では ICM から Epi への分化が完了したのち、Epi は細胞数を増加させ極性化するとともに、極 TE の消失に伴い直接的に子宮液に曝露される扁平な「胚盤」と呼ばれる組織に分

化する [118]。胚盤では原始線条が形成され、着床前に三胚葉への分化が開始される [169]。Epi が扁平な胚盤を形成するのはウシを含めヒト、ブタ、ウサギなど多くの哺乳類で共通しており、その点で着床時まで Epi が扁平化しないマウスの初期胚発生は特殊であるといえる。Epi の形態学的な違いを生み出している細胞の極性化状態や接着状態の相違が、多能性にみられる種間差の根本的な原因である可能性も指摘されている [170,171]。そのため、ゲル培養の更なる改善によりウシ胚盤の詳細な解析が可能になれば、なぜマウスやラットといった限られた種の ES 細胞だけが、生殖系列寄与という卓越した真の多能性を発揮できるのかといった疑問に答えられるかもしれない。原腸陥入などを含めた Epi のさらなる発生は、細胞間シグナル伝達と三次元的な細胞移動、そして TE や臓側内胚葉との相互作用が複雑に組み合わさったプロセスであり、最も解析が進んでいるマウス胚でさえも体外でこの過程を再現できた例は今のところない。今後は、可視性と再現性の高さというゲル培養の利点を生かすとともに、Epi の胚盤への分化を駆動する、細胞自律的、非自律的なシグナルについて解明していくことで、ゲル培養法自体も改善していくことが重要である。

第五章 総括

本研究では、ウシ胚独自の分化メカニズムの解明を目的に、胚盤胞期前後における遺伝子発現動態の変化を中心に解析を行った。本章では、第二章から第四章にかけて実施した本研究の、主な目的および結果を総括する。

第二章 *TEAD4* および *CCN2* 遺伝子が栄養外胚葉の発生に果たす役割

目的: マウス胚盤胞期胚では ICM と TE の不可逆的な運命決定が完了しているが、それに先立つ桑実胚の後期では、すでに内側と外側の割球で差次的な遺伝子発現が開始されている。それを支配するのが細胞密度を細胞内シグナルに変換する Hippo 経路であると考えられており、細胞密度が小さく Hippo 経路がオフになる外側割球において、TEAD4 による下流遺伝子の転写が亢進され TE 特有の遺伝子発現が誘導される。体細胞では、TEAD4 の下流において CCN2 というマトリクスタンパクの発現が亢進され、細胞増殖を制御する。ウシ初期胚において Hippo 経路が ICM と TE の分化にかかわるかどうかは決定されておらず、また TEAD4-CCN2 という制御が初期胚において保存されているかどうかはマウスを含め哺乳類全体で不明であった。そこで第二章では、shRNA を用いてウシ胚における *TEAD4* および *CCN2* 遺伝子の特異的な発現抑制を行い、胚盤胞期における遺伝子発現や細胞数の比の変化について調べた。

結果: shRNA の注入により *TEAD4*、および *CCN2* のウシ胚における mRNA 発現は効果的に抑制され、タンパク質レベルにおける発現の低下も確認された。*TEAD4* 発現抑制胚では、*CDX2*、*GATA2* といった TE 特異的な遺伝子の発現が抑制されていることに加え、*CCN2* 遺伝子の発現も顕著に抑制されていた。一方 *CCN2* 発現抑制胚においても *CDX2*、*GATA2* の発現が抑制され、さらに *TEAD4* の発現も顕著に低下していた。また、*CCN2* 発現抑制胚においては胚盤胞期における ICM 細胞数に対する TE 細胞数の比が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う関係

にあり、TE の細胞増殖に役割を果たすことが初めて示された。

第三章 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

目的: ウシ胚盤胞期胚における TE の運命拘束度はマウスと比べ著しく低く、これは ICM/TE 分化を支配する分子の制御機構の違いを反映している。また、ICM から Epi および PrE への分化や TE の機能発現といった胚盤胞形成以降のイベントに関しては種間の制御機構の差がより顕著になる。したがってこの時期における胚の詳しい解析を行う必要があるが、ウシを含め哺乳類における体外培養の発生限界が胚盤胞期にあることが研究の大きな障害となってきた。そこで第三章では、古典的な組織培養法である気液境界面培養法をウシ胚体外培養に応用することにより生存性を高め、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ことを目的に解析を行った。

結果: 本研究では血清代替物 (KSR)を多量に含む専用の培地をしみこませたアガロースゲルを培養基質として用いた気液境界面培養法により、従来の発生限界であったウシの胚盤胞期以降の生存性を顕著に高めることができた。この「ゲル培養法」により作出された胚では、ICM の多能性喪失なしに TE での OCT4 の低下が起こることが確認され、また培養の継続により TE は特異的遺伝子の発現上昇、二核細胞の出現を含む機能的分化を経験した。さらに、マーカータンパク質の局在に基づく ICM 細胞の経時的な観察により、ゲル培養により ICM からの PrE および Epi への分化が達成されていること、そしてこの分化はマウスで提唱されている「Salt and Pepper」モデルに従うことが明確に示された。一方、ゲル培養を D10 以降においても継続して行った場合、胚の生存性および Epi の完全性が急速に損なわれることが分かった。

第四章 ウシ胚盤胞期胚ゲル培養系の改良

目的: 前章で明らかとなった、ゲル培養胚における D10 以降の生存率の低下および Epi 細

胞数の減少という問題点を改善するべく、ゲル培養系に対し二つの新たな操作を導入した。初めに、培養条件における酸素分圧を通常の細胞培養と同様の 21%から、一般的な哺乳類の子宮内酸素分圧と同等の 5%に変更し培養を行った。次に、レンチウイルスベクターを用いて、機能は未知であるものの TE において特異的に発現が上昇することが分かっている *AREG*、*NRG2*、および *WNT11* の 3 遺伝子をゲル培養胚 TE で強制発現させた。これらの改変をゲル培養系に適用し、長期培養胚に起こる変化を解析した。

結果:酸素分圧を 5%に低下しゲル培養を行ったところ、21%の酸素分圧と比較し平均生存日数および最長生存日数のいずれもが延長された。また、D12 における総細胞数及び Epi 細胞数も 5%酸素分圧区で有意に上昇し、ゲル培養系においては低い酸素分圧が好適であること、そして Epi 細胞にはほかの細胞系列より高いストレス感受性があることが示された。一方 TE 特異的に *AREG*、*NRG2*、および *WNT11* を強制発現させゲル培養に供した結果、妊娠認識物質 IFNT の発現量の上昇に重要な *ETS2*、および PrE の分化と維持に役割を果たす *SOX17* の二つの転写因子の発現が顕著に上昇した。今後は、胚盤胞期以降発現が上昇する分泌因子が、どのような機序で下流遺伝子の発現を制御するかを解明していくことが望まれる。

総合結論

本研究より、ウシ胚における ICM と TE の分離は内外モデルの裏付けとなる Hippo 経路の下流因子である TEAD4 と CCN2 の協調により制御されることが明らかとなった。また、「ゲル培養法」はウシ胚における体外培養の限界を胚盤胞期の D8 から D12 まで延長し、ウシにおける ICM の分化が'Salt and pepper'モデルに従うこと、そしてウシ Epi には特異的なストレス感受性が存在することが示された。そして、*AREG*、*NRG2*、および *WNT11* といった遺伝子の TE における発現が上昇することが、下流の重要な転写因子の発現増加を誘導することが分かった。

謝辞

本研究の遂行にあたり熱心なご指導とご助言をいただいた准教授・川原学博士、助教・唄花子博士、教授・高橋昌志博士に謹んで感謝を申し上げます。細胞組織生物学研究室教授・西邑隆徳博士、東京農業大学 生命科学部 バイオサイエンス学科 教授・小川英彦博士には論文のご高閲を賜りました。ここに深く感謝を申し上げます。また、ウイルスベクターの作製法をご教授いただくとともに、HEK293FT 細胞を分与いただいた信州大学の富岡郁夫博士ならびに研究室の皆様には大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。実験材料の採取に当たりご協力いただいた、株式会社 北海道畜産公社 道央営業所 早来食肉工場流通センターの方々に心よりお礼申し上げます。妊娠子宮および伸長期胚の採取にご協力いただいた北里大学 永野昌志教授、北海道大学大学院獣医学研究科 柳川洋二郎助教、並びに学生の皆さま、北方フィールドセンター職員の皆さまには大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。ウシ凍結精液をご提供いただいた株式会社 ジェネティクス北海道の皆さまに心より感謝いたします。

さらに、本研究室のご卒業である山梨大学 ライフサイエンス実験施設 長友啓明特任助教、東京農業大学 生命科学部 バイオサイエンス学科 佐々木恵亮 博士研究員、帯広畜産大学 原虫病研究センター 白水貴大 博士研究員、McGill University 山崎渉 博士研究員には大変お世話になりました。心より感謝いたします。また、同期である郡七海氏には、公私ともに大きく支えていただきました。改めてお礼申し上げます。これまでに本研究室を卒業された多くの先輩方、同期、また後輩の方々につきましても、大変なサポートをいただきました。本当にありがとうございました。

最後に、精神的、経済的に学生生活を支えてくださった家族に、心より感謝申し上げます。

参考文献

[1] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 1995; 81:323–330.

[2] Iwamori N, Naito K, Sugiura K, Tojo H. Preimplantation-embryo-specific cell cycle regulation is attributed to the low expression level of retinoblastoma protein. FEBS Lett 2002; 526:119–123.

[3] Egashira A, Kano K, Naito K. Preimplantation-embryo-specific cell-cycle regulation is attributable to a low expression of retinoblastoma protein rather than its phosphorylation. J Reprod Dev 2011; 57:492–499.

[4] Hyafil F, Morello D, Babinet C, Jacob F. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. Cell 1980; 21:927–934.

[5] Fleming TP, McConnel J, Johnson MH, Stevenson BR. Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: Control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. J Cell Biol 1989; 108:1407–1418.

[6] Wiley LM. Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. Dev Biol 1984; 105:330–342.

[7] Heasman J. Patterning the early Xenopus embryo. Development 2006; 133:1205–1217.

[8] White MD, Angiolini JF, Alvarez YD, Kaur G, Zhao ZW, Mocskos E, Bruno L, Bissiere S, Levi V, Plachta N. Long-ｌived binding of Sox2 to DNA predicts cell fate in the four-cell mouse embryo. Cell 2016; 165:75–87.

[9] Goolam M, Scialdone A, Graham SJL, MacAulay IC, Jedrusik A, Hupalowska A, Voet T, Marioni JC, Zernicka-Goetz M. Heterogeneity in Oct4 and Sox2 targets biases cell fate in 4-cell mouse embryos. Cell 2016; 165:61–74.

[10] Tarkowski AK. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature 1959; 184:1286–1287.

[11] Kelly SJ. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J Exp

Zool 1977; 200:365–376.

[12] Dyce J, George M, Goodall H, Flemingf TP. Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? Development 1987; 100:685–698.

[13] Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: A history of embryonic stem cell research. Nat Rev Genet 2006; 7:319–327.

[14] Jackson BW, Grund C, Schmid E, Burki K, Franke WW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis: intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. Differentiation 1980; 17:161–179.

[15] Gardner RL, Rossant J. Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. J Embryol Exp Morphol 1979; 52:141–52.

[16] Gardner RL. Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. J Embryol Exp Morphol 1982; Vol. 68:175–198.

[17] Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10:91–103.

[18] Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium (homologous recombination/preimplantation embryos/epithelinum formation). Proc Natl Acad Sci 1994; 91:8263–8267.

[19] Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. Requirement of FGF-4 for postimplantatior mouse development. Science (80-) 1995; 267:246–249.

[20] Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:5082–5087.

[21] Daniel DC, Indrani B, Sudhandsu KD, Allen CE, Asgerally TF, Bruce AL, Koji Y. Embryo Implantation. Dev Biol 2000; 223:217–237.

[22] Wooding FBP. The synepitheliochorial placenta of ruminants: Binucleate cell fusions and hormone production. Placenta 1992; 13:101–113.

[23] Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, Wells DN, Broadhurst R, Donnison M, Pfeffer PL. Trophectoderm lineage determination in cattle. Dev Cell 2011; 20:244–255.

[24] Kuijk EW, van Tol LTA, Van de Velde H, Wubbolts R, Welling M, Geijsen N, Roelen BAJ. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. Development 2012; 139:871–882.

[25] Akizawa H, Nagatomo H, Odagiri H, Kohri N, Yamauchi N, Yanagawa Y, Nagano M, Takahashi M, Kawahara M. Conserved roles of fibroblast growth factor receptor 2 signaling in the regulation of inner cell mass development in bovine blastocysts. Mol Reprod Dev 2016; 83:516–525.

[26] Blomberg L, Hashizume K, Viebahn C. Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. Reproduction 2008; 135:181–195.

[27] Betteridge KJ, Fléchon JE. The anatomy and physiology of pre- attachement bovine embryos. Theriogenology 1988; 29:155–187.

[28] Maddox-Hyttel P, Alexopoulos N, Vajta G, Lewis I, Rogers P, Cann L, Callesen H, Tveden-Nyborg P, Trounson A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. Reproduction 2003; 125:607–623.

[29] Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. Reproduction 2002; 124:181–196.

[30] Sirard M-A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. Reproduction 2018; 156:R1–R7.

[31] Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 1995; 43:141–152.

[32] Kaufman MH, Evans MJ. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292:154–156.

[33] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci 1981; 78:7634–7638.

[34] Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 1984; 309:255–256.

[35] Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science (80-) 1998; 282:1145–1147.

[36] Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:7844–7848.

[37] Bogliotti YS, Wu J, Vilarino M, Okamura D, Soto DA, Zhong C, Sakurai M, Sampaio RV, Suzuki K, Izpisua Belmonte JC, Ross PJ. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. Proc Natl Acad Sci 2018; 115:2090–2095.

[38] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. Cell 2008; 135:1299–1310.

[39] Nagatomo H, Kagawa S, Kishi Y, Takuma T, Sada A, Abe Y, Wada Y, Takahashi M, Kono T. Transcriptional wiring for establishing cell lineage specification at the blastocyst stage in cattle. Biol Reprod 2013; 88:1–10.

[40] 定郁里. 平成27年度 修士論文. 2016.

[41] 秋沢宏紀. 平成28年度 修士論文. 2017.

[42] Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, Nakao K, Sasaki H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. Mech Dev 2008; 125:270–283.

[43] Nishioka N, Inoue K ichi, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, et al. The hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. Dev Cell 2009; 16:398–410.

[44] Beck F, Erler T, Russell A, James R. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: Possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. Dev Dyn 1995; 204:219–227.

[45] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. Cell 2005; 123:917–929.

[46] Chawiengsaksophak K, James R, Hammond VE, Köntgen F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. Nature 1997; 386:84–87.

[47] Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. Development 2005; 132:2093–2102.

[48] Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, Kaneko KJ, Vullhorst D, DePamphilis ML, Buonanno A. Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. Development 2007; 134:3827–3836.

[49] Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. Cell 2015; 163:811–828.

[50] Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang C, Chinnaiyan AM, Lai Z, Guan K. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. Genes Dev 2008; 22:1962–1971.

[51] Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, Shrestha K, Cahan P, Stanger BZ, Camargo FD. Hippo pathway activity influences liver cell fate. Cell 2014; 157:1324–1338.

[52] Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao J, Yuan H, Tumaneng K, Li H, Fu XD, Mills GB, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. Cell 2012; 150:780–791.

[53] Lai D, Ho KC, Hao Y, Yang X. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. Cancer Res 2011; 71:2728–2738.

[54] Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol Reprod 1975; 274:260–274.

[55] Aono A, Nagatomo H, Takuma T, Nonaka R, Ono Y, Kawahara M. Dynamics of intracellular phospholipid membrane organization during oocyte maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle. Theriogenology 2013; 79:1146–1152.

[56] Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, Sasaki H, Chea E, Rugg-Gunn P, Guo G, Robson P, Draper JS, Rossant J. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. Development 2010; 137:395–403.

[57] Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. Development 2003; 130:2779–2791.

[58] Canalis E, Zanotti S, Beamer WG, Economides AN, Smerdel-ramoya A. Connective tissue growth factor is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis in male mice. Endocrinology 2010; 151:3490–3501.

[59] Zhang K, Rajput SK, Lee K-B, Wang D, Huang J, Folger JK, Knott JG, Zhang J, Smith GW. Evidence supporting a role for SMAD2/3 in bovine early embryonic development: potential implications for embryotropic actions of follistatin. Biol Reprod 2015; 93:1–11.

[60] Sakurai N, Takahashi K, Emura N, Hashizume T, Sawai K. Effects of downregulating TEAD4

transcripts by RNA interference on early development of bovine embryos. J Reprod Dev 2017; 63:135–142.

[61] Wu X, Song M, Yang X, Liu X, Liu K, Jiao C, Wang J, Bai C, Su G, Liu X, Li G. Establishment of bovine embryonic stem cells after knockdown of CDX2. Sci Rep 2016; 6:1–12.

[62] Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the firsttwo extraembryonic cell lineages involved in implantation. Dev Biol 1994; 166:259–267.

[63] Emula N, Takahashi K, Saito Y, Sawai K. The neccessity of TEAD4 for early development and gene expression involved in differentiation in porcine embryos. J Reprod Dev 2019; 65:361–368.

[64] Kidder BL, Palmer S. Examination of transcriptional networks reveals an important role for TCFAP2C , SMARCA4 , and EOMES in trophoblast stem cell maintenance. Genome Res 2010:458–472.

[65] Memili E, Dominko T, First NL. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. Mol Reprod Dev 1998; 51:36–41.

[66] Chen Y, Segarini P, Raoufi F, Bradham D, Leask A. Connective tissue growth factor is secreted through the golgi and is degraded in the endosome. Exp Cell Res 2001; 271:109–117.

[67] Wahab NA, Brinkman H, Mason RM. Uptake and intracellular transport of the connective tissue growth factor: a potential mode of action. Biochem J 2001; 359:89–97.

[68] Negrón-Pérez VM, Hansen PJ. Role of Yes-associated protein 1, angiomotin and mitogen activated kinase kinase 1/2 in development of the bovine blastocyst. Biol Reprod 2017; 2:doi: 10.1093/biolre/iox172.

[69] Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. Development 2016; 143:1063–1074.

[70] Ryan DP, Prichard JF, Kopel E, Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy cows

during hot and cool seasons of the year. Theriogenology 1993; 39:719–737.

[71] Vajta G, Alexopoulos NI, Callesen H. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts in vitro in a three-dimensional gel system. Theriogenology 2004; 62:1253–1263.

[72] Vejlsted M, Du Y, Vajta G, Maddox-Hyttel P. Post-hatching development of the porcine and bovine embryo - Defining criteria for expected development in vivo and in vitro. Theriogenology 2006; 65:153–165.

[73] MacHado GM, Caixeta ES, Lucci CM, Rumpf R, Franco MMH, Dode MAN. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: The effects of tunnel preparation and gender. Zygote 2012; 20:123–134.

[74] Machado GM, Ferreira AR, Pivato I, Fidelis A, Spricigo JF, Paulini F, Lucci CM, Franco MM, Dode MA. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. Mol Reprod Dev 2013; 80:936–947.

[75] Brinkhof B, Van Tol HTA, Groot Koerkamp MJA, Wubbolts RW, Haagsman HP, Roelen BAJ. Characterization of bovine embryos cultured under conditions appropriate for sustaining human naïve pluripotency. PLoS One 2017; 12:1–25.

[76] Hosoe M, Furusawa T, Hayashi K-G, Takahashi T, Hashiyada Y, Kizaki K, Hashizume K, Tokunaga T, Matsuyama S, Sakumoto R. Characterisation of bovine embryos following prolonged culture in embryonic stem cell medium containing leukaemia inhibitory factor. Reprod Fertil Dev 2019; 31:1157–1165.

[77] Brandão DO, Maddox-Hyttel P, Løvendahl P, Rumpf R, Stringfellow D, Callesen H. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. Biol Reprod 2004; 71:2048–2055.

[78] Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. Cell 2014; 156:1032–1044.

[79] Martyn I, Kanno TY, Ruzo A, Siggia ED, Brivanlou AH. Self-organization of a human organizer by combined Wnt and Nodal signalling. Nature 2018; 558:132–135.

[80] Yang QE, Fields SD, Zhang K, Ozawa M, Johnson SE, Ealy a. D. Fibroblast Growth Factor 2 Promotes Primitive Endoderm Development in Bovine Blastocyst Outgrowths. Biol Reprod 2011; 85:946–953.

[81] 長友啓明. 平成25年度 博士論文 2014.

[82] Wooding FBP, Beckers J. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. 1987:667–673.

[83] Trowell OA. The culture of mature organs in a synthetic medium. Exp Cell Res 1959; 16:118–147.

[84] Deglincerti A, Croft GF, Pietila LN, Zernicka-Goetz M, Siggia ED, Brivanlou AH. Self-organization of the in vitro attached human embryo. Nature 2016; 533:251–254.

[85] Bedzhov I, Leung CY, Bialecka M, Zernicka-Goetz M. In vitro culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. Nat Protoc 2014; 9:2732–2739.

[86] Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature 2011; 471:504–508.

[87] Gardner DK, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol Reprod 1993; 48:377–385.

[88] Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? Bioessays 1994; 16:31–38.

[89] Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. Biol Reprod 2000; 62:847–856.

[90] Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian

preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. Theriogenology 1998; 49:83–102.

[91] Copp AJ. The mechanism of mouse egg-cyclinder morphogenesis in vitro. J Embryol Exp Morphol 1981; Vol. 61:277–287.

[92] Yu Chih H. Differentiation in vitro of mouse embryos beyond the implantation stage. Nature 1972; 239:200–202.

[93] Morris SA, Grewal S, Barrios F, Patankar SN, Strauss B, Buttery L, Alexander M, Shakesheff KM, Zernicka-Goetz M. Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo. Nat Commun 2012; 3:610–673.

[94] Ezashi T, Telugu BPVL, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:10993–10998.

[95] Wu G, Gentile L, Fuchikami T, Sutter J, Psathaki K, Esteves TC, Arauzo-Bravo MJ, Ortmeier C, Verberk G, Abe K, Scholer HR. Initiation of trophectoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. Development 2010; 137:4159–4169.

[96] Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Schöler H, Niemann H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. Biol Reprod 2000; 63:1698–1705.

[97] Xie D, Chen CC, Ptaszek LM, Xiao S, Cao X, Fang F, Ng HH, Lewin HA, Cowan C, Zhong S. Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. Genome Res 2010; 20:804–815.

[98] Pfarrer CD, Heeb C, Leiser R. Expression of gap junctional connexins 26, 32 and 43 in bovine placentomes during pregnancy. Placenta 2006; 27:79–86.

[99] Rarick HM, Opgenorth TJ, Geldern TW Von, Wu-wong JR, Solaro RJ. An essential myosin light chain peptide induces supramaximal stimulation of cardiac nyofibrillar ATPase activity. J Biol

Chem 1996; 271:27039–27043.

[100] Guillemot F, Caspary T, Tilghman SM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Anderson DJ, Joyner AL, Rossant J, Nagy A. Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. Nat Genet 1995; 9:235–242.

[101] Arnold DR, Lefebvre R, Smith LC. Characterization of the placenta specific bovine mammalian achaete scute-like homologue 2 (Mash2) gene. Placenta 2006; 27:1124–1131.

[102] Peter AT. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. Theriogenology 2013; 80:693–705.

[103] Hansen TR, Austin KJ, Perry DJ, Pru JK, Teixeira MG, Johnson GA. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. J Reprod Fertil Suppl 1999; 54:329–339.

[104] Awad M, Koshi K, Kizaki K, Takahashi T, Hashizume K. SOLD1 is expressed in bovine trophoblast cell lines and regulates cell invasiveness. Reprod Biol Endocrinol 2014; 12:1–10.

[105] Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. Reproduction 2002; 124:289–300.

[106] Whyte JJ, Meyer AE, Spate LD, Benne JA, Cecil R, Samuel MS, Murphy CN, Prather RS, Geisert RD. Inactivation of porcine interleukin-1β results in failure of rapid conceptus elongation. Proc Natl Acad Sci 2018; 115:307–312.

[107] Wang XL, Wang K, Han GC, Zeng SM. A potential autocrine role for interferon Tau in ovine trophectoderm. Reprod Domest Anim 2013; 48:819–825.

[108] Yaseen MA, Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. Reproduction 2001; 122:601–610.

[109] Cheng AM, Tracy, Saxton M, Sakai R, Kulkarni S, Mbamalu G, Vogel W, Tortorice CG, Cardiff RD, Cross JC, Muller WJ, Pawson T, et al. Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. Cell 1998; 95:793–803.

[110] Goldin SN, Papaioannou VE. Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm. Genesis 2003; 36:40–47.

[111] Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. Dev Cell 2006; 10:615–624.

[112] Frankenberg S, Gerbe F, Bessonnard S, Belville C, Pouchin P, Bardot O, Chazaud C. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving nanog and RTK signaling. Dev Cell 2011; 21:1005–1013.

[113] Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. Development 2010; 137:715–724.

[114] Molotkov A, Mazot P, Brewer JR, Cinalli RM, Soriano P. Distinct requirements for FGFR1 and FGFR2 in primitive endoderm development and exit from pluripotency. Dev Cell 2017; 41:511-526.e4.

[115] Kang M, Garg V, Hadjantonakis AK. Lineage establishment and progression within the inner cell mass of the mouse blastocyst requires FGFR1 and FGFR2. Dev Cell 2017; 41:496–510.

[116] Niakan KK, Ji H, Maehr R, Vokes SA, Rodolfa KT, Sherwood RI, Yamaki M, Dimos JT, Chen AE, Melton DA, McMahon AP, Eggan K. Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. Genes Dev 2010; 24:312–326.

[117] Artus J, Piliszek A, Hadjantonakis AK. The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. Dev Biol

2011; 350:393–404.

[118] Vejlsted M, Avery B, Schmidt M, Greve T, Alexopoulos N, Maddox-Hyttel P. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. Biol Reprod 2005; 72:678–686.

[119] Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 2001; 7:175–189.

[120] Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O2 tensions and the prevention of differentiation of HES cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:4783–4788.

[121] Carraway KL, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai C. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. Nature 1997; 387:512–516.

[122] Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Amphiregulin: A bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85:6528–6532.

[123] Johnson GR, Kannan B, Shoyab M, Stromberg K. Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185(erbB2). Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. J Biol Chem 1993; 268:2924–2931.

[124] Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. Nature 1997; 387:509–512.

[125] Berasain C, Avila MA. Amphiregulin. Semin Cell Dev Biol 2014; 28:31–41.

[126] Britto JM, Lukehurst S, Weller R, Qiu Y, Hertzog P, Busfield SJ, Fraser C. Generation and characterization of Neuregulin-2-deficient mice. Mol Cell Biol 2004; 24:8221–8226.

[127] Vullhorst D, Mitchell RM, Keating C, Roychowdhury S, Karavanova I, Tao-Cheng J-H, Buonanno A. A negative feedback loop controls NMDA receptor function in cortical interneurons

via neuregulin 2/ErbB4 signalling. Nat Commun 2015; 6:7222.

[128] Lee K-H, Lee H, Yang CH, Ko J-S, Park C-H, Woo R-S, Kim JY, Sun W, Kim J-H, Ho W-K, Lee S-H. Bidirectional signaling of Neuregulin-2 mediates formation of GABAergic synapses and maturation of glutamatergic synapses in newborn granule cells of postnatal hippocampus. J Neurosci 2015; 35:16479–16493.

[129] Falls DL. Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies. EGF Recept Fam Biol Mech Role Cancer 2003; 284:15–31.

[130] Uysal-Onganer P, Kypta RM. Wnt11 in 2011 - the regulation and function of a non-canonical Wnt. Acta Physiol 2012; 204:52–64.

[131] Cohen ED, Miller MF, Wang Z, Moon RT, Morrisey EE. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. Development 2012; 139:1931–1940.

[132] Andre P, Song H, Kim W, Kispert A, Yang Y. Wnt5a and Wnt11 regulate mammalian anterior-posterior axis elongation. Development 2015; 142:1516–1527.

[133] Majumdar A, Vainio S, Kispert A, McMahon J, McMahon AP. Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. Development 2003; 130:3175–3185.

[134] Kispert A, Vainio S, Shen L, Rowitch DH, McMahon AP. Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. Development 1996; 122:3627–3637.

[135] Sinha T, Lin L, Li D, Davis J, Evans S, Wynshaw-Boris A, Wang J. Mapping the dynamic expression of Wnt11 and the lineage contribution of Wnt11-expressing cells during early mouse development. Dev Biol 2015; 398:177–192.

[136] Denicol AC, Dobbs KB, McLean KM, Carambula SF, Loureiro B, Hansen PJ. Canonical WNT signaling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage. Sci Rep 2013; 3:1–7.

[137] Tribulo P, Moss J, Ozawa M, Jian Z, Tian X, Hansen. PJ. WNT signaling in the bovine embryo:

possible involvement of pathways independent of nuclear CTNNB1. Reproduction 2016; 1.

[138] Mamo S, Mehta JP, McGettigan P, Fair T, Spencer TE, Bazer FW, Lonergan P. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptuses associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. Biol Reprod 2011; 85:1143–1151.

[139] Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science (80-) 2002; 295:868–872.

[140] Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. EMBO Rep 2003; 4:1054–1060.

[141] Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. J Reprod Dev 2012; 58:1–9.

[142] Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schulte RM, Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology 2000; 54:137–145.

[143] Heyer BS, Macauley A, Behrendtsen O, Werb Z. Hypersensitivity to DNA damage leads to increased apoptosis during early mouse development. Genes Dev 2000; 14:2072–2084.

[144] Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis A-K. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. Development 2008; 135:3081–3091.

[145] Dumitru R, Gama V, Fagan BM, Bower JJ, Swahari V, Pevny LH, Deshmukh M. Human embryonic stem cells have constitutively active bax at the golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. Mol Cell 2012; 46:573–583.

[146] Liu JC, Guan X, Ryan JA, Rivera AG, Mock C, Agarwal V, Letai A, Lerou PH, Lahav G. High mitochondrial priming sensitizes hESCs to DNA-damage-induced apoptosis. Cell Stem Cell

2013; 13:483–491.

[147] Laurent A, Blasi F. Differential DNA damage signalling and apoptotic threshold correlate with mouse epiblast-specific hypersensitivity to radiation. Development 2015; 142:3675–3685.

[148] Buonanno A, Fischbach GD. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 2001; 11:287–296.

[149] Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubeit A, Spitz L, Ii PL, Goldfarb D, I ME. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. Nature 1993; 365:666–669.

[150] Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol 1998; 72:8463–8471.

[151] Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science (80-) 1996; 272:263–267.

[152] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:2140–2145.

[153] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. Nature 2009; 459:523–527.

[154] Xing A, Boileau P, Cauzac M, Challier J, Girard J, Hauguel-de Mouzon S. Comparative in vivo approaches for selective adenovirus-mediated gene delivery to the placenta. Hum Gene Ther 2004; 11:167–177.

[155] Senut MC, Suhr ST, Gage FH. Gene transfer to the rodent placenta in situ: A new strategy for delivering gene products to the fetus. J Clin Invest 1998; 101:1565–1571.

[156] Okada Y, Ueshin Y, Isotani A, Saito-Fujita T, Nakashima H, Kimura K, Mizoguchi A, Oh-Hora M, Mori Y, Ogata M, Oshima RG, Okabe M, et al. Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer. Nat Biotechnol 2007; 25:233–237.

[157] Milazzotto MP, Goissis MD, Feitosa WB, Martins LF, Strauss BE, Bajgelman MC, Assumpção MEODÁ, Visintin JA. Myostatin gene knockdown through lentiviral-mediated delivery of shRNA for in vitro production of transgenic bovine embryos. Zygote 2010; 18:339–344.

[158] Tessanne K, Golding MC, Long CR, Peoples MD, Hannon G, Westhusin ME. Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin. Mol Reprod Dev 2012; 79:176–185.

[159] Kohri N, Akizawa H, Iisaka S, Bai H, Yanagawa Y, Takahashi M, Komatsu M, Kawai M, Nagano M, Kawahara M. Trophectoderm regeneration to support full-term development in the inner cell mass isolated from bovine blastocyst. J Biol Chem 2019:(*in press*).

[160] Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. Eur J Biochem 1993; 211:7–18.

[161] Georgiades P, Rossant J. Ets2 is necessary in trophoblast for normal embryonic anteroposterior axis development. Development 2006; 133:1059–1068.

[162] Maroulakou IG, Papas TS, Green JE. Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis. Oncogene 1994; 9:1551–1565.

[163] Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Maki RA, Werb Z, Oshima RG. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. Genes Dev 1998; 12:1315–1326.

[164] Polydorou C, Georgiades P. Ets2-dependent trophoblast signalling is required for gastrulation progression after primitive streak initiation. Nat Commun 2013; 4:1658.

[165] Wen F, Tynan JA, Cecena G, Williams R, Múnera J, Mavrothalassitis G, Oshima RG. Ets2 is

required for trophoblast stem cell self-renewal. Dev Biol 2007; 312:284–299.

[166] Degrelle SA, Campion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard JP, Hue I. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. Dev Biol 2005; 288:448–460.

[167] Ezashi T, Das P, Gupta R, Walker A, Roberts RM. The role of homeobox protein distal-less 3 and its interaction with ETS2 in regulating bovine interferon-tau gene expression-synergistic transcriptional activation with ETS2. Biol Reprod 2008; 79:115–124.

[168] Sternlicht MD, Sunnarborg SW, Kouros-Mehr H, Yu Y, Lee DC, Werb Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. Development 2005; 132:3923–3933.

[169] Van Leeuwen J, Berg DK, Pfeffer PL. Morphological and gene expression changes in cattle embryos from hatched blastocyst to early gastrulation stages after transfer of in vitro produced embryos. PLoS One 2015; 10:1–26.

[170] Keefer CL, Pant D, Blomberg L, Talbot NC. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. Anim Reprod Sci 2007; 98:147–168.

[171] Gandolfi F, Pennarossa G, Maffei S, Brevini T. Why is it so difficult to derive pluripotent stem cells in domestic ungulates? Reprod Domest Anim 2012; 47:11–17.

付表 1. プライマーの配列

RT-PCR および定量 PCR 用

名称	配列 (5`-3`) (上段: フォワード、下段: リバース)	アニーリング (°C)	産物長 (bp)	NCBI Accession number
TEAD4	GGCAAGATGTATGGTCGGAA	62	150	XM_010805630
	TGCCTGATCCTTTAGCTTGG			
CCN2	CAAGCAGCTGAGCGAGTTGT	62	150	NM_174030
	TGGTACACAGTTCCTCCGAAA			
CDX2	GCCACCATGTACGTGAGCTAC	58	140	NM_001206299
	ACATGGTATCCGCCGTAGTC			
GATA2	CACCTGTTGCGCAAACTGTC	62	150	NM_001192114
	CGGGTCTGGATGCCTTCCTT			
GATA3	CTACCACAAGATGAACGGACAG	58	142	NM_001076804
	AGGGTCTCCATTGGCATTTC			
OCT4	ACATGTGTAAGCTGCGGCCC	58	107	NM_174580.3
	CTTTCGGGCCTGCACAAGGG			
SOX2	GCAGACCTACATGAACGGCT	58	245	NM_001105463.2
	ACATGTGAAGTCTGCTGGGG			
NANOG	CTCGCAGACCCAGCTGTGTG	58	198	NM_001025344.1
	CCCTGAGGCATGCCATTGCT			
IFNT	CTACTGATGGCCTTGGTGCT	55	204	NM_001031765.1
	GTCCTTCTGGAGCTGGTCAC			
ZFX	CACGTCTTGACGAGTGAGTCCA	60	290	NM_177490.1
	GCATCCATGGTCATTCCAGAGGA			
ATF3	AGAAATAAGATTGCAGCCGC	62	150	NM_001046193.2
	GTATATCAAATGCTGCTTCTCGT			
ELF3	CCGAAAGCTGAGCAAAGAGTC	62	150	NM_001098909.2
	TCTTGCCGGTTCTCCCACTT			
DLX4	CATCAAGAGCGGGAGACAGACT	65	150	NM_001098041.1
	GTGCTGGAAACGCTGGTTCA			
GJB1	GCCGAGTATGGCTCTCTGTC	55	150	NM_174069.2
	TGGGGAAAAAGTGGTCGTAG			
MYL3	CGGCTTCCTTCTCTACACCC	55	201	NM_001076501.2
	TCCGGAGTGAACTCGATCTTG			

付表 1. 続き

名称	配列 (5`-3`) (上段: フォワード、下段: リバース)	アニーリング (°C)	産物長 (bp)	NCBI Accession number
ASCL2	CTTCTCCAGCTGGTTAGGGG TTGCACACTAGCCTTGGGTC	55	193	NM_001040607.1
SSLP1	CGGTCCTGCCTTCTGTAAGT CATTCTAGAGCTTGCGGGAGT	55	120	NM_001105478.1
SOX17	AACGCCGAGTTGAGCAAGAT AGTTGGGATGGTCCTGCATG	55	121	NM_001206251.1
GATA4	CAGGAGGCAAAAATGCTAGG ATCACCCGTCGTCTTTCTTC	55	62	NM_001192877.1
HNF4A	CGGGCCACGGGCAAACACTA CACCACGCACTGCCGGCTAA	58	117	NM_001015557.1
PDGFRA	GCCGTGGACACACTTTTTCC CTGGCAGAGGATTAGGCTCG	55	148	NM_001192345.3
ACTB	TGGACTTCGAGCAGGAGATG GTAGAGGTCCTTGCGGATGT	55	221	NM_173979.3
H2AFZ	AGAGCCGGTTTGCAGTTCCCG TACTCCAGGATGGCTGCGCTGT	58	116	NM_174809.2
GAPDH	CACCCTCAAGATTGTCAGCA GGTCATAAGTCCCTCCACGA	55	103	NM_001034034.2

クローニング、ウイルスベクターの発現確認用

名称	配列 (5`-3`)	アニーリング (°C)	産物長 (bp)	備考
NRG2 5_RACE 2018R	GATTACGCCAAGCTTCTGTCG TAGCTGCGCTGCATGTCCG			5` RACE 用。 下線が *NRG2* 遺伝子に相補的な配列
NRG2 3_RACE 1902F	GATTACGCCAAGCTTCGCCGC GCCCATCAATTATCGCCT			3` RACE 用。 下線が *NRG2* 遺伝子に相補的な配列
Venus geno2	AGATCCGCCACAACATCGAG TCTCGTTGGGGTCTTTGCTC	60	114	レンチウイルスの感染確認用

付表 2. shRNA 発現ベクターの作製に用いた合成オリゴの配列

名称	配列（5`-3`）
TEAD4	GATCCGGACAAGCCCATCGACAATGAGTGTGCTGTCCTCATTGTCGATGGGC
TS	TTGTCCTTTTTTA
TEAD4	AGCTTAAAAAAGGACAAGCCCATCGACAATGAGGACAGCACACTCATTGTC
BS	GATGGGCTTGTCCG
CCN2	GATCCGGTCAAACTGCCCGGGAAATGTGTGCTGTCCATTTCCCGGGCAG
TS	TTTGACCTTTTTTA
CCN2	AGCTTAAAAAAGGTCAAACTGCCCGGGAAATGGACAGCACACATTTCCC
BS	GGGCAGTTTGACCG
Egfp TS	GATCCGACAACAGCCACAACGTCTATAGTGTGCTGTCCTATAGACGTTGT
	GGCTGTTGTCTTTTTTA
Egfp	AGCTTAAAAAAGACAACAGCCACAACGTCTATAGGACAGCACACTATAG
BS	ACGTTGTGGCTGTTGTCG

TS: Top strand、BS: Bottom strand

付表 3. 試薬組成

10×PBS (-)

Component	g/500 mL
NaCl	40
KCl	1
$Na_2HPO_4・12H_2O$	14.405
KH_2PO_4	1

オートクレーブ後、室温で保存

×1000 $CaCl_2・2H_2O$

Component	g/10 mL
$CaCl_2・2H_2O$	1.32

4°C で保存

×1000 $MgCl_2・6H_2O$

Component	g/10 mL
$MgCl_2・6H_2O$(関)	1.0

4°C で保存

Antibiotic

Component	/1.5 mL
Penicillin	150000 U
Streptomycin	0.15 g

10 または 50 µl ずつ 0.5 µL チューブに分注し、-20°C で保存

FSH Stock

Component	/mL
FSH	20 AU
PBS	1 mL

10 µL ずつ分注し、-20°C で保存

PB1

Component	/500 mL
10×PBS	50 mL
Glucose	0.5 g
Sodium Pyruvate	0.018 g
×1000 $CaCl_2$・$2H_2O$	500 µl
×1000 $MgCl_2$・$6H_2O$	500 µl
Antibiotic	250 µl
BSA	2 .0 g

濾過滅菌後、4°C で保存　使用期限は 3 日

TCM-199

Component		mg/10 mL
199		0.098
HEPES		0.298
$NaHCO_3$	12.5 mM	0.22
Cys		1 µl
Antibiotic		5 µl
FSH Stock		10 µl
FCS		500 µl

使用前に濾過滅菌、使用期限は 1 週間

B.O. Stock (黄色)

Component		g/100 mL
NaCl		6.5453
KCl		0.2997
NaH_2O_4・$2H_2O$		0.1145
$MgCl_2$・$6H_2O$		0.1057
$CaCl_2$・$2H_2O$		0.3303
Glucose		2.5181
phenol red	0.5 %	100 µl

4°C で保存し、使用期限は調製から 3 ヶ月

B.O. + teophyllin working solution

Component	g/100 mL
$NaHCO_3$	0.3108
Na-pyruvate	0.0138
Theophyllin	0.045
Stock	10 mL
Antibiotic	50 µl

調製後、pH 7.6 に調整　使用前に濾過滅菌し、残りは 4°C で保存、使用期限は 1 か月

B.O. + teophyllin+BSA

Component	/10 mL
B.O. + teophyllin working solution	10 mL
BSA	0.06 g

使用前に濾過滅菌　使用期限は 1 週間

mSOFai Stock A

Component		g/100 mL
NaCl		6.294
KCl		0.534
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		0.2513
KH_2PO_4		0.1619
Gentamycin sulfate	50 mg/mL	0.025
phenol red	0.5 %	100 µl

4°C で保存し、使用期限は調製から 3 ヶ月

mSOFai Stock B

Component		g/100 mL
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$		0.0996
Gentamycin sulfate	50 mg/mL	0.025

4°C で保存し、使用期限は調製から 3 ヶ月

Insulin Stock

Component	
ウシ Insulin	0.01 g
酢酸	10 µl
滅菌水	1 mL

4°C で保存し、使用期限は調製から 1 ヶ月

mSOFai working Solution

Component		g/100 mL
$NaHCO_3$		0.2106
Na-pyruvate		0.00363
Glutamine	1 mM	0.0146
Glycin	1 mM	0.0375
Taurin	2 mM	0.025
Na-lactate		50 µl
PVA	10 %	1.0 mL
MEM NEAA	×100	1.0 mL
BME AA	×50	2.0 mL
Stock A		10 mL
Stock B		10 mL

4°C で保存し、使用期限は調製から 1 ヶ月

mSOFai

Component	
mSOFai working Solution	10 mL
Insulin	10 µl
BSA	0.03 g

使用前に濾過滅菌、使用期限は 1 週間

ゲル培地

Component	/ 10mL
RPMI1640	6.6 mL
Knockout Serum Replacement (KSR)	3.0 mL
x 100 Insulin - Transferrin – Selenium Solution (ITS)	100 μL
x 100 MEM NEAA	100 μL
x 50 BME AA	200 μL
Cysteamine	1 μL

フィルター滅菌後 4°C で保存し、使用期限は調製から 1 週間

0.2M phosphate buffer (pH 7.4) (PB)

Component	g/ 100 mL
NaH_2PO_4・$2H_2O$	0.593
Na_2HPO_4・$12H_2O$	5.802

オートクレーブ後、室温で保存

グルタルアルデヒド固定液

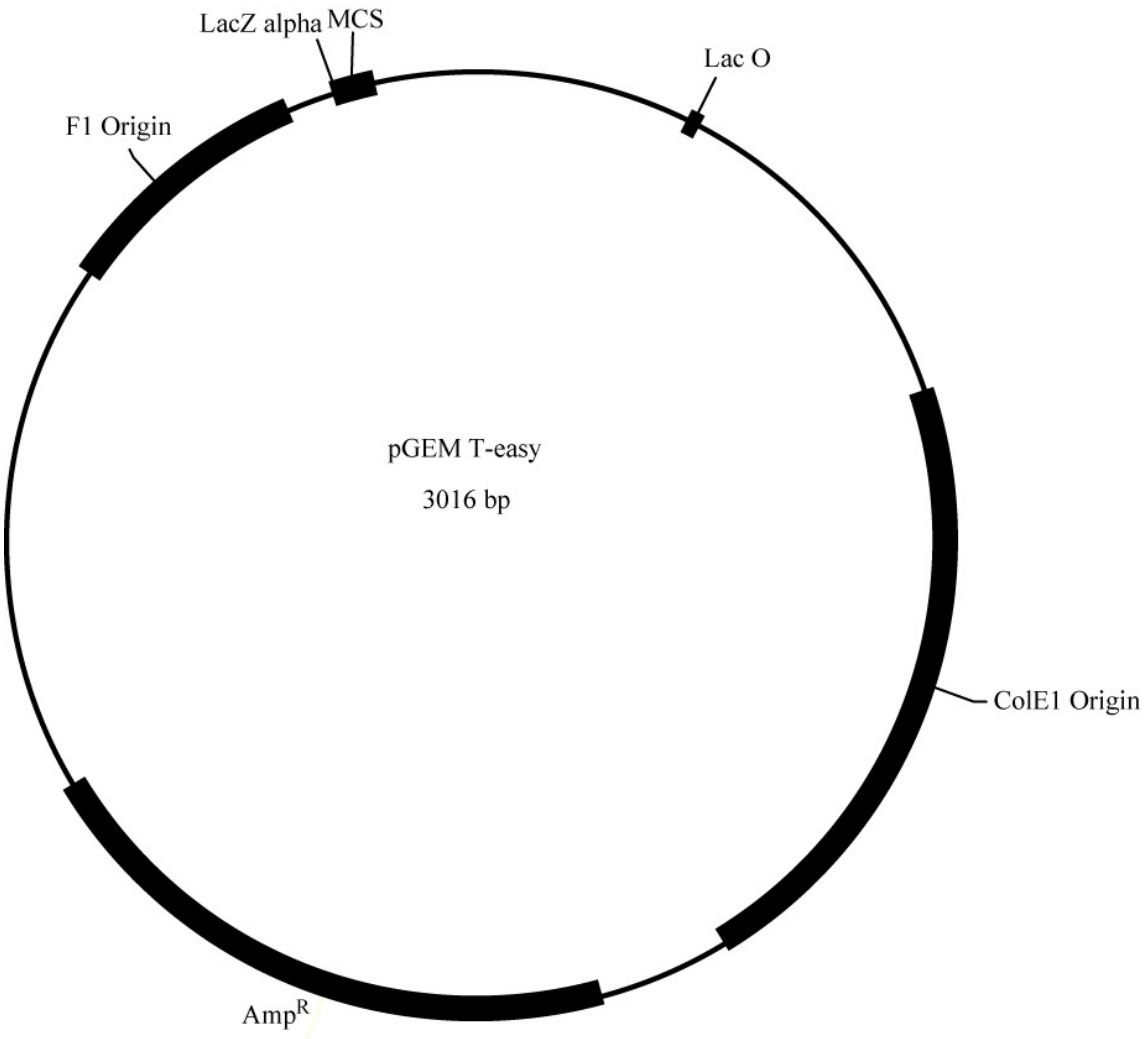
Component	mL/ 10 mL
PB	5
50% glutaraldehyde (電子顕微鏡用、日新 EM)	0.5

4°C 保存

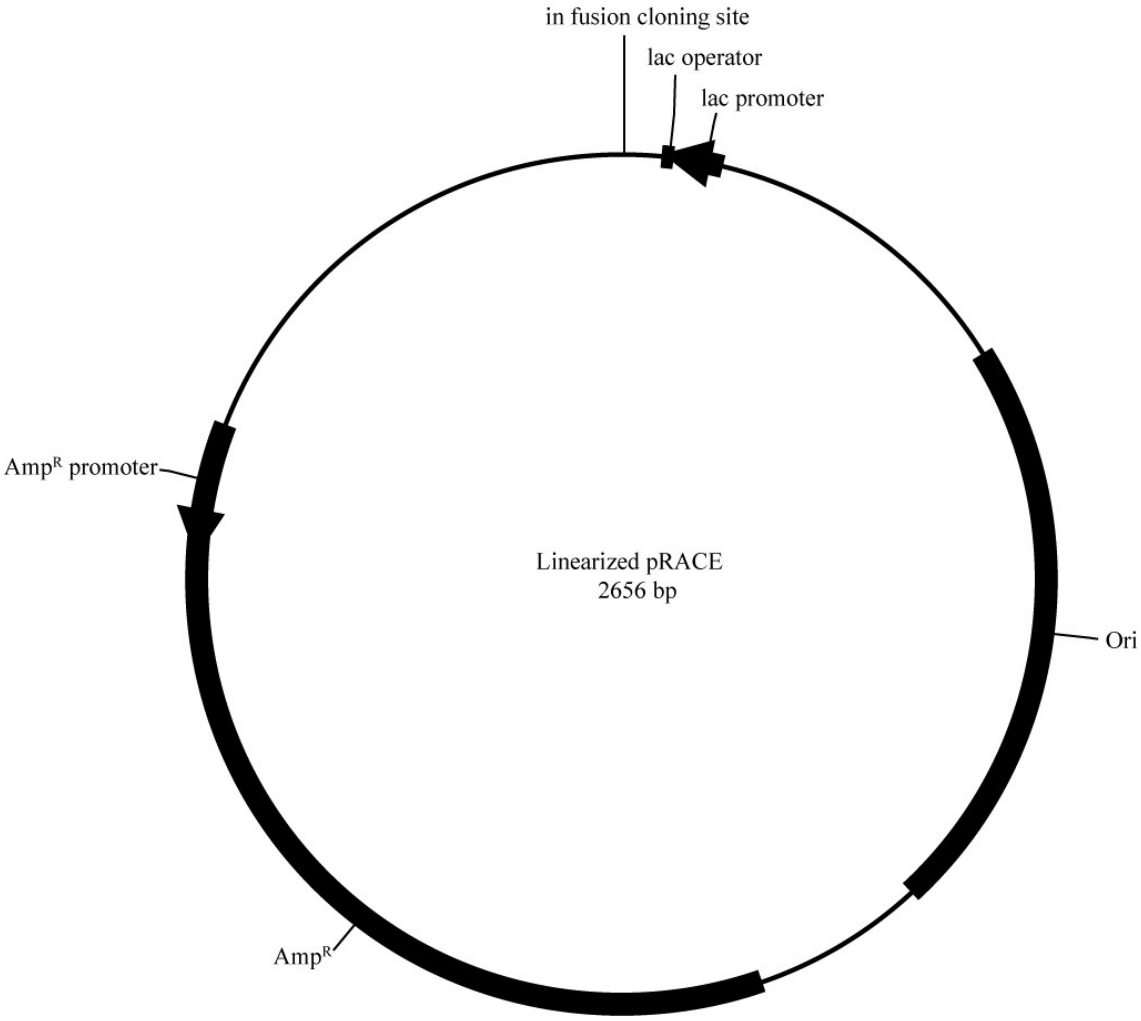
酸化オスミウム溶液

Component	mL/ 1.5 mL
2% OsO_4 水溶液	0.75
PB	0.75

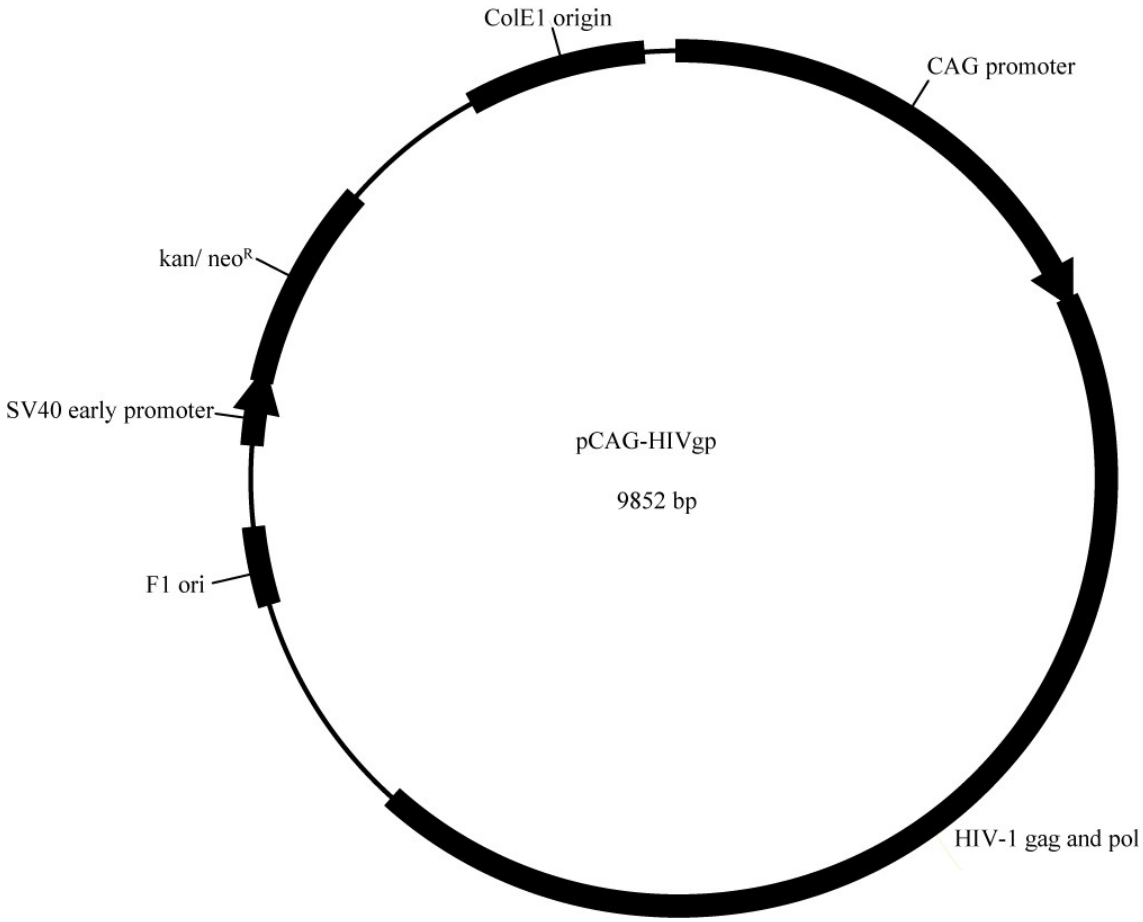
付図



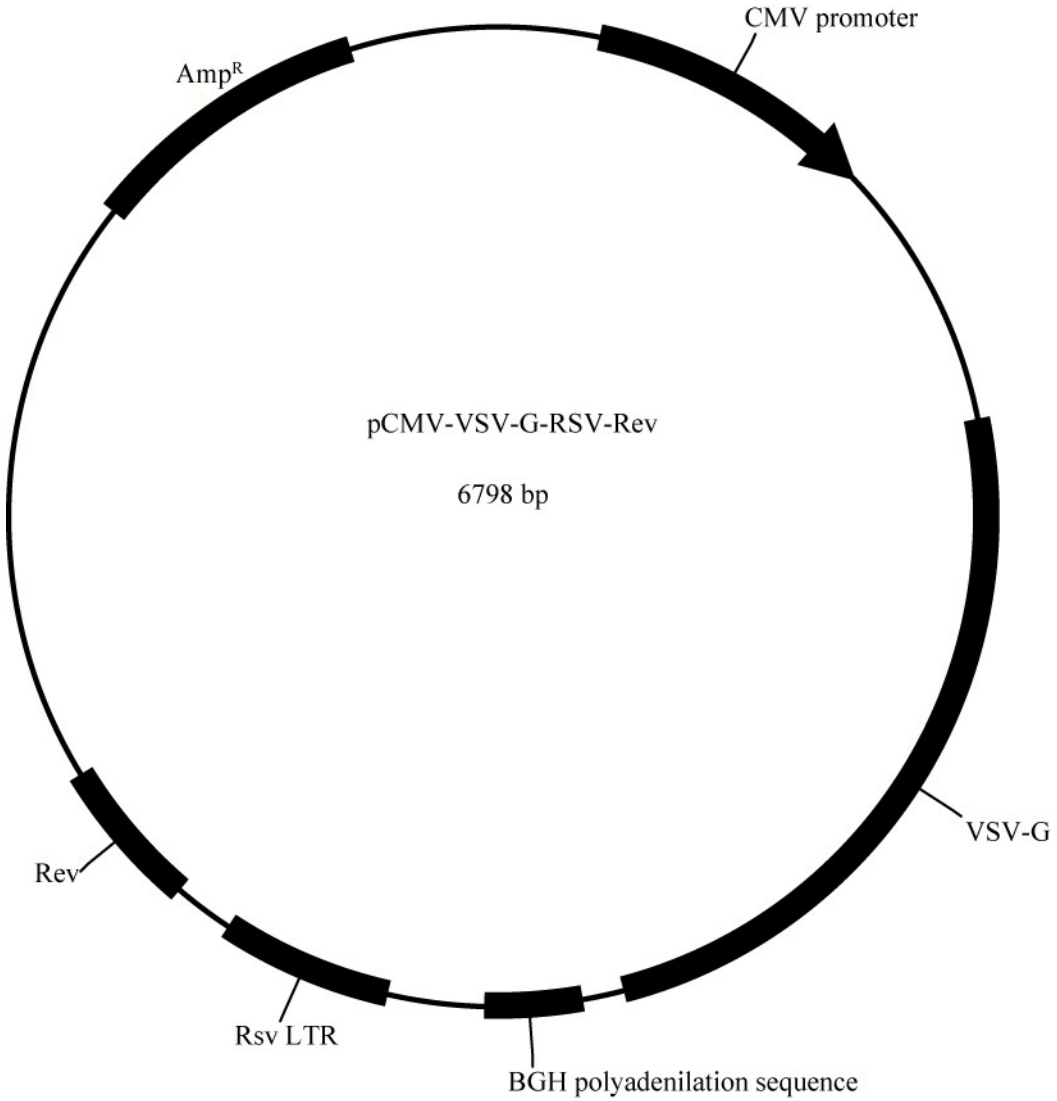
TA クローニングに用いた。
マルチプルクローニングサイト (MCS)内の EcoRV サイトで平滑末端にし、両鎖の 3`端にチミジンを付加した T ベクターである。
クローニングの際は PCR 産物の両鎖の 5`端に Taq ポリメラーゼの Terminal deoxinucleotidil transferase 活性によりアデニンを付加し、ベクターにライゲーションした。
クローニングサイトが LacZ alpha 配列の中間部に位置するため、JM109 のような lacZ⊿M15 の遺伝子型を有する大腸菌株から作製したコンピテントセルを用い、X-gal および IPTG を含む寒天培地で形質転換することにより、インサート陽性のコロニーは白色、陰性のコロニーは青色を呈する。



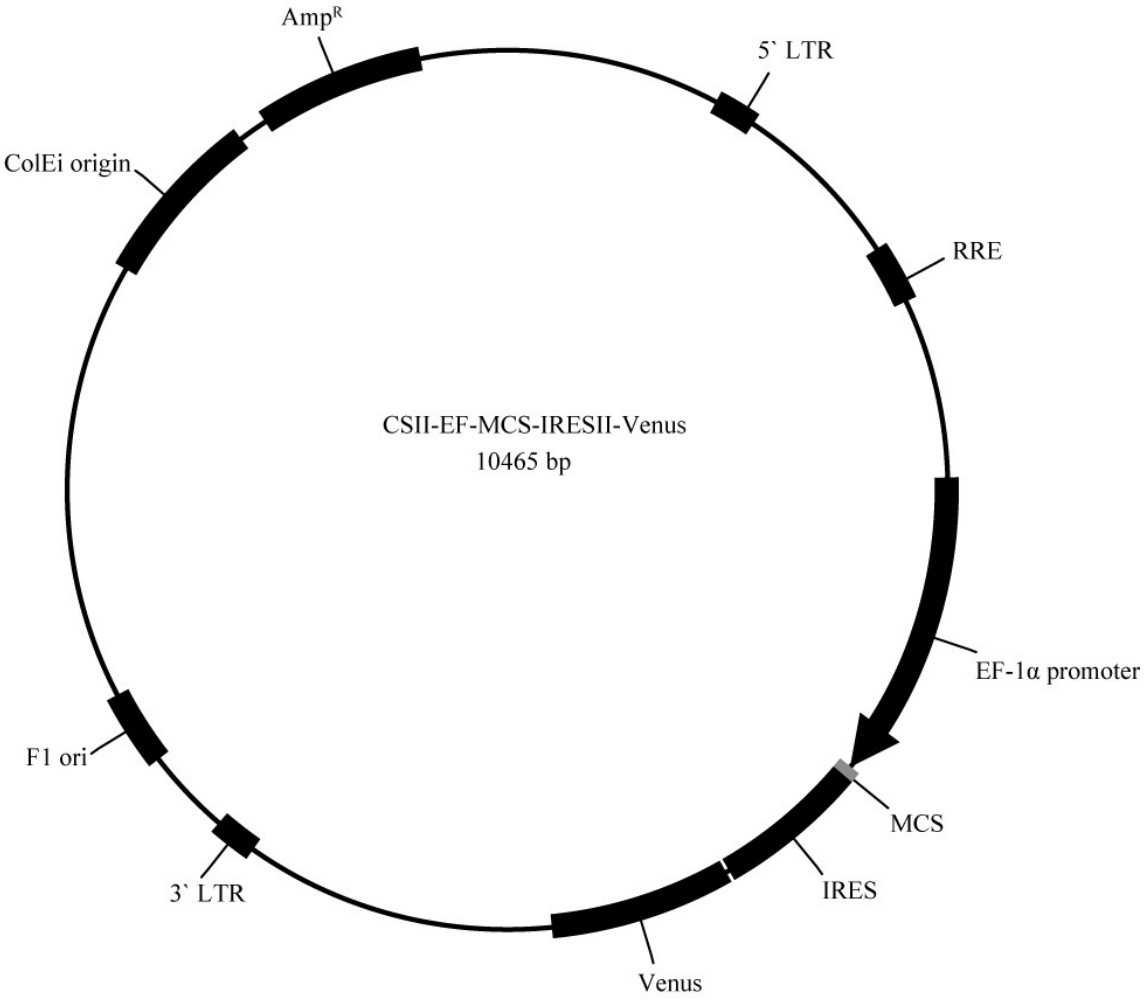
SMARTer RACE 5`/ 3` Kit (Takara)付属の、in fusion クローニング用の直鎖ベクター。
pUC19 ベクターを基礎とし、EcoRI および HindIII サイトで直鎖化してある。
ベクターの直鎖化部位から 15 bp 程度と相補的になる配列を PCR 産物の両端に付加するようなプライマーの組で目的配列を増幅し、相同組換えによりベクターへのサブクローニングを行った。



レンチウイルスベクター作製に用いた。
ウイルスのパッケージングに必要な I 型 HIV ウイルス由来の *gag* および *pol* 遺伝子を発現する発現ベクター。エンベロープを発現する発現ベクターと、トランスファーベクターとともに HEK293FT 細胞にトランスフェクションすることで培養上清中に偽ウイルス粒子を出芽させた。
本博士論文で使用したプラスミドベクターのうち、この pCAG-HIVgp だけはカナマイシンあるいはジェネティシン (ネオマイシン)を用いる必要がある。



レンチウイルスベクター作製に用いた。
ウイルスのエンベロープを構成する VSV-G、およびパッケージングに必要な RSV の LTR および *Rev* 遺伝子を発現する発現ベクター。VSV-G をエンベロープに持つレトロウイルス粒子はパントロピックであり、ウシを含む多くの真核生物の細胞を宿主とすることができる。*gag* や *pol* といったウイルス構成遺伝子を発現する発現ベクターと、トランスファーベクターとともに HEK293FT 細胞にトランスフェクションすることで培養上清中に偽ウイルス粒子を出芽させた。



レンチウイルスベクター作製に用いた。

MCS を利用し目的遺伝子の CDS (開始コドンから終始コドンまで)をサブクローニングした。また、外来遺伝子を導入していないベクターはコントロールの空ウイルス作製用に使用した。本トランスファーベクターを用いて作製したレンチウイルスベクターでは、感染細胞のゲノムに 5`LTR から 3`LTR までの領域が挿入される。感染細胞では、EF-1α プロモーターによりサブクローニングされた外来遺伝子を含む mRNA が構成的に発現する。

IRES 配列では MCS 直下の外来遺伝子の翻訳とは独立にリボソームの進入が起こるため、この mRNA からは外来遺伝子と蛍光タンパク質 Venus が別々のタンパク質として翻訳される。*gag* や *pol* といったウイルス構成遺伝子を発現する発現ベクターと、エンベロープを発現する発現ベクターとともに HEK293FT 細胞にトランスフェクションすることで培養上清中に偽ウイルス粒子を出芽させた。

両 LTR 間の鎖長が 8.1 kb を超えるとトランスフェクション細胞におけるパッケージング効率が著しく低下する。LTR 間のバックボーンは 5615 bp であるから、実用可能なウイルス力価を得るためには MCS に挿入する外来遺伝子の長さは 2300 bp 程度にとどめる必要がある。