

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14367

研究課題名(和文)胎盤置換による異種胚妊娠モデルの開発～マウスはラットを産めるのか？～

研究課題名(英文)A model of xenogeneic fetus pregnancy by the placenta replacement method

研究代表者

磯谷 綾子(Isotani, Ayako)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：20444523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の胎児は母体の体内で育ち誕生する。この母体と胎児の関係は、免疫学的に寛容で、同種間であれば代理母でも妊娠が成立する。しかし、異種間では子供は誕生しない。一方、マウスとラットの間では、胎盤と母体が同種になれば、異種キメラを誕生させることができる。そこで本研究では、マウスの胎盤を持つラット胚(胎盤置換ラット胚)を代理母マウスに移植して、異種胚移植モデルの検討を行った。結果、胎盤置換ラット胚は、胎生10.5日まで胎児が生存していることが確かめられたが、それ以降に発生は進まなかった。以上のことから、母体と胎盤間だけではなく、胎盤と胎児間にも異種認識メカニズムの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In mammals, the fetus develops and grows in the body of the mother during pregnancy. The pregnant mother has immune tolerance to the fetus. Thus, even if the fetus is genetically different from the mother, allogeneic transplantation can succeed. However, in case of xenogeneic transplantation, pregnancy cannot be achieved. On the other hand, the combination of a placenta and a pregnant mother's genotype is considered to be a critical factor for the success of xenogeneic chimeras. In this study, to establish a model of xenogeneic fetus pregnancy, we replaced the placenta of rat embryos with that of mice and transplanted the embryos into pseudopregnant mice. Although the placenta-replaced rat embryos survived at 10.5 dpc, they were aborted at 12.5 dpc. This suggests that there is a xeno-recognition mechanism not only between the placenta and mother but also between the placenta and fetus.

研究分野：実験動物学

キーワード：実験動物 胎盤 異種 妊娠

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の妊娠期における母体と胎児の関係は、免疫的に寛容なことが知られており、ヒトでも代理母が存在するように、同種間であれば、MHC の適合に関係なく妊娠が成立して子供が誕生する。しかし、異種胚移植の研究から異種間では、ほぼ妊娠が成立しない。

この原因として、異種細胞に対する免疫応答が予想された。しかし、獲得性免疫細胞である T 細胞と B 細胞を欠失し異種細胞移植が可能な免疫不全動物である Scid マウスへ異種ハタネズミ胚を移植した研究では、脱落膜形成は見られたものの、胚の発生はおこななかったという結果が報告されていた。すなわち、妊娠の成立には、免疫寛容以外にも母子間認識に種特異的なメカニズムが存在していることが示唆された。

一方で、異種キメラの実験において、マウスとラットの 8 細胞期胚を混ぜ合わせた集合法で作製された異種キメラは胎生致死になる。しかし、われわれは、胎盤に分化することのない ES 細胞を用いて、マウスとラットの異種キメラを誕生させることに成功した。集合法では胎児だけでなく胎盤もキメラとなるが、ES インジェクション法では、胎盤が母体と同種になるという違いがある。すなわち、異種の細胞を持つ胎児でも、母体と胎児を繋ぐ胎盤が同種のみから構成されれば、妊娠が成立することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、胎盤が同種であれば、異種の細胞を持つ胎児でも誕生できるという、われわれの研究成果をヒントに、胎児と母体を繋ぐ胎盤に焦点を当て、胎盤をマウス由来の組織で置換したラット胚が、マウスの代理母内で発生するのかどうかを、検証し、異種胚妊娠モデルの確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 2 細胞期胚を電気融合させて 4 倍体にした胚(テトラプロイド胚)は、胎盤にしか分化しないことが知られており、これに胎盤に分化しないことが知られている ES 細胞を打ち込むテトラプロイド・コンプリメンテーション法を用いれば、胎盤を完全に母体と同種に置き換えることができる。

そこで、マウスの 2 細胞期胚を用いてテトラプロイド胚を作製し、これにラットの ES 細

胞をインジェクションして、胎盤置換ラット胚を作製した。この胎盤置換ラット胚をマウスの代理母に移植し、個体発生がいつまで進行するのかを調査した(図 1)。

また、異種胚移植のコントロールとして、重篤な免疫不全マウス(NSG マウス)の代理母にラット胚の移植を行い、テトラプロイド・コンプリメンテーション法のコントロールとして、マウスのテトラプロイド胚にマウス ES 細胞を打ち込んでマウスの代理母に移植した。

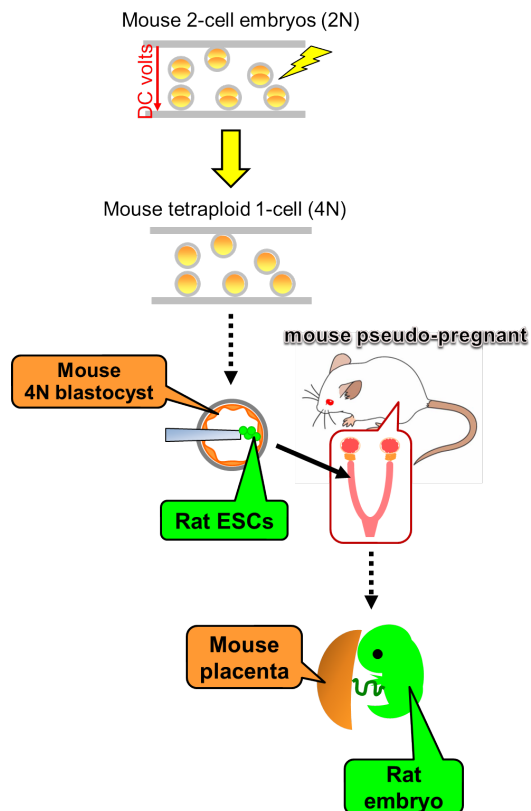


図 1 胎盤置換法による異種胚妊娠モデル

(2) 胎盤置換法による異種胚妊娠モデルは、異種胚移植より個体発生が進むことを期待して取り組んだが、異種胚の誕生までに個体発生が停止することも予想された。そこで、母体と胎児を繋ぐ胎盤に着目し、ラット型または、マウス型の遺伝子を胎盤特異的に補充することにより個体発生の進行を進めることができるかどうかを検討した。

具体的には、胎盤置換法にレンチウイルスベクターを用いた胎盤特異的遺伝子導入法を組み合わせ、実施した(図 2)。

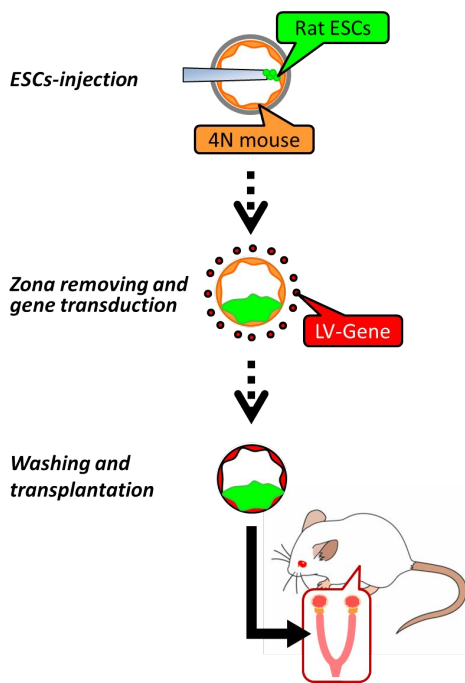


図 2 胎盤置換法と胎盤特異的遺伝子導入法を組み合わせた異種胚妊娠モデル

4. 研究成果

(1) 異種胚移植のコントロールでは、マウスの代理母の子宮内で脱落膜の形成は認められたが、胎生 7.5 日目までに胚は退行してしまっていた。一方、胎盤置換ラット胚では、胎生 10.5 日目まで胎児が生存していることが確かめられた。しかし、残念ながら、胎生 10.5 日目の時点で、既に胎児の発育遅延が認められ、胎生 12.5 日目には胎児は全て退行してしまっていた。また、それ以上の個体発生は認められなかった(図 3)。

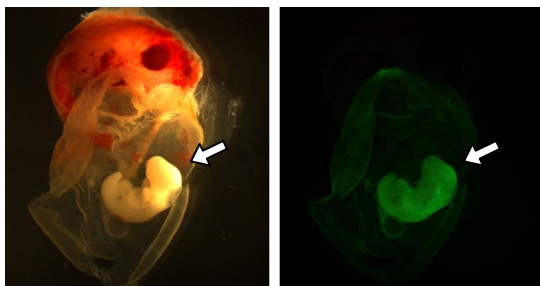


図 3 胎生 12.5 日目の胎盤置換ラット胚
左図：自然光写真。右図：GFP 蛍光写真。
マウス由来の胎盤を持つ GFP 蛍光で標識されたラット ES 細胞に由来するラット胚(矢印)は、12.5 日目までに個体発生が停止し、これ以降は認められなかった。

本研究により、異種移植のコントロールとして用いた重篤な免疫不全マウスへのラット胚の移植に比べ、胎盤を母体と同種に置換すると個体発生が進行したことから、着床前後に種特異的な母子間相互認識メカニズムの存在が示唆された。しかしながら、胎盤置換ラット胚でも胎生 10.5 日目以降は発生が停止してしまっていたことから、種特異性は、母体と胎児の相互作用が最初に起こる着床期だけでなく、胎盤と胎児の相互作用にも関わっていることが示唆された。

また、これと同時に、個体発生の進行具合を体節の数で評価したところ、胎盤置換ラット胚は、コントロールとしたテトラプロイドコンプリメンテーション・マウス ES 胚に比べ若干遅れている傾向はあったが、通常と同じ胎齢のラット胎児よりも明らかに発生が進んでいた。すなわち、胎盤置換ラット胚の発生は、代理母であるマウスの妊娠周期に同調していることが示唆された。

(2) 本研究において、胎盤置換法を用いた異種胚妊娠モデルは、胎生 10.5 日目までに発生の進行が停止することが分かった。そこで、次に胎盤と胎児の相互作用に着目し、ラットに由来する遺伝子をマウスの胎盤に補うことで、ラット胚の妊娠が維持できるかどうかを検討した。

具体的には、この時期に胎盤と胎児の相互作用に関わることが知られている胎盤の細胞膜上の既知の分子もしくは、そのリガンドになる分子に着目し、胎盤特異的遺伝子導入法を組み合わせ、胎盤置換ラット胚の発生の進行を観察した。

しかし、残念ながら、発生の進行を補うような種特異的な分子の同定には至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Isotani, A., Yamagata, K., Okabe, M., and Ikawa, M. (2016) Generation of Hprt-disrupted rat through mouse rat ES chimeras. *Sci Rep* Apr 11;6:24215. doi: 10.1038/srep24215.

[学会発表](計 3 件)

1. 磯谷綾子、小川昌起、田中嵩大、松村貴史、山縣一夫、岡部勝、伊川正人 「マウスラット ES キメラを介した遺伝子変異ラットの作出」 0-4, 『第 62 回日本実験動物学会総会』

京都、2015年5月

2. 磯谷綾子 「マウス⇄ラット異種キメラが導く応用研究の可能性」、『第9回ラットリソースリサーチ研究会』、京都、2016年1月（招待講演）

3. Isotani A, Yamagata K, Ikawa M, Okabe M 「Generation of knockout rat through mouse⇄rat chimera」、『International Symposium on “Epigenome dynamics and regulation in germ cells”』、京都、2016年2月

〔その他〕

ホームページ等

http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/ayako_isotani.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯谷 綾子 (ISOTANI Ayako)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授
研究者番号：20444523

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊川 正人 (IKAWA Masahito)
大阪大学・微生物研究所・教授
研究者番号：220304066

連携研究者

岡部 勝 (OKABE Masaru)
大阪大学・微生物病研究所・名誉教授
研究者番号：30089875