

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14533

研究課題名(和文) マウスにおける発生休止メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of mouse embryos in diapause

研究代表者

藤森 俊彦 (Fujimori, Toshihiko)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授

研究者番号：80301274

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)：多くのほ乳類の胚は、胚盤胞の段階で発生途上で一旦発生を止めることが知られており、発生休止あるいは遅延着床と呼ばれている。細胞周期を可視化するトランスジェニックマウスとKi67抗体染色により細胞周期を調べると、発生休止期間は4つの段階にわけられることが明らかになった。何れの段階でも細胞の分化形質は維持されていた。発生休止への突入と、発生休止からの脱出は胚の細胞層や胚の中の領域によって異なることがあきらかになった。以上の結果は発生休止は複数の段階が存在し、個々の細胞が休止状態に入るのは胚の中の領域によって異なることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Many mammalian species undergo diapause and suspend embryonic development at the blastocyst stage before implantation, which is also known as delayed implantation. We analyzed mouse embryos during diapause by cell cycle, identified by the expression of a transgenic cell cycle marker Fucci2 and also by Ki67 antibody staining. We found that diapause can be categorized into four stages. Cell differentiation status was maintained during these stages, and entrance into and exit from dormant status varied depending on cell layers and its location in an embryo. These results suggest that the initiation of embryonic diapause has multiple steps and the mechanisms involved in dormancy may be distinct between embryonic regions.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生休止 細胞周期 着床

### 1. 研究開始当初の背景

動物の初期発生の特定の段階で、環境の変化に応じて発生途上の胚の細胞が一斉に細胞周期を停止し、代謝が非常に低い状態になる現象が知られており、これを「発生休止」と呼ぶ。ほ乳類では、受精して胚盤胞まで進んだ胚は、季節や環境が整うまで子宮内で着床せずに発生を休止するため、遅延着床とも呼ばれる。発生休止は、外界の環境や母親の栄養状態などに応じて発生を休止・再開する一つの生存戦略であると考えられる。母親が先に産まれた仔に授乳している期間に受精したマウス胚は発生休止が誘導され、授乳が終わると発生が再開される。実験的には、受精後4日目に卵巣を除去し、プロジェステロン(P4)を投与することで、発生休止を誘導することができ、10日間以上維持できる。偽妊娠マウス子宮への移植などによって、発生が再開される。主に着床の遅延と再開に着目して研究が進められており、休止胚と、発生を再開した胚間での遺伝子発現の違いをマイクロアレイで比較した例や、子宮での遺伝子発現の変化を比較した例がある。一方で、発生休止に入る際に、どのタイミングで胚に発生休止シグナルが入るか、発生休止中の胚がどのような状態にあるかという点については解析されていない。また、発生休止につながる子宮に対するホルモンに関しては理解が進んでいるが、子宮から胚の細胞に直接働きかけるトリガーとなるシグナルの実体については解明されていない。

### 2. 研究の目的

動物種を問わず、発生休止のトリガーとなるシグナルの実態に関しては明らかになっていない。そこで、発生休止を実験的に再現良く誘導することが可能なマウスを実験対象として用い、発生休止中の胚を休止後の様々な時期に解析することからアプローチすることとした。本研究では、発生休止胚の細胞がどのような状態にあるかを詳細に解析することで、発生休止を誘導するトリガーの実体と、そのシグナルの伝達の機構を明らかにすることを目的とした。どのような機構によって、発生休止状態が作り出されるのか、胚の中の細胞はそれぞれどのように発生休止状態に対して反応するかを明らかにする。その情報を元に、発生休止トリガーとなる分子の実態の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

マウスにおいて受精後3日目に卵巣除去、継続的なプロジェステロンの投与によって発生休止を誘導した。発生休止誘導後7日間の各段階において以下の点について解析を行った。

(1)発生休止期間の長さによる胚の着床能、発生能の違いの比較

(2)発生休止誘導後の胚の細胞数の変動の解析

(3)細胞分化に重要なことが明らかになっている転写因子に対する抗体による休止胚における細胞分化状態の解析

(4)発生休止胚における細胞周期マーカーを用いた細胞周期の判定

更に、休止中の胚を3つの時期から回収し、in vitroでの発生休止からの回復時において、タイムラプス観察によって細胞周期の変遷を確認した。

### 4. 研究成果

(1)発生休止期間の長さによる胚の着床能、発生能の違いの比較

まず、発生休止誘導後にどのような時間経過をたどり、発生休止状態に突入し、その後胚としての能力が維持されるかを解明するために、発生休止誘導後の各段階から休止胚を回収し、それぞれ同じ数の胚を偽妊娠マウスへ移植し胚発生能を確認した。胚を移植してから4日後に子宮への着床数(脱落膜反応の見られた数)を数えることで、着床率を確認した。また、移植後9日後に胚を回収し、胚の形態観察により着床後胚発生が正常にすすむかの発生能の確認を行った。長い期間発生休止状態にあった胚は、移植後の着床率が低下していたが、約3割の胚が着床しており、依然着床能を維持した状態で発生を休止している胚が存在していることが示唆された。また、移植後着床し、発生が進んだ胚では、形態的にはほぼ正常であり肢芽形成がみられる段階まで発生が進んでいた。休止期間が長い胚は、休止期間が短い胚に比べて発生がやや遅れる傾向にあり、最大で1日程度の発生の遅延がみられた。以上から、着床能と発生率は低下するが少なくとも発生休止誘導後1週間は着床能、胚発生能を維持していることが明らかとなった。また、発生休止期間が長いと、着床、その後の発生の再開が遅れる可能性が示唆された。

(2)発生休止誘導後の胚の細胞数の変動の解析

発生休止に入った後に胚がどのように状態が変化するかを知ることを第一歩として、細胞数を比較した。休止誘導から1日間から7日間の段階で胚を回収し、固定後へキストによる核の染色し、コンフォーカル顕微鏡を用いて胚を撮影した。画像解析ソフトにより3次元再構築した胚の中の全細胞数をカウントした。休止誘導から3日間には、細胞数が緩やかに増加した。この細胞数の増加は着床後の胚での細胞数に比較して非常に少ないものであった。更に誘導後4日目以降では細胞数がほぼ一定で推移し変動がみられなかった。

形態を正常着床前胚と比較すると、全ての発生休止胚は着床直前の胚と同様に透明

帯からハッチしていた。また、胚は一層の細胞層の中に腔のみられる胚盤胞様の形態は維持されていた。しかし、発生休止が長くなるに従って胚盤胞としてはサイズは大きくなり、特に胚-非胚軸に沿って伸長した楕円型の形状であった。以上から、発生休止誘導後しばらくは細胞増殖がみられるが、4日目以降には細胞増殖が抑制されるか、細胞増殖と細胞死が同時に起きていることが示唆された。

(3) 細胞分化に重要なことが明らかになっている転写因子に対する抗体による休止胚における細胞分化状態の解析

次に発生休止中の胚において、着床前胚の分化状態、細胞層の分離状態が維持されているかを確認した。前項にも記したが、胚は胚盤胞様の形態を示し、ICMに相当する領域では細胞が塊を形成していた。そこで、エピプラスト、原始内胚葉、栄養外胚葉のそれぞれで発現している転写因子に対する抗体を用いて、発生休止誘導後7日間における胚を染色した。また、各細胞層における細胞数についても検討した。その結果、各細胞数で発現する転写因子は発生休止胚においても、着床前の正常胚とほぼ同様に発現しており、細胞層の形成も維持されることが明らかになった。休止期間中において、それぞれの分化マーカーで染色された細胞数を比較した。各細胞層での細胞数の変化に関しては明確な違いについては確定できなかった。

(4) 発生休止胚における細胞周期マーカーを用いた細胞周期の判定

発生休止中の胚における細胞周期を判定するために、タンパク質の分解の違いにより細胞周期を蛍光タンパク質によって可視化するR26Fucci2マウス胚を用いて、発生休止を誘導し、細胞周期の変化を確認した。これと平行して、Ki67抗体を用いてG1、G0期の判定を行った。発生休止中の胚では、発生休止誘導直後には緩やかに細胞数が増加し、緑色の蛍光を示す細胞が胚-非胚軸で偏って存在した。緑色の蛍光を示すS~M期にある細胞は胚盤胞の胚側で多く見られた。発生休止期間が長くなると、緑色の蛍光を示す細胞の数は減少した。発生休止誘導後4日目になると、緑色の蛍光を示す細胞はICM領域に局限した。更に発生休止期間が6日目を過ぎると、緑色を示す細胞はほぼ観察できなくなった。Ki67抗体を用いて染色した結果においても同様の傾向であった。正常着床前胚では、ほとんどの細胞がKi67陽性であった。一方で発生休止後には、Ki67細胞は非胚側から数が増え、ICM領域に局限がみられた後、胚全体がKi67陰性となった。つまり発生休止期間が長い胚においては、ほとんど細胞がKi67陰性となることから、G0期にあることが示唆され

た。

Fucci2 トランスジェニック発生休止胚をinvitroに移し培養すると、細胞周期が再開した。タイムラプス観察によって、赤色の蛍光を示していた細胞が培養期間中に緑色の蛍光へとスイッチし、更にその後細胞分裂する像が観察されたため、培養によって細胞周期が再開されたと考えられる。休止期間が短い胚では、胚盤胞の胚側から直ちに細胞周期が再開し24時間程度で非胚領域まで到達した。一方、長期間休止した胚では24時間後ようやく胚側の一部の細胞において細胞周期が再開し、その後更に時間をかけて胚全体に緑色の蛍光を示す細胞数が増えた。これらの結果から、マウスの発生休止は休止期間によって性質が異なる事、非胚側から休止に入り、胚側から発生を再開することが示唆された。つまり、胚の中の領域によって発生休止に入るタイミング、発生休止から回復するタイミングが異なることを示唆している。

以上の結果から、発生休止が胚の中での各領域の細胞の状態から4つの段階に分けられることが示された。休止誘導された後、非胚側にSまたはM期の細胞が存在し、細胞数の増加がみられる(ステージ1)。細胞数は緩やかに増加し、胚側でもICMでのみSまたはM期がみられる(ステージ2)。細胞数の増加はみられないが、ICM領域で一部の細胞において細胞周期はS期またはM期にある(ステージ3)。胚の全ての細胞において、SまたはM期にはなく、細胞数の増加もみられない(ステージ4)。

発生休止が誘導された後に細胞周期が停止する反応が、胚の領域によって異なることから、発生休止シグナルが胚に到達するメカニズムについて考察することが可能である。以下の2種類の仮説が予想される。胚の領域によらず同一の休止シグナルが受容されている場合には、胚の領域、細胞層によって休止シグナルが到達するまでの時間が異なる、あるいは受容して反応が出る閾値が異なる可能性が考えられる。別の可能性としては、休止シグナルがリレーされるモデルが可能である。ICMと反対側の栄養外胚葉において一旦休止シグナルが受容され、休止シグナルを受容した細胞から放出される第2のシグナルが他の細胞によって受容される可能性である。本研究においては、発生休止を誘導するトリガーとなる分子の同定にまでは至らなかった。今後これらの可能性について遺伝子発現の違いを比較するなどして更に解析を進めることによって、発生休止において直接細胞内で伝達されるシグナルの検索が可能であると期待される。

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)

Toyooka, Y., Oka, S., and Fujimori, T. Early preimplantation cells expressing Cdx2 exhibit plasticity of specification to TE and ICM lineages through positional changes. *Dev Biol.* 2016; 411(1):50-60. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.01.011. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

Toshihiko Fujimori, Regulation of cell differentiation during early mammalian embryogenesis. KEY Forum 2018 Stem Cell Traits and Developmental Systems, Jan.11-12, 2018, (Kumamoto) (invited)

藤森 俊彦, マウス初期胚における細胞分化、第12回認識と形成研究会、Sep.23-24, 2017, (Kumamoto)

Toshihiko Fujimori, Specification and plasticity of cells during early mouse development. RCMS mini-symposium "Cell Fate in Development", Sep.21, 2017, (Kumamoto) (invited)

Toshihiko Fujimori, How do cells differentiate during preimplantation mouse development? マウス着床前発生において細胞はどのように分化するか?、第55回日本生物物理学会年会、Sep.19-21, 2017, (Kumamoto) (invited)

Chizuru Kamemizu and Toshihiko Fujimori, Analysis of the mouse embryos in diapause. The 50th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, May 10-13, 2017, (Tokyo) (poster)

藤森 俊彦, マウス初期発生でどのように細胞運命は制御されるのか、日本動物学会沖縄大会 国内シンポジウム、Nov.17-18, 2016, (Okinawa) (invited)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.nibb.ac.jp/embryo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤森 俊彦 (FUJIMORI, Toshihiko)  
基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授  
研究者番号：80301274

(2) 研究分担者

無し ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

亀水 千鶴 (KAMEMIZU Chizuru)