

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06373

研究課題名(和文)ウシ体外受精胚の発育不全・組織分化異常に関わる因子の解明とその発現制御

研究課題名(英文)Regulation factors of differentiation and growth in bovine in vitro fertilization embryos.

研究代表者

澤井 健 (Sawai, Ken)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：90390864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウシIVF胚の発育不全の原因遺伝子は明らかにされていない。本研究では、体外発生(IVC)培地の血清成分およびDKK1がウシIVF胚の発育不全・組織分化異常に関わる因子発現におよぼす影響と成長因子などの添加がウシIVF胚の伸長期発育および組織分化におよぼす影響を検討した。血清無添加の条件下でIVC培地にDKK1(100 ng/ml)を添加することにより、IVF胚のIGFBP-3およびOCT-4発現が正常化することが明らかとなった。また、IVF胚における伸長期での発育不全は、DKK1(100 ng/ml)およびCSF2(100 ng/ml)の添加によって改善されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年世界的に盛んに実施されているウシIVF胚を利用した子牛生産において、受胎率を向上し得るIVC培地の開発や生産されたIVF胚の選抜などIVF技術を用いたウシ産子の生産率の向上に資するものである。

研究成果の概要(英文)：The low conception rate of bovine in vitro fertilization (IVF) embryos compared to in vivo embryos is a problem. If the expression of factors involved in embryonic failure and abnormal differentiation and growth of IVF embryos can be regulated by the addition of DKK1 and other factors, it will lead to overcoming these abnormalities in bovine IVF embryos. We investigated the effects of serum and DKK1 on the expression of factors associated with abnormal differentiation and growth in bovine IVF embryos and the effects of addition of growth factors on elongation stage development of bovine IVF embryos. The results showed that the addition of DKK1 (100 ng/ml) to IVC medium without serum normalized the expression of IGFBP-3 and OCT-4 in IVF embryos. In addition, the results revealed that the IVF embryos were abnormal growth in the elongation phase compared to Vivo embryos. However, these defects were not normalized by the addition of DKK1 (100 ng/ml) and CSF2 (100 ng/ml) to the IVC medium.

研究分野：発生工学, 家畜繁殖学

キーワード：ウシ IVF胚 胚発育・組織分化 遺伝子発現 伸長期胚

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウシの体外受精(IVF)胚は、胚移植後の受胎率が体内受精・体内発生(Vivo)胚と比較して低いことが問題となっている(*J. Anim. Sci.* 2019 など)。ウシ胚は、胚盤胞期以降、子宮内での栄養膜細胞(TE)の急激な増殖による伸長を経て着床に至るが、ウシ IVF 胚には、胚の伸長が起こらない、または不十分な伸長を特徴とする胚発育不全と、胎子組織へと分化する胚盤(ED)の形成不全(組織分化異常)が認められ、受胎率低下の要因となっている(*Domest. Anim. Endocrinol.* 2015)。IVF 胚の発育不全と組織分化異常は、細胞増殖や組織分化に関わる遺伝子の発現に異常が生じることが原因とされているが(*Nature Genet.* 2001 など)、ウシ IVF 胚の発育不全と組織分化異常を引き起す具体的な遺伝子(因子)は明らかにされておらず、その解明が求められている。

本研究者は、ウシ胚の発生と組織分化に OCT-4、CDX2、FGF4 および ZSCAN4 が必須の因子であることを明らかにするとともに(*J. Reprod. Dev.* 2019 など)、これら因子の発現量が低い IVF 胚の存在を確認している。これらのことから、上記因子群がウシ IVF 胚の発育不全と組織分化異常に関与している可能性が高い。しかし、ウシ IVF 胚の胚盤胞期から伸長期にかけての上記因子群の発現動態やそれら因子発現が IVF 胚の伸長期への発育と組織分化におよぼす影響は明らかではなく、その解明が必要である。また、ウシ IVF 胚の遺伝子発現異常は、体外発生(IVC)培地に添加される血清成分により誘起されることが示唆されている(*Biol. Reprod.* 2006 など)。IVC 培地への成長因子添加は、IVF 胚の胚盤胞期への発生率向上を目的に検討されてきたが、胚発育や組織分化に関わる遺伝子の発現制御因子という新たな観点から成長因子の機能を明らかにする必要がある。DKK1 などの添加によって IVF 胚の胚発育不全・組織分化異常に関わる因子の発現が制御(正常化)できれば、ウシ IVF 胚におけるそれら異常の克服につながる。

2. 研究の目的

本研究は、ウシ IVF 胚の胚盤胞期から伸長期にかけて起こる胚発育不全および組織分化異常の発生機序の解明とその克服を目的とし、下記の2つの課題に取り組む。

- (1) IVC 培地の血清成分および DKK1 がウシ IVF 胚の発育不全・組織分化異常に関わる因子発現におよぼす影響の解明
- (2) 成長因子などの添加がウシ IVF 胚の伸長期発育および組織分化におよぼす影響の解明

3. 研究の方法

解析対象は、IGFBP-2、IGFBP-3、OCT-4、CDX2 とした。IVC 培地は新生子牛血清(CS, 3%)添加または無添加(BSA 添加)の mTALP 培地とし、それら培地への DKK1 添加が胚盤胞期までの発生および遺伝子発現動態におよぼす影響について検討した。胚盤胞期胚での上記因子群の遺伝子発現量を定量的 PCR 法によって mRNA 発現量を測定し、IVF 胚と Vivo 胚の遺伝子発現量の比較を行った。次に、血清無添加の IVC 培地に DKK1(100 ng/ml)および CSF2(100 ng/ml)を添加して作出した IVF 胚をレシピエント雌牛に移植した。伸長期(胚盤胞期胚を1頭につき10~20胚移植後、IVF/人工授精後15日目に子宮灌流により回収)の IVF 胚および Vivo 胚の発育・組織分化の状態(胚の形状[球形・楕円形・繊維状]、胚の長短径、ED 形成の有無)の比較解析を行った。これら一

連の解析によりウシ IVF 胚の伸長期発育不全・組織分化異常に関わる因子の特定とその人為的制御を試みた。

4. 研究成果

(1) IVC 培地の血清成分および DKK1 がウシ IVF 胚の発育不全・組織分化異常に関わる因子発現におよぼす影響の解明

DKK1 添加の有無および添加濃度にかかわらず、Day6 において胚盤胞期以上に発生した胚の割合は BSA 添加区と比較して CS 添加区において有意($P < 0.05$)に高い値を示した。しかし、Day7 において胚盤胞期以上に発生した胚の割合は、血清成分の違い、DKK1 添加の有無およびその添加濃度にかかわらず、すべての処理区において差は認められなかった。*IGFBP-3* 発現量は、DKK1 添加の有無および添加濃度にかかわらず CS 添加培地由来の IVF 胚において Vivo 胚と比較して有意($P < 0.05$)に低い値を示した。BSA 添加培地においても DKK1 無添加の場合、*IGFBP-3* 発現量は Vivo 胚と比較して低い値($P < 0.05$)を示したが、100 ng/ml の DKK1 を添加すると、その発現量は Vivo 胚と差のないレベルにまで増加した(Fig. 1)。同様の傾向は、*OCT-4* 発現量にも認められ、CS 添加培地では DKK1 添加による発現量の変化は認められなかったが、BSA 添加培地においては、100 ng/ml の DKK1 添加によって、IVF 胚の *OCT-4* 発現量が Vivo と差がないレベルにまで増加した(Fig. 1)。*CDX2* および *FGF-4* 発現量は、すべての処理区において Vivo 胚と比較して有意($P < 0.05$)に低く、DKK1 添加による発現量の変化は認められなかった。

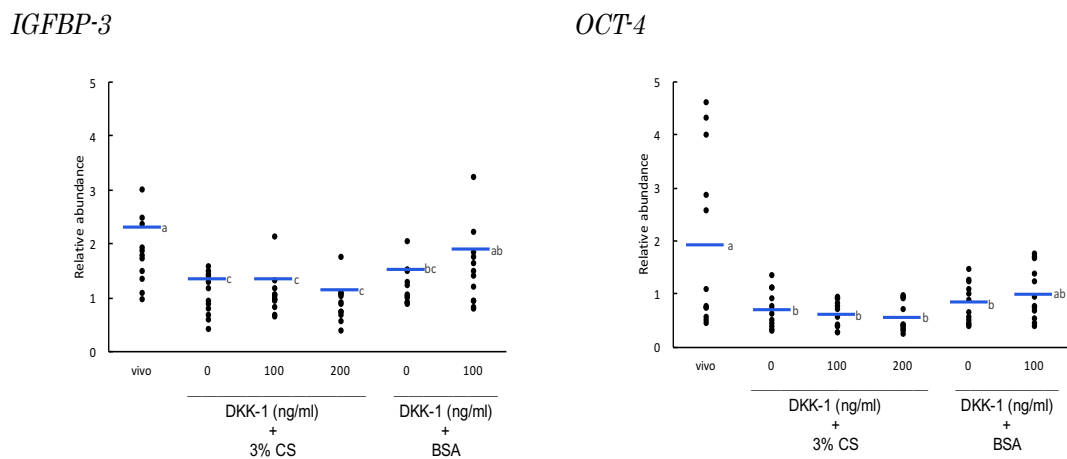


Fig 1. Relative abundance of *IGFBP-3* and *OCT-4* transcripts in bovine blastocyst stage embryos.

Black point: individual values, Blue bar: average.

a,b,c Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

(2) DKK1 添加がウシ IVF 胚の伸長期発育および組織分化におよぼす影響の解明

Vivo 胚、DKK 1 と CSF2 無添加培地由来 IVF 胚および DKK1 および CSF2 添加培地由来 IVF 胚の伸長期での形態を Fig. 2 に示した。

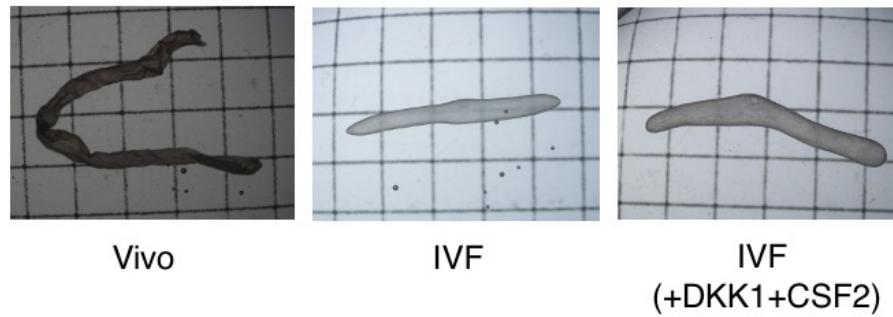


Fig 2. Representative photographs of bovine elongated stage embryos obtained from Vivo or IVF procedures.

伸長期胚の長径において、DKK1 および CSF2 の添加の有無にかかわらず、IVF 胚 (6.0 ± 1.6 mm, 8.2 ± 1.0 mm) は Vivo 胚 (16.6 ± 3.9 mm) と比較して有意 ($P < 0.05$) に短く、IVF 胚間で差は認められなかった。短径においては異なる区間に差は認められなかった。IVF 胚における伸長期胚の回収率は 53-60% であった。本研究から、IVF 胚の伸長期での発育不全が明らかとなった一方で、体外発生培地への DKK1 と CSF2 の添加は伸長期への発育に影響しないことが示された。

本研究から、ウシ IVF 胚の伸長期発育不全に関与する遺伝子が複数明らかとなった。さらに、それら遺伝子群においては、IVC 培地への DKK1 などの添加により人為的に正常化できる可能性が示された。これらの成果は、近年世界的に盛んに実施されているウシ IVF 胚を利用した子牛生産において、受胎率を向上し得る IVC 培地の開発や生産された IVF 胚の選抜など IVF 技術を用いたウシ産子の生産率の向上に資するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井貴志, 内藤 学, 澤井 健
2. 発表標題 ウシ体内生産胚および体外受精胚における遺伝子発現の比較解析.
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤井 健
2. 発表標題 家畜胚の初期発生における組織分化制御因子の役割に関する研究
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井天優, 藤井貴志, 長谷川昇司, 平田統一, 澤井 健
2. 発表標題 体外発生培地へのDKK1添加がウシ体外受精胚の遺伝子発現プロファイルにおよぼす影響
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------