

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05903

研究課題名(和文) 胚の着床能力獲得機構の解析と移植に最適な胚を選抜する評価法の樹立

研究課題名(英文) Molecular mechanism of blastocyst implantation and estimation of implantation potential in embryos derived from in vitro fertilization

研究代表者

松本 浩道 (Matsumoto, Hiromichi)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：70241552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：体外受精胚の移植では受胎率および産子率が低い。これまでの多くの研究にもかかわらず改善されていない。このことは新規のアプローチが必要であることを示している。これまで着床と妊娠の成立に関する研究に取組み、マウス胚の着床能力獲得過程に関するタンパク質の発現や分解の制御機構について新知見を報告してきた。また、それらの分子機構を指標として、胚盤胞における遺伝子とタンパク質の発現を培養系で賦活化し、母体由来のシグナルに対する応答能力を高めた状態にして子宮へ胚移植するというアプローチで、マウス体外受精由来胚盤胞の着床能力を改善する手法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外受精胚の移植では受胎率および産子率が低い。ウシ体外受精由来胚盤胞の受胎率は約40%、産子率は約20%と低い。ウシの体外受精と着床前の体外発生培養法は確立されており、体細胞クローンウシも多数作出されている今日ではあるが、何故産子生産率は低いのか？これまでの多くの研究にもかかわらず改善されていない。本研究では、胚の着床能力獲得過程に関する分子機構の解析を行なった。また、それらの分子機構を指標として、胚盤胞における遺伝子とタンパク質の発現を培養系で賦活化して子宮へ胚移植することで着床能力を改善する手法を構築した。体外受精胚の移植における低い受胎率および産子率の問題の解明と対処法の樹立に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The transfer of embryos derived from in vitro fertilization (IVF) results in low conception and fertility rates. Despite many previous studies, there has been little improvement in this regard. This highlights the need for a novel approach. We have been studying implantation and the establishment of pregnancy and have reported new findings on the regulatory mechanisms of protein expression and degradation during the acquisition of implantation ability in mouse embryos. Using these molecular mechanisms as a guide, we developed an approach to improve the implantation ability of mouse IVF-derived blastocysts by activating gene and protein expression in the blastocyst in a culture system and transferring the embryo to the uterus with an enhanced ability to respond to maternal signals.

研究分野：動物生殖科学

キーワード：繁殖 生殖 着床 受胎 妊娠 胚培養 体外受精 胚盤胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の特徴である妊娠は、胚が子宮腔上皮に着床することで開始される。そのため、体外受精など培養系で操作した胚を産子にするために、レシピエント(受胎雌、仮親)への胚移植を行う。しかしながら、胚移植後に得られる産子率は低く、受胎率の改善は必須である。

ウシの体外受精と胚移植は、優良形質個体の効率的な増産法として実用化されている。しかし、受胎率は約40%(受胎数/移植数)、産子生産率は約23%(産子数/移植数)である。この値は移植数が分母であるので、子宮への胚移植するステージである胚盤胞への発生率を約50%と考えても、実際の受胎率は約20%、産子生産率は約12%と非常に低率である。ウシの受精卵移植は35年以上経過しているが、いまだ低率のままで改善できていないのが現状である。すなわち、体外作出胚における低受胎率の原因究明と対応技術の開発は、優良家畜の安定増産において、重要かつ必要不可欠な課題である。

胚発生や着床の分子機構に関する研究は、これまでも国内外で多くの研究が行われてきた。家畜においては、反芻動物特有の受胎に関わる分子機構の解明が進んでおり、この分野では我が国の成果はトップレベルである。母体側の生理機構などから受胎率改善への試みもなされている。しかしながら、ウシの受精卵移植における受胎率は一向に改善されていない。このことは、分子機構などの基礎研究の更なる推進に加え、それらの知見を基に、標的とする分子機構を賦活させる体外培養系を作出し、受胎率を改善するアプローチの必要性を示唆している。

2. 研究の目的

先行研究として、着床と妊娠の成立に関する研究に取り組み、マウス胚の着床能力獲得過程に関してタンパク質の発現や分解の制御機構について新たな知見を報告してきた。また、それらの分子機構を指標として、胚盤胞における遺伝子とタンパク質の発現を培養系で賦活化し、母体由来のシグナルに対する応答能力を高めた状態にして子宮へ胚移植するというアプローチで、マウス体外受精由来胚盤胞の着床能力を改善する手法を構築した。本研究では、胚盤胞の着床能力に関する研究をより進展させ、体外受精由来胚盤胞の胚移植における受胎率と産子率の改善を目的とした。一方これまでのアプローチでは、培養後に固定した胚のタンパク質発現動態を解析し、タンパク質発現動態が良好な培養系で処理した胚を移植する、という間接的なものであった。そこで本研究では、生存性を維持して選抜した良好胚を移植する直接的な胚質評価法の樹立についても試みた。

3. 研究の方法

これまでにアミノ酸の組合せがマウス胚の着床率を正と負に制御することを報告している。すなわち、アルギニン(Arg)とロイシン(Leu)の複合処理は着床率を上昇させる。一方で、Arg単独は着床率を低下させるが、Leu単独では着床率に影響しない。そこでインテグリンなどの着床能力関連因子にどのような作用機序があるかを解析した。また胚をライブで直接評価する手法の作出も試みた。細胞内NOとO₂消費の同時解析を検討した。共焦点レーザー顕微鏡で測定および産生細胞の局在を解析した。さらに妊娠関連因子である遺伝子ノックアウトマウスの解析を行った。

4. 研究成果

マウス胚用の培養液にArgまたはLeuを添加し、胚盤胞を培養後に着床関連因子であるインテグリン $\alpha 5\beta 1$ (ITGA5B1)の発現を解析した。ITGA5B1発現は、Argでは変化せず、Arg+Leuで上昇した。以上のことから、Arg+LeuではROSの上昇に伴い、ITGA5B1の発現が上昇することで着床率が改善された可能性が示唆された。

Argは一酸化窒素(NO)の材料となるのでNO産生量を解析した結果、Argにより増加した一方で、Arg+Leuでは変化がなかった。O₂消費量はArgおよびArg+Leuにより低下した。NO産生量とO₂消費量は、無処理では正の相関があったのに対し、ArgおよびArg+Leuでは相関がなかった。以上のことから、ArgおよびArg+Leuで生じるO₂消費の低下は、NOとは別の経路で制御されていることが示唆された。

活性酸素種(ROS)はArgで上昇し、Arg+Leuによりさらに上昇した。着床関連因子であるイ

インテグリン $\alpha 5\beta 1$ (ITGA5B1) 発現は、Arg では変化せず、Arg+Leu で上昇した。Arg+Leu による ROS レベルの上昇は、ROS レベルを低減させるグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx) 低下に起因していた。以上のことから、Arg+Leu では ROS の上昇に伴い、ITGA5B1 の発現が上昇することで着床率が改善された可能性が示唆された。

妊娠関連因子である Tinagl1 ノックアウトマウスの解析を行った。その結果、Tinagl1 が欠損することで加齢に伴うコラーゲン蓄積の進行が抑制され、健常卵胞数を変化させることで、排卵能力の低下を緩和させることが明らかになった。また Tinagl1 は、筋肉においても作用することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Seki Misato, Takeuchi Eisaku, Fukui Emiko, Matsumoto Hiromichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Upregulation of iNOS and phosphorylated eNOS in the implantation induced blastocysts of mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12545 ~ e12545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoriko, Kawashima Keisuke, Fukui Emiko, Matsumoto Hiromichi, Yoshizawa Fumiaki, Sato Yusuke	4. 巻 1869
2. 論文標題 Functional analysis reveals that Tinag11 is required for normal muscle development in mice through the activation of ERK signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119294 ~ 119294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2022.119294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本浩道
2. 発表標題 マウス着床遅延モデルから胚盤胞の着床能力改善へ。シンポジウム「着床機構研究の最前線～着床不全克服への基礎研究～」
3. 学会等名 第41回日本受精着床学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大郷すみれ, 永井友香理, 岡本優, 松本浩道, 福井えみ子.
2. 発表標題 黒毛和種雌牛集団における受胎に関わる遺伝子多型と産歴の関連性
3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第24回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里百花, 松本浩道.
2. 発表標題 マウス体外受精由来胚盤胞においてアミノ酸がROS消去機構に及ぼす影響
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大郷すみれ, 佐藤元映, 岡本優, 永井友香理, 氏家優子, 阿久津充, 松本浩道, 福井えみ子.
2. 発表標題 黒毛和種去勢肥育牛におけるビタミンA制限飼料と産肉能力に関わる遺伝子多型およびルーメン内微生物の関連性
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅野悠香, 中里百花, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 ウシ血清アルブミンがマウス胚盤胞の活性酸素種産生およびインテグリン 5 1発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第116回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里 百花, 浅野悠香, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 マウス体外受精由来胚盤胞においてアミノ酸がGPx1 およびGPx4 発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里百花, 岡井大樹, 松崎夢々果, 福井えみ子, 松本浩道
2. 発表標題 アルギニンおよびロイシンで処理した個々のマウス胚盤胞におけるROS産生およびITGA5B1発現動態
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第115回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本苑子, 福井えみ子, 松本浩道
2. 発表標題 Tinagl1遺伝子欠損マウスにおける卵巣内卵胞数の解析
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第115回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本苑子, 福井えみ子, 松本浩道
2. 発表標題 Tinagl1遺伝子欠損マウスにおいて加齢が卵巣の健常卵胞数およびリポフスチン蓄積に与える影響
3. 学会等名 第77回関東畜産学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎夢々果, 竹内栄作, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 マウス体外受精由来胚盤胞においてアミノ酸がNO産生およびO ₂ 消費に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 体外における哺乳動物胚を選別する方法	発明者 松本浩道	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-31088	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 体外における哺乳動物胚を選別する方法	発明者 松本浩道	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-88499	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	福井 えみ子 (Fukui Emiko) (20208341)	宇都宮大学・農学部・教授 (12201)	

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
---------	---------