

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660209

研究課題名(和文) マウス及びウシ胚盤胞の休眠を誘導・長期間維持する体外培養法の開発

研究課題名(英文) Induction and long-term maintenance of embryonic diapause of mouse and bovine blastocysts under in vitro culture conditions

研究代表者

山田 雅保 (Yamada, Masayasu)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10243073

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)： マウス胚盤胞(受精後4日目(4 dpf))を脱イオン化BSA(dBSA)添加KSOM培地で培養すると、9 dpfにはその内部細胞塊(ICM)細胞数が著しく減少すると共に、受胎能が全く失われた。しかし、スレオニン添加によって、9 dpfにおいても胚盤胞のICM数及び受胎能も維持されることが分かった。体外受精後8日目のウシ胚盤胞は、マウス胚盤胞とは異なり、ウシ胎児血清、2メルカプトエタノール、メチオニンそしてROCK阻害剤(Y-27632)を培地に添加することによって、2週間拡張胚盤胞として維持できることが明らかとなった。しかし、そのように維持された胚の受胎能については不明である。

研究成果の概要(英文)： We found the following results; (1) although when ICR mouse blastocysts (4 days post fertilization, 4 dpf) were cultured in KSOM medium with deionized BSA (dBSA medium), they developed to expanded blastocysts and retained their morphological features for 10 days, the inner cell mass (ICM) cell numbers and birth rates after embryo transfer (ET) of the blastocysts on 9 dpf (9 dpf blastocysts) significantly decreased. (2) when 4 dpf blastocysts were cultured in dBSA medium with threonine, ICM cell numbers and birth rates after ET of the 9 dpf blastocysts were greatly improved. (3) when bovine blastocysts on 8 days post in vitro fertilization (8 dpf) were cultured in KSOM medium with FBS, 2 mercaptoethanol, methionine and ROCK inhibitor (Y-27632), they developed to expanded blastocysts and their morphological features were retained for 14 days. However, it still remains unknown whether such bovine blastocysts in extended period of culture have an ability to develop to term after ET.

研究分野：生殖生物学

キーワード：休眠 胚盤胞 スレオニン 体外培養 マウス ウシ

## 1. 研究開始当初の背景

体外培養において、マウス胚盤胞を着床可能な状態で長期間維持することを目的とした多くの研究がこれまで行われてきている。しかし、マウス胚盤胞が長期間生存できる体外培養法の報告はあるが、胚移植による胚の着床および産仔への発育を調べた研究は皆無に近い。トリプシン阻害剤である Nitrophenol-p-guanidino benzoate および Soybean trypsin inhibitor を添加した血清含有培地で培養した胚盤胞は長期間生存できるにもかかわらず、5.5 dpf までの胚からは産仔が得られるものの、それ以降の胚からは産仔を得ることができないことが唯一報告されているだけである。このように、体外培養でのマウス胚盤胞の休眠誘導及びその長期間維持法はこれまで全く確立されていない状況にある。

一方、これまで胚盤胞の休眠を起こさないと考えられていたヒツジ胚盤胞を卵巣除去偽妊娠マウスの子宮内に移植すると、マウス胚盤胞と同様に休眠が誘導され、その子宮から回収した休眠胚をヒツジ代理母の子宮に移植すると高率に産仔へ発生することが最近報告され、ウシ胚盤胞も同様に休眠が誘導されることから、胚盤胞の休眠を起こす能力は、多くの動物種で潜在的に保存された現象であることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、胚盤胞の休眠の誘導維持機構の解明を目指して、マウス及びウシ胚盤胞の休眠を誘導および長期間維持できる体外培養法を確立することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ICR 系雌マウスから採取した 2 細胞期胚を 0.3% dBSA を添加した EDTA 不含 KSOM 培地 (mKSOM) で 3 日間培養することによって着床前胚盤胞を得た。その胚盤胞を低吸着性 U 底プレートのウエルを用いて、dBSA、スレオニン、グリシン、ピルビン酸あるいは Acetyl-CoA 合成酵素 (ACLY) 阻害剤 (BMS303141) を添加した mKSOM 培地で培養し、マウス胚盤胞の形態と生存性の維持、細胞数あるいは胚移植後の産仔への発生能を調べた。胚盤胞の形態は、顕微鏡下で観察した後その面積を ImageJ で測定した。

(2) それぞれの培養条件で培養した胚盤胞の ICM 数、栄養外胚葉細胞 (TE) 数を、ICM に特異的に発現する Oct4 に対する抗体を用

いた免疫蛍光染色及びヘキスト染色で胚を染色することによって計測した。ヘキスト陽性細胞数 (全細胞数) から Oct4 陽性細胞数 (ICM 細胞数) を引いた値を TE 細胞数とした。

(3) 胚盤胞の受胎能を検討するために、種々の培養条件で培養した胚盤胞を偽妊娠交配後 2.5 日目の雌マウスの子宮内に移植した。

(4) 胚盤胞における 4 番目のリジンがトリメチル化したヒストン H3 (H3K4me3) および 9 番目のリジンがアセチル化したヒストン H3 (AcetylH3K9) の発現と局在をそれぞれの抗体を用いた免疫蛍光染色によって調べた。それぞれの発現量は、ImageJ で求めた相対的蛍光強度で表した。

(5) 胚盤胞における ATP citrate lyase (ACLY) 及び Acetyl-CoA synthetase (ACSS2) 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR によって測定した。内部標準として アクチン遺伝子を用いた。

(6) 食肉処理場由来のウシ卵巣から卵母細胞を回収し、体外成熟および体外受精後 8 日目 (8 dpf) に発生した胚盤胞を上記のマウス胚盤胞の培養と同様に低吸着性 96 ウエルを用いて、mKSOM 培地に種々の濃度の FBS、2 ME、スレオニン、メチオニン、あるいは Y-27632 を添加した培地で 14 日間培養し、胚の形態を観察し、さらに、胞胚腔の拡張の程度をその面積で表した。

## 4. 研究成果

マウス胚盤胞の形態および生存性に及ぼす dBSA の効果について検討した。4 dpf の胚盤胞を種々の濃度の dBSA を添加した培地で 14 日間培養した。無添加培地では、胚盤胞の胞胚腔が急速に萎縮し、培養 3 日目には胚は変性した。しかし、0.1%以上の濃度において、胚盤胞は拡張胚盤胞として 14 日間生存維持された。次に 0.6% dBSA 添加培地で 14 日間培養した胚盤胞の細胞数を計測した。胞胚腔は非常に拡張した状態で維持され、総細胞数及び TE 細胞数は培養開始時 (4 dpf) と変わらず、そして ICM 数は、4 dpf と比べて 7 dpf では変わらないが、9 dpf で有意に減少した (4 dpf: 14.5 vs 7 dpf: 17.0, 9 dpf: 8.6, 18 dpf: 1.8)。このような胚盤胞の産仔への発生能を胚移植によって調べたところ、培養開始時 (4 dpf) の胚盤胞の産仔への発生率は 28.5%であるのに対して、7 dpf の胚盤胞の産仔への発生率は急減し 12.0%と低率であり、8 dpf 以降の胚には産仔への発生能は全く認められなかった。これまでに報告された

胚盤胞の培養において、6 dpf で既にその産仔への発生能(受胎能)が失われることから、dBSA 添加培地では、わずかではあるが受胎能が保持されることがわかった。しかし、胚盤胞の産仔への発生能を高く維持する培養法を開発するためには、ICM 数の減少を阻止することが必要と思われた。

最近、ICM に由来するマウス ES 細胞の自己増殖に必須の因子としてスレオニンが同定された。ES 細胞においてスレオニンは、ミトコンドリア内に局在する TDH を介してグリシンと Acetyl-CoA に代謝され、グリシンはさらにメチオニン回路で S-アデノシルメチオニンへと代謝される。それはメチル基供与体として働き、特に ES 細胞においては、ヒストン H3K4 のトリメチル化を促進することによってその多能性を担保するエピゲノムの状態を維持していることが報告されている(図 1(a))。マウス胚盤胞においても、TDH は ICM 特異的に局在し、ES 細胞と同様のメカニズムによってその発生を制御していると考えられている。そこで、産仔への発生能を維持した状態で胚盤胞を培養できる条件の確立を目指して、培地へのスレオニン添加の効果について検討した。

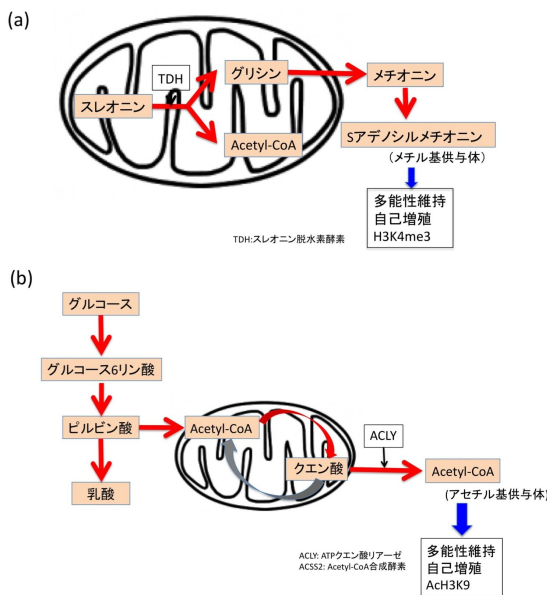


図1. マウスES細胞の多能性及び自己増殖を制御する代謝 (a) ミトコンドリア内のスレオニンは、TDH によってグリシン及び Acetyl-CoA へ代謝される。グリシンの S アデノシルメチオニンへの代謝によって H3K4me3 の発現が促進される。(b) ミトコンドリア内の Acetyl-CoA がクエン酸を介して ACLY によってサイトゾル内の Acetyl-CoA へ代謝される。それによって、Acetyl H3K9 の発現が促進される。

スレオニン (10 mM) を添加した dBSA 培地で 4 dpf の胚盤胞を 9 dpf まで培養した。ICM 数は 4 dpf 胚に比べて 9 dpf まで減少することなく維持されることが分かった (4 dpf: 14.5 vs 7 dpf: 20.5, 9 dpf: 16.0)。TE 細胞数および全細胞数もほとんど変化はなかった。そこで、4 dpf、7 dpf そして 9 dpf のスレオニン処理胚盤胞を偽妊娠マウスの子宮内に移植し、それぞれの胚の産仔への発生能を比較した。4 dpf 胚の産仔率 28.5% に対して、7 dpf 胚盤胞の産仔への発生率は 43.0% と非常に高い値を示した。また、9 dpf 胚の産仔への発生率は有意に減少した (6.4%) が 9 dpf の胚からも産仔が得られることが分かった。この結果から、マウス胚盤胞を 9dpf までの 5 日間スレオニン添加培地で培養することによって、産仔への発生能を維持した状態、つまり休眠状態で維持できること、そして 7 dpf の胚盤胞は、4 dpf の胚と比べて非常に高い産仔への発生能を有していることも明らかとなった (マウス胚盤胞の休眠培養法を初めて開発した)。

次に、このようなスレオニンの効果がどのようにして発揮されるのかについて検討した。まず、スレオニンの TDH による代謝産物であるグリシンと Acetyl-CoA の効果について、グリシンとピルビン酸 (Acetyl-CoA への代謝基質) の共添加によって、スレオニン添加と同様に 9 dpf での胚盤胞の ICM 数が維持されるのかを検討した。その結果、1 mM グリシンと 2 mM ピルビン酸をスレオニンの代わりに添加すると、9 dpf 胚盤胞の ICM 数 (13.5) は、4 dpf (14.5) と変わらず維持できることが明らかとなった。また、スレオニンの代わりにそのバリエーションで、TDH によってグリシンと propionyl-CoA に代謝される 3-ヒドロキシノルバリン (3HN) を添加すると、培養 3 日目には胞胚腔の萎縮が観察され、さらに、3HN と共にスレオニンを加えると、胚盤胞の形態は完全に回復することが観察された。これらの結果から、スレオニンの効果は、TDH による代謝によって発揮されることが示唆された。

ES 細胞では、グリシンの代謝によって H3K4 のトリメチル化 (H3K4me3) が促進されることから、9dpf の胚盤胞における H3K4me3 の発現レベルを免疫蛍光染色による蛍光強度から測定した (図 2)。その結果、スレオニン添加によって胚盤胞の ICM における H3K4me3 の発現レベルが、無添加区に比べて有意に高くなることが分かった。

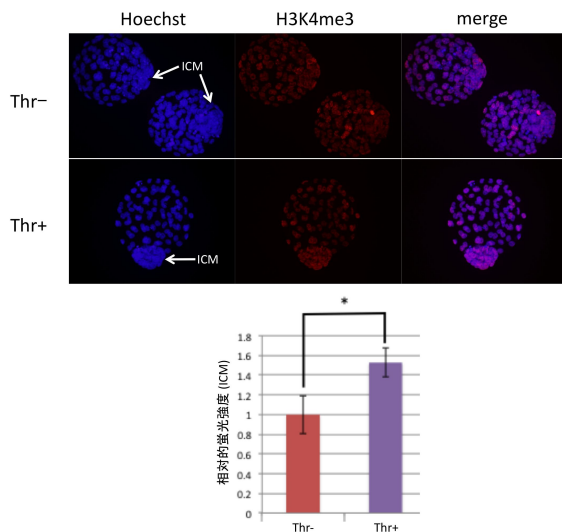


図2. 培養5日目の胚盤胞(9 dpf)におけるH3K4me3の発現に及ぼすスレオニンの効果  
Thr-: スレオニン無添加、Thr+: スレオニン添加 (\* $P<0.05$ )

一方、スレオニンの効果の一翼を担う Acetyl-CoA の作用メカニズムについて検討した。最近、ES細胞では、ATP生産をミトコンドリアでの酸化的リン酸化よりも解糖系に依存して行っており、ミトコンドリア内の Acetyl-CoA は主にクエン酸を介して ATP クエン酸リアーゼ (ACLY) によってサイトゾル Acetyl-CoA へと代謝されることが報告された(図1(b))。そこで、スレオニンの効果が、サイトゾル Acetyl-CoA への代謝によって発揮されるのかを明らかにするために、その代謝を阻害する ACLY 阻害剤 (BMS303141) を用いて検討した。4 dpf 及びスレオニン添加・無添加条件での 9 dpf のいずれの胚盤胞においても、ACLY 遺伝子を発現していることが RT-PCR によって確認された。4 dpf の胚盤胞を  $1\mu\text{M}$  BMS303141 添加あるいは無添加のスレオニン添加培地で 9 dpf まで培養した結果、阻害剤は、胞胚腔の拡張の程度およびその総細胞数には全く影響を及ぼさないが、ICM 数が無添加区に比べて有意に減少した (8.2 vs 16.3)。この結果から、スレオニンの効果の一翼となる Acetyl-CoA の作用は、そのミトコンドリアからサイトゾル内の Acetyl-CoA へと代謝されることによって発揮されることが示唆された。

次に、高い受胎能を維持した状態(休眠)でマウス胚盤胞を短期間ではあるが体外で培養できることが判明したことから、ウシ胚盤胞も同様な条件で体外培養が可能かどうかについて検討した。体外受精由来胚盤胞(8 dpf)を上記のマウス胚盤胞の培養条件下で培養を試みたが、2~3日目には胞胚腔の萎縮

と細胞の変性が観察された。そこで、これまでに胚盤胞の拡張を促進することが知られている FBS と 2 ME を添加して培養したところ、胚盤胞は拡張した状態で培養4日目まで維持された。しかしその後、脂質顆粒の蓄積と思われる胚細胞の黒色変性が観察され、胚全体が萎縮変性した。このような変性を阻止するために、グルコースの至適濃度や胚性幹細胞のアポトーシス変性を抑制する Y-27632 添加の効果を検討した(図3)。拡張胚盤胞の形態を維持する胚の割合を経日的に観察したところ、10%FBS、200  $\mu\text{M}$  2ME、1 mM グルコース、10  $\mu\text{M}$  Y-27632 そしてスレオニンの代わりにその中間代謝物である 120  $\mu\text{M}$  メチオニンを添加した培地で培養すると、70%の胚が拡張胚盤胞として14日間維持できることが明らかとなった。しかし、このように長期間拡張した状態で生存維持されるウシ胚盤胞の受胎能力などの機能についてはさらなる研究によって明らかにする必要がある。

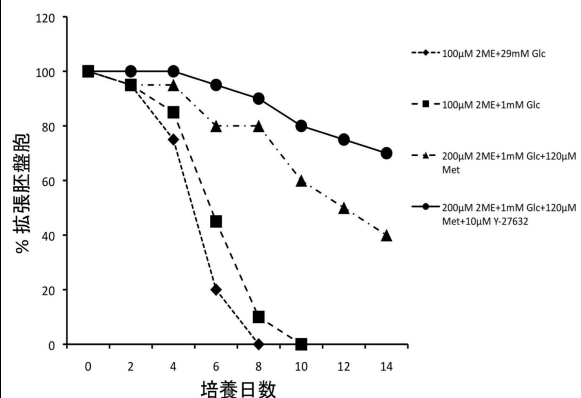


図3 体外培養におけるウシ胚盤胞(8 dpf)の形態と生存性の経日的変化(拡張胚盤胞の割合で表す)

基本培地: 10% FBS 添加 KSOM (EDTA 不含) 培地

### 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)

[学会発表](計2件)

堀上 健斗, 後藤 奈々, 今井 裕, 山田 雅保  
マウス体外培養遅延着床胚盤胞のスレオニン-メチオニン代謝への依存性について  
2014年8月20日 帯広

K. Horikami, N. Goto, H. Imai and M. Yamada  
Developmental ability to term of mouse blastocysts cultured in vitro for an extended period of time is dependent on threonine.

IFFS/JSRM International Meeting in  
Yokohama (国際学会)  
2015年4月26日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 雅保 (Yamada Masayasu)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：10243073