

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02321

研究課題名（和文）ウシ栄養膜細胞再誘導を介した新規ゲノミック評価系の基盤構築

研究課題名（英文）Trophectoderm regeneration to support full-term development in the inner cell mass isolated from bovine blastocyst

研究代表者

川原 学（Kawahara, Manabu）

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70468700

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：受精卵は細胞分裂を繰り返して胚盤胞期胚と呼ばれる内部に腔所のある球状構造を形成する。胚盤胞期胚は、内部細胞塊（ICM）と栄養外胚葉（TE）という二種類の細胞で構成されており、それぞれ胚と胎盤の大部分に成長する。我々は、ウシのICM細胞は、TEを再生することが可能であり、胚と胎盤の両方を形成することができることを示した。ウシ胚盤胞期胚から単離したICMは一定期間体外培養することで、TEを再生した。さらに、TE再生の完全性を調べるために、TE再生胚を受胎牛に胚移植した。胚移植後、4頭のうち1頭が妊娠し、明らかに正常な胎盤を持つ雌の子牛が自然分娩で生まれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から、ウシ胚盤胞期胚のICMは完全なTE再生機能を保持していることが証明されたので、TEの大部分を利用して遺伝子検査に供した上で個体生産できる可能性が示された。さらに、ウシ胚のTEのYAP1局在はマウス胚TEとは異なって動的に局在様式が変化していることが判明し、これによりマウス胚などと比べて緩やかに細胞分化が進行するウシ胚の発生が調節されていると推察された。本研究を足掛かりに生理現象の中でのYAP1細胞内局在の多様な制御機構の理解が深まることが期待され、さらに研究を進めることで、哺乳類の細胞運命決定のメカニズムや種による違いが明らかになるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：The blastocyst consists of two types of cells, the inner cell mass (ICM) and the trophectoderm (TE), which develop into an embryo proper and a large part of the placenta, respectively. We have shown that, since bovine ICM cells can regenerate TE, they are capable of forming both the embryo and placenta. To test developmental ability of TE-regenerated embryos, we then transferred the regenerated blastocysts to recipient females. After the embryo-transfer, to their surprise, one of the four cows became pregnant and a female calf was naturally born with an apparently normal placenta. Our study suggests that we can remove and use a large part of TE for genetic testing to breed cattle with improved qualities. Also, further studies could reveal the mechanism of cell fate decision in mammals and its differences between species.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 胚盤胞期胚 個体発生 栄養膜細胞 ゲノミック評価

1. 研究開始当初の背景

ウシ育種において遺伝的能力(育種価)の推定は必要不可欠である。分子生物学の進歩に伴いゲノムの直接評価が可能になったことで、世界的に育種方式が転換しつつある。更に家畜改良増殖効率の高度化は加速しており、性成熟までの成長を待たずに、受精卵レベルでのゲノム評価も模索されている。受精卵レベルでのゲノム評価のためには受精卵からバイオプシーにより採取した遺伝情報 DNA を分析することが必須であるが、解析に十分量の DNA サンプルを回収することは難しい。バイオプシーサンプルでは、DNA を人工的に増幅させなければ検査に耐えうる量を確保することができず、技術的に増幅エラーを失くすことができないため、評価の正確性に疑問が残る。したがって、ウシ個体の育種価を高精度に推定するために、充分量の細胞サンプルを提供し、なおかつ、個体までの発生能力を担保するバイオプシー胚の作出を可能にする新たな繁殖技術構築がウシ育種方式の先進化のために求められている。そこで我々は、充分量のバイオプシー細胞として、胚盤胞期胚の胎盤を形成する栄養外胚葉(TE)に着目し、TE 除去胚からの個体生産の可能性を探ることとした。

2. 研究の目的

ウシ胚盤胞期胚における細胞分化能の解析を通じて、栄養外胚葉 TE を除去した胚からの個体発生能を調べる。

3. 研究の方法

(1) マウスとウシの二種の哺乳類において、内側の内部細胞塊 ICM と外側の栄養外胚葉 TE からなる胚盤胞期の受精卵を用意し、界面活性剤処理を施すことで栄養外胚葉部分のみを選択的に破壊した。TE を取り除いた単離 ICM を、さらに 24 時間体外培養に供し外側に TE の目安となるマーカータンパク質 CDX2 発現の有無を確認した。さらに、TE 再形成ウシ胚における網羅的な遺伝子発現解析を実施して、通常の体外受精胚 IVF 胚と比較した。また、これらの胚をマウス及びウシの子宮に胚移植に供して、個体までの発生能力を評価した。

(2) 加えて、ICM および TE 細胞分化に重要なシグナル伝達系として知られている Hippo シグナルのウシ胚での特性についても解析を進めるべく、胚盤胞期胚の胞胚腔液を吸引採取する独自の実験系を構築した。人為的に胞胚腔液を吸引したウシ胚盤胞期胚における Hippo シグナル関連タンパク質 YAP1 の細胞質内局在を免疫染色法によって観察した。さらに、YAP1 局在に影響があると考えられる YAP1 リン酸化およびアクチン細胞骨格、それぞれの阻害剤存在下における YAP1 細胞内局在解析も実施した。

4. 研究成果

3-(1)において、マウスおよびウシ胚の単離 ICM の TE 再生能を比較したところ、双方とも TE マーカーである CDX2 発現陽性細胞が腔再形成胚の外周の細胞において観察された。しかし、マウス胚 (57%) よりもウシ胚 (97%) の方が明らかに高い割合で胞胚腔を再形成した。マウスの胚盤胞期胚に比べて、ウシの胚盤胞期胚の細胞数がより完全に回復したことは、ウシの ICM 細胞がより高い TE 再生能力を持っていることを示唆していた(図 1)。

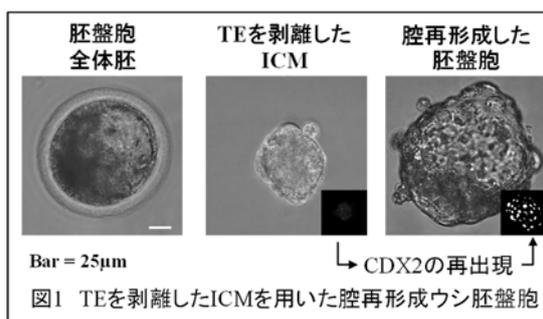


図1 TEを剥離したICMを用いた腔再形成ウシ胚盤胞

次に、腔再形成胚について RNA-seq により発現を確認した 9509 遺伝子について通常の胚盤胞期胚と比較した。その結果、全体として両者が極めて似通った遺伝子発現パターンを示すことが判明し(図 2)、腔再形成胚が遺伝発現の観点から通常の胚盤胞期胚に類似した性質を持つことが明らかになった。

さらに、作出したマウスおよびウシの腔再形成の個体までの発生能力を調べるために、胚移植試験を実施した。マウス腔再形成胚は、120 個の胚を 10 匹の偽妊娠 ICR マウス子宮に移植したが、妊娠満期までの発生は確認できなかった。一方のウシ腔再形成胚に関しては、2 個の腔再形成胚を一頭のホルスタイン雌ウシ子宮に移植したところ、着床し妊娠 282 日目に自然分娩によって 1 頭の個体を得ることができた(図 3)。この個体の後産のサイズや宮阜数を調べたと

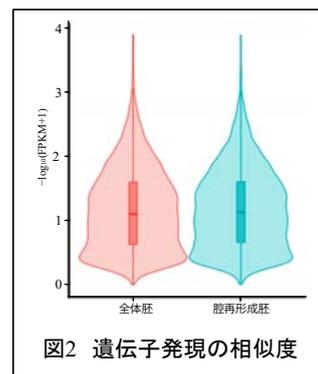


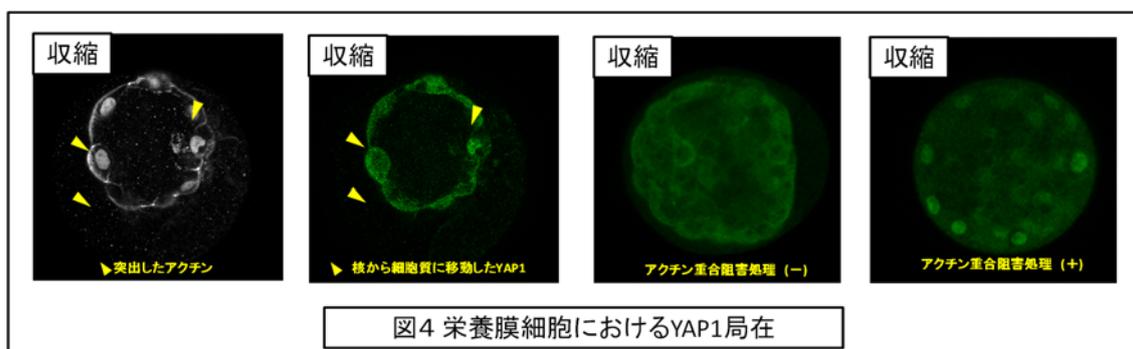
図2 遺伝子発現の相似度

ころ顕著な異常は認められなかった。この個体は2021年5月26日現在も正常に発育している。

次いで3-(2)において、機械的刺激がYAP1細胞内局在に及ぼす影響を調べる上で、ウシ胚盤胞期胚のポンピング現象に着目した。ポンピング現象とは、浸透圧によって胞腔内の液成分を増加または減少させて胚盤胞期胚が拡張と収縮を繰り返すことである。これに伴い胚全体の形は大きく変形するが、我々はこのときのTEにおけるYAP1細胞内局在を解析することにした。免疫染色による観察の結果、通常はTE核内に局在するYAP1が、収縮時には細胞質に移動していることが判明した。次に、胚収縮によるYAP1局在変化の原因を探るべく、細胞骨格アクチンの分析を併せて行ったところ、収縮胚のうちアクチンが頂端側に突出している割球においてYAP1が核から細胞質に移動していることがわかった(図4)。さらに、アクチン重合阻害剤を加えてアクチン構造を破壊したところ、収縮によるYAP1局在変化は観察されなくなった。



図3 内部細胞塊から誕生したウシ



本研究により、ウシ受精卵の胚盤胞期において胎盤形成の基礎となる栄養外胚葉を完全に取除いても、残った内部細胞塊から栄養外胚葉を再生し、個体まで発生することが示され哺乳類受精卵の驚異的な発生能力の一端が明らかになりました。また、ウシもマウスも胚盤胞期の受精卵における内部細胞塊は栄養外胚葉様の細胞を再生する能力を共に維持しているものの、ウシではより完全な栄養外胚葉が再生されるという事実から、同じ哺乳類であっても、ウシとマウスでは受精卵における分化制御の仕組みに違いがあることが明確になった。また、胚盤胞期におけるウシ胚の収縮に伴う細胞骨格アクチンの局在変化に応じて、YAP1の細胞内局在が変化することが判明し、初期の個体発生における機械的刺激の動的な変化が分化関連タンパク質の局在に影響を及ぼすことを示した。これまでは、細胞の密度、位置、極性、および接着状態からYAP1細胞内局在が分析されてきたが、本研究により細胞の機械的刺激の動的な変化によるアクチン細胞骨格の分布状態もYAP1局在に影響を及ぼすことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohri Nanami, Akizawa Hiroki, Iisaka Sakie, Bai Hanako, Yanagawa Yojiro, Takahashi Masashi, Komatsu Masaya, Kawai Masahito, Nagano Masashi, Kawahara Manabu	4. 巻 294
2. 論文標題 Trophectoderm regeneration to support full-term development in the inner cell mass isolated from bovine blastocyst	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19209 ~ 19223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oikawa Kohei, Yamazaki Takeshi, Yamaguchi Satoshi, Abe Hayato, Bai Hanako, Takahashi Masashi, Kawahara Manabu	4. 巻 135
2. 論文標題 Effects of use of conventional and sexed semen on the conception rate in heifers: A comparison study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2019.06.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akizawa H., Yanagawa Y., Nagano M., Bai H., Takahashi M. and Kawahara M.	4. 巻 90
2. 論文標題 Significance of CCN2 expression in bovine preimplantation development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiina K., Komatsu M., Yokoi F., Bai H., Takahashi M. and Kawahara M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Overgrowth of mice generated from postovulatory aged oocyte spindles.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2019-00005	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 Kohri Nanami, Akizawa Hiroki, Iisaka Sakie, Bai Hanako, Takahashi Masashi, Kawahara Manabu	4. 巻 528
2. 論文標題 The role of RHOA signaling in trophectoderm cell-fate decision in cattle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 713 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamura Shota, Goda Nanami, Akizawa Hiroki, Kohri Nanami, Balboula Ahmed Z., Kobayashi Ken, Bai Hanako, Takahashi Masashi, Kawahara Manabu	4. 巻 468
2. 論文標題 Yes-associated protein 1 translocation through actin cytoskeleton organization in trophectoderm cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 14 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Saito Shun, Yamamura Shota, Kohri Nanami, Bai Hanako, Takahashi Masashi, Kawahara Manabu	4. 巻 555
2. 論文標題 Requirement for expression of WW domain containing transcription regulator 1 in bovine trophectoderm development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 140 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Komatsu M., Yokoi F., Imai S., Yamane M., Bai H., Takahashi M., and Kawahara M.
2. 発表標題 Species-specific dynamics of mitochondrial content within an embryo during preimplantation development in mice and cattle.
3. 学会等名 Fertility Conference and Exhibition 2020, Edinburgh (UK). (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山村頌太, 郡七海, 秋沢宏紀, 唄花子, 高橋昌志, 川原学.
2. 発表標題 Hippo経路標的分子TAZ 遺伝子の発現抑制がウシ初期胚に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会 (長野県上田市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小松正明, 鈴木惇文, 国井宏樹, 川原学, 木村康二, 高橋昌志, 唄花子.
2. 発表標題 ウシ子宮内膜上皮細胞を用いた暑熱負荷培養およびインターフェロン・タウ応答性の検証.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会 (長野県上田市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 唄花子, Shabur Md Abdus TALUKDER, 国井宏樹, 伊藤月乃, 川原学, 高橋昌志.
2. 発表標題 乳牛の分娩前後における末梢血単核球のストレスおよび免疫関連因子の解析.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会 (長野県上田市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 及川康平, 山崎武志, 山口諭, 阿部隼人, 唄花子, 高橋昌志, 川原学.
2. 発表標題 性選別精液による乳牛人工授精の受胎率に及ぼす環境要因の影響.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会 (長野県上田市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 及川 康平, 山崎 武志, 唄 花子, 高橋 昌志, 川原 学.
2. 発表標題 父の遺伝情報の欠落がゲノミック評価の精度に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本畜産学会 (京都府 京都大学) COVID-19感染拡大により開催中止
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郡 七海, 唄 花子, 高橋 昌志, 川原 学.
2. 発表標題 ウシ初期胚におけるRHOA阻害が栄養外胚葉形成に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本畜産学会 (京都府 京都大学) COVID-19感染拡大により開催中止
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 内部細胞塊から腔再形成胚を作製する方法および腔再形成胚を用いたウシ個体の作出方法	発明者 川原学、郡七海、高橋昌志、唄花子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-172732	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

北海道大学農学部 遺伝繁殖学研究室 http://lab.agr.hokudai.ac.jp/anim/breed/index.html
--

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	唄 花子 (Bai Hanako) (60775443)	北海道大学・農学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	永野 昌志 (Nagano Masashi) (70312402)	北里大学・獣医学部・教授 (32607)	(間接経費の内訳、北大: 63978円、北里大学: 11022円)

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