

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19269

研究課題名（和文）哺乳類胚発生休止における子宮の役割と試験管内再現技術の開発

研究課題名（英文）The significance of uterus in mammalian embryonic diapause and advancements in In vitro reproduction strategies.

研究代表者

高岡 勝吉（TAKAOKA, Katsuyoshi）

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：90551044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：発生休止とは、胎生の哺乳類母体が環境に応じて子宮内環境を変化させ、着床前胚に細胞周期と細胞分化の休止を誘導する現象である。発生休止の誘導は胚の自己組織化のブレーキの役目を果たすが、その分子メカニズムの大部分は未だ不明なままである。そこで本研究では、子宮が発生休止を誘導する仕組みを明らかにすることを目的とする。これまでに、発生休止の各ステージごとの子宮と胚組織のトランスクリプトーム解析、パスウェイ情報解析を行い、発生休止を制御する子宮-胚間相互作用因子の候補をリストアップした。また、それらの候補因子に対して、大規模ノックアウトスクリーニング解析により、候補因子の絞り込みを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行より明らかになる「発生休止現象の分子メカニズム」の学術的知見は、ヒトの初期流産の発症機構の解明につながるなど、そのインパクトは多くの学術分野にわたる。加えて、発生休止誘導技術の確立により、機能的なin vitro着床胚作製が可能になれば、胎生動物胚の完全in vitro培養や人工子宮のような叶うことのない夢と思われてきた技術への道筋が見えてくる。このように本研究は、学術面・技術面の両面で多大な意義のあるイノベーションを生み出す可能性を秘めた研究である。

研究成果の概要（英文）：Embryonic diapause, a crucial process in mammalian embryogenesis, entails the initiation of a cell cycle and cell differentiation pause in the preimplantation embryo induced by alterations in the intrauterine environment orchestrated by the maternal system. Although developmental quiescence acts as a regulatory brake on embryonic self-organization, its underlying molecular mechanisms remain largely unexplored. This study aims to unravel the intricate mechanism by which the uterus induces developmental arrest. Transcriptome and pathway analysis were conducted on both uterine and embryonic tissues across distinct stages of developmental diapause, leading to the identification of putative factors governing utero-embryo interactions and embryonic diapause regulation. Subsequently, a comprehensive large-scale knockout screening analysis was performed to narrow down the list of candidate factors.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生休止 着床 不妊治療 着床遅延 生殖補助医療技術

1. 研究開始当初の背景

「活動」と「休止」の両側面を合わせ持つ生命現象に対して、従来の多くの発生再生研究は「活動」に注力し一定の成果をあげてきた。例えば、マウス着床期胚の体軸形成においては、Nodal シグナルの分子ゆらぎを増幅することで自己組織化が引き起こされ、最初の体軸を獲得する (Takaoka *et al.*, Dev cell 2006, Nature cell biol. 2011, Dev. 2012, Nat. commun. 2017)。しかし、それらの知見を応用したヒトやマウスの *in vitro* 着床胚や未分化培養細胞による再構成胚は、生体内であれば経由する「発生休止状態」をスキップし着床に適さない発生ステージのまま着床過程に進むため、機能面や効率面に多くの課題を残す (Harrison *et al.*, Science 2017, Rivron *et al.*, Nature 2018, Sozen *et al.*, Nature Cell Biol. 2018, Dev. Cell 2020)。発生休止 (Embryonic diapause) とは、胎生の哺乳類母体が環境に応じて子宮内環境を変化させ、着床前胚に細胞周期と細胞分化の休止を誘導する現象である。発生休止の誘導は胚の自己組織化のブレーキの役目を果たし、着床に適した胚発生ステージで休止させることで安定的な妊娠を可能としている。また発生休止の破綻は、ヒトの場合、着床不全・早期流産につながる。このように発生休止現象は非常に重要な胚発生イベントであるが、その分子メカニズムの大部分は未だ不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、「発生休止は子宮からの分泌因子によって誘導されている」という研究代表者独自の予備実験結果に基づき、子宮が発生休止を誘導する仕組みを明らかにすることを目的とする。また得られた知見を応用し、発生休止を試験管内で再現する技術の開発を並行して行う。つまり本研究では、発生休止現象に対して、分子メカニズムの解明と試験管内再現技術の開発を並行して行うことでその相乗効果を狙う。得られた成果は、発生休止現象の本質的理解への突破口となり、ヒトの初期流産の発症機構の解明など、そのインパクトは多くの学術分野にわたる。加えて、発生休止誘導技術の確立により、機能的な *in vitro* 着床胚作製が可能になれば、胎生動物胚の完全 *in vitro* 培養や人工子宮のような叶うことのない夢と思われてきた技術への道筋が見えてくる。

3. 研究の方法

研究代表者の予備実験から、発生休止期の子宮は様々な因子を産生して発生休止胚に作用することがわかった。例えば、発生休止状態の子宮内膜では Nodal・Wnt シグナルの分泌因子が発現しており、発生休止胚において Wnt や Nodal シグナルの活性化が観察できていることから、これらのシグナルの誘導因子が子宮から産生されていると考えられる。実際に、発生休止を誘導する因子が胚由来ではなく、子宮分泌液に含まれていることを、発生休止子宮上清を添加した *in vitro* 培養の予備実験より明らかにしている。そこで本実験では、発生休止を誘導する子宮分泌因子の実体を明らかにする。具体的には、(1)発生休止の各ステージごとの子宮と胚組織のトランスクリプトーム解析、(2)発生休止子宮上清液に含まれるタンパクの質量分析を行う。(1)では、発生休止の各ステージにおいて子宮と発生休止胚の組織の RNA-seq を行う。(1)(2)で得られたオミクス実験結果はパスウェイ情報解析を行い、発生休止を誘導するシグナル候補経路をリストアップする。得られた候補因子に対して、5 遺伝子同時ノックアウト (KO) 作製技術を駆使して、子宮内膜に発現する分泌因子 5 遺伝子を 1 プールとし発生休止の表現型解析を行う。さらにプールごとの組み合わせを工夫することで責任因子を絞り込む。発生休止現象の表現型の評価は、細胞分化状態を可視化できる *Nanog-GFP*, *Cdx2-GFP* Tg マウスや、細胞周期をモニターできる R26-Fucci KI マウスを用いて、発生休止胚を観察することでハイスループットに行う。研究代表者の予備実験より明らかになった候補シグナル経路である Wnt や Nodal シグナルについても本実験で生理学的意義を検証する。

4. 研究成果

発生休止を誘導する子宮分泌因子の実体を明らかにするために、(1)発生休止の各ステージごとの子宮と胚組織のトランスクリプトーム解析を行った。得られたオミクス実験結果はパスウェイ情報解析を行い、発生休止を誘導するシグナル候補経路をリストアップした。さらに、得られ

候補因子に対して、5 遺伝子同時ノックアウト(KO)作製技術を駆使して、子宮内膜に発現する分泌因子 5 遺伝子を 1 プールとし発生休止の表現型解析を行い、責任因子を絞り込む。発生休止現象の表現型の評価は、細胞周期をモニターできる Fucci KI マウスを用いて、発生休止胚を観察することでハイスループットに行った。さらに、代表者の予備実験より明らかになった候補シグナル経路である Wnt や Nodal シグナルについても本実験で生理学的意義を検証した。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minegishi Katsura, Roth Benjamin, Komatsu Kaoru R., Ono Hiroki, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Katoh Takanobu A., Kajikawa Eriko, Sai Xiaorei, Miyashita Emi, Takaoka Katsuyoshi, Bando Kana, Kiyonari Hiroshi, Yamamoto Tadashi, Saito Hirohide, Constam Daniel B., Hamada Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Fluid flow-induced left-right asymmetric decay of Dand5 mRNA in the mouse embryo requires a Bicc1-Ccr4 RNA degradation complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24295-2	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 該当する

1. 著者名 Sai Xiaorei, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Mizuno Katsutoshi, Kajikawa Eriko, Katoh Takanobu A., Kimura Toshiya, Shiratori Hidetaka, Takaoka Katsuyoshi, Hamada Hiroshi, Minegishi Katsura	4. 巻 149
2. 論文標題 Planar cell polarity-dependent asymmetric organization of microtubules for polarized positioning of the basal body in node cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200315	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浜崎祥生、高岡勝吉
2. 発表標題 「マウス胚における最初の細胞分化」
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜崎祥生、竹本龍也、高岡勝吉
2. 発表標題 「組織特異的かつ大規模ノックアウトマウス作製法の確立とその応用法」
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高岡勝吉
2. 発表標題 哺乳類胚が発生休止する仕組み
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 浜崎祥生、高岡勝吉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 85
3. 書名 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 3月号	

〔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		
スイス	EPFL, School of Life Sciences, Lausanne		