

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07367

研究課題名(和文)胎盤低形成モデルを用いた初期胎盤発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of early placental formation mechanism using placental hypoplasia models

研究代表者

三浦 健人(Miura, Kento)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・特別研究員

研究者番号：70802742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスの胎盤低形成モデルである体細胞クローン胚を用いて、初期胎盤の栄養膜細胞の増殖と分化の制御メカニズムの解明を目指した。本研究遂行にあたり、これらの胎盤低形成が栄養膜細胞(内因性)または胎仔性因子(外因性)のいずれに原因があるかを明らかにするため、体細胞クローン胚にES細胞を注入し作製したキメラ胚を解析した。その解析結果から、クローン胚の胎盤異常が「胎仔性因子」に起因している可能性が示唆された。またクローン胚の作製に必要な、マウス卵の人為的な活性化に関連する技術の開発を行った(Miura et al., J Reprod Dev, 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は本研究において、クローン胚盤胞に正常なES細胞を注入することで、「正常なES細胞由来の胎仔」と「クローン胚の胎盤」から構成されるキメラ胚を作製することに成功した。キメラ胚ではクローン胚で見られる組織学的異常が改善する傾向が見られたことから、クローン胚の胎盤異常が「胎仔性因子」に起因している可能性が示唆された。また、マウス卵の人為的な活性化に関連する技術の開発も行い、卵内のタンパク質量の制御や生殖補助医療への応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this research, I tried to clarify the regulatory mechanisms for trophoblast cell proliferation and differentiation using placental hypoplasia (= poor development) mouse models generated by somatic cell nuclear transfer. For this purpose, I generated the chimeric embryos by injection of embryonic stem cells from normal mice into blastocysts of the mouse model. The experimental results indicated that fetal (exogenous) factors might be responsible for the placental hypoplasia of cloned mouse embryos. In addition, I developed the technology associated with oocyte artificial activation necessary to generate cloned mouse embryos (Miura et al., J Reprod Dev, 2018).

研究分野：発生工学

キーワード：体細胞クローン キメラマウス 発生工学 組織学 胎盤 ES細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の受精卵は細胞分裂を繰り返し、受精後 3.5 日目 (E3.5) に、胚内部に割腔と呼ばれる空間を持つ胚盤胞になる。胚盤胞は、胚内側の内部細胞塊と外側の栄養外胚葉から構成される。内部細胞塊の細胞は増殖して、将来胎子を作る胚盤葉上層 (Epiblast) と呼ばれる胎子組織を作る。胚盤胞外縁の 1~数層の細胞から構成される栄養外胚葉からは、外胚葉性胎盤円錐や胚体外外胚葉等の胎盤組織が作られ、胎盤組織を構成する栄養膜細胞 (Trophoblast cell) が適切に増殖・分化することで胎盤が形成される (図 1)。これまでの研究で、胎子組織から分泌される FGF4 が栄養膜細胞の増殖・分化を制御していることが知られているが (Kunath et al., 2004)、初期胚の胎盤発生機構については、材料の微細さや解析方法の制限もあって、理解が進んでいない。

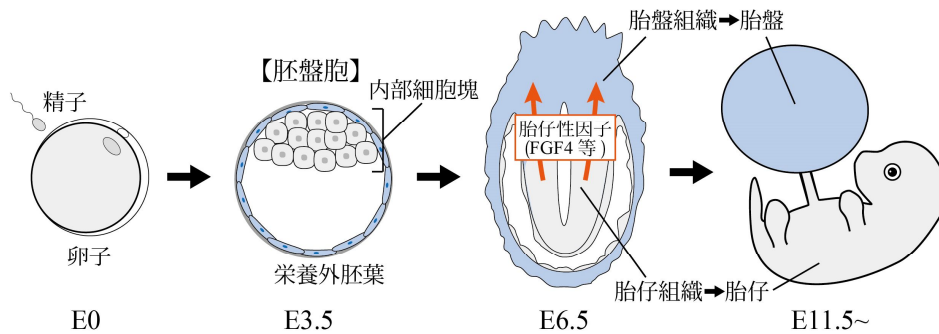


図 1. マウス胚の初期発生

2. 研究の目的

核移植技術は、1つの細胞のゲノムから新たに個体を作出できる唯一の方法である。体細胞クローン胚は、除核した卵子に体細胞核を移植し作製した胚盤胞を仮親に移植することで、着床および出生させることが出来る。クローン胚は、着床後の初期 (E6.5-11.5) に胎盤低形成を示し、着床率・出生率の低下も見られる (Meissner et al., 2006; Wakisaka-Saito et al., 2006)。胎盤低形成の原因として、内因性 (栄養膜細胞の X 染色体や刷込み遺伝子など特定の遺伝子; Okae et al., 2014) および外因性 (胎子からの成長因子; Kunath et al., 2004) の原因が考えられているが、その詳細は不明である。本研究では、クローン胚を胎盤低形成のモデルとして用いて、栄養膜細胞の増殖・分化の制御メカニズムの解明を目指す。特に胎盤低形成が、内因性 (栄養膜細胞) または外因性 (胎子性因子) のどちらの原因に起因するか注目する。

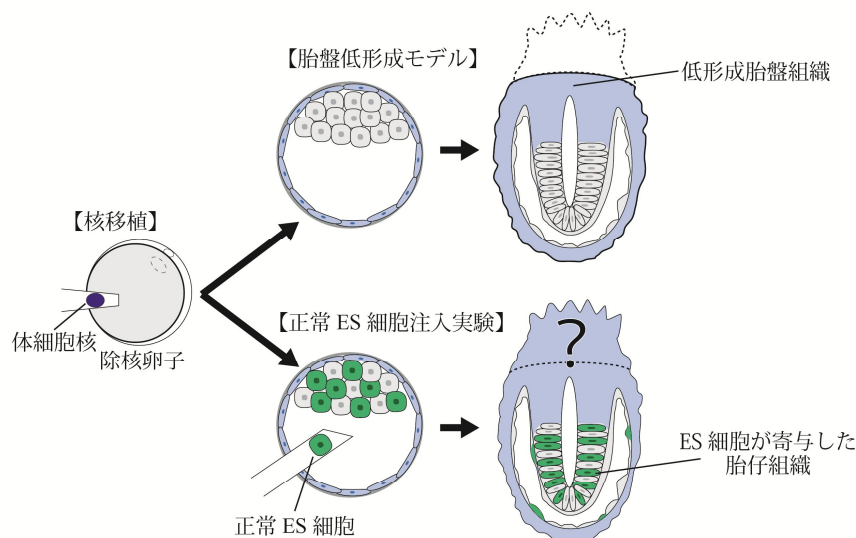


図 2. 胎盤低形成モデルと ES 細胞注入実験

3. 研究の方法

本研究では、クローン胚盤胞の胎盤低形成モデル胚 (以降、モデル胚) に正常な胚性幹細胞

(ES細胞)を注入することで、「正常な細胞を持つキメラ胎仔」と「モデル胚の胎盤」から構成される胚を作製する(図2)。胎盤の低形成が外因性の原因により引き起こされている仮定すると、ES細胞を注入したモデル胚では胎盤形成の正常化が期待できる。胚盤胞への注入には、GFP(緑色蛍光タンパク質)を発現するES細胞を用いることで、ES細胞が胎仔組織に寄与していることを確認する。また、ES細胞を注入したモデル胚の胎盤を組織学的に解析することで、胎仔が初期胎盤の組織構造の形成に与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 申請者はクローン胚盤胞に正常なES細胞を注入することで、「正常なES細胞由来の胎仔」と「クローン胚の胎盤」から構成されるキメラ胚を作製することに成功した。そこで、体外受精胚、通常のクローン胚、ES細胞を注入したクローン胚(キメラ胚)をそれぞれ採材し組織切片を作製した。作製した切片に対して、抗GFP抗体および未分化な栄養膜細胞のマーカーである抗TPBPA抗体を用いて免疫組織化学を行った。まず抗GFP抗体を用いてキメラ胚の染色を行い、胎仔組織がGFP陽性を示すキメラ胚を用いて以下の結果を得た。TPBPA陽性の胎盤領域は、体外受精胚と比較してクローン胚で減少していたが、キメラ胚の中にはクローン胚よりも広いTPBPA陽性の胎盤領域を示すものが観察され、キメラ胚ではクローン胚で見られる組織学的異常が改善する傾向が得られた。以上の結果から、クローン胚の胎盤異常は「胎仔性因子」に起因している可能性が示唆された。
- (2) クローン胚の作製には、マウス卵を人為的に活性化させる必要がある。申請者は、哺乳類の受精において精子が持ち込むタンパク質である phospholipase C zeta (PLC ζ) の mRNA を用いて、マウス卵の活性化に関連する新たな技術の開発を行った (Miura et al., J Reprod Dev, 2018)。技術開発に際して、auxin-inducible-degron (AID) 配列を持ったタンパク質をオーキシン依存的に分解する技術 (AID 技術) をマウス卵に応用することを試みた。最初に、マウス未受精卵に高濃度のヒト PLC ζ (hPLC ζ) mRNA を顕微注入した所、活性化率(前核形成率)は高かったものの、発生率(2細胞および胚盤胞率)が低かった。hPLC ζ -AID-EGFP を注入したマウス卵で観察された GFP 蛍光は、オーキシン添加培養により減少した。さらに、高濃度の hPLC ζ を注入した卵で観察された低発生率は、オーキシン添加培養により改善された。本研究の結果から、AID 技術を用いてマウス卵内のタンパク質を分解できること、高濃度の hPLC ζ mRNA から翻訳されるタンパク質を分解することで胚発生率が改善することが示された。
- (3) ES細胞を用いたキメラマウス作出に関連する技術開発として、申請者は生殖細胞欠損を引き起こす遺伝子変異を持った胚盤胞にES細胞を注入することで、ES細胞由来の生殖細胞のみを持つキメラマウスの作出を試みた。具体的な方法として、生殖細胞の発生に必須の Nanos3 遺伝子を標的とした3種類の guide RNA (Nanos3-sgRNAs) と Cas9 mRNA を導入した胚盤胞に、野生型のES細胞を注入することでキメラマウスを作出した。対照群として用いた野生型の胚盤胞を用いて作出したキメラマウスからは、ホストの胚盤胞に由来する F1 産子のみが得られた。一方で、Nanos3-sgRNAs 処理した胚盤胞を用いて作出したキメラマウスから得られた F1 産子は全て、ドナーのES細胞に由来していた。本研究の結果に基づき、今後は致死性の遺伝子を持つES細胞を用いたキメラマウスの作出を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- (1) Kento Miura, Kyoko Harikae, Mayu Nakaguchi, Kenya Imaimatsu, Ryuji Hiramatsu, Ayako Tomita, Yoshikazu Hirate, Masami Kanai-Azuma, Masamichi Kurohmaru, Atsuo Ogura & Yoshiakira Kanai. “Molecular and genetic characterization of partial masculinization in embryonic ovaries grafted into male nude mice”, PLoS One. 2019 Mar 6;14(3):e0212367. doi: 10.1371/journal.pone.0212367. 査読有
- (2) Kento Miura, Shogo Matoba, Narumi Ogonuki, Takafumi Namiki, Junya Ito, Naomi Kashiwazaki, Atsuo Ogura. “Application of auxin-inducible degron technology to mouse oocyte activation with PLC ζ ”, J Reprod Dev. 2018 Aug 20;64(4):319-326. doi: 10.1262/jrd.2018-053. 査読有
- (3) Kenya Imaimatsu, Wataru Fujii, Ryuji Hiramatsu, Kento Miura, Masamichi Kurohmaru & Yoshiakira Kanai. “CRISPR/Cas9-mediated knock-in of murine Y chromosomal Sry

gene”, J Reprod Dev. 2018 Jun 22;64(3):283-287. doi: 10.1262/jrd.2017-161. 査読
有

〔学会発表〕(計5件)

- (1) Kento Miura, Shogo Matoba, Michiko Hirose, Atsuo Ogura. “Generation of chimeric mice with germ cells fully derived from embryonic stem cells” Germinal Stem Cell Biology, Gordon Research Conference, Germ Cell Programming in Vertebrate Biology, Medicine and Biotechnology, Shatin, Hong Kong (May 2019)
- (2) 三浦健人、的場章悟、廣瀬美智子、小倉淳郎「ES細胞に由来する生殖細胞のみを持つキメラマウスの作出とその応用」第66回日本実験動物学会総会、福岡、2019年5月
- (3) 三浦健人、的場章悟、廣瀬美智子、小倉淳郎「胚性幹細胞に由来する生殖細胞のみを持つキメラマウスの作出と応用」新学術領域研究「性スペクトラム - 連続する表現型としての雌雄」第1回若手研究会、御殿場市、2019年3月
- (4) Kento Miura, Shogo Matoba, Michiko Hirose, Atsuo Ogura. “Production of chimeric mice with germ cells fully derived from embryonic stem cells” RIKEN EPIGENETICS in Wako, Saitama, JAPAN (February 2019)
- (5) 三浦健人、的場章悟、越後貫成美、並木貴文、伊藤潤哉、柏崎直巳、小倉淳郎「オーキシン依存的にマウス卵内のタンパク質を分解する技術の開発とPLCを用いた卵活性化法への応用」第111回日本繁殖生物学会、上田、2018年9月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。