

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08054

研究課題名（和文）ゲノム編集技術を用いたブタ妊娠メカニズムの解明と繁殖技術への応用

研究課題名（英文）Study of molecular mechanism of pregnancy using genome editing technology in pig

研究代表者

柏崎 直巳（Naomi, Kashiwazaki）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90298232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではゲノム編集技術を用いることでブタ胚着床および妊娠メカニズムを明らかにしようとした。その結果、マウスで子宮から分泌される胚着床に必須な因子であるLIFが、ブタでは胚で発現していることを明らかにした。またマウスでは、LIF、LIF受容体および転写因子であるStat3が胚着床に必須のシグナルであることを明らかとした。また、マウス・ブタ胚におけるゲノム編集技術の条件の最適化にも成功した。さらにブタ胚にもその技術を応用することで、受精卵ではKO卵の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、ブタでは胚自身が着床因子であるLIFを発現すること、またLIF受容体も発現していることを明らかにした。この知見は、例えばブタにおける胚移植時にLIFを投与することなどにより、ブタの効率的生産に寄与できる可能性を示した。またゲノム編集技術を用いて効率的にブタ胚の遺伝子改変を行うことができる可能性を示したことから、今後多くの遺伝子改変ブタを作製することで、基礎生物学および医学分野の研究の発展に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We clarified that LIF-LIFR-Stat3 signal is indispensable for embryo implantation in mouse using gene manipulated mice. We also tried to optimize genome editing protocol for mouse and pig embryos and then succeeded in production of genome edited pig embryos.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ブタ 妊娠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生殖分野における研究は、体外受精や人工授精さらには顕微授精等の技術が開発され、ヒト生殖補助医療や優良な形質をもつ有用家畜の効率的生産に広く応用されている。上記の方法により得られた受精卵(胚)を個体へと発生させるためには、卵管あるいは子宮への胚移植が必要となるが、現在最適な環境・技術を用いた場合でも妊娠率・受胎率は 60%程度であり、より高い妊娠率・受胎率が望まれている。移植された胚が子宮(母体)と行う最初のコンタクトは「着床」であり、何らかの原因で着床が阻害されると着床不全となりその後のプロセスは起こらない。このことから胚の着床メカニズムを十分に理解することが、妊娠率・受胎率の向上に重要となる。エストロゲン受容体(ER)および白血病阻止因子 Lif 遺伝子を欠損させたノックアウト(KO)雌マウスは着床不全を呈したことから、ER-Lif シグナルは胚着床に必須な因子であると考えられている(図 1)。また不妊女性の着床期の子宮では、通常的女性と比較して Lif の発現が低かったという報告があり、ヒトにおいても着床時における Lif の重要性が考えられている。さらに、家畜(ブタ・ウシ)でも着床期の子宮で Lif が発現していたという報告はある。しかし、哺乳動物の種類により胚の着床様式は異なること、またげっ歯類と家畜ではエストロゲンの分泌場所が異なること等から、哺乳類に共通して ER-Lif が着床に必須な因子であるか不明である。さらにはこれまでマウス以外では KO 動物の作製が困難で着床に必須な因子を分子レベルで明らかにすることができなかった。

### 2. 研究の目的

近年ゲノム編集技術が開発され、マウス以外の動物でも個体レベルで遺伝子を KO することが可能となった。中でも CRISPR/Cas9 システムは、目的の遺伝子に対する guide RNA(gRNA)と DNA 切断酵素の Cas9 mRNA の 2 種類を受精卵に注入するだけで、他の方法に比べて安価で簡便に遺伝子を KO できることから、今後の発展が期待されている技術である。本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いて胚着床関連遺伝子(ER, Lif)に関する KO ブタを作製し、分子生物学的あるいは解剖学的手法を用いて解析することでブタ胚の着床時における ER-Lif の役割を明らかにする。また妊娠初期のブタ子宮内において、ER-Lif で誘導される各遺伝子の発現量およびその局在を明らかにすることでブタにおける胚着床メカニズムを分子レベルで初めて明らかにする。

### 3. 研究の方法

研究 CRISPR/Cas9 を用いた胚着床関連遺伝子(ER, Lif)ノックアウト(KO)ブタの作製と解析  
マウスでは ER および Lif KO マウスが作製されており、前者は排卵障害および着床不全によって、後者は着床不全によってそれぞれ不妊になることがすでに明らかにされている。そこでこれらの遺伝子を KO したブタの作出を目的として次の実験を行った。

実験 :ER および Lif 発現時期と組織の同定 .はじめに通常の胚着床時における ER および Lif の発現を調べるために、ブタにおいて胚着床が起こると考えられている妊娠 12 日前後の子宮組織を回収した。回収した組織を用いて免疫組織染色を行うことで ER および LIF の発現部位を調べた。一方、卵巣より回収した卵を体外成熟培養、体外受精および体外発生培養を行い、卵および胚における ER および LIF タンパク質の発現を調べた。

実験 :ER および Lif KO ベクターの構築とブタ体細胞における検証

ER および Lif 遺伝子上で gRNA が認識する PAM 配列(5'-NGG-3')を有する領域を CRISPR direct を使用して検索し、同ソフトにてオフターゲット効果の発生頻度を調べ、候補となる特異性の高い gRNA を 3 種類程度設計した。設計した gRNA とその相補鎖をオリゴヌクレオチド

として作製し、アニールさせた後、ベクターに組み込んだ。作製したベクターを、ブタセルトリ細胞由来である ST 細胞およびブタ鼻甲介由来である PT-K75 細胞の 2 種類のブタ培養細胞にトランスフェクションし、培養 24 および 48 時間後に回収した。細胞からゲノムを抽出し、T7E1 assay を行うことで作製した 3 種類のベクター間でのゲノム編集(KO)の効率を比較した。実験：ゲノム編集マウスおよびブタの開発 実験 で最も効率よくゲノム編集が確認されたベクターを用い、マウスおよびブタ胚でのゲノム編集を行い、ゲノム編集効率を調べた。またそれぞれ胚移植を行い、産子作出を試みた。

#### 4. 研究成果

実験：ER および Lif 発現時期と組織の同定。マウス子宮では ER および LIF の発現が確認できたのに対して、ブタではその発現は確認できなかった。一方ブタ胚では、ER の発現は不明瞭であったが、LIF および LIF 受容体の発現が確認された。

実験：ER および Lif KO ベクターの構築とブタ体細胞における検証。少なくとも 3 種類の内 1 つにおいてターゲットとしたブタ Lif の欠損が確認された。シーケンス解析によってもターゲット部位の欠損が確認できた。

実験：ゲノム編集マウスおよびブタの開発 マウスおよびブタそれぞれにおいて ER および LIF 遺伝子がゲノム編集された胚を作成することに成功した。このうち LIF に関しては、胚移植を行い候補となるマウスを作成に成功した。一方、ゲノム編集したブタ胚を移植したが産子を得ることはできなかった。

## 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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kamoshita Maki, Kato Tsubasa, Fujiwara Katsuyoshi, Namiki Takafumi, Matsumura Kazuaki, Hyon Suong-Hyu, Ito Junya, Kashiwazaki Naomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated -poly-L-lysine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0176711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0176711	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 Kaneko Hiroyuki, Kikuchi Kazuhiro, Men Thi Nguyen, Nakai Michiko, Noguchi Junko, Kashiwazaki Naomi, Ito Junya.	4. 巻 91
2. 論文標題 Production of sperm from porcine fetal testicular tissue after cryopreservation and grafting into nude mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 154-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org10.1016/j.theriogenology.2016.12.036.	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 Nakai Michiko, Ito Junya, Suyama Ayumi, Kageyama Atsuko, Tobarai Yasuko, Kashiwazaki Naomi	4. 巻 91
2. 論文標題 Phospholipase C (PLC ) versus postacrosomal sheath WW domain binding protein (PAWP): Which molecule will survive as a sperm factor?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13345	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 Namiki Takafumi, Ito Junya, Kashiwazaki Naomi	4. 巻 17
2. 論文標題 Molecular mechanisms of embryonic implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 331 ~ 342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12103	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 MIURA Kento, MATOBA Shogo, OGONUKI Narumi, NAMIKI Takafumi, ITO Junya, KASHIWAZAKI Naomi, OGURA Atsuo	4. 巻 64
2. 論文標題 Application of auxin-inducible degron technology to mouse oocyte activation with PLC	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 319 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-053	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 Kawahara Tai, Okamoto Naoki, Takae Seido, Kashiwagi Megumi, Nakajima Mariko, Uekawa Atsushi, Ito Junya, Kashiwazaki Naomi, Sugishita Yodo, Suzuki Nao	4. 巻 33
2. 論文標題 Aromatase inhibitor use during ovarian stimulation suppresses growth of uterine endometrial cancer in xenograft mouse model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 303 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/humrep/dex368	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 Fujiwara Katsuyoshi, Kamoshita Maki, Kato Tsubasa, Ito Junya, Kashiwazaki Naomi	4. 巻 88
2. 論文標題 Generation of rats from vitrified oocytes with surrounding cumulus cells via in vitro fertilization with cryopreserved sperm	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 180 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.12666	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Risako HAYASHI, Maki KAMOSHITA, Junya ITO, Naomi KASHIWAZAKI
2. 発表標題 Induced mutations of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) in porcine blastocysts by microinjection with RNAs of CRISPR/Cas9 system
3. 学会等名 Asian Australasian Animal Production Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴨下 真紀・林 理紗子・伊藤 潤哉・柏崎 直巳
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 によるブタ胚ゲノム編集における核酸注入濃度が発生能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	伊藤 潤哉  (ITO JUNYA)  (30454143)	麻布大学・獣医学部・教授    (32701)	