

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05936

研究課題名(和文) 胚が着床能力を獲得する制御機構の解析と移植する胚の質的評価法の樹立

研究課題名(英文) Molecular events involved in the completion of blastocyst implantation and estimation of implantation potential in embryos during in vitro culture

研究代表者

松本 浩道 (Matsumoto, Hiromichi)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：70241552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：体外受精胚の移植では受胎率および産子率が低い。これまでの多くの研究にもかかわらず改善されていない。このことは新規のアプローチが必要であることを示している。これまで着床と妊娠の成立に関する研究に取組み、マウス胚の着床能力獲得過程に関するタンパク質の発現や分解の制御機構について新知見を報告してきた。また、それらの分子機構を指標として、胚盤胞における遺伝子とタンパク質の発現を培養系で賦活化し、母体由来のシグナルに対する応答能力を高めた状態にして子宮へ胚移植するというアプローチで、マウス体外受精由来胚盤胞の着床能力を改善する手法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外受精胚の移植では受胎率および産子率が低い。ウシ体外受精由来胚盤胞の受胎率は約40%、産子率は約20%と低い。ウシの体外受精と着床前の体外発生培養法は確立されており、体細胞クローンウシも多数作出されている今日ではあるが、何故産子生産率は低いのか？これまでの多くの研究にもかかわらず改善されていない。本研究では、胚の着床能力獲得過程に関する分子機構の解析を行なった。また、それらの分子機構を指標として、胚盤胞における遺伝子とタンパク質の発現を培養系で賦活化して子宮へ胚移植することで着床能力を改善する手法を構築した。体外受精胚の移植における低い受胎率および産子率の問題の解明と対処法の樹立に貢献する。

研究成果の概要(英文)：In vitro fertilization (IVF) embryo transfer has low conception and fertility rates. Despite many previous studies, there has been no improvement. This indicates the need for a novel approach. We have been studying implantation and the establishment of pregnancy, and have reported new findings on the regulatory mechanisms of protein expression and degradation during the acquisition of implantation ability in mouse embryos. Using these molecular mechanisms as a guide, we have developed an approach to improve the implantation ability of mouse IVF-derived blastocysts by activating gene and protein expression in the blastocyst in a culture system and transferring the embryo to the uterus with an enhanced ability to respond to maternal signals.

研究分野：動物生殖科学

キーワード：繁殖 生殖 着床 受胎 妊娠 胚培養 体外受精 胚盤胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の特徴である妊娠は、胚が子宮の上皮に着床することで開始される。そのため、体外受精など培養系で操作した胚を産子にするために、レシピエント(受胎雌、仮親)への胚移植を行う。しかしながら、胚移植後に得られる産子率は低く、受胎率の改善は必須である。

ウシの体外受精と胚移植は、優良形質個体の効率的な増産法として実用化されている。しかし、受胎率は約 40% (受胎数 / 移植数)、産子生産率は約 23% (産子数 / 移植数) である。この値は移植数が増えることで、子宮への胚移植するステージである胚盤胞への発生率を約 50% と考えても、実際の受胎率は約 20%、産子生産率は約 12% と非常に低率である。ウシの受精卵移植は 20 年以上経過しているが、いまだ低率のままで改善できていないのが現状である。すなわち、体外作出胚における低受胎率の原因究明と対応技術の開発は、優良家畜の安定増産において、重要かつ必要不可欠な課題である。

胚発生や着床の分子機構に関する研究は、これまでも国内外で多くの研究が行われてきた。家畜においては、反芻動物特有の受胎に関わる分子機構の解明が進んでおり、この分野では我が国の成果はトップレベルである。母体側の生理機構などから受胎率改善への試みもなされている。しかしながら、ウシの受精卵移植における受胎率は一向に改善されていない。このことは、分子機構などの基礎研究の更なる推進に加え、それらの知見を基に、標的とする分子機構を賦活させる体外培養系を作出し、受胎率を改善するアプローチの必要性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胚が着床能力を獲得する分子機構の解析を行い、その結果を基に「体外で作出した胚の生産性は低い」という問題点を改善することにある。体外受精胚の移植は、受胎率および産子生産率が低く、これまでの多くの研究にも関わらず改善されていない。このことは、従来の研究に加え、新規のアプローチが必要であることを物語っている。

研究代表者の最近の結果は、着床関連因子を三つの因子群に分類する必要性を示している。すなわち、着床に必要な因子である因子 A 群、着床に必要な因子で着床時に局在の変化する因子 B 群、着床能力誘起時に発現するが着床期には消失しなければならない因子 C 群、である。本研究では、因子 A 群の解析を中心に展開し、マウス胚の着床能力に関連する機構を解析し、加えて胚移植後の着床率を向上させる体外培養系の構築を行った。

また因子 B 群の特性を明らかにするためノックアウトマウスの解析を行った。因子 B 群である *Tinagl1* は胚が着床能力を獲得すると同時に基底膜に移行する。これは基底膜の主要な構成成分であるラミニンより先に局在を示す。着床期の子宮においては脱落膜で発現した *Tinagl1* はインテグリンと複合体を形成している。これらの結果は *Tinagl1* が胚や子宮の細胞系譜や組織の分化に介在し着床の成立と妊娠の維持に関与している可能性を示唆している。また加齢による妊孕性低下が緩和されている可能性も考えられている。そこで本研究では *Tinagl1* ノックアウトマウスの卵巣機能に着目し、解析を行った。

ウシにおいては、マウスの胚着床過程で発現する因子の解析を行なった。また、研究代表者らが開発した、マウス胚盤胞の着床能力を活性化する培養液が、ウシの胚発生にどのような作用を及ぼすかを検討した。

3. 研究の方法

体外受精胚の着床率が改善するのは、通常の培養系では着床しない胚に正の効果があった結果である。一方、胚盤胞が着床能力を獲得する分子機構を明らかにするためには、負に作用する因子も同定し、それらを組合せて解析することが有効である。先行研究ではアミノ酸の組合せがマウス胚の着床率を正と負に制御することを示唆していた。そこで、アミノ酸処理を行なった胚盤胞を移植し、着床率を解析した。またアミノ酸がマウス胚の着床能力関連因子の発現に及ぼす作用を解析した。加えて、因子 B 群の遺伝子ノックアウトマウスの解析を行った。ウシにおいては、因子 A 群に分類されるタンパク質の発現動態解析を行なった。

4. 研究成果

マウス胚用の培養液に Arg または Leu を添加し、胚盤胞を培養後に胚移植を行ったところ、Arg は着床率を低下させたのに対し、Leu は着床率に影響しなかった。一方で、Arg と Leu の複合処理は着床率を上昇させた。

Arg は一酸化窒素 (NO) の材料となるので、NO 合成酵素 (NOS) の関与が考えられる。そこでマウス胚における NOS の発現動態を解析した。NOS には eNOS、iNOS などがある。また eNOS は Ca^{2+} 依存的に活性化されるが、 Ca^{2+} に依存せず 1,177 番目のセリン残基がリン酸化されて活性化するリン酸化型 eNOS (p-eNOS) がある。それらについて解析を行ったところ、Arg は eNOS の発現を上昇させることが明らかになった。

胚盤胞における NO 産生を非侵襲的なライブアッセイ法で解析することを目的として、NO 産生速度と測定時間の条件検討を行い、胚盤胞における至適測定条件を確立させた。NO 産生量は対照区と比較して Arg 処理により上昇する傾向を示した。

アポトーシスは、対照区と比較して Arg 処理区では変化がなかったが、Arg+Leu 処理区において減少する傾向があった。以上のことから、Arg+Leu 処理によるアポトーシスの減少が着床率を

上昇させた可能性が考えられた。

また因子 B 群の特性を明らかにするため Tinagl1 ノックアウトマウスの解析を行った。その結果、Tinagl1 が欠損することで加齢に伴うコラーゲン蓄積の進行が抑制され、排卵能力の低下が緩和されることが明らかになった。

ウシの胚発生過程において、マウスの胚着床過程で発現する因子 A 群に分類される BRCA1 タンパク質の発現動態解析を行なった。ウシの体外受精由来胚の着床前発生過程において、BRCA1 は発現が上昇し、胚盤胞においては栄養外胚葉に存在していた。

ウシ体外受精由来胚の受胎率が低い一因として、初期発生時における発生能の低下が考えられる。そこで、研究代表者らが開発したマウス胚盤胞の着床能力を活性化する培養液が、ウシの胚発生に及ぼす効果を検討した。プロラクチン、上皮成長因子、4-ヒドロキシエストラジオールの3因子を作用させたところ、発生ステージによって感受性が異なることが明らかになった。また胚移植の結果、受胎率を改善させる傾向が示された。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akaiwa Masato, Fukui Emiko, Matsumoto Hiromichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Tubulointerstitial nephritis antigen like 1 deficiency alleviates age dependent depressed ovulation associated with ovarian collagen deposition in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 50～57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12301	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 Chuanqiang Zhang, Nanako Suzuki, Hiromichi Matsumoto, Motoharu Miyamura, Hideki Tsuchiya, Seizo Hamano, Hiroshi Makino, Masanori Ochi, Midori Yoshizawa, Emiko Fukui.	4. 巻 36
2. 論文標題 BRCA1 expression on bovine pre-implantation embryos produced by in vitro fertilization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Mamm Ova Res	6. 最初と最後の頁 61～67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内栄作, 岡井大樹, 関美沙都, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 マウス胚盤胞においてアルギニンおよびロイシンがNOSアイソフォームの発現に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会112回大会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡井大樹, 竹内栄作, 赤岩将門, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 アルギニンおよびロイシンがマウス胚盤胞のNO産生に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会112回大会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内栄作, 関美沙都, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 AktがeNOSのリン酸化に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会111回大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤岩将門, 鈴木沙織, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 Tinagl1遺伝子欠損マウスにおいて加齢が卵巣における排卵能力およびコラーゲン蓄積に与える影響.
3. 学会等名 第73回関東畜産学会大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡井大樹, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 アルギニンおよびロイシンがマウス胚盤胞のNO産生およびアポトーシスに及ぼす影響.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎夢々果, 竹内栄作, 福井えみ子, 松本浩道.
2. 発表標題 アルギニンおよびロイシンで処理したマウス胚盤胞における同一胚のミトコンドリアとO ₂ 消費の解析.
3. 学会等名 日本繁殖生物学会113回大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高崎久子, 川田智弘, 宍戸容子, 湯澤裕史, 川田智弘, 関澤文夫, 松崎夢々果, 竹内栄作, 松本浩道, 福井えみ子.
2. 発表標題 ホルモン及び成長因子の培地への混合添加がウシ体外受精由来胚の発生能に与える影響の検討.
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会.
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 体外における哺乳動物胚を選別する方法	発明者 松本浩道	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-082968	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

動物育種繁殖学研究室 http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/anj/page/ikuhan.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	福井 えみ子 (Fukui Emiko) (20208341)	宇都宮大学・農学部・教授 (12201)	

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
---------	---------