

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19267

研究課題名（和文）異種ハイブリッド胎盤を用いた母子間認識の研究

研究課題名（英文）Study of recognition mechanism between mother and embryo using the xeno-hybrid placenta

研究代表者

磯谷 綾子（Isotani, Ayako）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：20444523

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）：免疫不全マウスの代理母にラット胚を移植しても妊娠は成立しない。すなわち、動物種特異的な母子間認識が存在することが示唆されていた。本研究にて、免疫不全マウスの代理母に移植したラット胚は、胎生5.5日目までは生存しているが、胚のサイズは小さく、胚体外組織が十分に増殖していないことが分かった。また、マウスとラットの8細胞期胚を集合させた異種間キメラ胚を免疫不全マウスの代理母に移植したところ、栄養芽細胞系列にラットの細胞は寄与していなかった。これらのことから、栄養芽細胞の増殖・分化は、異種の栄養芽細胞間では誘導されず、母体に由来する脱着膜との相互作用が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類において、妊娠の成立には、母体の子宮内膜と胚が相互に作用しあう母子間相互作用が必要不可欠である。最初の母子間相互作用である着床は、子宮に到達した胚（最外層に位置する栄養膜細胞）からのシグナルを受け、子宮内膜が肥厚して胚を包み込むように脱着膜が形成されてはじまる。本研究で、免疫不全マウスにラット胚や異種間集合キメラ胚を移植した実験により、脱着膜形成後に栄養芽細胞を含む異種の胚体外組織の増殖不全が認められ、母子間相互作用は、着床時だけでなく、脱着膜形成後も胚体外組織の増殖に重要であることが示された。このことは、原因不明の流産を繰り返す習慣性流産の原因解明につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：If rat embryos are transferred into an immunodeficient surrogate mouse mother, they do not make it a pregnancy. This suggested that there was species-specific recognition between the mother and embryo. In this study, rat embryos, which were transferred into the immunodeficient surrogate mice, survived at embryonic day 5.5, but the embryos were small in size, and the extraembryonic tissues were not fully proliferated. Furthermore, no rat cells contributed to the trophoblast lineage when interspecies chimeric embryos produced from mouse and rat 8-cell stage embryos were transferred into immunodeficient surrogate mice. These findings suggested that trophoblast proliferation and differentiation were not induced by the interaction with trophoblasts of different species and that interaction with the decidua derived from the mother may be important.

研究分野：実験動物学

キーワード：母子間認識 異種 胎盤 脱着膜 ハイブリッド

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の妊娠期における母体と胎児の関係は、免疫学的に非常に寛容なことが知られており、ヒトでも代理母が存在するように、同種間であれば、MHCの適合に関係なく妊娠が成立して子供が誕生する。しかし、異種胚移植の研究から異種間では、ほぼ妊娠が成立しないことが分かっている。この原因として、異種細胞に対する母体側の免疫応答による拒絶が起こっていると考えられてきた。一方、胎盤に分化しない多能性幹細胞と受精卵で作ったマウスとラットの異種間キメラを受精卵の種と同じ代理母に移植すると、異種間キメラ個体を誕生させることができる。すなわち異種の細胞を持つ胎児でも、母体と胎児を繋ぐ胎盤が同種で構成されれば、妊娠が成立する。このことから、胎盤に異種の細胞が含まれれば母体の免疫応答により拒絶されることが予想され、異種胚でも同様であると強く示唆された。

そこで、我々は、免疫学的な拒絶を回避するために、ラットだけでなくヒトの血液幹細胞移植が可能な免疫不全マウスを代理母として、異種のラット胚の移植を試みた。母体からの免疫応答を回避する目的の試みだったが、胎生 7.5 日までにラット胚の発生は停止し、異種胚妊娠が成立しないのは、免疫応答の有無だけではないことが示唆された。

これらのことから、妊娠成立のためには、非免疫学的で動物種特異的な母子間認識が存在している事が強く示唆されていた。

2. 研究の目的

- (1) 異種胚移植モデルを使い、非免疫学的で動物種特異的な母子間認識の実体を調べるために、ラットの細胞を拒絶しない免疫不全マウスを作製する。
- (2) 非免疫学的な母子間認識の実態を調べるために、代理母の子宮内膜に直接、接触する栄養芽細胞に着目し、代理母に移植した異種胚由来の栄養芽細胞の増殖・分化を調査する。

3. 研究の方法

(1) 代理母用免疫不全マウスの作製と、異種細胞に対する免疫応答の評価

① 免疫細胞のNK細胞と、獲得免疫細胞であるT細胞とB細胞が減少することが知られている *Il2rg* ノックアウト・マウス(*Il2rg*-KO マウス)と、獲得免疫細胞であるT細胞とB細胞を欠失する *Rag2* ノックアウト・マウス(*Rag2*-KO マウス)を *Crispr/Cas9* システムを用いて作製した。これらの免疫不全マウスを用いて、ラットES細胞を精巣被膜下に移植して、テラトーマ形成を行うことで、異種のラット細胞に対する免疫応答を評価した。

② 雌マウスを代理母にするためには、精管結紮した雄マウスと交配刺激が必要である。しかし、

排卵直前の状態にある雌マウスでなければ雄マウスは交配しない。このため、妊娠マウスや代理母マウスを効率よく作製するために、ホルモンアゴニスト(LHRHa)を用いた方法を開発し、作出した免疫不全マウスに対して適用可能かどうかを評価した。

(2) 免疫不全マウス代理母への異種胚、異種間キメラ胚、異種間ハイブリッド胎盤-胚の移植と胚発生の評価

① マウス代理母の子宮にラット胚盤胞を移植して、ラット胚の生存可能な時期、および栄養芽細胞の状態を調べた。

② マウスの栄養芽細胞とラットの栄養芽細胞が相互作用して増殖・分化するのかを調べるために、マウスとラットの 8 細胞期胚を集合させた集合キメラ胚を免疫不全マウスの代理母に移植し、胎盤へのラット細胞の寄与を観察した。

③ 4 倍体胚が胎盤系列として分化し機能することから、マウスの 2 細胞期胚の片方の割球にラット細胞を注入した異種間ハイブリッド胎盤-マウス胚を作製し、胚盤胞期胚までの発生率及びハイブリッド 4 倍体細胞の分布について観察した。

4. 研究成果

(1) ①アミノ酸をコードしている ORF を含むゲノム領域を欠失させた *Il2rg*-KO マウスと、*Rag2*-KO マウスをそれぞれ、独自に樹立し、これまでの報告と同様に各免疫細胞の欠失・減少をフローサイトメーターで確かめた。また、異種細胞に対する免疫拒絶を評価するために、*Il2rg*-KO マウスと、*Rag2*-KO マウスの精巣被膜下に GFP で標識されたラット ES 細胞を移植し、観察したところ、両方の KO マウスの体内でラット由来細胞が増殖し、テラトーマが形成されることが確かめられた。コントロールとしてラット ES 細胞を野生型マウスもしくは、ヘテロ欠損マウスに移植した場合は、テラトーマ形成は認められなかった。すなわち、*Il2rg*-KO マウスと、*Rag2*-KO マウスで共通して減少または、欠損しているキラー T 細胞と抗体産生 B 細胞の働きが異種細胞の排除に重要であることが示された。

②妊娠マウスや代理母マウスを効率よく作製するために、ホルモンアゴニスト(LHRHa)を用いた方法を開発し、作出した免疫不全マウスの雌に対しても適用できることを確かめた。

さらに、*Il2rg*-KO マウスでは、全身に循環している NK 細胞だけでなく、妊娠初期の脱着膜内に局在する uNK 細胞が欠損することも知られていた。このことを確かめるために、作出した *Il2rg*-KO 雌マウスに LHRHa を投与し、野生型の雄と交配させたのち、妊娠 7.5 日目の脱着膜を観察したところ、野生型雌の妊娠マウスでは、DBA で染色される uNK 細胞が認められたが、*Il2rg*-KO 雌では、検出されず、全身性の NK 細胞だけでなく、uNK 細胞も欠失していることが確かめられた。

(2) ① われわれは、重篤な免疫不全マウスを代理母にしてラット胚を移植した場合、脱着膜形成は認められるものの胎生 7.5 日までにラット胚の発生は停止し退行することを突き止めていた。しかし、この重篤な免疫不全マウスは、日和見感染でも死に直結し維持が難しいため、胚移植の実験は、結果を得るまでに死亡するリスクを伴う。このため、本研究にてラット細胞によ

るテラトーマ形成も可能であり、uNK 細胞も欠失する *Il2rg*-KO マウスを代理母に、ラットの胚盤胞期胚を子宮に移植して、ラット胚がいつまで生存しているのかを観察した。その結果、ラット胚は、少なくとも胎生 5.5 日目まで生存することが確かめられた。しかし、胚の大きさは同じ時期のマウス胚よりも明らかに小さく、特に胎盤の元となる胎盤外円錐などの胚体外組織が十分に増殖していないことがわかった。

② マウスとラットの異種間キメラ動物では、それぞれの種の細胞が 1 個体内で共存している。すなわち、異種間キメラ動物の体内で、内部細胞塊に由来するマウスとラットの細胞は、それぞれが相互に作用しながら発生・分化・成熟する。栄養芽細胞でもマウスとラットの細胞が相互に作用して増殖・分化するのかを調べるために、異種間集合キメラ胚を *Il2rg*-KO マウスの代理母に移植し、胎盤へのラット細胞の寄与を観察した。胎生 13.5 日目に解剖したところ、異種間キメラの胎児が存在していることが確かめられた。しかし、胎盤へのラット細胞の寄与は、わずかに内部細胞塊に由来する胎児血管のみで、栄養芽細胞由来の細胞には、認められなかった(図 1)。(2)-①、(2)-②の結果より、栄養芽細胞の増殖・分化は、異種細胞との相互作用では引き起こされず、母体に由来する脱落膜との相互作用が重要であることが示唆された。

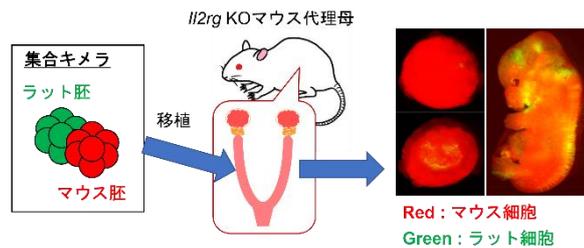


図 1 マウスとラットの異種間集合キメラ胚の免疫不全代理母マウスへの移植と個体発生。内部細胞塊に由来する胎児の組織は、マウスとラットの細胞から構成されていたが、栄養芽細胞に由来する胎盤はマウスの細胞のみから構成されていた。

③ マウスとラットのゲノム情報を合わ

せ持つ異種間ハイブリッド胎盤(栄養芽細胞)を作ることができれば、脱落膜から動物種特異的なシグナルを受けられ、異種間ハイブリッド胎盤が形成されるのではないかと考えた。4 倍体細胞が胎盤系列として機能することから、マウスの 2 細胞期胚の片方の割球にラット細胞を注入した異種間ハイブリッド胎盤-マウス胚を作製し、胚盤胞期胚までの発生率及びハイブリッド 4 倍体細胞の分布について観察した。同種のマウスであれば ES 細胞と TS 細胞を用いた場合で、胚盤胞期胚への発生率に違いは認められなかったが、ラット ES 細胞を用いた異種間ハイブリッド胎盤-胚では、胚盤胞期胚までの発生率がマウスに比べ著しく低下し、ほとんどの異種間ハイブリッド 4 倍体細胞は細胞分裂しておらず、ES 細胞を用いた異種間ハイブリッド胎盤の形成は期待できないことが明らかになった。

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 Takafumi Matsumura, Taichi Noda, Yuhkoh Satouh, Akane Morohoshi, Shunsuke Yuri, Masaki Ogawa, Yonggang Lu, Ayako Isotani, Masahito Ikawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Sperm IZUM01 Is Required for Binding Preceding Fusion With Oolemma in Mice and Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2021.810118. eCollection 2021.	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 Gema Puspa Sari, Patrick Louis Lagman Hilario, Shunsuke Yuri, Arata Honda, Ayako Isotani	4. 巻 12
2. 論文標題 Scheduled simple production method of pseudopregnant female mice for embryo transfer using the luteinizing hormone-releasing hormone agonist	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26425-2.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯谷綾子、Gema Puspa Sari
2. 発表標題 簡単な偽妊娠マウス作製法の検討
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://bsw3.naist.jp/isotani/>

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