

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450390

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受胎率を向上させる体外培養系の構築

研究課題名(英文) Molecular events involved in the completion of blastocyst implantation and development of in vitro culture system for implantation ability in embryos

研究代表者

松本 浩道 (Matsumoto, Hiromichi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：70241552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：体外受精胚の移植は、受胎率および産子生産率が低く、多くの研究にもかかわらず改善されていない。我々の最近の研究結果は、着床関連因子を三つの因子群に分類する必要性を示唆していた。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、それぞれの特性を示す因子の発現解析を行い、その制御機構について新たな知見を加えることができた。またその成果を基に、上流機構に関わる液性因子を培養液に加えることで、着床率を向上させる体外培養系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Implantation of a blastocyst into a receptive uterus involves a series of highly coordinated cellular and molecular events. Poor quality of embryos obtained by in vitro fertilization (IVF) is one of the major causes of implantation failure. Our study reveals that selective proteolysis in an activated blastocyst is associated with the completion of blastocyst implantation after embryo transfer. Furthermore, treatment with prolactin (PRL), epidermal growth factor (EGF), and 4-hydroxyestradiol (4-OH-E2) promoted the expression of BRCA1 in the trophectoderm (TE) of blastocysts in vitro. Blastocysts that were treated with combination of PRL, EGF, and 4-OH-E2 and then transferred into the uteri of mice exhibited an increased implantation rate. A better understanding of blastocyst biology during the peri-implantation period would facilitate further development of reproductive technology.

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

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。この値は移植数が分母であるので、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%と非常な低率である。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。申請者の最近の結果は、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。そこで本研究ではこの三つの因子群(因子A~C群)の発現動態の解析を基軸に胚の着床能力獲得を制御する機構解析を行う。また、その成果を基に受胎率を向上させる体外培養系を構築する。

B群についてはその特性を明らかにするためノックアウトマウスの作製を行う。またウシにおける受胎率改善のために高い経済形質をもつ黒毛和種子牛の効率的生産法を

討した。

3. 研究の方法

体外受精胚の移植は、受胎率および産子生産率が低く、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。我々の最近の研究結果は、着床関連因子を三つの因子群に分類する必要性を示唆していた。因子A群はこれまでの研究で標的とされてきた特性であるのに対し、因子B群とC群は我々の最近の研究結果を基に設定する必然性が示された、新たな特性と項目である。

またB群の特性を明らかにするためノックアウトマウスの作製を行った。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。そこで本研究ではTinagl1のノックアウトマウスの作製し妊孕性の解析を行った。

ウシにおいては、遺伝子型をデザインすることで高い経済形質をもつ黒毛和種子牛を効率的に生産できるかどうかを検討した。

4. 研究成果

本研究では、上記A~Cの三因子群の発現動態の解析を基軸に胚の着床能力獲得を制御する機構解析を行い、その成果を基に受胎率を向上させる体外培養系構築を展開した。

マウスの着床遅延モデルを用い、因子A群と因子C群を中心に解析を進めた。着床誘起胚において、エストロゲン受容体であるERαは胚盤胞の栄養外胚葉で発現が誘起されていた。この発現は培養6時間で消失した。タンパク質分解酵素であるプロテアソームの阻害剤MG132で処理するとERαの発現は維持された。これらの胚を子宮に移植したところ、ERαの発現が維持されている胚では低い着床率を示した。MG132でERαの発現が維持されている胚をER拮抗剤ICI 182,780で処理した胚盤胞を胚移植したところ、着床率は回復した。これらの結果から、マウス胚においてユビキチン-プロテアソームを介したERα分解が着床の成立に必要なことが示された。一方で、この過程において発現したBrca1は分解されていない。すなわち、Brca1は因子A群、ERαは因子C群、にそれぞれ分類できる。また、着床する際に必要なタンパク質分解は選択的に制御されていることが示された。

我々の最近の研究結果は、着床関連因子を三つの因子群に分類する必要性を示唆してい

た。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。因子A群はこれまでの研究で標的とされてきた特性であるのに対し、因子B群とC群は我々の最近の研究結果を基に設定する必然性が示された、新たな特性と項目である。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群の存在は示唆されていたものの具体的な分子とその消失機構は不明であった。本研究の結果、胚盤胞において発現するER α がユビキチン-プロテアソーム経路で分解されることが胚着床の成立に必要なことが明らかになった。また、因子A群としてBrca1が同定された。Brca1ノックアウトマウスは早期胚性致死になることが報告されている。よって因子A群の中でも重要性の高い機能を有していることが考えられた。

次に胚盤胞の体外培養系における着床に必要な因子の発現解析を行った。検討したのは因子A群として、Brca1のタンパク質の発現と局在を免疫蛍光染色法で解析した。胚盤胞の特性からも液性因子を選抜し、着床関連因子の上流因子を培養液に添加し検討した。その結果、プロラクチンが胚盤胞におけるBrca1タンパク質の発現を誘起することが明らかになった。また因子B群については、Tinagl1タンパク質の発現と局在を免疫蛍光染色法で解析した。その結果、4-ヒドロキシエストラジオール(4-OH-E₂)がBrca1タンパク質発現を誘起に加え、Tinagl1タンパク質発現と局在変化を誘起することが明らかになった。

さらに、着床に必要な因子の解析と体外培養系での発現評価を展開した。標的として検討したのは着床能力獲得時に発現する因子A群とB群に加え、C群も解析した。その結果、プロラクチン、EGF、4-OH-E₂の複合処理によりマウス胚盤胞においてBrca1、EGFレセプターおよびTinagl1の発現を賦活化することが明らかになった。この複合処理はC群であるER α の発現を賦活化することはなかった。これらの結果を受けてレシピエントマウスに胚移植を行った。その結果、上記の3因子の複合処理は着床率を向上させることが明らかになった。

因子B群であるTinagl1のノックアウトマウスの作製した結果、雌マウスで様々な不妊症状を示すことが明らかになった。すなわち表現型は6つに分類された。Type Iは膣栓がみられず交配しなかった個体、Type IIは膣栓がみられたが胎盤徴候がみられなかった個体、Type IIIは胎盤徴候がみられたが分娩しなかった個体、Type IVは死産または生存産子が2匹以下、Type Vは分娩するが産子が1週間に

内に半数以上死にいたるもの、Type VIは正常に分娩し産子が育つもの、であった。ホルモンによる排卵誘発の結果、排卵は正常におきた。また得られた排卵卵に体外受精をしたところ胚盤胞まで正常な発生を示した。これらの結果から、ノックアウトマウスで示された不妊症状は、卵巣機能の不全によるものではなく、子宮機能の異常によることが示唆された。

ウシにおいては、遺伝子型をデザインすることにより高い経済形質をもつ黒毛和種の子牛を効率的に生産できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Matsumoto H, Fukui E, Yoshizawa M. Molecular and cellular events involved in the completion of blastocyst implantation. *Reproductive Medicine and Biology*. 査読有. Vol. 32, 53-58, 2016.

DOI: 10.1007/s12522-015-0222-8.

Takahashi A, Rahim A, Takeuchi M, Fukui E, Yoshizawa M, Mukai K, Suematsu M, Hasuwa H, Okabe M, Matsumoto H. Impaired female fertility in tubulointerstitial antigen-like 1-deficient mice. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有. Vol. 62, 43-49, 2016.

DOI:http://doi.org/10.1262/jrd.2015-109.

Matsumoto H, Fukui E, Yoshizawa M. Angiogenesis and hormonal regulation on uterine receptivity for blastocyst implantation. *Journal of Mammalian Ova Research*. 査読有. Vol. 32, 79-85, 2015.

DOI:10.1274/jmor.32.79.

福井えみ子, 湯澤知子, 松本浩道, 川野辺章夫, 櫻井由美, 大島藤太, 北條享, 新楽和孝, 桑波田暁子, 越知正憲, 吉澤緑. 遺伝子型をデザインした黒毛和種の効率的作出の試み. *日本畜産学会報*. 査読有. Vol. 86, 375-378, 2015.

http://doi.org/10.2508/chikusan.86.375.

Sakurai M, Sato Y, Mukai K, Suematsu M, Fukui E, Yoshizawa M, Tanemura K, Hoshino Y, Matsumoto H, Sato E. Distribution of tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 and structural matrix proteins in mouse embryos during preimplantation development in vivo and in vitro. *Zygote*. 査読有. Vol. 22, 259-265, 2014.

DOI: 10.1017/S0967199412000469.
Saito K, Furukawa E, Kobayashi M, Fukui E, Yoshizawa M, Matsumoto H. Degradation of estrogen receptor α in activated blastocysts is associated with implantation in the delayed-implantation mouse model. *Molecular Human Reproduction*. 査読有. Vol. 20, 384–391, 2014.
DOI: 10.1093/molehr/gau004.

〔学会発表〕(計 11 件)

鈴木なな子, 福井えみ子, 松本浩道, 川野辺章夫, 櫻井由美, 北條享, 中山一大, 岩本禎彦, 桑波田暁子, 越知正憲, 吉澤緑. 優れた経済形質を有するホルスタインにおける SNP 解析によるマーカー遺伝子の解析. 第 70 回関東畜産学会大会. 2015 年 11 月 20 日. 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市).

竹内美紀, 高橋明仁, 古川悦子, 福井えみ子, 吉澤緑, 松本浩道. PRL, EGF, 4-OH-E₂ 複合添加培地で培養したマウス体外受精由来胚盤胞の着床能力. 日本繁殖生物学会 108 回大会. 2015 年 9 月 17-20 日. 宮崎大学 (宮崎県宮崎市).

鈴木なな子, 福井えみ子, 松本浩道, 土屋秀樹, 宮村元晴, 濱野晴三, 桑波田暁子, 越知正憲, 吉澤緑. 定量 PCR を用いたウシ初期胚における BRCA1 遺伝子の発現動態. 第 56 回日本卵子学会. 2015 年 5 月 30-31 日. 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市).

西萌香, 中里千帆, 福井えみ子, 松本浩道, 桑波田暁子, 越知正憲, 吉澤緑. 体外受精に由来するマウス多前核胚からの産子作出. 第 56 回日本卵子学会. 2015 年 5 月 30-31 日. 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市).

松本拓也, 磯部 圭祐, 佐々木亜美, 福井えみ子, 松本浩道, 桑波田暁子, 越知正憲, 吉澤緑. 老齢モデルマウスを用いた卵核胞置換由来胚の発生率の改善. 第 56 回日本卵子学会. 2015 年 5 月 30-31 日. 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市).

鈴木なな子, 福井えみ子, 土屋秀樹, 宮村元晴, 濱野晴三, 松本浩道, 吉澤緑. ウシ胚盤胞における BRCA1 遺伝子の発現解析. 第 31 回動物生殖工学研究会. 2014 年 12 月 6 日. 北里大学 (東京都港区).

高橋明仁, 古川悦子, 齊藤恭佑, 福井えみ子, 吉澤緑, 松本浩道. 着床に関連するタンパク質の発現を誘起させる因子の複合添加培養が着床に与える影響. 第 59 回日本生殖医学会学術講演会. 2014 年 12 月 4-5 日. 京王プラザホテル (東京都新宿区).

中里千帆, 吉澤緑, 松本浩道, 福井えみ子, 桑波田暁子, 越知正憲. マウス多精

子新入由来多前核卵の胚盤胞における染色体分析. 第 55 回日本卵子学会. 2014 年 5 月 17-18 日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市中央区).

磯部圭祐, 松本拓也, 福井えみ子, 松本浩道, 荒木泰行, 荒木康久, 桑波田暁子, 越知正憲, 若山照彦, 吉澤緑. 高齢マウス由来卵子の卵核胞置換による体外受精率の改善. 日本生殖再生医学会第 9 回学術集会. 2014 年 3 月 16 日. 大阪国際会議場 (大阪府大阪市).

磯部圭祐, 可兒知加子, 福井えみ子, 松本浩道, 桑波田暁子, 越知正憲, 若山照彦, 吉澤緑. Multicolor-FISH を用いた高齢マウス卵子の第一減数分裂期における染色体分析. 日本生殖再生医学会第 9 回学術集会. 2014 年 3 月 16 日. 大阪国際会議場 (大阪府大阪市).

中里千帆, 福井えみ子, 松本浩道, 桑波田暁子, 越知正憲, 吉澤緑. 体外受精により作出されたマウス多前核胚の第 1 卵割期紡錘体観察および 2 細胞期における染色体分析. 第 68 回関東畜産学会大会. 2013 年 11 月 15 日. 東京大学 (東京都文京区).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 浩道 (MATSUMOTO, Hiromichi)
宇都宮大学・農学部・准教授
研究者番号: 70241552

(2) 研究分担者

福井 えみ子 (FUKUI, Emiko)
宇都宮大学・農学部・准教授
研究者番号: 20208341

吉澤 緑 (YOSHIZAWA, Midori)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号: 60114162