

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 小田 佳奈子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 574 号
学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 初期胚の体外培養がマウスの個体発生に及ぼす影響

論文審査委員 主査 教授 崎村 建司
副査 教授 那波 宏之
副査 教授 笹岡 俊邦

博士論文の要旨

【目的】

申請者らは生殖工学的操作を用いて日々マウスを生産しているが、その中で、オスの体重が増加する傾向を見いだした。生殖工学的操作はマウスの生産に広く活用されているが、申請者は体外培養が初期胚の発生および個体発生に及ぼす影響を明確にするため、体外培養した初期胚の発生の早さ・細胞数・遺伝子発現の解析、および体外培養胚から生産した個体と自然交配で得た個体の主要な臓器重量の比較等の解析を行った。

【方法】

メスマウスは C57BL/6N Cr1Cr1j をオスマウスは GFP トランスジェニックマウスを使用し体外受精により胚を得た。媒精後 6 時間に前核の形成を確認し、受精判定を行った。組換えヒトアルブミンを添加し、マウス胚を KSOMaa 培地または MW 培地で培養を行ったものを体外培養 (In vitro) 胚とし、媒精後 8 時間までに偽妊娠マウスに移植を行ったものを母体内発生 (In vivo) 胚とし、解析には卵管および子宮から灌流し得られた胚を用いた。胚の形態および発生の解析は、媒精後 8 時間から 24 時間ごと実体顕微鏡下で観察した。免疫染色は、媒精後 96 時間の胚で、内部細胞塊 (ICM) は抗 Oct3/4 抗体で栄養外胚葉 (TE) は抗 Cdx2 抗体で染色した。TUNEL 染色は常法に従って行った。個体の作成は、体外培養 (In vitro) 胚は、媒精後 72 時間まで培養した後、偽妊娠 2.5 日雌の子宮に移植を行った。In vivo 胚は、媒精後 8 時間までに偽妊娠 0.5 日雌の卵管に移植した。妊娠 19.5 日目に、自然分娩および帝王切開にて産仔を得た。体重の測定は、出生後 4 週までは 7 日毎、その後は 4 から 5 週間隔で出生後 52 週まで行った。臓器重量は、出生後 52 週間飼育した後、測定した。内臓は舌から直腸までの胸腔内臓器、腹腔内臓器および臓器周囲の脂肪を繋いで採材した。臓器は、脳、脾臓、肝臓、心臓、腎臓、前頸骨筋を、オスにおいては精巣を採材し、臓器周囲の脂肪等を除いて臓器実質重量を測定した。インプリント遺伝子と分化マーカー遺伝子の発現解析は、媒精後 96 時間の胚盤胞期胚を用いて mRNA 発現の解析を qRT-PCR を用いて行った。

【結果】

媒精後 24 時間から 96 時間まで経時的に実体顕微鏡下で体外培養胚と母体内発生胚の形態を観察した結果、胚の発生形態に違いがあることが観察され、In vitro rKSOMaa 区および In vivo 区では高率で胚盤

胞期胚へと発生することが分かった。胚盤胞期胚への発生時期を解析したところ、In vitro rKSOMaa 区は他の二区と比較し、胚盤胞期胚への発生が早いことが観察され、培養培地の違いによっても発生率に違いが見られた。免疫抗体法を用いて簡便に媒精後 96 時間における内部細胞塊(ICM)および栄養外胚葉(TE)の細胞数を計数した結果、In vitro rKSOMaa 区では、In vivo 区と比較して、ICM 数は少ない($p < 0.05$)が、TE 数は多く($p < 0.05$)、総細胞数はほぼ同じであった。In vitro rMW 区では、In vitro rKSOMaa 区と比較して、ICM 数、TE 数、総細胞数のいずれも少なかった($p < 0.05$)。TUNEL 法を用いて媒精後 96 時間におけるアポトーシス細胞数を計数したところ、In vitro rKSOMaa 区および In vivo 区と比較し In vitro rMW 区で有意に高かった($p < 0.05$)。胚移植を行い、妊娠 19.5 日目における産仔への発生数と総着床数を計数した。In vitro rKSOMaa 区では総着床数が多いにもかかわらず、In vivo 区よりも産仔への発生数が有意に低かった。In vitro rMW 区は産仔率、総着床率共に低い結果であった。体重および臓器重量を In vitro rKSOMaa 区、In vivo 区(In vivo(IVF))および自然交配後母体内発生胚(In vivo(NM))間で比較した。出生後 52 週では In vitro rKSOMaa 区で体重が重く、メスマウスでは内臓以外の組織の重量において、In vitro rKSOMaa 区が In vivo(IVF)および In vivo(NM)両区よりも有意に重かった($p < 0.05$)。オスマウスでは内臓重量において In vitro rKSOMaa 区が In vivo(NM)区よりも有意に重かった($p < 0.05$)。

インプリント遺伝子と分化マーカー遺伝子の発現解析では、In vitro rKSOMaa 区では In vivo 区に対して、インプリント遺伝子である H19 の発現は低く、また、栄養外胚葉の分化マーカーである Cdx と未分化細胞マーカーである Nanog は有意に高い値を示した。

【考察】

今回申請者が行った検討の結果、マウス初期胚は体外培養を行うと、母体内発生胚と比較し、胚の形態、発生時期、ICM 数および TE 数に差を生じ、さらに出生時の産仔率の低下並びに成熟個体の体重の増加という個体への発生に大きく影響を受ける事が明らかとなった。また、体外培養下において胚盤胞期におけるインプリント遺伝子の発現量の低下が観察された。このことは、体外培養によりインプリント遺伝子のメチル化状態がリセットされていない部分があることを示唆している。また、分化マーカー遺伝子 Cdx が高い値を示したことは、TE 数が多い事が要因と考えられた。未分化マーカー Nanog も高い値を示したことは、ICM 細胞当りの発現量上昇の可能性が考えられた。体外培養に使用する培地の違いによりマウス初期胚の発生に大きな違いを生じた。また、DNA の断片化が多く起こっていることは、産仔率と着床率の低さ、すなわち個体への発生に影響することが考えられる。

【結論】

体外培養胚は、母体内発生胚に比べて胚盤胞期胚へ高効率で早く発生するが、インプリント遺伝子および分化マーカー遺伝子の発現に変化が見られ、出生時の産仔率に差があった。また、体外培養胚由来の個体は、自然交配由来の個体に比べ、成熟期の体重・臓器重量が増加していた。本研究により、自然交配と同等の動物生産に向けて体外培養を最適化する指標が明らかとなった。

審査結果の要旨

本研究は、人工授精や体外培養したマウス胚から得られる産子が、自然分娩されたマウス個体と差異があるか否かを検証したものである。この目的のために、C57BL/6N 雌マウスと GFP トランスジェニック雄マウスの体外受精により得た胚を、2 種類の培地で後期胚盤胞まで培養後子宮内へ移植したもの、人工授精確認後早期に卵管移植したものと及び自然交配したものをそれぞれ用いて、胚の発生、着床と産子の生育、産子の体重や臓器の重量などを解析した。その結果、KSOMaa 培地で培養すると生体内で育成した胚よりも

早く発生が進むが、内部細胞塊の細胞数は少なく、子宮に移植すると着床するが、発生が途中で止まる割合が高いことが見いだされた。また、得られた産子の体重は、雌では胚盤胞まで培養した群で重く、それは皮下脂肪の重量増加によると考えられた。一方雄では、人工授精した胚は培養の長さにかかわらず体重が増加し、それは内臓脂肪の増加によると考えられた。さらに、インプリント遺伝子の発現解析で、胚盤胞まで培養すると、当該遺伝子 H19 の発現が減少していることが明らかになった。本研究により、自然交配と同等の動物生産に向けて体外培養を最適化する指標が明らかとなったことに本論文の学位論文の価値を認める。