

新しいウシ受精卵培養系の開発による細胞分化機構の解明

～ウシの基本設計の解明から畜産学の発展に期待～

ポイント

- ・従来培養法では不可能だった受精後 10 日目以降へのウシ受精卵培養系の構築に成功。
- ・ウシ受精卵における細胞分化機構がマウスなど他の哺乳類と異なることが判明。
- ・受精卵移植により個体作出能力が確認されたことで、新たなウシ改良増殖法開発に寄与。

概要

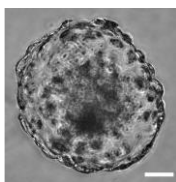
北海道大学大学院農学研究院の川原 学准教授と同大学院農学院博士課程の秋沢宏紀(現・マサチューセッツ大学博士研究員)らの研究グループは、同大学院獣医学研究院及び東京農業大学の研究グループと共同で、新規ウシ胚培養系を開発、これまで培養不可能だった受精後 10 日目以降の発生ステージまで胚を効率よく発生させることに成功し、さらに受精後 10 日まで体外培養したウシ胚から正常に個体発生することを初めて証明しました。

本研究では、アガロースゲルを培養基質として用いた新規ウシ胚培養系を開発し、ウシ胚盤胞期以降の胚生存性が従来法に比べて平均生存日数が 2.5 日延長することを見出しました(図 1)。この「ゲル培養」により作出した胚では、将来胎盤となる栄養外胚葉^{*1}に特有の遺伝子発現や形態的特徴が体外で再現されると同時に、従来法では判然としなかった内部細胞塊^{*2}からの胚盤葉上層^{*3}と原始内胚葉^{*4}への分化が明瞭に観察され、体内同様の発生過程を経ていることが確かめられました。さらに、ゲル培養胚の発生能力を調べるために、本学北方生物圏フィールド科学センターで飼育されている雌ウシを受胎牛として受精卵移植したところ、着床し妊娠が継続され個体発生能力が確かめられました。体外環境で 10 日間培養したウシ胚からの個体作出は世界で初めての事例となります。

また、本培養法によって、これまで不明瞭だったウシ胚の発生機構が調査できるようになりました。さらに、本研究によって従来よりも長く体外培養しても受精卵移植により個体作出できることが明らかになったため、発育能力をより厳密に見極められるようになりました。そのため、初期胚の時点で発生停止してしまう胚を効率的に排除して動物生産を効率化できる可能性が示されました。加えて、従来よりも細胞増殖させてから移植できるようになったため、受精卵での遺伝子検査に対応した新しいウシ改良増殖システムの展開に繋がることが期待されます。

なお、本研究成果は、2021 年 9 月 27 日(月)公開の米国科学誌 The FASEB Journal にオンライン公開されました。

従来



新規培養系



新規培養法により得られたウシ胚

【背景】

受精卵は、受精後一定期間は循環器系の観点で母体とは独立しているものの、更なる成長を遂げるために子宮に着床し、胎盤形成することによって分娩後の母体からの自立に備えることとなります。すなわち、着床前までは母体への依存度が低いので、理論上体外培養が可能であると考えられています。マウスやヒトでは、胚盤胞期と呼ばれる発生ステージの直後に着床するので、受精卵の体外培養は基本的に胚盤胞期までとなります。そして、ウシでも受精後8日の胚盤胞期胚まで発育した受精卵が個体生産に利用されているのが一般的です。しかし、マウスやヒトとは異なり、ウシを含む多くの哺乳類では、胚盤胞期直後ではなく更に発生を継続した後に着床することが知られています(図1)。ところが、ウシでは胚盤胞期以降への発生培養系が確立していないため10日目以降のウシ胚の発生は解析ができず、ウシ着床前胚の発生機序の詳細についてこれまで不明でした。

【研究手法】

哺乳類の受精卵は、胚盤胞期という発生ステージに至る過程で最初の分化が起こります。一段階目として、胚内で将来主に胎盤を形成する栄養外胚葉 (Trophectoderm: TE)と、それ以外の胎子成分を形成する内部細胞塊 (Inner Cell Mass: ICM)にそれぞれ分化します。続いて二段階目として、ICMはさらに胚盤葉上層 (Epiblast: Epi)と原始内胚葉 (Primitive Endoderm: PrE)へと分化し、Epiが胎子を、PrEが卵黄嚢をそれぞれ形成していきます。したがって、TE、Epi、及びPrEの3成分の形成が胚発生に必須となります。これをウシ胚で分析できるように、二段階目の細胞分化が起きる過渡期である受精後8日目の胚の培養をゲル上で培養する方法を考案しました(図2)。次に、TE、Epi、及びPrEの3成分の各種分子マーカータンパク質を免疫染色法で可視化することにより、受精卵の分化状態を調べました。最後に、ゲル培養胚の発生能力を決定するために、受精卵移植して着床能力及び妊娠満期までの個体形成能力を評価しました。

【研究成果】

従来の培養液微小滴中で培養する方法では、培養8日目以降に徐々に胚が変性していきますが、ゲル上で気液境界面培養に供したところ、劇的に生存性が向上することがわかりました(図1)。培養9日目以降も順調な発育を示し、生体ウシより回収した体内由来胚と遜色のない細胞数にまで発育できることが判明しました(図2)。しかし、単に細胞数が増加しただけでは受精卵の分化能力については不明なため、次に細胞分化の状態について分析しました。その結果、TE、Epi、及びPrEの3成分の各種分子マーカータンパク質を、これまでの体内由来胚の知見と齟齬の無い局在様式で発現していることがわかり、本培養系で作出した受精卵が正常な分化能力を維持していることが示唆されました(図3)。さらに、個体までの発生能力の有無を決定的に証明するために受精卵移植を実施したところ、論文投稿時で妊娠240日以上の子の生存を確認しました。ウシの平均妊娠日数は280日ではほぼ妊娠満期に達する状態まで発生することが示されたので、ゲル培養胚は正常な個体発生能力を有しているといえます(図4)。なお、本研究は、本学が保有する充実した畜産学研究設備と優秀な技術職員のサポートならびに東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの御支援により達成されました。

【今後への期待】

受精卵は新しい生命の源となる特殊な細胞塊のため個体形成の基盤形成と捉えることができます。そのため、命が形作られる基礎を成す受精卵分化は、古くからそして現在も多くの研究分野の研究者たちが多大な関心を持って研究を進めています。哺乳類受精卵の体外培養は、農学における家畜生産、

動物生命科学における発生工学的基盤技術ならびに医学における不妊治療を背景として社会の要請に応える形で目覚ましく発展した生殖技術ですが、マウスやヒトとは異なる発生様式を示すウシなどの動物種では未完成であり、更なる研究が求められています。本研究で開発したゲル培養によるウシ受精卵の作製が更に発展することで、ウシ受精卵の発生機序の理解、それに基づいた新たなウシ改良増殖技術の提案と創出といった、基礎生物学から畜産学の発展にまで広範な分野への波及効果が期待されます。例えば、従来法と比べて長く培養ができるようになったためウシ生存胚のスクリーニングの厳密化や能力評価のための遺伝子検査用細胞検体の採取効率化に寄与できるかもしれません。

論文情報

論文名	Deciphering two rounds of cell lineage segregations during bovine preimplantation development (ウシ着床前胚における細胞分化機構の解明)
著者名	秋沢宏紀 ¹ , 斎藤 隼 ¹ , 郡 七海 ¹ , 古川瑛理 ² , 林 芳弘 ¹ , 唄 花子 ³ , 永野昌志 ⁴ , 柳川洋二郎 ² , 塚原隼人 ¹ , 高橋昌志 ⁵ , 加川真二郎 ¹ , 川原玲香 ⁶ , 小林久人 ⁷ , 河野友宏 ⁸ , 川原 学 ³ (¹ 北海道大学大学院農学院, ² 北海道大学大学院獣医学研究院, ³ 北海道大学大学院農学研究院, ⁴ 北里大学獣医学部, ⁵ 北海道大学大学院国際食資源学院, ⁶ 東京農業大学生物資源ゲノム解析センター, ⁷ 奈良県立医科大学医学部, ⁸ 東京農業大学応用生物科学部)
雑誌名	The FASEB Journal (米国科学誌)
DOI	10.1096/fj.202002762RR
公表日	2021年9月27日(月)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院農学研究院 准教授 川原 学 (かわはらまなぶ)

T E L 011-706-2541 F A X 011-706-2541 メール k-hara@anim.agr.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.agr.hokudai.ac.jp/r/lab/animal-genetics-and-reproduction>

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

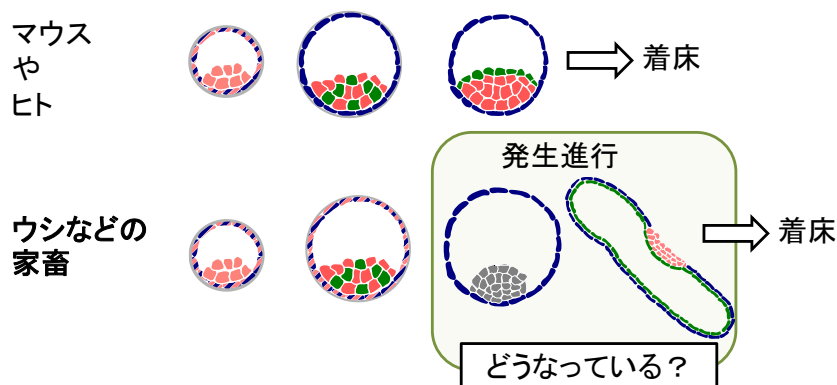


図1. 着床前の発生の違い

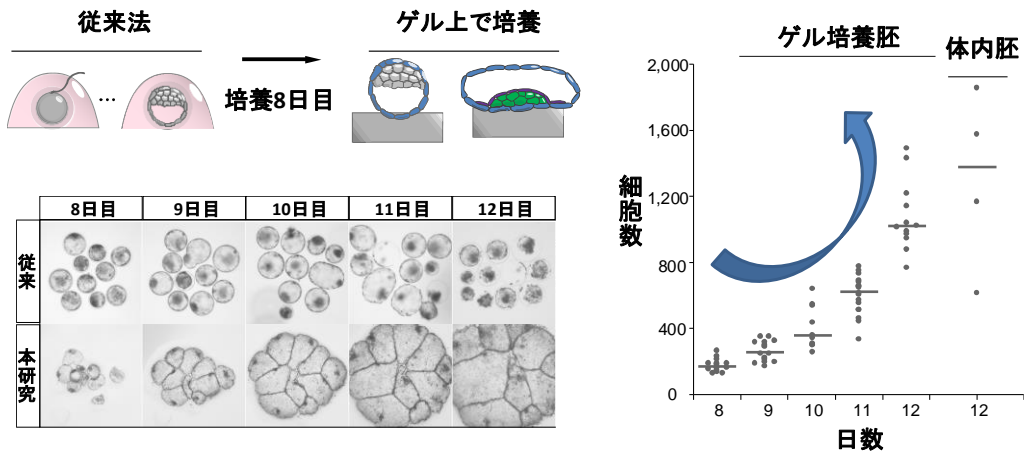


図2. ウシ胚のゲル培養による生存性向上

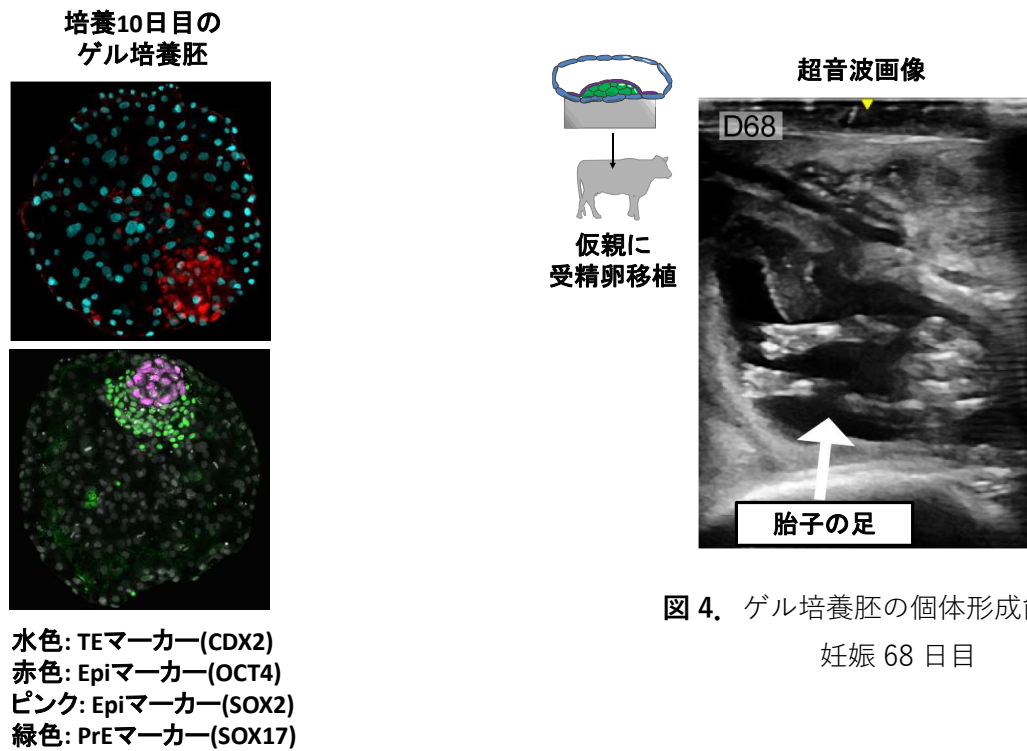


図4. ゲル培養胚の個体形成能
妊娠 68 日目

図3. ゲル培養胚の細胞分化

【用語解説】

- *1 栄養外胚葉 (Trophectoderm: TE) … 胚盤胞期の受精卵において外周に位置する細胞集団のこと。将来主に胎盤を形成する。
- *2 内部細胞塊 (Inner cell mass: ICM) … 胚盤胞期の受精卵において内部腔所内で偏在している細胞群のこと。胚盤葉上層と原始内胚葉とに派生しながら胎盤以外の部分を形成する。
- *3 胚盤葉上層 (Epiblast: Epi) … 内部細胞塊から発達して、胎子を構成するあらゆる組織を構築する。
- *4 原始内胚葉 (Primitive endoderm: PrE) … 内部細胞塊から派生するが、胎子本体には寄与せずに卵黄嚢などを形成する。