

氏 名 亀水 千鶴

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2091 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 マウス発生休止胚の解析

論文審査委員 主 査 教授 吉田 松生  
教授 藤森 俊彦  
教授 高田 慎治  
教授 佐々木 洋  
大阪大学大学院生命機能研究科

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 亀水 千鶴

論文題目 マウス発生休止胚の解析(Analysis of mouse embryos in diapause)

Mouse fertilized eggs begin development in the oviduct, and embryos are transferred to the uterus and implant at the blastocyst stage. When embryos fail to implant, their development fails to progress and instead regresses. Therefore implantation is an important process for development. In many mammals, embryonic development is suspended at the blastocyst stage, and its development is reinitiated after a certain period to undergo implantation. This phenomenon is called “diapause”. Because the pre-implantation is prolonged, diapause is also called delayed implantation. In the mouse, diapause can be induced naturally during lactation after postpartum ovulation and successful mating. And it can be also induced experimentally by ovariectomy (OVX) on the morning of the pregnant female at day4 after the fertilization.

However, molecular mechanisms underlying the entry into diapause and how blastocysts pause their development are almost unknown. To understand how embryos enter the diapause, and how embryos are maintained during the diapause, I examined embryos in diapause. In this study, embryos in diapause (D4.5~D10.5) was recovered after the OVX, and ability of implantation and embryogenesis, differentiation properties of cells, number of cells and cell cycle status were examined. Dormant embryos at seven stages of D4.5, D5.5, D6.5, D7.5, D8.5, D9.5, and D10.5 after diapause induction were subjected to experiments. “D” corresponds the dormant embryo, and the following number indicates the period (days) after fertilization.

I tested whether dormant embryos are capable of implantation and further development over the period from D4.5 to D10.5. Embryos of D4.5 and D10.5 were transplanted into the uterus of a female mouse on the 2.5 day of

pseudopregnancy, and embryos were collected 9 days after transplantation to observe morphology of developing embryos. Diapause embryos from D4.5 to D10.5 had the ability to implant and generate developed embryos.

I next examined whether cells in embryos in diapause are maintained as normal preimplantation blastocysts. From the antibody staining for differentiation markers for each cell type, it was suggested that differentiation properties of cells in diapause embryos were maintained similar to the intact pre-implantation embryos.

I examined cell number in dormant embryos until 7 days (D4.5 to D10.5) after the induction of diapause by ovariectomy and P4 administration. Nuclei in each embryo visualized by Hoechst staining were counted after capturing images with a confocal microscope. The captured images were re-constructed in 3D and the number of nuclei was counted. From D4.5 to D10.5, number of cells in diapause embryos increased for a while after induction of the diapause, but remarkable increase was not observed after that.

To clarify cell cycle in each cell in dormant embryos, I utilized R26-Fucci2, a cell cycle reporter mouse line, where nuclei in S to M phase and G1/G0 phase are visualized in green and red fluorescence, respectively. Embryonic diapause was induced after the wild type ICR females were crossed with the R26p-Fucci2 males. Embryos between D4.5 and D10.5 were collected and placed in PBS immediately, and observed with a confocal microscope. Almost all of the cells entered in G1/G0 phase in later stages. The transition of cell cycle varied depending on the region within each blastocyst. I tried to identify whether the cells of dormant embryos are in the G1 or G0 phase by Ki67 antibody staining. In diapause embryos, eventually all of the cells had entered the G0 phase in later stages.

In this study, dormant embryos with different periods during diapause were observed. D4.5~D10.5 diapause embryos were capable for implantation and further development, and cellular differentiation status was resembled to the normal

preimplantation embryos. Cell number of dormant embryos increased but reached plateau in later stages of embryonic diapause. From the results of direct counting of the number of cells and observation of cell cycle by Fucci2 and Ki 67 staining, it is suggested that the dormant embryos can be classified into the 4 stages.

These results suggest that the initiation of embryonic diapause has multiple steps and the mechanisms involved in dormancy may be distinct between embryonic regions.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 亀水 千鶴

Title  
論文題目 マウス発生休止胚の解析

マウス胚は卵管で受精した後に卵管で発生を開始し、子宮に移動した胚盤胞の段階で着床する。多くのほ乳類の種において、胚盤胞の段階で発生を一旦止める現象が知られており、発生休止と呼ばれている。一旦発生を休止した胚は、その後子宮内の環境が整うと着床し発生を再開する。発生休止が誘導され、胚盤胞の段階で発生を休止しつづける分子機構については未解明である。

申請者は、マウスの発生休止胚を経時的に観察することによって、胚盤胞がどのようにして発生休止状態に入り、発生休止から復帰するかを明らかにすることを目指した。実験的に発生休止を誘導するために、受精後 3 日目の午前に妊娠マウスの卵巣を除去し、その後毎日プロジェステロン投与した。発生休止誘導後 1 週間にわたって経過を解析した。まず、発生休止が確実に誘導できているかを確認するために、休止誘導後の各段階において胚盤胞を回収し、2.5 日目の偽妊娠マウスの子宮に移植した。全ての段階の発生休止胚は、移植後着床し、胚発生が問題なく進められたことから、発生休止の誘導が確実に行われていた。休止期間が長くなると、移植後の胚発生の遅延がみられたことから、発生再開までに時間を要することが示唆された。

各段階の発生休止胚を形態的に観察すると、休止中の胚は透明帯からハッチしており、着床前の胚盤胞に比較してサイズが大きく、胚-非胚軸 (Em-Ab 軸) に沿って伸長していた。子宮内では、胚は子宮上皮には直接接触しておらず、子宮上皮の上皮構造も維持されており、脱落膜反応も見られていないことから、着床時に見られる子宮の反応が無いことが示唆された。発生休止中の胚について、細胞分化、細胞数、細胞周期に着目して解析を進めた。休止中の胚の細胞が分化状態をエピプラスト、原始内胚葉、栄養外胚葉のそれぞれのマーカーである Nanog, Gata4, Cdx2 を抗体染色して確認した。これらのマーカーは発生休止の全ての時期において発現しており、原始内胚葉とエピプラストは混在せず層構造を形成していたことから、正常発生における着床直前の状態で分化状態は維持されていることが示唆された。次に、発生休止中の胚の中での細胞数の変化を直接解析した。休止中の胚をヘキストで核染色した後に、各胚での全細胞数を数えた所、休止誘導して 3 日目までは緩やかに細胞数の増加が見られ、その後約 200 個で細胞数が一定となった。分化マーカーと核染色とを比較したところ、分化形質と細胞数の増加に関しては明確な関連は見られなかった。次に、細胞周期を可視化するための R26-Fuscci2 マウスを用いて、休止胚を回収後ただちに観察した。非休止胚の胚盤胞はほぼ全ての細胞では緑色の蛍光がみられ、G1 あるいは G0 期は短い。一方で発生休止胚については、内部細胞塊から離れた(非胚領域の)栄養外胚葉ではほとんどの胚で赤色の蛍光がみられたことから、G1 あるいは G0 期であった。休止後 1 日目には内部細胞塊だけでなく、胚側の栄養外胚葉においても緑色の蛍光が

見られる細胞が存在していたが、休止時期が長くなるに従って、栄養外胚葉は赤色の蛍光のみとなり、6日目にはほぼ全ての細胞が赤色となった。このことから、発生休止誘導後、全ての細胞が同時に細胞周期を止めるのではなく、非胚側の栄養外胚葉から細胞周期を止め、やがて胚側の栄養外胚葉、最後に内部細胞塊領域で細胞周期が止まることが示唆された。細胞周期特異的なタンパク質の分解を利用した細胞周期マーカーである Fucci2 では、G1 期と G0 期を判別することができない。そこで、別の細胞周期マーカーである Ki67 抗体を用いて各段階の発生休止胚を染色した。細胞周期の止まり方については、Fucci2 を用いた観察と同じ傾向がみられた。休止誘導後 6 日目にはわずかに Ki67 陽性細胞が存在していたが、休止誘導後 7 日目には全ての細胞が Ki67 陰性であった。このことから、細胞周期は非胚領域から緩やかに停止し、休止誘導後 7 日目には全ての細胞が G0 期にあることが示唆された。

発生休止からの発生の再開に関して、胚盤胞の中で領域や細胞の分化状態によって違いがあるかについて調べる為に、発生休止中の R26-Fucci2 マウス胚を培養し、Fucci2 マーカーの発現を観察した。それぞれの休止段階から回収した胚を 24 時間培養して観察を行うと、全ての胚において胚側の領域で緑色の蛍光が見られた。休止後 7 日目の胚の培養では他の胚に比べて緑色へと変化した細胞数は少なかった。詳細な変化を確認するために、休止後 3 日目、7 日目の胚を培養し、タイムラプス観察を行った。核の蛍光が赤色から緑色へと変換することが観察され、培養開始から核の色の変化に要した時間は休止誘導後 7 日目の胚の方が長い傾向がみられた。これらの結果から、発生休止胚が発生を再開する際には、胚側から再開し非胚側へと広がること、発生休止期間が長くなると発生再開に要する時間も長くなることが示唆された。

以上の結果から、マウス胚の発生休止は段階的に起きることが示された。また、発生休止誘導後には、非胚側から細胞周期が緩やかに止まり、やがて胚全体へと広がり、この間それぞれの細胞の分化形質は維持されたままである。発生休止胚が発生を再開する際には逆に胚側から細胞周期が再開することも示された。上記の観察から、発生休止シグナルを胚が受ける際には、着床の際に直接子宮上皮と接触する非胚領域から胚全体へと休止状態が伝搬することが推測された。

以上の申請者の研究は、ほ乳類の発生休止に関して新しい知見を与える物であり、今後着床を含む関連領域に影響を与える研究であると、審査員一同が評価した。

---

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A 4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページあたり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.