

# マウス発生休止胚の解析

亀水 千鶴

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究科

基礎生物学専攻

平成30（2018）年度

# マウス発生休止胚の解析

総合研究大学院大学

生命科学研究所 基礎生物学専攻

亀水 千鶴

# 目次

第1章 序論	1
(1) 発生休止という現象	1
(2) 哺乳類の発生休止	1
(3) 発生休止胚	2
(4) 齧歯類の発生休止と発生休止胚	3
(5) 本研究での目的	4
第2章 結果	6
(1) D4.5~D10.5 の休止胚	6
発生休止胚の形態的特徴	6
発生休止誘導後の子宮と胚の観察	8
休止胚の発生能と着床能	10
(2) 休止胚の分化状態	12
(3) 休止胚の細胞数	13
(4) 休止胚の細胞周期	16
26p-Fucci2 マウスを用いた休止胚における細胞周期の解析	16
Ki67 抗体での休止胚の抗体染	19
KSOM(着床前胚培養液)中での休止胚の細胞周期の動き	21
Fucci2 マウスの休止胚の CV1000 を用いたタイムラプス撮影	23
図と表	25
第3章 考察	40
第4章 材料と方法	45
参考文献	50
謝辞	53

## 第1章 序論

### (1) 発生休止という現象

発生休止とは胚発生中に発生が一時的に停止する現象である。多くの動物の分類群で見られる現象である。発生休止は外的環境の変化によって引き起こされる。発生を続けるのに好ましくない環境に胚がさらされると発生は停止する。その後環境が改善されると発生は即座に再開し正常に進行する。また好条件の下で仔を産み育てるために、妊娠の度にあらかじめ発生休止がおこるようにプログラムされた動物もいる。休止期間中、休止胚では最低限の生命活動のみ見られ、休止前の発生状態が維持され続ける。哺乳類のある種によっては一年近くも休止状態が続く。発生を停止しながら胚としての“質”を長期間維持し続けるという点で発生休止はとても興味深い現象である。

### (2) 哺乳類の発生休止

哺乳類では130種以上で発生休止がおこることが確認されている (Renfree and Fenelon, 2017)。哺乳類の発生休止が他の生物と異なる大きな特徴は、母体の中で発生休止が起こることである。卵巣から排卵された卵は卵管で精子と受精する。卵管から子宮へ運ばれる過程で胚の発生が進み、受精卵から胚盤胞になる。胚盤胞は子宮に着床しその後より複雑な発生が進む。多くの哺乳類で休止は着床前の胚盤胞期に起きる。着床直前の胚盤胞期に発生休止が起き、着床が遅延されることから、別名遅延着床とも呼ばれる。哺乳類において初めて発生休止が確認されたのはノロジカである。(Ziegler, 1843; Short and Hay, 1966)。交尾後に雌の体内に精子が貯蔵され“受精の遅延”によって受精時期をコントロールする現象は知られていたが、発生を進めた後に、発生を一時的に止めて“着床の遅延”をし、出産時期をコントロールする生殖戦略は新たな発見であった。哺乳類の発生休止は大きく2つに分けられる。Obligate form of diapause と呼ばれる

妊娠のたびに、発生休止がおこるタイプと、Facultative form of diapause と呼ばれるある状況下におかれた時のみに発生休止がおこるタイプである。発生休止が起こる哺乳類の大半は Obligate form of diapause に分類される。季節や光や栄養状態、温度の変化に影響して発生休止が起こる。例としてノロジカ、アナグマや、アルマジロが挙げられる。Facultative form of diapause は有袋類や実験室で飼われているマウスやラットにみられる。このタイプの発生休止は授乳中に妊娠した場合に見られる。授乳刺激によってプロラクチンの分泌が上昇し、それによってエストロジェン (E2) の分泌が阻害され発生休止が誘導されると考えられている。授乳中の仔マウスを取り除き、授乳刺激をなくすか、授乳中でも雌マウスにプロラクチンの阻害剤を投与することによって休止状態は解除される。どちらのタイプも外的環境の変化によって母体の状態が変化し発生休止が起こるといわれている。

### (3) 発生休止胚

発生休止によって発生が一時的に停止した胚は発生休止胚と呼ばれる。哺乳類の発生休止は着床前の胚盤胞期に発生が停止する (Aitken 1977a)。発生休止が起きないといわれていたヒツジの胚を卵巣除去によって発生休止を誘導したマウスに移植すると、ヒツジの胚は子宮の中で休止状態になることがわかった。本来なら発生休止がみられなかった種においても休止環境に胚をおくと、休止がおこることから、発生休止状態になるポテンシャルは幅広く種を超えて保存されている現象であると考えられる。これまでヒトにおいては発生休止と言う現象は報告されていなかったが、十分おこりうる可能性がある。

#### (4) 齧歯類の発生休止と発生休止胚

マウスでは授乳中に妊娠した場合、休止が誘導される (Weichert, 1940)。また、妊娠 2 日目のラットの卵巣除去によっても発生休止を誘導できることが発見された。(Chambon, 1949a)。卵巣除去により休止を誘導した場合プロジェステロン (P<sub>4</sub>) の注射で状態を維持できる (Canivenc & Laffargue 1956)。また卵巣除去による発生休止状態はエストロジェン(oestradiol-17 $\beta$ )の投与によって停止できる。(Psychoyos 1962, 1973a, b)。

エストロジェンによる休止状態の停止は前もってプロジェステロンの投与が必要である (Moore Smith & Biggers 1968 ; Yoshinaga & Adams 1966)。ラットとマウスでは妊娠後の 2 日~3 日目から P<sub>4</sub> の分泌量が増え着床時期に分泌量はピークになる (Watson et al. 1975)。またエストロジェンは発情前と妊娠 3 日目のラットでは着床前の 30~40 時間前 (Psychoyos 1973a, b) マウスでは 15~25 時間前 (MaCormack & Greenwald 1974) にそれぞれピークをむかえる。マウスでは妊娠 3.5 日目に卵巣を除去し、その後毎日プロジェステロンを投与することで、実験的に休止状態を誘導できる。また妊娠 2.5 日目または 3.5 日目にエストロゲンレセプターのインヒビターを投与することでも休止を誘導できる (Yoshinaga and Adams, 1966; Paria et al., 1998)。この状態はエストロジェンを投与することで解除できる (Yoshinaga and Adams, 1966; McLaren, 1968; Psychoyos, 1973)。妊娠 3.5 日目はエストロジェンの分泌量がピークにさしかかる時期である。マウスではエストロジェン投与後 18~20 時間以内に着床が見られる (Yoshinaga and Adams, 1966; Paria et al., 1993b; Das et al., 1994)。また細胞周期の活性や細胞数の増加、代謝活性や DNA、RNA、タンパク質合成は 4~16 時間以内に見られ始める (Spindler et al., 1996)。

休止期間中の胚は細胞の分裂は最小限に抑えられており、徐々に代謝活性は減

少していく。細胞の分化状態は休止前の状態が維持されている。休止胚は子宮から分泌されている分子による制御を受けているものと考えられている。休止胚とエストロゲン投与によって休止状態が解除された胚との遺伝子発現量を比較したところ、細胞周期、細胞シグナル、エネルギーや代謝の経路に関するカテゴリーに大きな違いがあった (Hamatani 2004)。

マウスの休止胚では着床前の胚盤胞の状態が発生が停止している。しかし休止胚の細胞は OVX 後、27 時間の間に 100 個も満たない数から 130 個ほどまで増殖し、その後は細胞数の増加はみられなくなる (Maclaren et al. 1968; Spindler et al. 1996)。休止誘導後、細胞数の増加が見られなくなってから E2 を投与し、休止状態の解除を行うと、細胞数の増加が再開する。またその細胞の増加は胚の ICM 領域から見られ、その後 TE 領域でも細胞の増加が見られる (Given & Weitlauf 1981)。休止胚の DNA 含有量の結果から、ある時期のマウスの休止胚では細胞が G1 または G0 期で停滞していると言われている (Sherman and Barlow, 1972; Surani, 1975) ことから、休止胚で細胞数の増加が見られなくなる理由として、細胞周期が G1 または G0 期で停滞しているからではないかと考えられている。休止胚の細胞の増殖が見られないのは細胞周期の G1 または G0 期での停滞が考えられるが、休止胚の細胞周期が G1 と G0 期でのどちらで停滞しているのかはわかっていない。

#### (5) 本研究での目的

卵巣除去による発生休止誘導を行い、どのように胚が正常な発生能を保ちながら、休止状態に入り、またどのような状態で子宮にとどまっているのか調べる。休止胚の特徴として、分化状態が着床前の胚盤胞で維持されていること、この時細胞増殖の停止と細胞周期が停滞していることが知られている。これま

では休止誘導の休止胚は一括りに扱われてきたが、OVXによる休止誘導後、細胞数の増殖がしばらく見られることから、休止誘導後の休止期間の長さによって休止胚の状態に違いがあるのではないかと考えた。本研究では休止期間の違う休止胚に関して、形態と子宮の中での存在様式を調べ、それぞれの休止胚が正常な発生能をもっているのか調べた後、1.分化状態、2.細胞数、3.細胞周期に関して休止から7日間にわたり、継時的に休止胚を解析した。



## 第2章 結果

### (1) D4.5~D10.5 の休止胚

#### 発生休止胚の形態的特徴

マウスでは次に述べる2つの状況下で発生休止が観察されている。1つは自然に起こる場合で、授乳中に妊娠した場合である。授乳刺激によって休止が誘導され、授乳刺激をなくすと、休止胚は速やかに着床して、正常に発生することが知られている (Whitten 1955)。この場合、授乳刺激によって卵巣からのエストロゲン (E2) の分泌量の減少により休止が引き起こされる (Lopes et al. 2004; McLaren 1968; Renfree and Shaw 2000)。2つ目は人工的に発生休止を誘導する方法である。妊娠 3.5 日目の午前中に雌マウスの卵巣を除去し、その後プロジェステロン (P4) の投与を連日行うことで休止は誘導され、維持される (Yoshinaga and Adams 1966)。プロジェステロンの投与がなくても休止は誘導されるが、投与を行わない場合は休止胚の回収率が低くなる (Kirby, 1971)。また、外科手術なしで、タモキシフェン (抗エストロゲン薬) と Depo-Provera (プロジェステロン) を妊娠 2.5 日目相当のマウスに投与することでも休止は誘導できる (MacLean and Evans, 1999)。どちらの場合も卵巣からの E2 の分泌が抑制されることによって引き起こされる。卵巣除去と P4 による休止誘導は先行研究でよく行われており、本研究では、卵巣除去と P4 投与による休止誘導をおこなった。休止誘導のタイムスケジュールを図 1.1 に示す。妊娠 3.5 日目に卵巣除去を行い、翌日から胚を回収するまで毎日一回、P4 の投与を行った。本研究では休止誘導からの7日間の D4.5、D5.5、D6.5、D7.5、D8.5、D9.5、D10.5 の7つの時期の休止胚を実験対象とした。この時 D は休止胚を意味し、その後続く数字は妊娠期間に相当する。

まず、回収した休止胚の形態的な観察を行った。休止胚は胚盤胞様の形態で

維持されていると言われている(Renfree and Shaw, 2000)。非休止胚である E3.5 の胚盤胞は栄養外胚葉、その内側に内部細胞塊と液で満たされた胚盤胞腔から形成され、胚は透明帯で包まれており球形をしている (図 1.2 A)。E4.0 には透明帯からハッチした胚盤胚が多く見られる。休止胚では、回収した全ての胚が透明帯からハッチした状態であった。D4.5 と D10.5 の休止胚を図 1.2 B, C に示す。非休止胚と同様に栄養外胚葉、内部細胞塊、胚盤胞腔の三構造で形成されていた。非休止胚である胚盤胞と比較すると、休止胚は長径と短径の差が大きく、楕円形をしていた。また休止期間が長くなるとより長径と短径の比が大きくなりより伸長した楕円体となる。胞胚腔の領域が大きくなっている傾向がみられ、胚の長径が大きくなっていた。非休止胚と比較すると胚自体の大きさに違いがあるが、基本構造は同じであり、先行研究同様に D4.5~D10.5 の休止胚は着床前の胚盤胞に似た状態であると考えられる。

## 発生休止誘導後の子宮と胚の観察

次に休止胚が実際に子宮の中でどのように存在しているのか休止を誘導したマウスの子宮を観察した。休止を誘導し D4.5、D6.5、D10.5 の休止胚をもった子宮をパラフィンに包埋し、組織切片を作製しヘマトキシリンエオジン染色 (HE 染色) を行い観察し、正常妊娠した 3.5 日目 (着床前) と妊娠 4.5 日目 (着床後) と比較した。

先行研究では、妊娠 3.5 日目頃に子宮では子宮間膜-対子宮間膜方向にクリプトと呼ばれる溝のようなものが形成される。クリプトは子宮内腔の上皮細胞が外反して形成したもので、そのなかに胚が配置される (Daikoku et al. 2011; Cha et al. 2014)。妊娠 3 日目から 4 日目にかけての夜 (20:00~24:00) になるとクリプトの上皮細胞と胚の栄養外胚葉細胞 (TE 細胞) が接触し始める (Das et al. 1994)。それと同時に TE 細胞と接触した上皮細胞周辺のストロマ細胞は急激な細胞増殖、分化をおこし、脱落膜細胞が形成される (脱落膜反応)。妊娠 4 日目の朝には上皮細胞と TE 細胞は密接に接着し、妊娠 4 日目の夕方 (18:00~20:00) 頃には TE 細胞周辺の子宮上皮細胞が不均一に並び細胞間に間隙がみられるようになり、最終的に上皮細胞は消失し TE 細胞はダイレクトに脱落膜反応を起こしたストロマ細胞と接着する (Li et al., 2015)

休止を誘導していない妊娠 3.5 日目の子宮では、胚と子宮上皮は接しておらず、子宮内腔上皮の細胞の核はきれいに整列して、一層の細胞層を作っていた (図 1.3 A)。妊娠 4.5 日目になると、胚は非胚側の TE 細胞と子宮内腔上皮の細胞と接していた (図 1.3 B)。胚が存在している領域では子宮上皮が胚を囲むようにポケットの形をしており、胚と接した子宮内腔上皮の細胞では核は整列しておらず、きれいな層構造が壊れ分厚くなっていた。胚の TE と子宮上皮は密接に接していた。一方で休止を誘導した全ての時期で、子宮腔にある胚は内腔上皮と

は接することなく浮いた状態で存在しており、また子宮上皮細胞も一層の整列した状態で維持されており、妊娠 3.5 日目の着床前と似ていた(図 1.3 C, D, E)。妊娠 4.5 日目に見られるような脱落膜反応は見られなかった。ただ、D6.5、D10.5 の休止胚をもつ子宮では、ポケット状の構造を形成していた(図 1.3 D, E)。発生休止を誘導した場合、全ての時期で胚は内腔上皮に接触することなく存在しており、子宮内腔の上皮細胞、核はきれいに整列していることから、子宮は着床前の状態で維持されていることがわかった。

## 休止胚の発生能と着床能

休止誘導後の子宮と胚の観察から D4.5～D10.5 の休止胚は着床せずに、存在することがわかった。次にこの時期の胚が着床、発生能をもっており、休止胚としての要件を満たすのかどうかを調べた。これまでの文献で休止胚はエストロゲンの注射 (Psychoyos, A. 1962, 1973a, b) または偽妊娠マウスへの移植 (Paria et al., 1993) によって休止状態が打破されて着床し、発生を再開することが報告されている。そこで D4.5 と D10.5 休止胚を偽妊娠マウスに移植し、我々が誘導した発生休止胚が着床し、正常に発生するかどうか調べた。

まずは、移植した休止胚が着床するかどうかを調べた。偽妊娠 2.5 日目の雌マウスの子宮に D4.5、D10.5 の胚をそれぞれ移植した。左右の子宮それぞれに休止胚を 8 個ずつ移植し、移植 4 日後に開腹した。子宮を取出し観察し、子宮に脱落膜反応がある領域を着床部位としその数を調べた。その結果を表 1 に示す。E3.5 の非休止胚を移植した場合、移植した胚の 47.7% が着床した。E3.5 の非休止胚を子宮に移植した場合、妊娠した割合は 0～75% と様々で報告によって開きがある。(Goto et al., 1992; Hogan et al., 1994) 先行研究では E3.5 の非休止胚を移植した場合、移植した胚の 47%～52% の胚が着床した (Paria et al., 1993)。D4.5 の休止胚を 5 匹のレシピエントマウスの子宮にそれぞれ 8 個ずつ移植した。計 80 個の休止胚を移植した。そのうち着床が確認されたマウスは 4 匹であった。着床が確認されたマウスの 4 匹で合計 34 個の着床部位が観察された。移植した休止胚の 42.5% が着床した。D10.5 の休止胚では 7 匹のレシピエントマウスの子宮の片側にそれぞれ 8 個ずつ、計 112 個の休止胚を移植した。そのうち着床が確認されたマウスは 6 匹であった。着床が確認されたマウスの 6 匹で合計 32 個の着床部位が観察された。移植した休止胚の 28.6% が着床した。両方の子宮で着床部位がみられなかったデータはうまく移植できなかったものとし、除外

し計算すると着床率は 33.3%であった。D4.5 の休止胚を移植した場合、着床した胚の割合(42.5%)は非休止胚(E3.5 の胚盤胞)を移植した時場合(47.7%)とほとんど違いはなかった。しかし D10.5 の休止胚を移植した場合は D4.5、非休止胚と比較すると着床した胚の割合は低かった。次に移植した休止胚が着床後に発生を再開できるか調べた。妊娠 2.5 日目の偽妊娠マウスの子宮に D4.5、D10.5 の休止胚を移植し、移植 9 日後に開腹し、胚を観察した。通常 3.5 日目胚を偽妊娠 2.5 日目のレシピエントに移植した際には、胚の発生は一日遅れる。従って、上記の実験により 3.5 日目胚を移植した場合に 9 日後には 11.5 日目の胚と同様のステージに発生していることが期待される。前肢芽、後肢芽の形成を指標として、移植された休止胚の発生段階を判定した。正常発生において 9.5~10.0 日目から肢芽の形成がはじまり、その後徐々に軟骨形成や指の間の細胞の細胞死がおこり指が形成される。

D4.5 の休止胚を移植した胚を観察すると、前肢芽、後肢芽ともに形成がみられ、前肢では指の形成の兆候が見られた。これらの特徴から D4.5 の休止胚を移植し、9 日後の胚は正常発生における 11.5~12 日目頃の胎齢だと考えられる。D10.5 の休止胚を移植した場合、D4.5 の場合と同様に前肢芽、後肢芽の形成がみられた。しかし前肢芽、後肢芽共に指の形成の兆候は見られなかった。このことから、D10.5 の休止胚は D4.5 の休止胚を移植した場合と比較すると発生が 0.5~1.0 日程度の遅れがみられると考えられた。(data not shown)

以上から卵巣除去、P4 の投与によって誘導された D4.5、10.5 の休止胚は着床できる環境に移すことで、着床とそれ以降の発生が進むことが明らかになった。また、休止期間が長くなると着床する胚の割合は減少する傾向があり、発生再開後の胚発生の進行に若干の遅れが見られることがわかった。

## (2) 休止胚の分化状態

D4.5、D10.5 の休止胚を移植した場合、どちらの時期の休止胚も着床した胚は正常に発生したことから、休止期間の長さに関わらず、胚の状態が維持されていると考えられる。胚盤胞形成時には栄養外胚葉 (TE) と内部細胞塊 (ICM) の分化を経て、さらに着床前には ICM はエピブラスト、原始内胚葉細胞に分化する。そこで D4.5~D10.5 の 7 つの休止時間の異なる休止胚をエピブラストの分化マーカーである Nanog 抗体、原始内胚葉の分化マーカーである Gata4 抗体を用いて染色した。また TE の分化マーカーである Cdx2 抗体でも染色を行い、各時期のそれぞれの細胞の分化状態を調べた。

E4.0 の着床前の非休止胚では既に報告されている通り、Nanog、Gata4 抗体で染色された細胞が観察され、Nanog 抗体で染色された細胞と Gata4 抗体で染色された細胞それぞれが層をなすように局在した (図 2.1 E4.0)。D4.5~D10.5 の休止胚も非休止胚と同様に、Nanog と Gata4 の抗体で染色された細胞は層をなすように観察でき、非休止胚と同様の局在パターンであった (図 2.1 D4.5~D10.5)。しかし、一部の休止胚では非胚側の TE の内側に Gata4 抗体で染まる細胞がエピブラストから離れて、存在しているものもあった (D4.5 n=4/14 D5.5 n=4/12 D6.5 n=1/15 D7.5 n=3/16 D8.5 n=0/7 D9.5 n=1/14 D10.5 n=0/15)。着床後の胚ではエピブラストに接していた原始内胚葉が栄養外胚葉に沿って胚側から非胚側に向かって移動することが知られている。一部の休止胚ではこれと似た現象が起きていたと考えられる。一方 Cdx2 の発現は ICM を取り囲むように存在する TE において非休止胚と同様に観察された (図 2.2)。以上の結果は休止胚では細胞の分化は着床前と変わらなかったことを示している。

### (3) 休止胚の細胞数

親マウスが授乳中に妊娠した際に胚が休止環境にさらされると、休止胚では2～3日以内に細胞数の増加は見られなくなり、DNAの合成も起きなくなり、徐々に細胞数の増加は緩やかになり最終的に130個程で細胞数の増加は停止することが報告されている(Mclaren, 1968)。しかしこの実験では休止誘導から3日目(本研究でのD6.5相当の休止胚)以降の休止胚における細胞数は調べられておらず、卵巣除去による休止胚における細胞数については調べられていない。本研究では卵巣除去による休止誘導後の7日間(D4.5～D10.5)の間で休止胚の細胞数を数え、休止期間の違いによる細胞数の変化を調べた。D4.5～D10.5の休止胚を子宮から回収し、核を可視化するために固定後ヘキスト染色し、コンフォーカル顕微鏡で撮影した(図3.1B)。撮影した画像は画像解析ソフトImarisを用いて3D構築し、核の数を数えた(図3.1C)。

図3.1Aに休止胚D4.5～D10.5の細胞数をプロットしたグラフを示す。着床前の胚盤胞E3.75～E4.5では細胞数は64～100前後といわれている(Frum and Ralston, 2015)。休止誘導後1日目のD4.5休止胚の細胞は(104～179個 平均142個)であった。非休止胚である胚盤胞の細胞数と比較すると、細胞数は多かった。その後休止誘導後3日目までのD6.5(178～215個 平均198個)の休止胚までは細胞数の増加が見られた。しかしそれ以降のD7.5(187～220個 平均201個)～D10.5(193～220個 平均206個)の休止胚では細胞数の増加が見られなかった。休止胚では約200個前後までは細胞数が増えるがそれ以上は細胞数が増えることはなかった。最終的におちつく細胞数を比較すると先行研究では130個程度に対して、本研究では200個程度と細胞数に差があった。休止開始後徐々に細胞数の増加が見られなくなる点では先行研究と同様の結果であった。これらのことから、休止を誘導した後しばらくは細胞を増やす機構



が働いているが、徐々に細胞数の増加が起きない状態に変化していくと考える。

次に胚のどの領域の細胞に細胞数の変化がみられるか調べることにした。まず胚の ICM の領域での細胞数の変化を調べるために、図 2.1 でおこなった Nanog、Gata4 の抗体染色の結果を用いて、それぞれの抗体で染色された細胞の数を計算した。Nanog 抗体はエピプラストの分化マーカー、Gata4 は原始内胚葉の分化マーカーである。Nanog 抗体で染色された細胞数は D4.5~D5.5 では細胞数の変化がみられなかったが、D6.5 で細胞数が減少し、D7.5 で細胞数の増加が見られた。その後 D8.5~D10.5 では D4.5~D5.5 と同じぐらいの細胞数であった (図 3.2 A)。Gata4 抗体で染色された細胞は D7.5 までは細胞数の増加が見られ、それ以降、細胞数は徐々に減少していった (図 3.2 B)。Nanog と Gata4 抗体で染色された細胞を合計した数 (ICM の数) を見ると、D4.5~D6.5 までは細胞数は緩やかに増加し、細胞数の増加は D7.5 まで見られた。そこから D10.5 までは徐々に細胞数が減少していた。図 3.1 の休止胚の細胞の総数と比較すると D4.5~D6.5 までの細胞数の増加は ICM 領域、とくに原始内胚葉領域の細胞の増殖が 1 つの要因であると考えられる。しかし休止胚の細胞の総数では D6.5 と D7.5 では細胞の総数にほとんど変化がないのに対して、ICM 領域の細胞数だけをみると D7.5 では D6.5 から細胞数の増加がみられること、また D7.5 以降、休止胚の細胞の総数に変化が見られないのに対して ICM 領域の細胞数だけをみると D8.5 から緩やかな細胞数の減少が見られた。休止胚の全細胞数の増加と ICM の細胞数の増加パターンには違いがあり、細胞数の変化についてつじつまがあわなかった。この疑問に関しては TE 領域の細胞数を調べる必要があると考える。Copp, 1982 によると、D6.5 までは細胞数の増加を領域別に調べたところ、ICM と ICM 領域付近の TE (polar TE) の細胞数の増加はほとんど見られなか

ったが、休止胚の ICM 領域から離れた TE 領域 (mural TE) で細胞数の増加が見られた。このことから、まだ解析をしていない細胞の数 TE 領域の細胞数を詳細に解析し、議論する必要があると考える。

#### (4) 休止胚の細胞周期

##### R26p-Fucci2 マウスを用いた休止胚における細胞周期の解析

休止胚の細胞数の解析結果から、休止誘導後 2~3 日をかけて細胞の数は徐々に増えなくなることがわかった。

細胞数の変化がみられなくなる理由として、二つの理由が挙げられる。1つ目は単純に細胞周期が停滞してしまい分裂が止まり、細胞の数が増えなくなる。2つ目として、細胞増殖はおこるが、それと同等に細胞が死んでしまい結果的に細胞数の増加が見られなくなることである。先行研究で休止胚の細胞を TUNEL 染色した場合、通常胚よりも TUNEL 染色された細胞数の割合は低く、胚全体の数パーセントの細胞のみ染色された(Ptak et al. 2012)。また発生休止中は細胞死が抑制されていることも報告されている(Hand and Menze, 2008)。これらのことから、休止胚での細胞数の増加が見られない理由は細胞周期が停滞することで細胞の分裂が止まり、細胞の数が増えない状態であるからではないかと予測した。これまでに、休止胚の細胞の細胞周期は G1 期で停滞していることが示唆されている(Sherman and Barlow, 1972)。Sherman and Barlow, 1972 らは D9.5~D10.5 相当の休止胚に関してのみ調べており、それ以前の休止胚の細胞の細胞周期がどのような状態であるかはまだわからない。前述したように、休止誘導後数日間は細胞数の増加が見られることから、休止後すぐに、全ての細胞周期が G1 期で停滞しているのではないと考えた。休止誘導後、5 日目にも一部の細胞のみではあるが、チミジンの取り込みが見られる(Van Blerkom et al. 1979)ことから、休止誘導から徐々に細胞周期が G1 期に移り、その後 G1 期で停滞しているのではないかと考えた。そこで、D4.5~D10.5 の休止胚での細胞周期とその変化を調べるために、SR26p-Fucci2 (Abe et al., 2013) マウスを用いて発生休止を誘導し、休止胚を観察した。R26p-Fucci2 は細胞周

期の S~M 期にある細胞と G1/G0 期にある細胞をそれぞれ緑と赤色の蛍光によって識別できるマウスである。上記の実験で発生休止を誘導したのと同様に R26p-Fucci2 マウスと交配した ICR メスの卵巣を除去し休止を誘導して、D4.5 から D10.5 の休止胚を回収して、PBS に入れてすぐに共焦点顕微鏡で観察をした。休止を誘導していない 3.5 日目の胚盤胞の非休止胚胚 (7 個) では胚のほとんどの細胞が緑色の蛍光を示した (図 4.1 E3.5)。これは着床前胚で細胞周期が短く分裂が盛んである (実際には、多くの細胞が S~M 期にあること) ことを示している。一方休止胚では、緑色の蛍光を示す細胞は少なく、多くが赤色の蛍光を示した細胞であった (図 4.1 D4.5~D10.5)。休止誘導後 1 日目の D4.5 の休止胚ですでに、胚のほとんどの細胞が赤色の蛍光を示し、緑色の蛍光を示す細胞は少ししか見られなかった。休止誘導 2、3、4、5 日目の D5.5、D6.5、D7.5、D8.5 の休止胚でも D4.5 の休止胚と同様に緑色の蛍光を示す細胞数は少ししか見られず、その数は休止時間が長い休止胚になるほど少なくなっていた (図 4.1 D5.5~D8.5, 図 4.2 A)。D9.5、D10.5 の休止胚では緑色の蛍光を示す細胞は見られなくなった (図 4.1 D9.5 D10.5, 図 4.2 A)。D9.5、D10.5 になると休止胚の全ての細胞は赤色の蛍光を示していたが、コントラストを上げて観察すると D10.5 では緑色の蛍光を示す細胞が、ICM の領域で 1~2 個観察できた。その他の領域では緑色の細胞はみられなかった。

休止胚で見られる緑色の蛍光を示す細胞は、ICM 細胞側の胚領域に多く見られた。胚の領域を図 4.2 C に示すように、ICM 領域とそれに接する TE から構成される embryonic と TE のみで構成される領域を 2 つに分けた ab-embryonic1、ab-embryonic2 の 3 つの領域とすると、休止胚では、緑色の蛍光を示した細胞は、胚の embryonic 領域、ab-embryonic1 領域に見られ、ab-embryonic2 領域には見られなかった (図 4.2 B)。緑色の蛍光を示す細胞は

多くが胚の **embryonic** 側に局在しており、D7.5、D8.5 の休止胚では緑色の蛍光を示す細胞のほとんどが **embryonic** 側に局在した (図 4.2 B)。

これらのことから休止胚ではほとんどの細胞は G1/G0 期の細胞であることが示唆された。D8.5 までは S~M 期の細胞と G1/G0 期の細胞が存在するが、D9.5 以降の休止胚では **Fucci2** の赤色の蛍光で標識される細胞だけが存在しており、G1/0 期の細胞だけが存在することが示唆された。さらに、S~M 期の細胞の局在は、胚の **embryonic** 側領域に多く、D7.5 からは S~M 期の細胞の局在のほとんどが **embryonic** 側で見られ、最終的には S~M 期の細胞の局在はほとんど休止胚で見られなくなった。

## Ki67 抗体での休止胚の染色

Fucci2 マウスの休止胚の観察から、休止胚の細胞の多くが赤色の蛍光を示した。このことから休止胚の細胞は G1 または G0 期にあることが考えられる。Fucci2 を用いた観察のみでは G1 または G0 なのか判断はできない。先行研究では、休止誘導後数日で、DNA の合成はほとんど見られなくなり、細胞の DNA 量からほとんどの細胞が G1 または G0 期にいたることが報告されている (Sherman and Barlow, 1972) が、DNA 量のみでは G1 か G0 期のどちらに細胞が属しているのか判断はできない。そこで本研究では Ki67 の抗体染色を行い休止胚の細胞が G1 または G0 期のどちらに属しているのか調べた。Ki67 抗体は G1 期、S 期、G2 期、M 期の細胞が染色される。つまり G0 期に属している細胞は染色されない。

非休止胚である 3.5 日目の胚盤胞では全ての細胞が Ki67 抗体で染色された (図 4.3 E3.5)。一方で休止胚では一部の細胞のみが Ki67 抗体で染色され、休止時期の違いによって抗体の染色パターンが異なった (図 4.3 D4.5 , D6.5 , D8.5)。D10.5 の休止胚では Ki67 抗体で染色された細胞は見られなかった (図 4.3 D10.5 , 図 4.4 A)。D4.5 の休止胚では、胚の embryonic 領域の細胞において Ki67 抗体で染色される細胞が多く見られ、胚の ab-embryonic 側でも Ki67 抗体で染色された細胞は見られたが、ab-embryonic2 領域では Ki67 抗体で染色された細胞は少なかった (図 4.4 B)。D6.5 の休止胚では D4.5 の休止胚と比較すると Ki67 抗体で染色された細胞は少なかった (図 4.4 A)。また Ki67 抗体で染色された細胞のほとんどが embryonic 側に局在していた (図 4.4 B)。D8.5 の休止胚では D4.5、D6.5 の休止胚と比較するとより Ki67 抗体で染色された細胞の数が少なかった (図 4.4 A)。Ki67 抗体で染色された細胞は embryonic 領域の ICM に見られ、(図 4.3 D8.5) ab-embryonic 側では Ki67 抗体で染色された

細胞は ab-embryonic1 領域のみに見られた (図 4.4 B)。これらの結果から、非休止胚では G0 期の細胞が胚に存在していないのに対して、休止胚では G0 期に属している細胞が存在するとがわかった。また休止期間が長くなるにつれて、G0 期の細胞が増えていくこともわかった。G0 期の細胞は ab-embryonic 領域から増え始め、その後徐々に embryonic 領域に向かって細胞は G0 期に入っていく。最終的に休止胚の細胞の全ては G0 期に入る。先行研究でも E3.5 の胚盤胞では Ki67 の抗体で強く染まることが報告されているが、休止誘導 12 時間後にはすでに Ki67 抗体で染色された細胞は見られなくなり、24 時間後の休止胚 (D4.5 相当) でも Ki67 抗体で染色された細胞はみられなかった (Li et al., 2015)。つまり休止誘導後 12 時間以内で全ての細胞が G0 期に入っていることになる。これは本研究のデータと違う。また別の論文では、Ki67 抗体で休止胚を染色した場合、休止誘導後 4 日目の休止胚 (D6.5 相当) では Ki67 抗体染色された細胞は存在するが、その局在領域は ICM の epiblast のみであること、また epiblast 領域の Ki67 抗体で染色された細胞の数はマウスの系統によって異なることが報告されている (Batlle-Morera et al., 2008)。休止胚における G0 期の細胞様式に関してはマウスの系統によって違いがあるのかもしれない。共通して言えることは、非休止胚では G0 期の細胞が存在しないが、休止胚では G0 期に移行する細胞が増えるということである。本研究では休止胚の細胞周期の状態を継時的に調べてきた。Fucci2 マウスの休止胚では、休止期間が長くなるにつれて ab-embryonic 領域から embryonic 領域に 3 に赤色の蛍光を示す細胞 (G1 期または G0 期) が増えていった。Ki67 抗体染色の結果と合わせて考えると、休止の早い段階では ab-embryonic 側の細胞がまず、G1 期で停滞する。その後通常の細胞周期 (G1 期、S 期、G2 期、M 期) に戻ることなく、G0 期に突入していき、徐々にこの現象が embryonic 側に広がっていくと考える。

## KSOM(着床前胚培養液)中での休止胚の細胞周期の動き

休止胚では最終的に全ての細胞が G0 期の細胞に移行することが考えられえる。体細胞では分化し終わったほとんどの細胞が G0 期であり、その後は通常増殖期とよばれる細胞周期 (G1 期、S 期、G2 期、M 期) にもどることなく細胞増殖がみられなくなる。そのため G0 期は休眠期ともいわれる。一方で G0 期に細胞が移行しても、自由に通常細胞周期を行き来できる細胞や機構も存在する (Wilson, A et al., 2008)。休止胚は一時的に細胞周期が停止し、細胞の増殖がみられない。しかし、着床できる環境におくと、細胞周期を開始し、細胞の増殖がみられ正常の発生が始まることから、G0 期に突入しても速やかに通常細胞周期に移行できる機構がそなわっていると考える。休止胚を休止状態から解放した場合その動きを調べることにした。

胚を着床前の胚を培養する培養液 (KSOM) にいれて休止胚の細胞周期がどのように動きだすのか観察した。D4.5、D6.5、D7.5、D10.5 の 4 つの休止期間の異なる休止胚を KSOM に入れて培養して、1 日培養した。

取り出してすぐの D4.5 では embryonic、ab-embryonic1 領域に緑色の蛍光を示す細胞が存在していた (図 5.1 D4.5 day0)。培養後 1 日経過すると、ab-embryonic-2 領域にもまばらに緑色の蛍光を示す細胞がみられはじめた (図 5.1 D4.5 day1)。D6.5 では embryonic 側には緑色の蛍光を示す細胞は数個あるが、ab-embryonic 領域には見られなかった (図 5.1 D6.5 day0)。培養後 1 日経過すると embryonic 側の、特に ICM の領域で緑色の蛍光を示す細胞が多く見られ、ab-embryonic1 領域にも緑色の蛍光を示す細胞が見られはじめた (図 5.1 D6.5 day1)。D7.5 でも embryonic 領域にのみに見られた緑色の蛍光を示す細胞 (図 5.1 D7.5 day0) は、1 日培養すると ab-embryonic-1 領域にも見られるようになった (図 5.1 D7.5 day1)。D10.5 では緑色の蛍光を示す細胞がみられな



かったが (図 5.1 D10.5 day0)、培養後 1 日経過すると、embryonic 領域の ICM に緑色の蛍光を示す細胞が数個見え始めた (図 5.1 D10.5 day1)。D4.5、D6.5、D7.5 の休止胚では培養時間の経過とともに embryonic 側から ab-embryonic 側に緑色の蛍光を示す細胞が見え始めたが、D10.5 の休止胚では培養後 1 日目では ab-embryonic 側には緑色の蛍光を示す細胞はみられなかった。KSOM で休止胚を培養すると S~M 期の細胞は徐々に embryonic 側から ab-embryonic 側へと増えていた。G1 または G0 期で停滞していた細胞は embryonic 側から ab-embryonic 側へと方向性をもって細胞周期が動きははじめているのではないかと考えた。

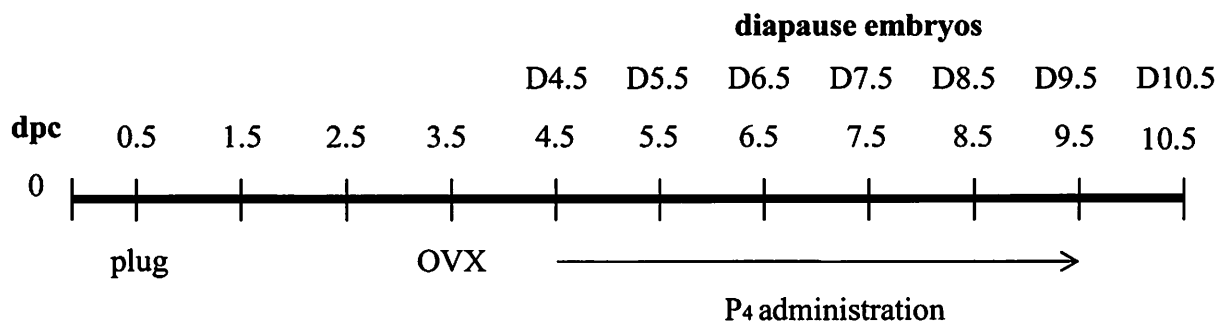
## Fucci2 マウスの休止胚のタイムラプス撮影

休止胚を休止状態から解放した場合、D4.5、D6.5、D7.5 と D10.5 の休止胚では S~M 期の細胞の見え方が異なっていた。図 5.1 では 1 日おきに細胞周期の状態を観察した。さらに数十分単位での細胞周期の変化を継続的に見るために共焦点スキャナボックス CellVoyager CV1000 を用いて、30 分おきに数時間 R26p-Fucci2 マウスの休止胚の観察を行った。

D6.5 の休止胚を培養した際には、3 時間後に徐々に embryonic 領域から緑色の蛍光を示す細胞が増えていき、培養 20 時間までには embryonic 側ほとんど ab-embryonic1 領域の細胞が緑色の蛍光を示した (図 5.2 D6.5)。一方 D10.5 の休止胚では培養後 10 時間後あたりから embryonic 側から数個の緑色の蛍光を示す細胞がみられ始めた (図 5.2 D10.5)。徐々に緑色の蛍光を示す細胞が embryonic 側から ab-embryonic1 領域に増え始めたが、D6.5 と比較するとまばらに、広範囲に見られた (図 5.2 D10.5)。D4.5 の休止胚でも D6.5 の休止胚と同様の結果が得られた (date not shown.)。どちらの時期も ab-embryonic2 領域では緑色の蛍光が見られる細胞は出現しなかった。最低でも 20 時間は G0 または G1 期で停滞したままであると考えられる。

休止時間の長い D10.5 の休止胚では、embryonic 側の細胞が赤から緑色の蛍光に変わる細胞がみられ始めるのに時間がかかった。その理由として、Ki67 抗体染色の結果から D10.5 では胚の全ての細胞が G0 期で、通常の細胞周期に入るのに時間がかかったのではないかと考える。またどの時期の休止胚でも ab-embryonic-2 領域側の細胞で緑色の蛍光がみられなかった理由としても以下のように考える。休止開始すぐに、ab-embryonic2 領域の細胞はほとんどが G0 期である。一方 embryonic 領域と ab-embryonic1 領域には S~M または G1 期の細胞が存在し、徐々に G0 期に移行していく。embryonic 細胞と比較すると

ab-embryonic 側領域の細胞は G0 期である期間が長く、通常の細胞周期に入るのに時間がかかるのではないかと考える。



**図1.1 発生休止誘導のスケジュール**

マウスを交配させ、プラグが確認された日を妊娠0.5日目とする。妊娠3.5日目の午前中（8:30～10:00）に卵巣除去(OVX)を行う。その後開腹して休止胚を取り出すまで午前中にプロジェステロン（P4）の投与を行う。Dは休止胚(Diapause)を意味し、その後に続く数字は妊娠期間を示す。D4.5は妊娠4.5日目の雌マウスから回収された休止胚を示す。

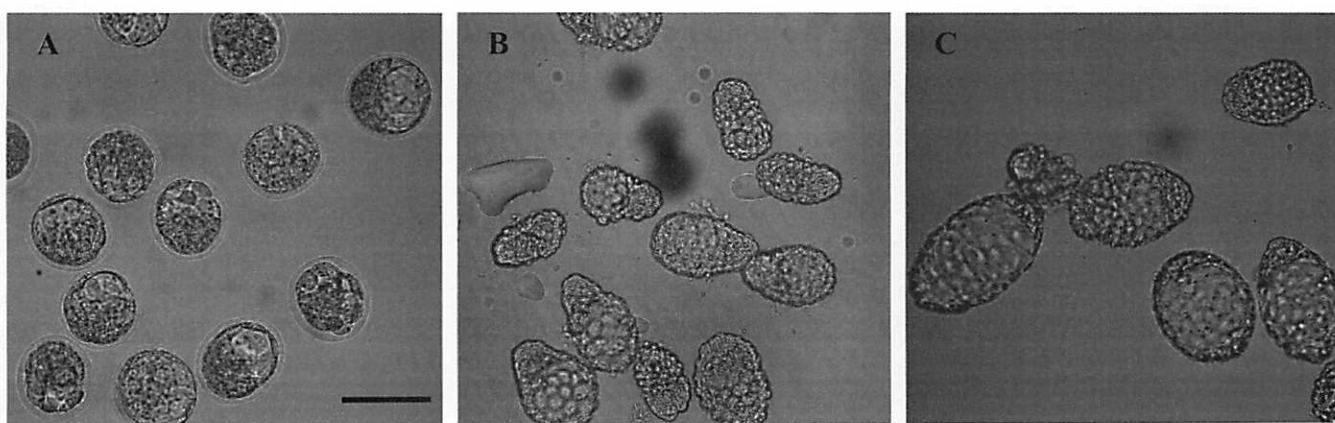


図1.2 休止胚と非休止胚（着床前の胚）

着床前の胚盤胞と休止胚の写真 A : E3.5(非休止胚) B : D4.5(休止胚)

C : D8.5(休止胚) Scale bar : 100  $\mu m$

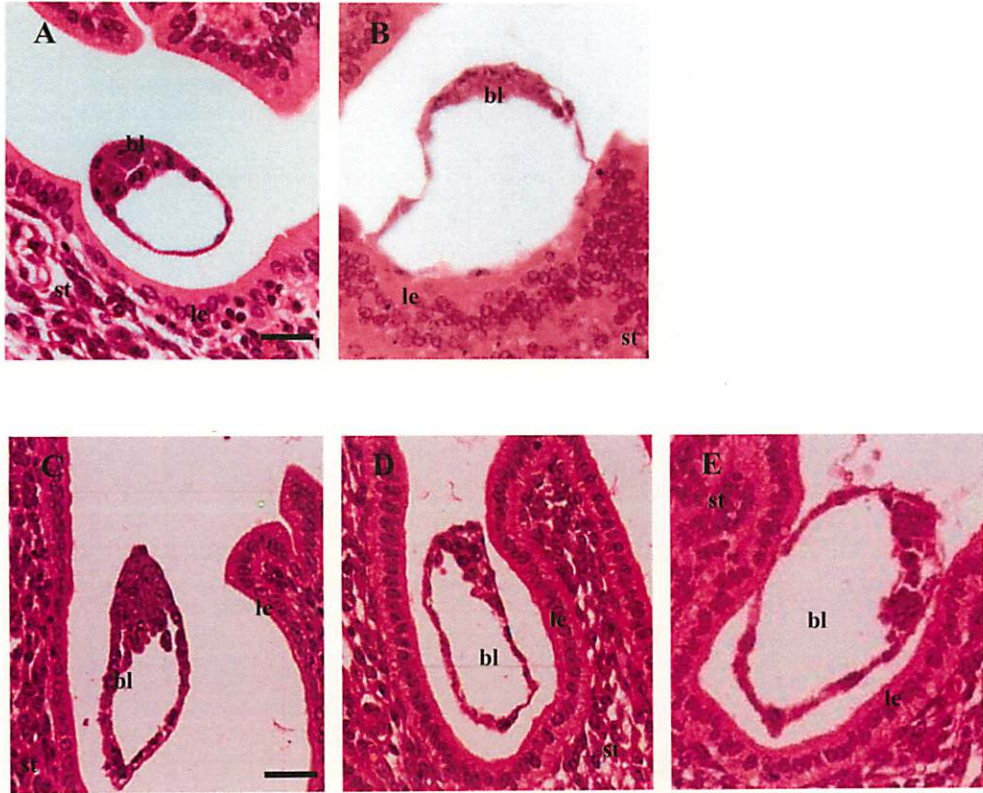


図1.3 休止誘導後の子宮と胚の組織切片像

卵巣除去による休止誘導後、D4.5、D6.5、D10.5の休止胚をもつ子宮を取出し固定し、パラフィン切片を作製後にHE染色をおこなった。

A: E3.5 (非休止胚) B: E4.5 (非休止胚) C: D4.5休止胚と子宮

D: D6.5休止胚と子宮 E: D10.5休止胚と子宮

bl: blastocyst 胚 le: luminal epithelium 子宮内腔上皮 st: stroma 間質 ms: 子宮間膜

Scale bar: 25  $\mu$ m

<b>Donor</b>	<b>No. of recipients</b>	<b>No. of blastocysts transferred</b>	<b>No. of mice implanted</b>	<b>No. of implantation site</b>	<b>% of implantation site</b>
D4.5	5	80	4	34	42.5%
D10.5	7	112	6	32	28.57%
3.5 control	7	111	7	53	47.74%

表1 偽妊娠マウスへの休止胚の移植と着床数

休止胚D4.5.D10.5を回収して、偽妊娠マウスの子宮に胚を移植した。移植から4日後に開腹し着床部位の数を調べた。コントロールとして3.5日目の胚盤胞を移植した。

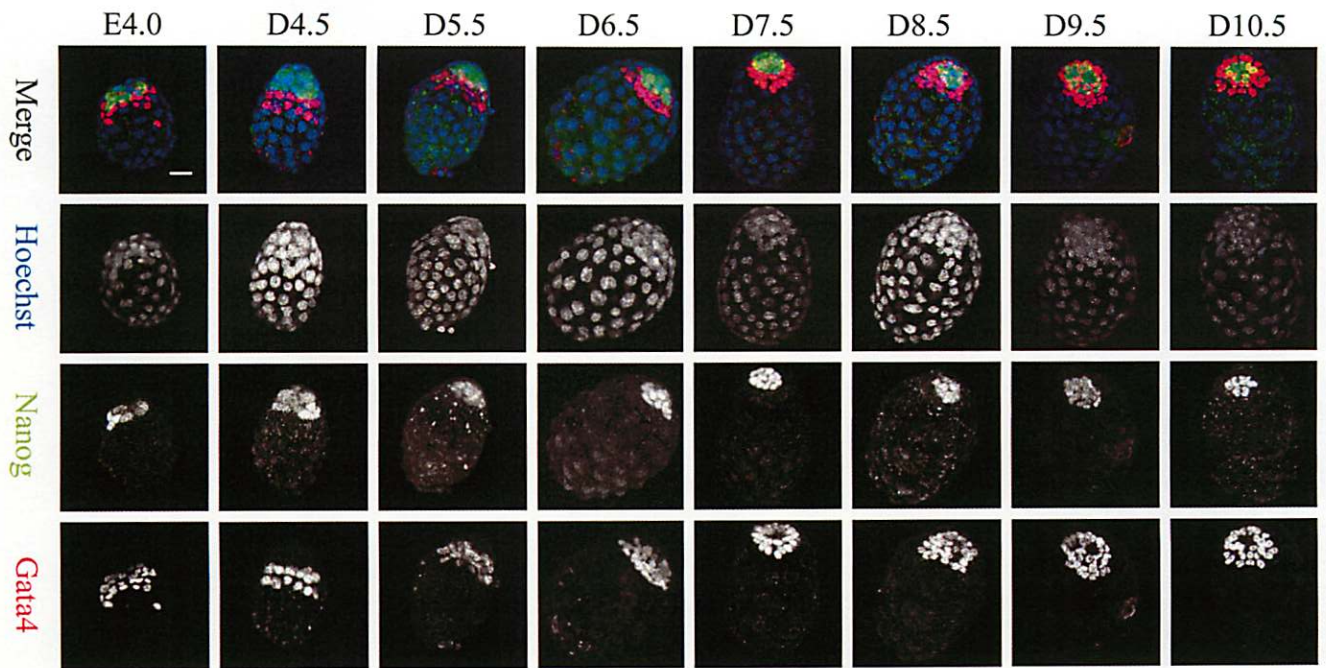


図2.1 休止胚のNanog、Gata4抗体による抗体染色

E4.0の非休止胚とD4.5～D10.5の休止胚を回収しPFAで固定後、Nanog、Gata4抗体で抗体染色、核をヘキストで染色した。それぞれMIP画像を示す。

緑：Nanog 赤：Gata4 青：Hoechs Scale bar：20  $\mu$ m



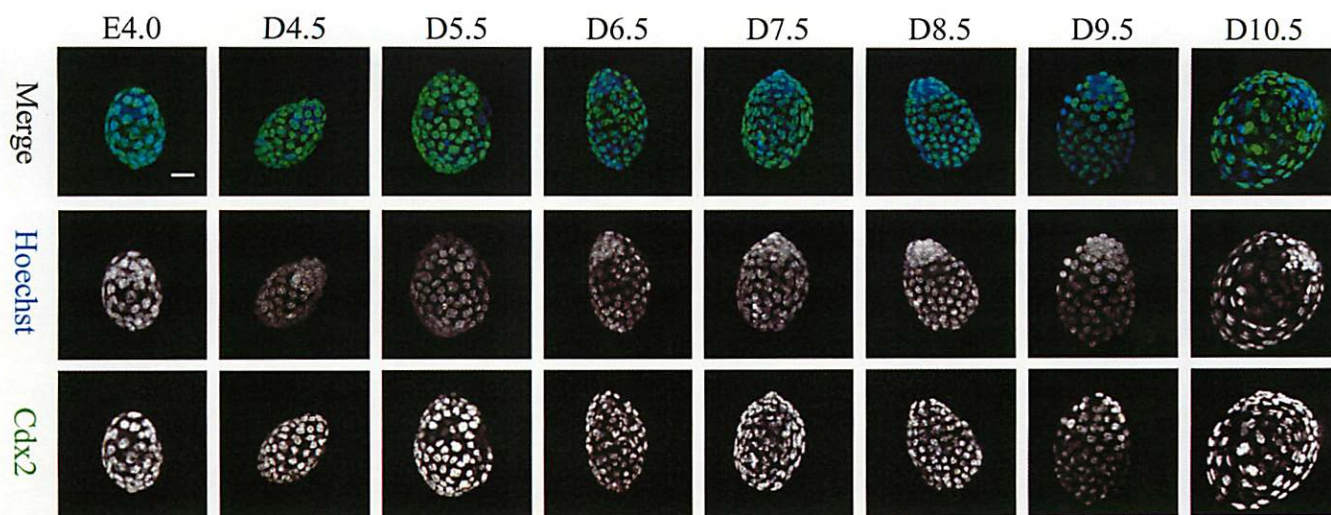


図2.2 休止胚のCdx2抗体による抗体染色

E4.0の非休止胚とD4.5～D10.5の休止胚を回収しPFAで固定後、Cdx2抗体で抗体染色、核をヘキストで染色した。それぞれMIP画像を示す。

緑：Cdx2 青：Hoechst Scale bar：20  $\mu$ m

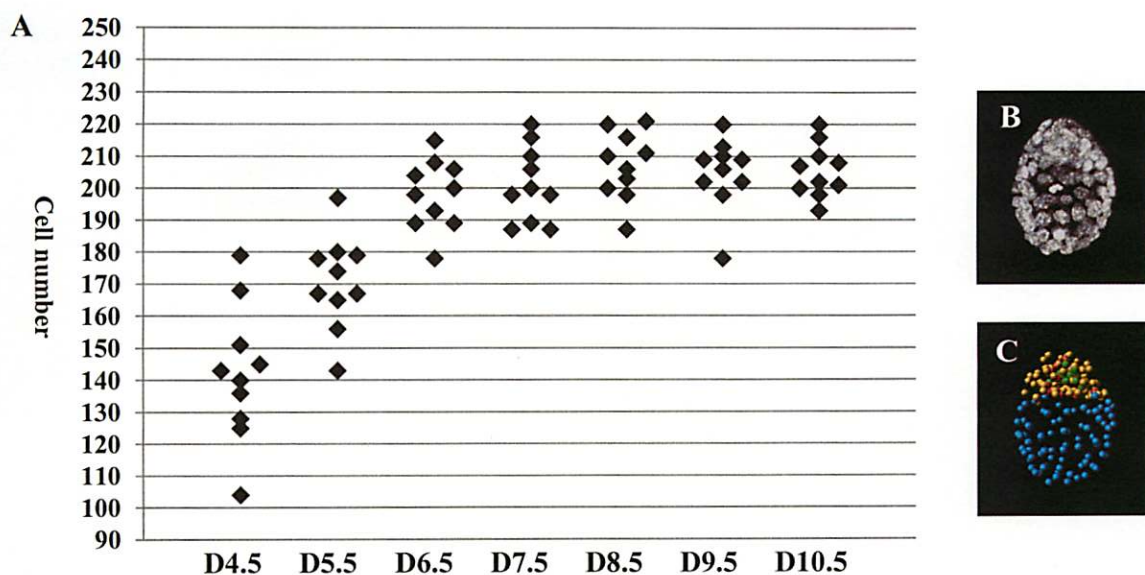


図3.1 休止胚の細胞数

D4.5～D10.5の休止胚を回収しPFAで固定後、核をヘキストで染色し細胞の数を数えた。細胞の数はImarisを用いて調べた。全ての休止胚において10個ずつ細胞の数を数えた。

A：細胞数のグラフ B：Hoechstで染色した休止胚 C: Imarisによって休止胚の核を認識し点を打った写真

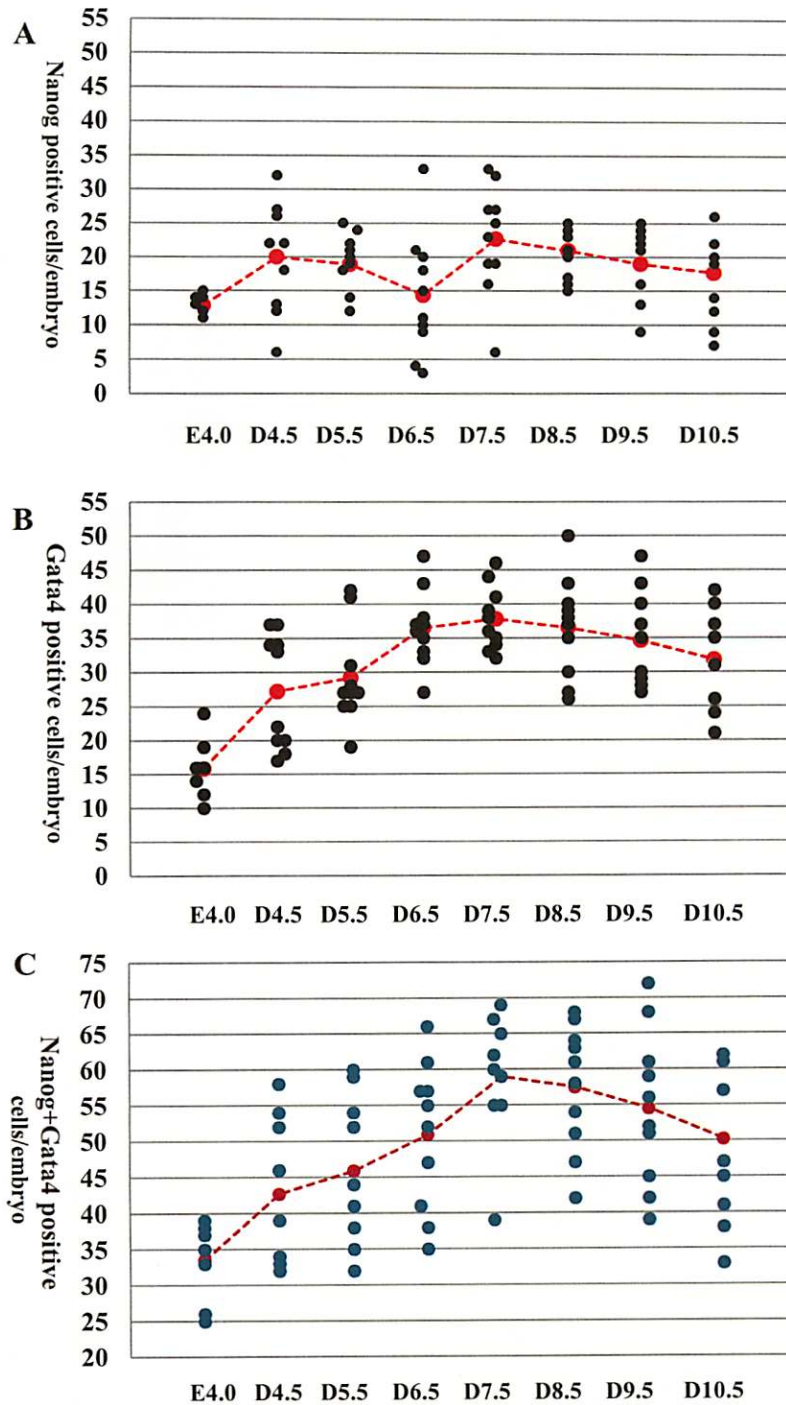


図3.2 NanogとGata4抗体で染色された細胞の数

NanogとGata4抗体でE4.0の非休止胚と休止胚を染色し、それぞれの抗体で染色された細胞数を図3.1同様にImarisを用いて数えた。全ての休止胚において10個ずつ細胞の数を数えた。A：Nanog抗体で染色された細胞の数 B：Gata4抗体で染色された細胞の数 C：NanogとGata4抗体で染色された細胞の合計数 赤丸は平均を示す

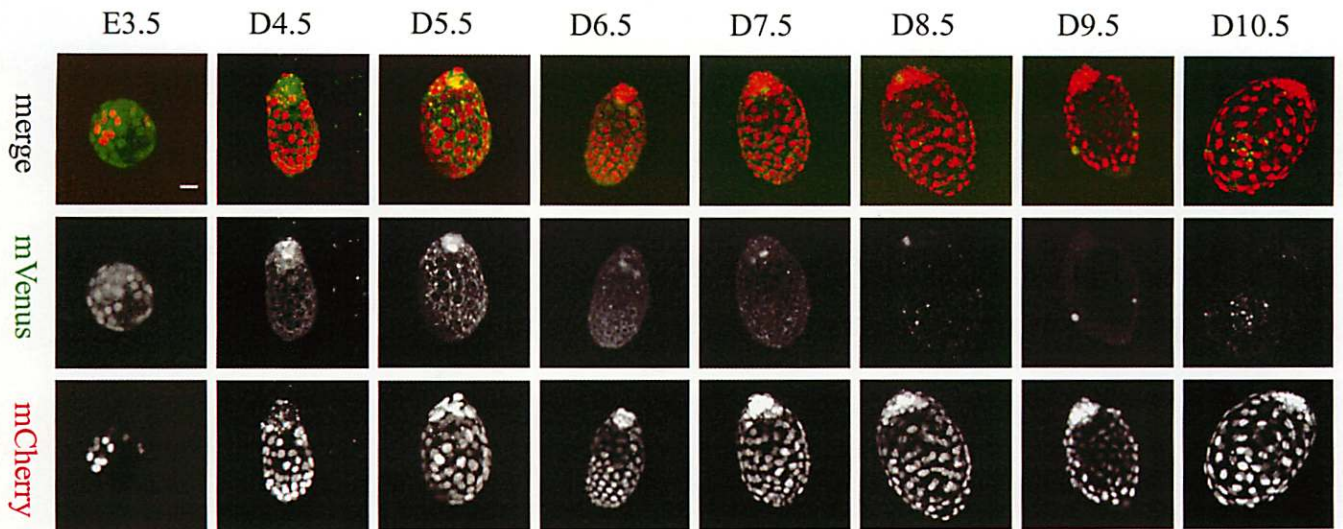
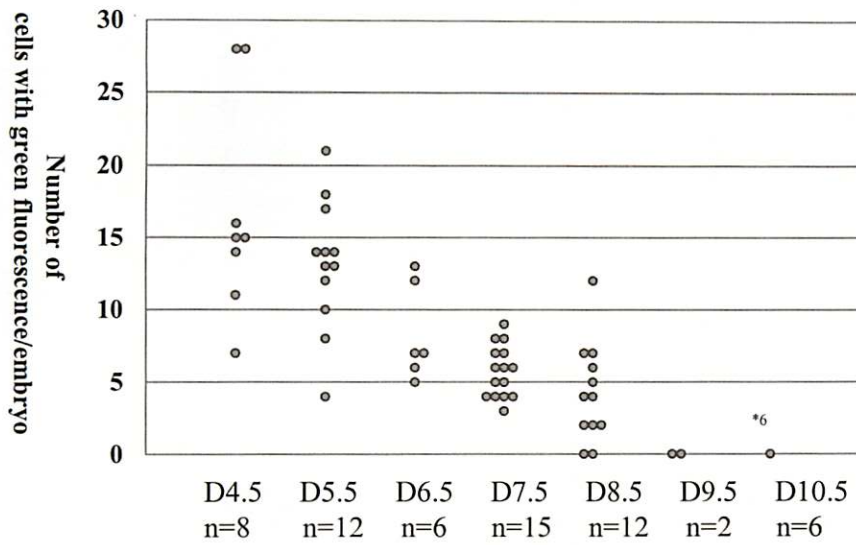


図4.1 Fucci2マウスの休止胚の観察

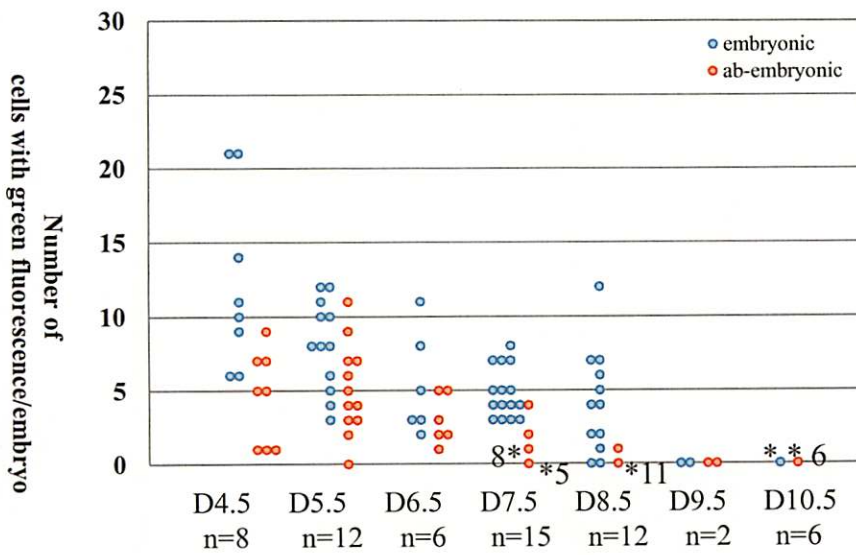
Fucci2マウスを休止誘導し、休止1日目～7日目のD4.5～D10.5の休止胚を回収し観察した。それぞれMIP画像を示す。Scale bar : 20  $\mu m$



A



B



C

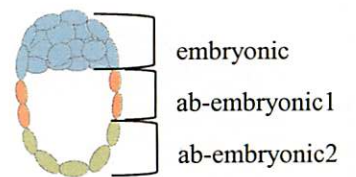


図4.2 **Fucci2**マウスの休止胚における緑色の蛍光を示す細胞（S~M期細胞）の数  
 図4.1で撮影したFucci2マウスのD4.5~D10.5の休止胚の画像をもとに、Imarisを用  
 細胞の数を数えた。A: 休止胚全体における緑色の蛍光を示す細胞の数 B: 休止胚  
 の3領域それぞれの緑色の蛍光を示す細胞の数 C: 休止胚の3領域  
 \*同じ場所に点が複数分布していることを示す。\*横の数字は重なった点の数を示す

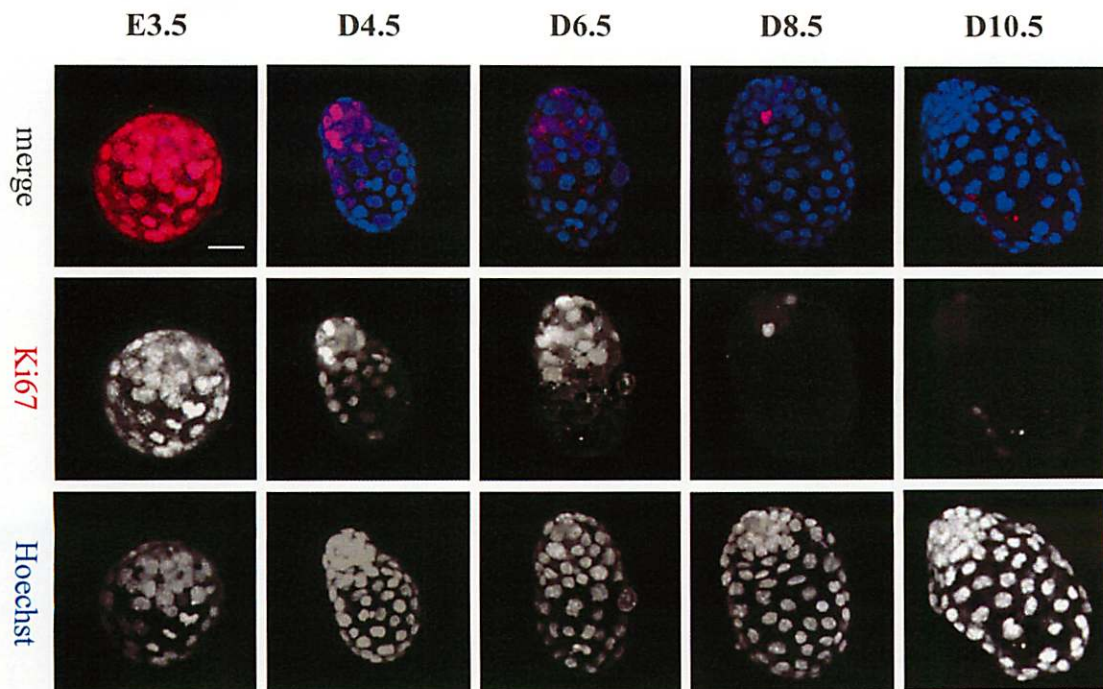
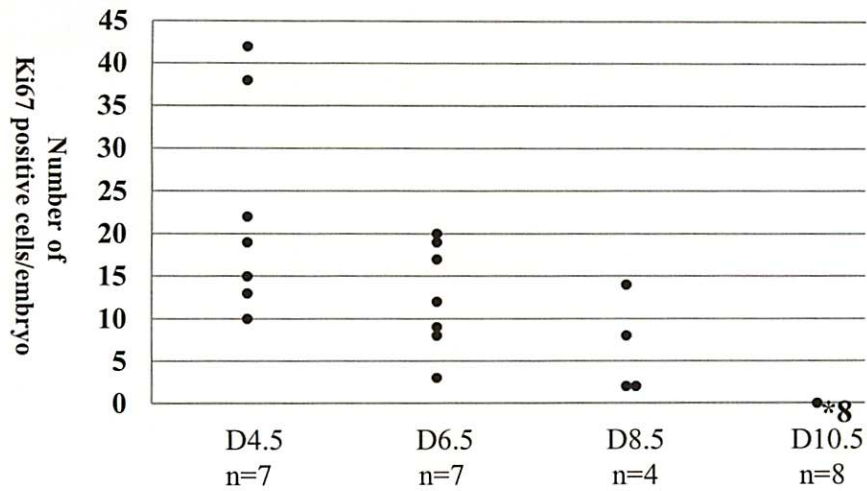


図4.3 休止胚のKi67抗体による抗体染色

E3.5の非休止胚とD4.5、D6.5、D8.5、D10.5の休止胚を回収しPFAで固定後、Ki67抗体で抗体染色、核をヘキストで染色した。それぞれMIP画像を示す。

赤：Ki67 青：Hoechst Scale bar：20  $\mu$ m

A



B

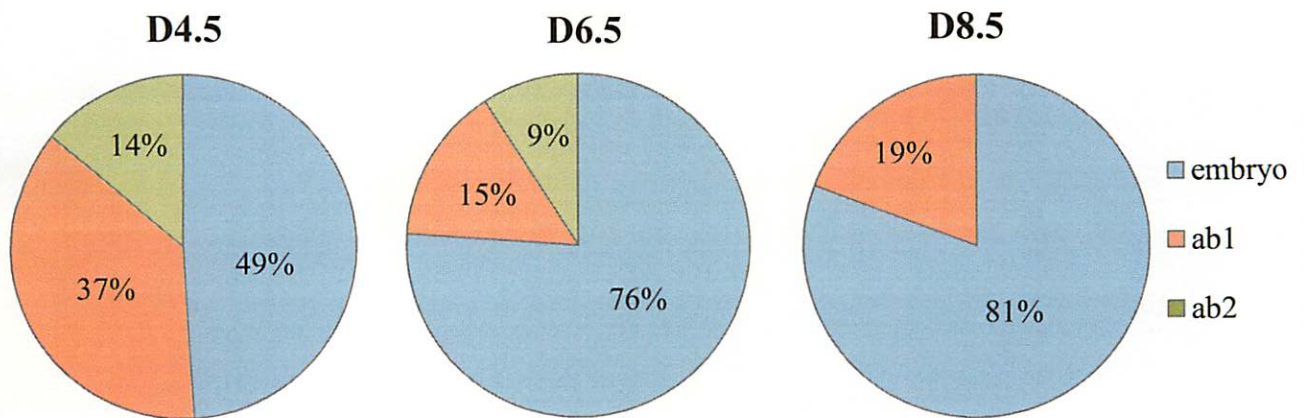


図4.4 休止胚におけるKi67抗体で染色された細胞の数と割合

図4.3で撮影したD4.5、D6.5、D8.5、D10.5の休止胚の画像をもとに、Imarisを用細胞の数を数えた。A: 休止胚全体におけるKi67抗体で染色された細胞の数 B: Ki67陽性細胞数が胚の3領域それぞれに占める割合

\*同じ場所に点が複数分布していることを示す。\*横の数字は重なった点の数を示す

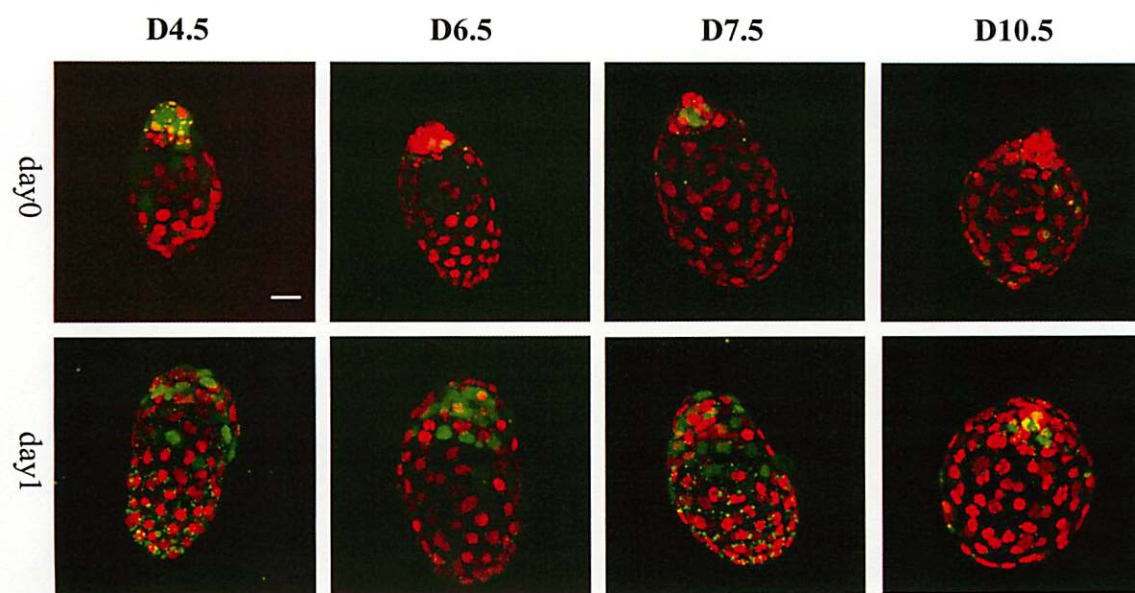


図5.1 Fucci2マウス休止胚のKSOM下での培養

Fucci2マウスの休止胚を取出し、KSOM中に入れて培養した。Day0は子宮から休止胚を取り出してすぐにKSOMに入れて撮影。Day1はKSOMで培養して1日経過して撮影。mCherryとmVenusのmerge画像。それぞれMIP画像を示す。Scale bar : 20  $\mu\text{m}$



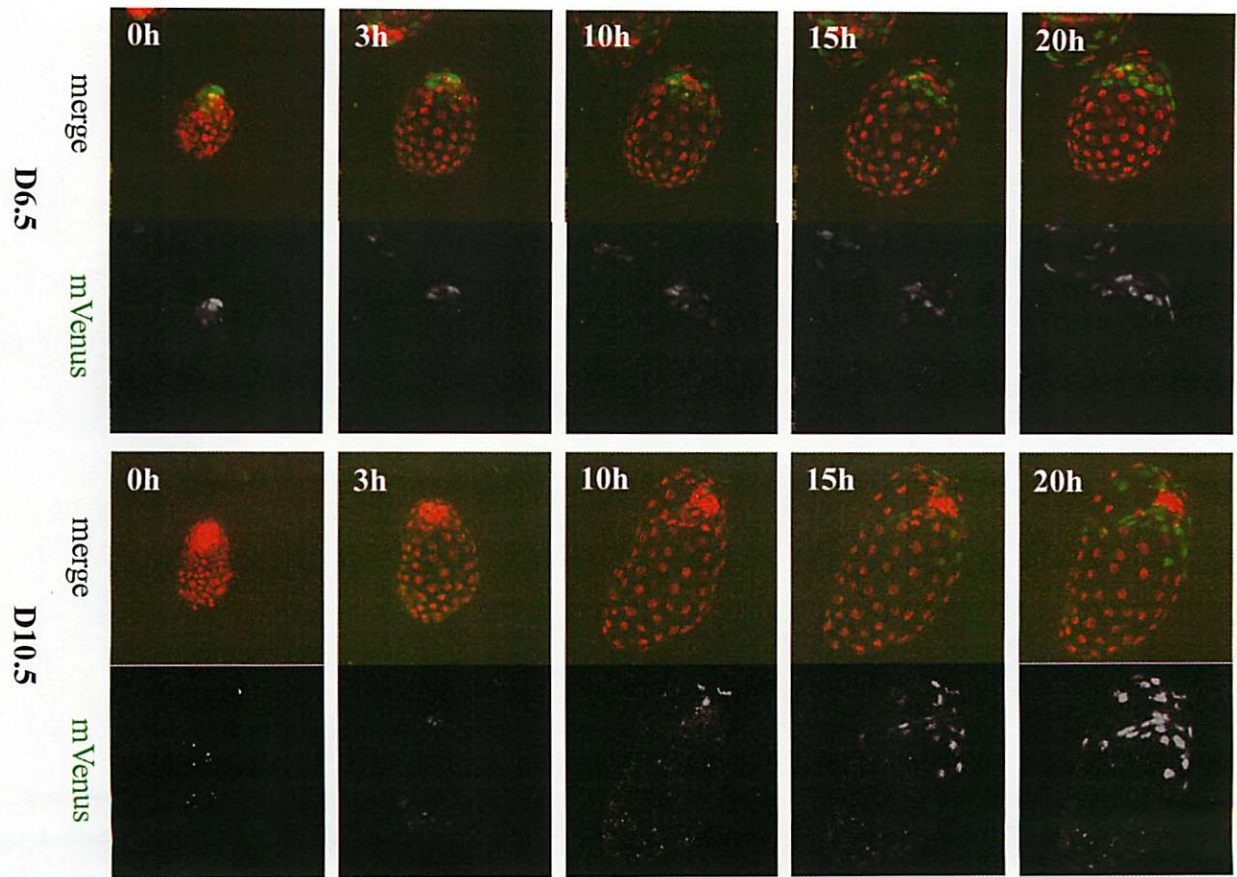


図5.2 Fucci2マウス休止胚のKSOM下でのライブイメージ

Fucci2マウスのD6.5とD10.5の休止胚を取出し、KSOM中に入れCV1000で撮影。mCherryとmVenusのmerge画像とmVenusの画像。それぞれMIP画像を示す。

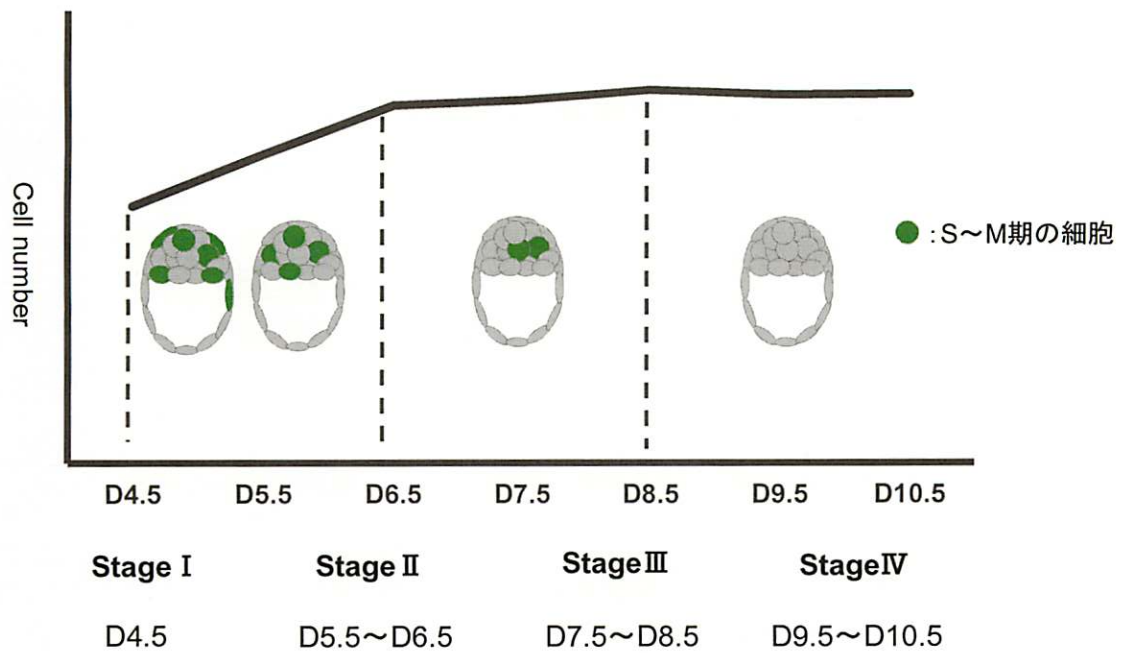


図6.1 休止胚の分類

休止胚の細胞数と細胞周期によって、休止胚を分類。

### 第3章 考察

本研究では休止期間の異なる休止胚を7日間にわたり、分化状態、細胞数、細胞周期に関して継時的に解析をおこなった。分化状態は休止誘導後、7日の間、着床前の胚盤胞の分化状態で維持されていることがわかった。休止期間の長さによって分化状態の変化は見られなかった。細胞数については、休止誘導後3日後までは細胞数の増殖が見られるが、その後は細胞数の増殖が見られなくなった。休止の期間の長さの違いによって細胞数の増加が見られる場合と見られない場合があった。7日間にわたり休止胚の細胞周期を観察すると、休止胚の殆どの細胞はG1またはG0期に属しており、休止期間が長くなるにつれて細胞周期がS~M期の細胞は完全にいなくなり、G1またはG0期の細胞となる。そして最終的には全ての細胞がG0期へ移行することがわかった。これらの結果により休止胚の細胞はG0期へと移行することで、細胞周期を完全に停滞させ細胞の増殖を止めるが、分化状態は休止期間が長くなっても着床前の状態を維持していることがわかった。

マウスでは数週間休止状態を維持できると言われている。着床前の状態を数週間も維持し続けることはとても興味深く、特に分化状態は、休止誘導から7日間は着床直前の発現とその局在をきれいに維持していた。しかしながら、休止期間が異なる休止胚が全て同じ状態であるかという点、必ずしもそうではないと考える。まず本研究で休止胚を回収した際、休止期間が長くなるにつれて子宮から回収できる休止胚の数は少なかった。(data not shown)。休止期間が長くなると、長期間の休止状態に適応できる胚のみ子宮に留まることができるのではないかと考える。また、休止胚の偽妊娠マウスの移植では、D10.5胚を移植した場合と比較すると、D4.5胚を移植した方が子宮への着床率が高かった。D10.5胚を移植した場合には着床痕が見られたが、着床初期の段階で発生がう

まくいかず成長していない胚も多く見られたと考えられる。これらのことから休止期間の長さだけでなく、同じ時期でも質の異なる休止胚は存在するのではないかと考える。

正常発生では着床を期に胚の細胞数は爆発的に増える一方、休止胚では休止誘導後3日までに細胞の増殖が見られなくなる。着床直前の胚は着床したら直ちに急激に細胞を増やす状態へとシフトしていく一方で、胚が休止状態にさらされると、着床前の状態を維持するために細胞の増殖を徐々に抑える方向にもっていく機構が働いていると考える。R26p-Fucci2 マウスの休止胚の観察から、休止胚のほとんどがG1またはG0期であり、休止期間が長くなるにつれて分裂期を含むS~M期の細胞が少なくなり、見られなくなる。Ki67抗体の染色からD10.5の休止胚では全ての細胞がG0期で停滞していることから、最終的に細胞周期をG0期に停滞させることによって、細胞増殖を防いでいると考える。細胞周期をコントロールすることで段階的な細胞増殖の変化が見られたと考える。

先行研究でも細胞増殖が見られなくなるのは2~3日かかると言われている(Mclaren, 1968)。細胞周期を調節しながら休止期間の違いによって細胞の増殖が見られる時期と見られない時期が存在することになる。細胞数と細胞周期の状態から休止胚は次の4つの状態に分類できるのではないかと考える(図6.1)。

ステージ1 (D4.5) : S~M期の細胞がembryonic側(ICMとTE)に存在し、細胞の増殖が見られる。ステージ2 (D5.5~D6.5) : S~M期の細胞がICMの領域にのみ存在し、細胞の増殖も見られる。ステージ3 (D7.5~D8.5) : S~M期の細胞がICMの領域に存在するが、細胞の増殖が見られない。ステージ4

(D9.5~D10.5) : S~M期の細胞が存在せず、細胞の増殖も見られない。これまでは休止胚は一括りにして扱われてきたが、本研究によって細胞数と細胞周期によって休止胚は4つに分類でき、休止期間によって休止胚は異なる状態(細

胞数と細胞周期)をとることがわかった。本研究では細胞数と細胞周期の点で休止胚でも休止期間の違いによって異なる状態をとることがわかったが、他の面でも違う点がある可能性も考えられる。

本研究では、休止期間による休止胚間の違いだけではなく、胚の領域によって休止状態に対する細胞周期の反応が異なることもわかった。休止状態に入ると胚の ab-embryonic 側の TE では全ての細胞が G1 または G0 に分類されることに対して、embryonic 側の ICM、ICM に近接する TE では S~M 期の細胞が存在する。ICM を境に胚の領域で休止にたいする細胞周期の動きが異なった。細胞周期の領域による反応の違いは休止胚を休止状態から解放した状態にした場合にも見られた。休止胚を KSOM で培養したとき、embryonic 側から S~M 期の細胞が増え始め、ab-embryonic 側には 2 日間の培養では S~M 期の細胞は見られなかった。ただ D10.5 の休止胚では他の時期の休止胚とは異なり、S~M 期の細胞がみられ始めるのが遅く、ICM の領域に少しみられた。培養 2 日目には胚全体にランダムに S~M 期の細胞が見られた。

また質の異なる細胞 (ICM と TE) 間でも反応性が異なるのではないかと考える。embryonic 側の細胞では TE 領域ではすぐに S~M 期の細胞が見られなくなるのに対して、ICM 領域ではしばらく S~M 期の細胞が存在する。さらに同質の細胞である ICM、TE 細胞間でも休止に対する反応性の違う亜集団が存在することも考えられる。TE は前述したように領域によって反応性が異なる。ICM でも細胞周期の動きは同調的ではなく、素早く G1 または G0 期に移行し停滞するものと、休止期間が長くなっても G0 または G0 期で停滞しない細胞が存在した。細胞の領域(embryonic 側と ab embryonic 側)間、質の異なる細胞間 (ICM と TE)、質の同じ細胞間による休止に対する細胞周期の反応性の違いが、休止時期の細胞周期を段階的に変化していくことにどういう意味があるかはわ

からないが、細胞周期を調節することが休止胚が休止胚であるのに必要であるのではないかと考える。これまで休止期間の違いによる休止胚の違いに言及した論文は少なく、どの時期の休止胚でもひとくくりに休止胚として扱ってきた傾向であった。本研究から休止期間が異なる休止胚は全ての点において同じ状態ではないと指摘することができると思う。また 1 つの胚の中でも休止に対する反応性が異なることから、細胞単位で休止胚を扱う際には注意しなければいけないと考える。

これまで休止胚は G0、G1 期のどちらかの細胞で停滞していると言われてきた。本研究の Ki67 抗体の染色により、休止期間が長くなるにつれて G1 期の細胞が徐々に G0 期に移行し、休止誘導から 7 日間までには全ての細胞は G0 期に移行し G0 期で細胞周期が停滞しているのではないかと考えられる。つまり休止胚では最終的に全ての細胞を G0 期にし、休止状態を保っていることが分かった。Nanog 抗体染色からどの時期の休止胚でも ICM の領域で多能性をもつエピプラストが存在している。細胞周期を G0 期で停滞させ細胞増殖を抑えながら多能性細胞を胚の中で維持している。よく比較される ES 細胞の維持機構では増殖を伴う多能性維持機構であるが、休止胚では増殖を伴わず、この違いは cMyc の発現によるものであると考えられている。(Scognamiglio et al, 2016)。増殖を伴わないかを除いた場合、ES 細胞でも休止胚でも LIF/stat3 シグナルを介して多能性を維持している点で、ES 細胞と休止胚の ICM は似た状態であるとも言われていた (Nichols and Smith, 2009)。最近、mTOR インヒビターを加え、胚盤胞を培養すると休止状態に似た状態を *in vitro* で維持し、さらに増殖を伴わない ES 細胞を一時的に作成できることがわかった (Bulut-Karslioglu et al, 2016)。休止胚を培養下で維持でき、休止胚の多能性細胞の維持機構を再現できることになる。mTOR インヒビターを加えることで得られた休止胚が卵巣除去

によって得られた休止胚と同様のものであるか興味がある。

本研究では、休止誘導後 7 日間の休止胚を継時的に調べたことによって、子宮の中での休止胚の状態は休止期間の長さによって異なることがわかった。これまで休止胚は一括りに扱われてきたが、本研究の結果により、休止胚の状態は細胞数と細胞周期の状態から 4 つのタイプ(ステージ 1~4)に分けられると考える。分類したどのタイプ休止胚でも着床前の胚盤胞の分化状態で維持されており、これまでいわれてきた休止胚の特徴と同じであり、これら休止胚は偽妊娠マウスに移植すると正常に発生した。休止胚がステージ 4 に入ると休止胚の細胞は細胞周期 G1~M 期から外れ、静止期である G0 期に入るが、休止誘導後、子宮から休止胚を取り出す (KSOM 下で培養) と、細胞周期は G0 期から G1~M 期に入る。KSOM 下での培養が休止胚を偽妊娠マウスへ移植した場合と同じ条件とは言い難いが、偽妊娠マウスへ休止胚を移植した場合も同様に細胞周期が G0 期から G1~M 期へ移行して正常発生が進むのではないかと考える。非増殖性の細胞や分化細胞のほとんどは G0 期に入っている。G0 期は G1~M 期とは異なり細胞分裂、準備の周期から分かれた状態で、静止期とも呼ばれている。もともと増殖性を持ち、未分化細胞が多く存在している胚盤胞の細胞が、休止状態になると細胞が G0 期に入り、休止状態が停止すると、G0 期から G1~M 期へと移行することには驚いた。休止の開始と停止の際に、細胞の分裂周期と静止期へ相互に移行する調節機構働いているが、どのように細胞周期を調整しているのかはわからない。また細胞周期を調整することで休止の開始や停止を引き起こしているかもしれない。現在、休止の開始や停止を制御する詳しい分子的機構についてはわかっておらず、休止と細胞周期の制御機構について深く調べることで休止の開始と停止を制御する機構を解明するヒントを得られるのではないかと考える。

## 第 4 章 材料と方法

### 遅延着床（胚の休止）の誘導

メスのマウス（ICR 10~36 週齢）とオスのマウス（ICR 11~65 週齢または Rosa26p-Fucci2 12~48 週齢(Abe et al. 2013)) を掛け合わせてプラグが確認できた日を 0.5 日目とする。プラグが確認された 3 日後（3.5 日目）の午前中（9:00~10:00）に両方の卵巣除去手術を行う（Yoshinaga 1966 他）。ソムノペンチル（共立製薬）を注射し、麻酔をかけ卵巣除去を行う。卵巣除去後の次の日から胚を回収する日まで毎日ゴマ油に溶解したプロジェステロン 2mg を午前中（9:00~11:00）に投与した。

休止胚は卵巣除去後 1 日目の胚を D4.5(delayed embryo 4.5)と呼ぶこととし、それ以降の休止胚も同様に D5.5、D6.5、D7.5、D8.5、D9.5、D10.5 とする。この実験では休止誘導(卵巣除去)から休止誘導後 7 日間の胚を対象とした。

### R26p-Fucci2 マウス

Fucci2 マウスは異なる細胞周期で異なる蛍光を発するマウスである(Abe et al., 2013)。G1/G0 期に入っている細胞は赤色の蛍光を示す。一方 S~M 期の細胞周期に入っている細胞は緑色の蛍光を示す。つまり、細胞が G1~G0 か S~M 期の 2 つの時期に分類されるのか、細胞の示す蛍光をみることでわかる。このマウスを用いて生きた状態で胚の細胞周期を調べた。

### 胚の回収

それぞれの時期のマウスを開腹し、子宮を取り出す。取り出した子宮を M2 培地が入ったシャーレに移す。M2 培地でフラッシングをして子宮から胚を取出し回収した。



## 抗体染色

胚を M2 培地で回収後、PBS で洗う。4%PFA/PBS で 4℃一晩固定する。固定後、胚を PBS でよく洗う。固定が完了した胚を 0.2%TritonX100/PBS の溶液に入れ透徹処理を室温 15 分行う。透徹後 2%FBS, 0.2%TritonX100/PBS の溶液に移し、ブロッキング処理を室温 30 分行う。ブロッキング後胚を一次抗体抗 Nanog (Reprocell ウサギポリクローナル抗体 RCAB0001P 200 倍希釈)、抗 Gata4 (Santa Cruz ヤギポリクローナル抗体 SC-1237 500 倍希釈)、抗 Cdx2 (Bio Genex マウスモノクローナル抗体 MU392-UC 1000 倍希釈)で 4℃一晩反応させる。翌日 PBS でよく洗い、二次抗体 Alexa488 (ロバ抗ウサギ抗体 Molecular probes A21206、ロバ抗マウス抗体 Molecular A21202 1000倍希釈)、Alexa594 (ロバ抗ヤギ抗体 1000 倍希釈 MolecularA11058)を反応させる。その後 PBS で 5 分×3 回洗った後、ヘキスト染色 (Molecular H3570 1ug/ml) し、ガラスボトムディッシュ(Mat Tek P35G-0-10-C)上に 20%グリセロール溶液でドロップを作製し、その中にマウントする。

## 胚の移植

レシピエントマウスである ICR の偽妊娠マウスにソムノペンチル(共立製薬)を注射し、麻酔をかけ、十分に麻酔がきいたことを確認したら、移植を開始する。マウスをうつ伏せにして背側全体を 70%アルコールで消毒する。背側に 1~2cm の切り込みを入れ子宮をピンセットでつまみ引き出す。手術用クリップではさみ固定する。子宮に注射針 (27G×3/4" Terumo) で穴をあけ、M2 培地で回収した胚をガラスキャピラリーを用いて移植する。移植後は切り口をクリップで塞ぐ (マウスの胚操作マニュアル 第 3 版 近代出版 p254-257)

## 子宮の固定

卵巣を除去して発生休止を誘導し、開腹するまでプロジェステロンの投与を行う（上記に従う）。D4.5（除去後1日目）、D6.5（除去後2日目）、D10.5（除去後3日目）の子宮を取出し、PBSで洗う。その後ブアン固定液（武藤化学）で一晩固定する。その後70%アルコールで洗い100%アルコール中で包埋するまで保存した。100%アルコールで保存していた子宮を取出し、パラフィン包埋を行った。その後切片を作製してHE染色した。

## 胚のタイムラプス撮影

R26p-Fucci2 オスマウスとICRメスマウスを交配して得られた胚を生きた状態でタイムラプス撮影を行った。ガラスボトムディッシュ(Mat Tek P35G-0-10-C)上に培養液KSOMでドロップを作り、その中に胚を包埋した。包埋後ガラスボトムディッシュを流動パラフィン(Wako 128-04375)で満たし、培養液が乾燥しないようにした。観察する胚をいれ、撮影には共焦点スキャナボックス cell voyager CV1000(YOKOGAWA)を用いた。

## 参考文献

AITKEN, R. J. Changes in the protein content of mouse uterine flushings during normal pregnancy and delayed implantation, and after ovariectomy and oestradiol administration. *Journal of reproduction and fertility*, 1977, 50.1: 29-36.

BARLOW, Peter W.; SHERMAN, Michael I. The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *Development*, 1972, 27.2: 447-465.

BATLLE - MORERA, Laura; SMITH, Austin; NICHOLS, Jennifer. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis*, 2008, 46.12: 758-767.

BULUT-KARSLIOGLU, Aydan, et al. Inhibition of mTOR induces a paused pluripotent state. *Nature*, 2016, 540.7631: 119.

CANIVENC, R.; LAFFARGUE, M. Prolonged survival of nonimplanted fertilized ova in the uterus of rats castrated and treated with progesterone injections. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 1956, 242.24: 2857-2860.

CHA, Jeeyeon; DEY, Sudhansu K. Cadence of procreation: Orchestrating embryo-uterine interactions. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2014. p. 56-64.

COPP, A. J. Effect of implantational delay on cellular proliferation in the mouse blastocyst. *Journal of reproduction and fertility*, 1982, 66.2: 681-685.

DAIKOKU, Takiko, et al. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Developmental cell*, 2011, 21.6: 1014-1025.

DAS, Sanjoy K., et al. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor

in implantation. *Development*, 1994, 120.5: 1071-1083.

FRUM, Tristan; RALSTON, Amy. Cell signaling and transcription factors regulating cell fate during formation of the mouse blastocyst. *Trends in Genetics*, 2015, 31.7: 402-410.

GIVEN, Randall L.; WEITLAUF, Harry M. Resumption of DNA synthesis during activation of delayed implanting mouse blastocysts. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 1981, 218.2: 253-259.

GOTO, Yasuo, et al. Pregnancy achieved by transferring blastocysts into endometrial stroma in mice. *Human Reproduction*, 1992, 7.5: 681-684.

HADIDA, E.; LAFFARQUE, P.; CHAMBON, Y. Reticulohistiocytose maligne leucémique. *Bull Soc Franc Derm Syph*, 1949, 56: 360-362.

HOGAN, Brigid, et al. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold spring harbor laboratory, 1986.

HAMATANI, Toshio, et al. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental cell*, 2004, 6.1: 117-131.

HAND, Steven C.; MENZE, Michael A. Mitochondria in energy-limited states: mechanisms that blunt the signaling of cell death. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211.12: 1829-1840.

HOGAN, Brigid; COSTANTINI, Frank; LACY, Elizabeth. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. 1986.

KIRBY, D. R. Blastocyst-uterine relationship before and during implantation. 1971.

LEE, Jong-Eun, et al. Autophagy regulates embryonic survival during delayed implantation. *Endocrinology*, 2011, 152.5: 2067-2075.

LI, Shi-Jie, et al. Differential regulation of receptivity in two uterine horns of a recipient mouse following asynchronous embryo transfer. *Scientific reports*, 2015, 5: 15897.

LOPES, Flavia L.; DESMARAIS, Joëlle A.; MURPHY, Bruce D. Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction*, 2004, 128.6: 669-678.

MACLEAN HUNTER, Susan; EVANS, Martin. Non - surgical method for the induction of delayed implantation and recovery of viable blastocysts in rats and mice by the use of tamoxifen and Depo - Provera. *Molecular reproduction and development*, 1999, 52.1: 29-32.

MCCORMACK, J. T.; GREENWALD, G. S. Evidence for a preimplantation rise in oestradiol-17 $\beta$  levels on day 4 of pregnancy in the mouse. *Journal of reproduction and fertility*, 1974, 41.2: 297-301.

MCLAREN, A. N. N. E. A study of blastocysts during delay and subsequent implantation in lactating mice. *Journal of Endocrinology*, 1968, 42.3: 453-463.

NICHOLS, Jennifer; SMITH, Austin. Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell*, 2009, 4.6: 487-492.

PARIA, B. C. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholestrogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology*, 1998, 139.12: 5235-5246.

PARIA, B. C.; HUET-HUDSON, Y. M.; DEY, S. K. Blastocyst's state of activity determines the " window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90.21: 10159-10162

PSYCHOYOS, A. A study of the hormonal requirements for ovum implantation in the rat, by means of delayed nidation-inducing substances (chlorpromazine, trifluoperazine). *Journal of Endocrinology*, 1963, 27.3: 337-343.

PSYCHOYOS, A. (1973a) Hormonal control of ovo-implantation. *Vitam. Horm.* 31, 201-256

PSYCHOYOS, A. (1973b) Endocrine control of egg implantation, in *Handbook of Physiology*, Vol 2, part2 (Greep, R. O. & Astwood, E. B. ,eds), pp. 167-215, American Physiological Society, Washington, D.C.

PTAK, Grazyna E., et al. Embryonic diapause is conserved across mammals. *PloS one*, 2012, 7.3: e33027.

RENFREE, Marilyn B.; SHAW, Geoff. Diapause. *Annual review of physiology*, 2000, 62.1: 353-375

RENFREE, Marilyn B.; FENELON, Jane C. The enigma of embryonic diapause. *Development*, 2017, 144.18: 3199-3210.

SCOGNAMIGLIO, Roberta, et al. Myc depletion induces a pluripotent dormant state mimicking diapause. *Cell*, 2016, 164.4: 668-680.

SMITH, DIANNE MOORE; BIGGERS, J. D. The oestrogen requirement for implantation and the effect of its dose on the implantation response in the mouse. *Journal of Endocrinology*, 1968, 41.1: 1-9.

SHORT, R. V., and MARY F. Hay. Delayed implantation in the roe deer *Capreolus capreolus*." In *Symp. Zool. Soc. Lond*, vol. 15, pp. 173-194. 1966.

SPINDLER, R. E.; RENFREE, M. B.; GARDNER, D. K. Carbohydrate uptake by quiescent and reactivated mouse blastocysts. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 1996, 276.2: 132-137.

SURANI, M. A. H. Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implications for implantation and embryonic diapause. *Journal of reproduction and fertility*, 1975, 43.3: 411-417.

WEICHERT, Charles K. The experimental shortening of delayed pregnancy in the albino rat. *The Anatomical Record*, 1940, 77.1: 31-47.

VAN BLERKOM, JONATHAN; CHAVEZ, DANIEL J.; BELL, Hobart. Molecular and cellular aspects of facultative delayed implantation in the mouse. *Maternal Recognition of Pregnancy*, 1979, 141-172.

WHITTEN, W. K. Endocrine studies on delayed implantation in lactating mice. *Journal of Endocrinology*, 1955, 13.1: 1-6.

.YOSHINAGA, K.; ADAMS, C. E. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *Journal of reproduction and fertility*, 1966, 12.3: 593-595.

ZIEGLER L. Beobachtungen über die Brunst und den Embryo der Rehe. Hannover, Germany: Hellweg'sche Hofbuchhandlung. 1843.

## 謝辞

本論文を作製するにあたり、研究の機会をくださり、指導をしてくださった藤森俊彦先生に深く感謝申し上げます。また実験など支えてくださった研究室のみなさんにも感謝申し上げます。