

マウス着床遅延モデルを用いた  
着床期胚の活性化機構に関する研究

東京大学 大学院農学生命科学研究科  
獣医学専攻 動物育種繁殖学教室

平成 12 年度博士課程入学

松橋 珠子

指導教官 酒井仙吉

## 目次

要旨	2
序論	7
第一章	1 1
緒言	1 2
材料及び方法	1 4
結果	1 8
考察	2 1
図表	2 3
第二章	2 8
緒言	2 9
材料及び方法	3 2
結果	3 4
考察	3 9
図表	4 3
第三章	5 6
緒言	5 7
材料及び方法	6 1
結果	6 3
考察	6 7
図表	7 2
第四章	8 5
緒言	8 6
材料及び方法	9 0
結果	9 2
考察	9 5
図表	1 0 0
総括	1 0 5
引用文献	1 1 1
謝辞	1 2 5

## 要旨

着床期になると、胚はそれまでの内在的にプログラム化された遺伝子発現から、外部シグナルに依存した遺伝子発現へとその制御機構を大きく切り替える。着床前の胚盤胞に対し、卵巣の除去などによりエストロジェン ( $E_2$ ) の作用がない環境を作ると、胚は着床直前で胚発生を停滞し、いわば休眠状態に至る。しかしその後、母体に  $E_2$  を投与すると、休眠状態の胚は再び胚発生を開始する。これは、この時期の  $E_2$  に由来する外部からのシグナルが、その後の胚発生には必須であることを意味する。しかし、何故  $E_2$  の作用がない状態では胚発生が停止するのか。そして  $E_2$  の投与により何故胚発生が再開し、 $E_2$  はその後の胚発生に対してどのように関与するのか、その詳細は全くわかっていない。そこで本研究では、着床期胚の発生調節機構を明らかにするために、妊娠マウスの卵巣除去と  $E_2$  投与によって人為的に胚の休眠状態と活性化状態を誘導できる着床遅延モデルを用い、特に胚の細胞増殖能と遺伝子発現制御機構に着目した実験を行った。

まず、着床期胚の胚発生における  $E_2$  の作用を調べた。卵巣除去により  $E_2$  の作用を阻害して休眠胚を作製し、細胞増殖の変化を調べたところ、交配後 3.5 日目頃に卵巣除去を行った場合、胚は交配後 5 日目までほぼ等比級数的に細胞数を増加させ、その後は細胞増殖をほとんど停止した状態で維持されることがわかった。子宮内にある休眠胚に対し、母体に投与することで  $E_2$  を作用させて細胞の DNA 合成活性を調べたところ、休眠胚では活性はほとんど検出されなかったのに対し、 $E_2$  投与後 12 時間には DNA 合成活性を示した細胞数は明確に増加し、 $E_2$  投与後 16 時間から 20 時間の間に胚のおよそ 30% の細胞で DNA の合成が検出された。一方、胚の細胞数や細胞周期が M 期にある細胞の割合は増加しな

ったことから、休眠胚は G1 期で細胞周期を停止していることがわかった。胚の総転写活性は、休眠胚では交配後 4 日目の胚と比較して明確に低下していた。活性化胚では、総転写活性は再び上昇し交配後 4 日目の胚以上のレベルに達した。これらのことから、E<sub>2</sub> の分泌が無い場合、着床期の胚は着床やその後の胚発生を行わずに細胞周期を G1 期で停止して細胞増殖を抑え、総転写活性も低下した状態に移行すること、その一方でこの胚は、E<sub>2</sub> の刺激を受けた場合に急速に総転写活性を回復させ、細胞周期の進行を迅速に開始することが明らかとなった。そこで次に、胚の細胞増殖および遺伝子発現の制御機構に対する E<sub>2</sub> の作用を明らかにするために、この時の細胞周期の制御に関わる因子と、遺伝子発現の変化を制御するエピジェネティックな修飾を明らかにすることを試みた。

初期胚における細胞周期の制御機構は未だ解明されていない部分が多い。4 細胞期以降の胚発生では、細胞はサイクリン D-pRB 系を欠いており、ほぼ M 期と S 期のみの繰り返しによる内在的にプログラム化された遺伝子発現と細胞増殖を繰り返す。これに対し着床期以降の胚では、細胞は外部環境とのコミュニケーションを開始し、胚の中の細胞同士あるいは胚と母体組織間でシグナルを交換しあい、互いの細胞増殖の速度や時期を調整し合いながら、より複雑な構造を形成していくと考えられる。しかし、このような一般の体細胞の持つ細胞増殖機構を胚がいつから獲得するのは不明な点が多い。そこで本研究では、着床期の胚盤胞における細胞周期制御因子の発現の変化を明らかにすると共に、E<sub>2</sub> の刺激の有無がこれらの因子の発現に与える影響を調べた。休眠胚は G1 期で細胞周期を停止していること、E<sub>2</sub> 由来の刺激は MAP-サイクリン D 系を經由して細胞増殖に関与する可能性が高いことから、G1 期の進行を制御する因子の変化に着目した。その結果着床期の胚では、それ以前から発現されているサイクリン D3 やサイクリン E の他に、サイクリン D1 の発現の開始が観察された。休

眠胚ではサイクリン D 及びサイクリン E の発現はいずれも低下しており、一方 p21 の発現の上昇が見られ、G1 サイクリンの機能が抑制状態にあることが明らかとなった。これに対し活性化胚では、サイクリン D とサイクリン E はいずれも発現が急増し、p21 の発現量は低下して、G1 サイクリンの機能が活発な状態に移行していた。

E<sub>2</sub> の有無によって生じる休眠胚と活性化胚では、総転写活性の変化に代表されるように、細胞周期制御因子だけでなく複数の遺伝子の発現が大きく変化していることが明らかとなっている。しかしこの様な遺伝子の発現を制御する主要なメカニズムである、エピジェネティックな修飾の変化は、着床期の胚においてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、エピジェネティックな修飾の中でも比較的研究が盛んに行われ、遺伝子発現への関与と機能の多様性が明らかになりつつある、ヒストン H3 及び H4 のアセチル化修飾とメチル化修飾、そしてヒストン変異体の置換に着目して、E<sub>2</sub> の作用に関連する修飾の探索を試みた。交配後 4 日目の胚および休眠胚と活性化胚でヒストン修飾を検出したところ、それぞれの修飾は胚の種類や部位によって様々な量で存在していることが明らかとなった。内部細胞塊 (ICM) と栄養外胚葉 (TE) では複数の修飾で修飾量が大きく異なる傾向があった。多くの修飾は活性化に伴う胚の総転写活性の変化に関わらず、明確な修飾量の変化を示さなかったが、ヒストン H3 Lysine 9 (H3K9) のジメチル化修飾と H3.1 の変異体である H3.3 への置換量は胚の休眠化や活性化に伴う転写活性の変化に相関した変化を示した。すなわち、H3K9 のジメチル化修飾は休眠胚の ICM で高い修飾レベルを示し、H3.3 は交配後 4 日目の胚および活性化胚で核小体に強く検出された。休眠胚の ICM で検出された H3K9 のジメチル化修飾の上昇は、この修飾が着床期胚の発生進行に関わる遺伝子の発現を抑制していることを示唆しており、ヒストン H3.3 の

核小体への局在は、このヒストンが rRNA 合成を促進することで、活性化胚における翻訳効率を増加させていることを示唆している。

卵巣から分泌される  $E_2$  は子宮から複数のシグナル因子の発現を誘導し、これらの因子は胚へ作用して胚の着床能獲得に寄与する。EGF は子宮側から発現するシグナル因子で、胚側は受容体を発現してこのシグナル因子を受容し、遺伝子発現を変化させることが報告されている。また、卵巣から分泌される  $E_2$  は、子宮内膜において代謝型の 4-OH- $E_2$  となり、これが胚に作用して胚の着床能獲得に関与することが報告されている。これらの外因性シグナル因子が存在しない *in vitro* の胚培養系では胚発生は胚盤胞の時期までしか進行できないことから、*in vitro* 胚でも着床期以降の胚発生には母体側から分泌されるこれらの様なシグナル因子が必要となると考えられる。そこで次に、胚培養系においても *in vivo* における胚の休眠化と活性化と同様の状態が再現されるか調べた。まず、胚培養系で外部から着床能獲得の指標として頻繁に用いられる outgrowth 現象を指標として用い、KSOM 培地中で胚を培養し、増殖因子等を何も添加しない状態およびこれらの因子を添加した時の胚の活性化の有無を調べた。同時に細胞周期制御因子の遺伝子発現、およびヒストン修飾の変化を確認した。その結果、培養液中に何も添加しない場合、胚は胚盤胞までは正常に細胞分裂を繰り返し胚発生を進行したが、受精後 4 日目の透明帯から脱出後は outgrowth 現象を起こさず、胚発生をほとんど停止したままの状態を数日間維持した。また、受精後 5 日目に EGF、 $E_2$ 、4-OH- $E_2$  を添加した場合は、単独で培養液に添加した場合も、EGF と  $E_2$  や 4-OH- $E_2$  を同時に添加した場合も、活性化の指標である胚の outgrowth 現象は見いだせなかった。そこで、単一の因子のみでは胚の活性化を誘導できない可能性を考慮し、次に複数のシグナル因子を含有していると考えられる FBS を用いた。受精後 5 日目に培養液中に FBS を添加した場合には胚の

outgrowth 現象が観察された。また、FBS 無添加下では、受精後 5 日目の胚に対し 7 日目の胚の遺伝子発現は、サイクリン D1 やサイクリン E1 の発現が低下し、休眠胚と類似した遺伝子発現の変化を示した。さらに受精後 7 日目の胚に FBS を投与すると、受精後 8 日目にはサイクリン D1 やサイクリン E1 の発現の上昇が確認され、また受精後 10 日目には outgrowth 現象が確認され、*in vivo* での胚の活性化と類似した状態が再現できた。その一方で、*in vivo* では胚の活性化に伴って修飾量の変化が見られた H3K9 ジメチル化修飾や H3.3 の置換は *in vitro* で FBS により活性化させた胚においては同様の修飾パターンは示されなかった。この様に培養胚においても、*in vivo* における休眠胚や活性化胚の細胞周期制御因子の遺伝子発現の多くを再現できることが明らかとなった。しかし一方で、エピジェネティックな修飾や一部の遺伝子発現が異なっており、outgrowth を指標として再現した今回の *in vitro* モデルは、*in vivo* の遺伝子発現制御機構や細胞周期制御機構を完全には再現していないことが明らかとなった。

以上のことから、胚は着床期に遺伝子発現のメカニズムを大きく転換するが、E<sub>2</sub> 由来の外因性シグナルはこの転換期以降の遺伝子発現の進行に不可欠であり、サイクリン D1 やサイクリン E 等の G1 期サイクリンを介して細胞周期の進行に関わり、またエピジェネティックな修飾を変化させることが示された。活性化後の胚では、シグナル伝達や代謝に関わる遺伝子の発現が大きく上昇することが報告されており、胚は E<sub>2</sub> の刺激による遺伝子発現調節機構の転換により、着床期以降の急激な細胞増殖を可能とする新たな遺伝子発現パターンを生み出すものと考えられる。

# 序論

マウス胚は受精後急激な細胞増殖を開始し、わずか一個の細胞は交配後 7.5 日目には約 15,000 個の細胞の集団に成長する(Snow 1977)。ところが受精卵を体外で培養すると、胚は胚盤胞期で発生を停止し(Streffer et al. 1980)、以降の発生を継続させることができない。この現象は、胚盤胞期胚の発生が内在的にプログラム化された調節機構から、外部シグナルに依存した機構へとその制御機構を大きく切り替えることから生じると考えられる。すなわち胚盤胞期までの胚発生では胚の質量はほとんど変化せず、外部からのシグナル非依存的に、ほぼ細胞分裂期(M期)とDNA複製期(S期)のみの細胞分裂を繰り返す(Aiken et al. 2004; Chisholm 1988; Moore et al. 1996; Smith and Johnson 1986; Whitten 1971)。これに対し胚盤胞期以降の胚は、まず子宮に着床し、その後も外部環境と相互作用しながら、細胞数と質量を共に爆発的に増大させる(Snow 1977)。そのため、外部からのシグナル因子の存在しない培養環境下では、胚はその後の正常な胚発生が行えず、胚盤胞期で発生が停滞するものと推測される。しかし、着床期の胚盤胞における胚発生調節機構の転換の詳細は明らかではない。

*In vitro* における胚発生の停止と同様の現象は、*in vivo* においても着床遅延という現象において見いだすことができる。マウスやラット、カンガルーなどでは、吸乳刺激や季節的な条件によって母体側からのホルモン等の分泌が変化すると、卵巣からのエストロゲン ( $E_2$ ) などの分泌が抑えられ、その結果胚は子宮中に移行した後も着床を行わず、その後の胚発生が停滞する(McLaren 1968; Renfree 1981)。吸乳刺激がなくなると、あるいは適切な季節になると母体のホルモンの分泌が妊娠時の状態に戻り、卵巣からの  $E_2$  などの分泌が引き起こされて、胚は子宮への着床とその後の胚発生を開始する(Lopes et al. 2004; Mead 1993)。この様に、一時的に着床を行わず発生を停止し、子宮内に浮遊した状態にある胚は、休眠胚と呼ばれる。マウスの場合、着床直前の時期に卵巣除去を行い卵巣

からの  $E_2$  の分泌を抑えることで、同様の状態を人工的に成立させることができる (Psychoyos 1973; Yoshinaga and Adams 1966)。この時胚では、子宮への着床が行われなくなるだけでなく、同時に遺伝子発現やタンパク質合成の低下など、細胞活性の低下を伴う胚発生の停滞が認められる (Giebelhaus et al. 1985; Nieder et al. 1987; Weitlauf and Kiessling 1980)。また、母体に  $E_2$  を投与することで胚に対して  $E_2$  を作用させると、休眠状態の胚は細胞活性を上昇させて活性化状態となり、子宮内に着床して以降の胚発生を正常に進行する (Psychoyos 1973)。これらのことは、 $E_2$  由来の外因性シグナルが着床期以降の胚に正常な遺伝子発現と細胞増殖を引き起こさせ、結果として正常な胚発生を継続させるのに必須の因子であることを意味する。しかし、何故  $E_2$  の作用がない状態ではこの時期の胚発生が停止するのか。そして  $E_2$  の投与により何故胚発生が再開し、 $E_2$  はその後の胚発生に対してどのように関与するのか、そのメカニズムは全くわかっていない。

そこで本研究では、着床遅延モデルを用いて着床期胚の胚発生における  $E_2$  の機能を、特に胚の細胞増殖調節機構と遺伝子発現制御機構に着目して解析することで、着床期胚の発生調節機構を明らかにすることを試みた。

まず第一章では、着床遅延モデルにおいて、卵巣除去により作製できる休眠状態の胚と、この胚に  $E_2$  由来のシグナルを与えることによって生じる胚の活性化時の細胞増殖能や転写活性を把握することを試みた。この結果を基に第二章では胚の細胞増殖調節機構に焦点を絞り、着床期の胚における細胞周期制御因子の発現の変化を明らかにすると共に、 $E_2$  が外因性シグナルとして着床期胚の細胞周期を制御する機構を明らかにすることを試みた。また第三章では、休眠胚及び活性化胚におけるエピジェネティックなヒストン修飾の状態を明らかにすることで、着床期胚におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにすることを試みた。第四章では、これらの情報を元に、胚培養系におい

でも着床期胚の胚発生停止が引き起こされることを利用して、*in vitro* での胚の休眠化および活性化系を作製することを試みた。

# 第一章

着床遅延モデルの条件検討と

休眠胚、活性化胚の細胞増殖能・転写活性の把握

## 緒言

自然条件下のマウスでは、出産後まもなく次の交配を行い受精が成立した場合に、子宮中の胚が着床を起こさず数日間子宮内に浮遊し続ける、いわゆる着床遅延状態が引き起こされる(Whitten 1955)。この現象は出産した子マウスの吸乳刺激によって、卵巣からの  $E_2$  分泌が抑えられることによって引き起こされる(Lopes et al. 2004; McLaren 1968; Renfree and Shaw 2000)。1966年に Yoshinaga らによって、妊娠マウスの卵巣を除去し継続的にプロジェステロン ( $P_4$ ) を投与することによって人為的に着床の遅延を引き起こせること、さらに  $E_2$  の投与によって任意の時期に着床を成立させられることが報告された(Psychoyos 1973b; Yoshinaga and Adams 1966)。この報告により着床遅延モデルは、着床研究の格好の研究材料として、胚の着床能獲得や子宮の胚受容能獲得のメカニズム、胚の子宮への接着・浸潤のメカニズムなど、これまで解析の困難だった様々な着床の研究に用いられるようになった(Chavez et al. 1984; Dey et al. 2004; Lopes et al. 2004)。

その一方でこのモデルを用いた研究で、胚の発生自体に着目した研究は数少ない。Weitlauf らは、着床遅延モデルで生じる着床遅延状態の休眠胚と、母体への  $E_2$  投与によって着床能を獲得した活性化胚について詳細に調べ、休眠胚では細胞分裂、RNA やタンパク質の合成、代謝活性が抑えられていること、活性化時にはこれらの活性が上昇することを示した(Bitton-Casimiri et al. 1976; Given and Weitlauf 1981; Nieder et al. 1987; Weitlauf 1974; Weitlauf et al. 1979; Weitlauf and Kiessling 1980)。しかしこれらの研究では、用いた胚の数が少ない、あるいは胚の一部の細胞だけしかシグナルを確認していないなど不備が見られる。また、休眠胚や活性化胚を長時間培養して活性の変化を計測しており、その間に休眠胚が活性化し始めた可能性もあることから、本研究の基盤となるデータとして

扱いにくい。

そこで本章では、まず着床遅延モデルを利用するにあたり、 $E_2$  の作用を考慮した適切な卵巣除去手術時期の選定を行い、次に研究の基盤として、作製した休眠胚や活性化胚における細胞数の変化、DNA 合成能、転写活性の変化についてより詳細に調べ、 $E_2$  と着床期胚の細胞増殖や遺伝子発現との関連を明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### (1) マウス

実験には、6週から10週齢の成熟した雌ICRと6ヶ月齢以降の繁殖能力のある雄ICRマウス（日本SLC、浜松、日本）を用いた。これらの動物は、クリーンルームにおいて自由摂餌・摂水、照明コントロール下（14時間明：10:00-24:00）で飼育した。

### (2) 卵巣除去手術・ホルモン処理・胚採取

本研究では、着床遅延モデルの構築方法について様々な条件検討を行った。その結果、図1-1Aに示す方法で安定した休眠胚の採取が可能となったので、この条件を採用し、休眠胚と活性化胚を作製した。

雄と自然交配した雌マウスは、膣栓が確認された日を交配後0日目（正午＝交配後0.5日目）として3日目に卵巣除去手術を行った（図1-1A）。手術を行った時間は、後述の実験結果から9:00-11:00とした。手術の方法は以下の通りである。ネンブタール（ペントバルビタールナトリウム；大日本製薬、大阪、日本）で麻酔した妊娠マウスの背筋を二カ所切開し、子宮角に近い卵管を一カ所糸で縛って卵巣を切除したのち、子宮を元の位置に戻して筋肉・皮膚を縫合した。

手術したマウスは、処置日の翌日からゴマ油に溶解した2mgのプロジェステロン（4-Pregnene-3,20-dione（P<sub>4</sub>）；Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri）を毎日24時間毎に背部皮下に投与して胚の着床遅延状態を維持した。P<sub>4</sub>の投与は交配後5日目から8日目まで、あるいは胚採取日の前日まで継続して行った。エストロジェン（ $\beta$ -estradiol（E<sub>2</sub>）；Sigma-Aldrich Co.）の投与は、後述の実験結果に従って胚採取の16時間前、あるいは適当な時間にP<sub>4</sub>の投与に合わせて25ng

を背部に皮下注射した。

交配後 3.5 日目から 4.25 日目の正常発生胚、休眠胚および活性化胚は、約 1 ml の HEPES-buffered Whitten's medium (WM) (Whitten 1971)を用いた子宮貫流により採取した。得られた胚の実体顕微鏡像を図 1-1B に示した。

### (3) 細胞数の計測

子宮より採取した胚は0.9%クエン酸ナトリウム/0.3%ポリビニルピロリドン (PVP, Sigma-Aldrich Co.) で20分低張処理したのち、メタノール/酢酸/H<sub>2</sub>O (5:1:4) に1-2分間浸して固定し、スライドガラス上でメタノール/酢酸 (3:1) の滴下によって固定・展開して、風乾により固着させた。メタノール/酢酸 (3:1) で30分固定、メタノール/酢酸/H<sub>2</sub>O (3:3:1) で1分間処理したのち、0.1 µg/ml 4'6'-Diamidino-3-phenylindole (DAPI) /PBSで核を染色し、蛍光顕微鏡で観察して胚あたりの核の数を計測した。

### (4) DNA 合成活性と M 期細胞数

E<sub>2</sub>を投与した着床遅延マウスの子宮から胚を採取し、10 µM 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) を含むWM中で 5% CO<sub>2</sub>/95% air、37 °Cの条件下で4時間培養した後、3.7% パラホルムアルデヒド (PFA) /PBSで4°Cにて一晩固定した。胚は0.3% BSA (Sigma-Aldrich Co.) /PBSで3回洗浄後、2 N HClで37°C、1時間DNA変性処理し、ホウ酸バッファー (3.82 mg/ml Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 9.92 mg/ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.34 mg/ml NaCl, pH 8.5) で10分間の中和処理後、0.3% BSA/PBSで洗浄し、2 µg/mlの抗BrdU抗体 (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN) で室温1時間処理した。一次抗体処理後、0.3% BSA/PBSで洗浄し、続いて30 µg/mlのFITC標識二次抗体 (モノクローナル抗マウス抗体、Jackson

Immuno Research, West Grove, PA) で室温45分間処理し、0.5 mg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich Co.) / 50 µg/ml Rnase A (Roche) / PBSで37°C、30分間処理してDNAを染色後、0.3% BSA/PBSで洗浄してVectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で封入した。蛍光はCarl Zeiss LSM 510共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss Co., Ltd., Oberkochen, Germany) で検出した。Z軸方向に複数枚の画像を得ることで、胚内のすべての細胞について蛍光の有無を確認し、胚の総細胞数に対するシグナルの検出された細胞の数と、M期にある細胞の数を算出した。得られたデータは、分散分析および最小有意差法により、時間経過に伴う変化の有意性と条件区間の有意差の有無を検定した。危険率 $P < 0.05$ をもって有意であるとした。

#### (6) 総転写活性の測定

*In vitro* transcriptional activity assay法はKimらの方法を一部変更して行った (Kim et al. 2002)。交配後4.0日目の胚盤胞、交配後9.5日目の休眠胚、E<sub>2</sub>投与後16時間の交配後9.5日目の活性化胚は、採取直後に.3% PVP/Physiological Buffer (PB : 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM CH<sub>3</sub>COOK, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1 mM Na<sub>2</sub>ATP, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 units/ml RNasin (ribonuclease inhibitor : Promega Corporation, Madison, WI) ) (Ferreira and Carmo-Fonseca 1995; Jackson et al. 1993) で洗浄後、0.05% Triton X-100/PBで1.5分間透過処理し、PBで3回洗浄後、BrUTPを含むtranscription mixture (TM: 2 mM ATP, 各0.4 mMのGTP, CTP, BrUTP, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) /PB中で33°C下15分間インキュベートして転写反応を行った。PBで3回洗浄後、反応を停止するため0.2% Triton X-100/PBに胚を移して4°Cで3分間インキュベートし、PBで3回洗浄して3.7% PFA/PBで室温1時間固定し、免疫染色に供した。免疫染色は抗BrdU抗体を用いて (4) DNA合

成活性の検出時と同様の方法で行い、蛍光はCarl Zeiss LSM 510共焦点レーザー  
スキャン顕微鏡で検出した。胚はその上端から下端までをZ軸方向に2.5  $\mu\text{m}$ 厚の  
複数枚の画像に撮影し、胚全体のシグナルを画像として得た。次に、この複数  
枚の画像を重ね合わせ、シグナルを加算して一枚の画像を作製した。画像のシ  
グナル量はNIH-Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて計測  
した。得られた胚全体の蛍光量から細胞質部分の蛍光量を差し引いて核の総蛍  
光量を得た。この値を各ステージの胚における平均細胞数で除することによっ  
て、核1個あたりの平均蛍光量を算出した。得られたデータは、Student's *t*-test  
により、条件区間の有意差の有無を検定した。危険率 $P < 0.05$ をもって有意差が  
あるとした。

## 結果

### (1) 着床遅延モデルの条件検討と $E_2$ の影響が生じる時期の確認

着床遅延モデルの利用にあたって、適切な卵巣除去手術の処置時刻を決定するために、交配後 3 日目の様々な時刻に卵巣除去手術を行い、得られた休眠胚の個数と、着床が成立した場合に子宮角に確認された着床斑の数を調べた。In vivo では、胚は交配後 3 日目ごく初期になってようやく卵管から子宮角内に移動する。その後、交配後 3.5 日目頃には卵巣から分泌される内因性の  $E_2$  の影響を受けて着床能を獲得する。そこで、胚が子宮内に移動した後、 $E_2$  の影響を受ける前に卵巣除去を行う為に、胚が子宮角内に移行した交配後 3 日目の午前中から午後にかけて卵巣除去手術を行い最適な処置時刻を調べた。その結果、休眠胚の作製には午前 9 時から 11 時の間での卵巣除去手術が最適であることがわかった。得られた休眠胚の一腹あたりの個数は、午前 9 時から 11 時がもっとも多く、時刻が遅くなるにつれて採取される胚数は減少した (図 1-2)。一方、卵巣を除去したにもかかわらず子宮角内に着床が成立した胚は 11 時以降から観察されはじめ、その数は時間経過とともに増加した。これより、卵巣からの  $E_2$  の分泌は交配後 3 日目の 11 時以降に上昇することが示唆された。着床斑の確認された個体では卵巣除去時にはすでに卵巣からの  $E_2$  分泌が開始されており、子宮角内の胚に作用して着床を誘導したと考えられる。

### (2) 休眠胚の細胞数の変化

次に、着床期胚の細胞増殖に対する  $E_2$  の作用を明らかにするために、まず休眠胚の細胞増殖能を調べた。卵巣除去後  $P_4$  を経日的に投与した個体の子宮から様々な日数後に休眠胚を採取し、細胞数の変化を調べた。その結果を、図 1-3

に示す。胚あたりの細胞数は 4 細胞期から胚盤胞期まで等比級数的に増加する (Barlow et al. 1972; Graham 1973)。その勢いは卵巣除去後もほとんど衰えず交配後 5.0 日目には胚あたりの細胞数は 160 ( $162 \pm 6$  cells) に達した。しかし、5.0 日目以降は細胞増殖速度は急速に低下し、交配後 9.0 日目 ( $169 \pm 7$  cells)、13.0 日目 ( $169 \pm 10$  cells) でも細胞数の増加はほとんど見られなかった。この結果から、休眠胚では 5.0 日目以降は細胞増殖がほとんど行われなことが示された。これは同時に本来ならば着床期に受けるはずの  $E_2$  の刺激を受けない場合には、胚はその後の細胞増殖を正常に進行できなくなることを示している。

### (3) $E_2$ 投与時の DNA 合成活性の変化

次に、実際に  $E_2$  からの刺激が休眠胚の細胞増殖を促すことができるかを調べた。活性化した胚は  $E_2$  投与後 24 時間程で子宮内に着床してしまうため、その細胞数が増加したか否かを正確に把握することは困難である。そこで、細胞増殖の指標として、胚の DNA 合成活性の変化および M 期にある割球数の変化を調べた。まず、着床遅延中の個体に  $E_2$  を投与して、0 時間、8 時間、12 時間、16 時間後の胚の DNA 合成活性を調べた。またそれぞれの時期の胚に含まれる分裂期 (M 期) の形態を示す割球の割合を求めた。その結果を図 1-4 に示す。DNA 合成が検出された割球の割合は時間経過に伴い有意な上昇を示した ( $P < 0.001$ 、図 1-4A)。  $E_2$  投与後 8 時間では休眠胚 (0 時間) との間に有意差はなかったが、8 時間後に比べ 12 時間後では有意に上昇した。そしてさらにこの割合は 12-16 時間後にかけて有意に増加した。  $E_2$  投与後 0 時間および 16 時間後の胚における BrdU のシグナルを図 1-4B に示す。同じ時期の胚に観察された M 期細胞の割合は、  $E_2$  投与後 16 時間まで常に 0.06-0.2% と低く、時間経過に伴う有意な変化は認められなかった (図 1-4C)。以上の結果から、  $E_2$  の刺激の効果は投与後 12 時

間には S 期への進行を示す BrdU 陽性の割球数の上昇という形で現れ、投与後 16 時間にはこのような割球の割合が顕著に上昇したことが明らかとなった。また、E<sub>2</sub> の投与によって S 期に入った割球の割合が増加したにもかかわらず、M 期にある割球の割合は増加しなかったことから、休眠胚は G2 期ではなく、G1 期において細胞周期を停止 (G0/G1 期) していたと考えられる。これらの結果から、E<sub>2</sub> 投与後 16 時間には休眠胚は活性化された状態にあると判断し、以降の実験ではこれを活性化胚として用いることとした。

#### (4) 胚の休眠化および活性化における総転写活性

休眠胚では細胞増殖の停滞だけでなくタンパク合成活性や様々な生理活性も低下していることが報告されており (Weitlauf 1974; Weitlauf and Greenwald 1968)、着床期に E<sub>2</sub> の刺激がない胚ではその後の胚発生に必要な様々な遺伝子の発現が行われず、結果として細胞周期進行や着床等の現象を引き起こすことができないということが考えられる。そこで次に、E<sub>2</sub> のシグナルを受けていない休眠胚および E<sub>2</sub> 刺激後 16 時間の活性化胚における総転写活性のレベルを調べた。その結果を示したのが図 1-5 である。細胞あたりの総転写活性は、交配後 4.0 日目の正常発生胚に比べ休眠胚では有意に低くなっていた。また、E<sub>2</sub> 投与により活性化された胚では、総転写活性は休眠胚から有意に上昇し交配後 4.0 日目よりも高くなっていた。

## 考察

本実験では、着床遅延状態の成立および維持のための条件検討を行い、着床遅延モデルから休眠胚と活性化胚を安定的に採取することを可能にした。妊娠マウスでは交配後 3 日目に卵巣からの  $E_2$  の分泌が増加し、子宮の胚受容能が上昇することが報告されている(Lim et al. 2002; Paria et al. 1993; Psychoyos 1973a)。本研究結果から、 $E_2$  の分泌が起こるのは交配後 3 日目の午後であることが示唆された。

卵巣からの  $E_2$  刺激を受けなかった休眠胚では、胚発生に伴う細胞数の増加は、交配後 3.5 日目の卵巣除去手術後も 5.0 日目頃まではほぼ等比級数的な増加速度を維持することが明らかとなった。さらに 5.0 日目以降は細胞増殖速度が急激に低下することが明らかとなった。この結果から、胚の細胞増殖を制御するメカニズムの転換は交配後 5.0 日目頃にあり、胚は交配後 5.0 日目まではそれまでのプログラム化された機構によって等比級数的に細胞数を増加させ続けるが、交配後 5.0 日目以降は胚の細胞増殖に  $E_2$  から刺激を必要とすることが示唆された。

次に  $E_2$  からの刺激が、休眠胚の細胞増殖を促すことを確認した。細胞増殖の指標としては、胚の DNA 合成の変化および M 期にある割球数の変化を調べた。その結果、休眠胚は  $E_2$  投与後 12 時間頃から  $E_2$  の刺激に反応して DNA 合成活性を上昇させた。一方で、M 期にある割球の割合は  $E_2$  投与後 16 時間まで、調べたいずれの時間でも変わらずに低かった。以上の結果から、卵巣より分泌される  $E_2$  由来のシグナルは、交配後 5.0 日目以降の胚で細胞増殖の継続的な進行を維持するのに必須の外因性シグナルであることが明らかとなった。すなわち、この刺激を受容できなかった胚は、交配後 5.0 日目以降、G1 期で細胞周期をほとんど停止すること、そして、その後  $E_2$  の刺激を受けた胚は 16 時間後頃には活

性化して、多くの細胞が G1 期から S 期へと細胞周期を移行することが示された。

では、休眠状態に入った場合、胚の転写活性は維持されるのだろうか。交配後 4.0 日目の胚を指標にして、休眠胚および活性化胚の総転写活性を調べた結果、予想されたとおり休眠胚の総転写活性は交配後 4.0 日目の胚に比べて低下していた。さらに、母体に E<sub>2</sub> を投与すると細胞あたりの総転写活性は交配後 4.0 日目の胚以上にまで回復した。

以上の結果から、着床期に母体の卵巣から分泌される E<sub>2</sub> は確かに胚の細胞増殖を制御することが明らかとなった。また、総転写活性も低下していることから、E<sub>2</sub> は胚の様々な遺伝子発現にも関与することが示唆された。これより休眠胚における細胞増殖の G1 期での停滞は、特に G1 期の細胞周期進行に必要な因子の発現が E<sub>2</sub> の刺激の欠如により低下するためではないかと推測された。そこで、第二章では、胚の細胞増殖調節機構に焦点を絞り、E<sub>2</sub> の刺激がない場合に休眠胚の細胞増殖が抑制されるメカニズムと、母体からの E<sub>2</sub> の刺激によって細胞周期の進行が回復するメカニズムを明らかにすることで、着床期胚の細胞増殖における E<sub>2</sub> の役割を同定することを試みた。特に G1 期の進行に関わる細胞周期制御因子に注目してその発現量の変化を調べることにした。

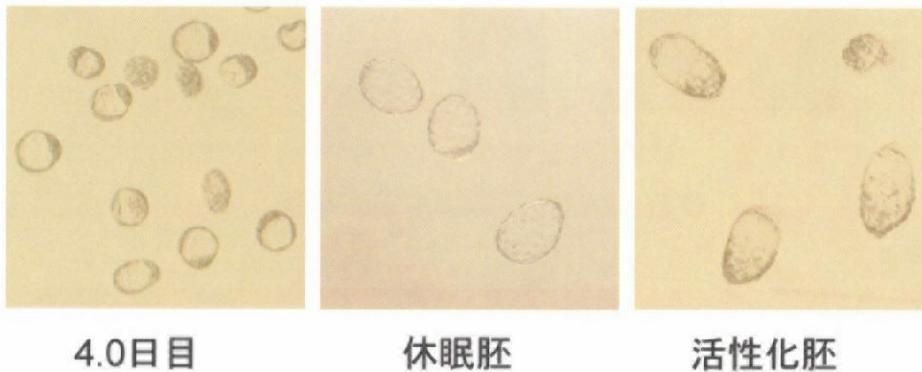
**B**

図 1-1 休眠胚および活性化胚の作成法

(A) 休眠胚・活性化胚作成のために行った手術およびホルモン投与の処置過程を示す。自然交配した時刻を 0 日目の午前 0 時（膣栓を確認した日の正午は交配後 0.5 日目）とし、3 日目に卵巣除去手術を行い、翌日から毎日 2 mg のプロゲステロン（P<sub>4</sub>）を背部皮下に注射して胚の休眠状態を維持した。また、P<sub>4</sub>と同時に 25 ng のエストロジェン（E<sub>2</sub>）を投与して休眠胚の活性化を誘導した。(B) 実験で用いた各胚の実体顕微鏡像を示す。交配後 4.0 日目の胚は正常な妊娠マウスから採取した。休眠胚と活性化胚はどちらも交配後 9.5 日目に採取した。E<sub>2</sub>は活性化胚の採取時間の 16 時間前に投与した。

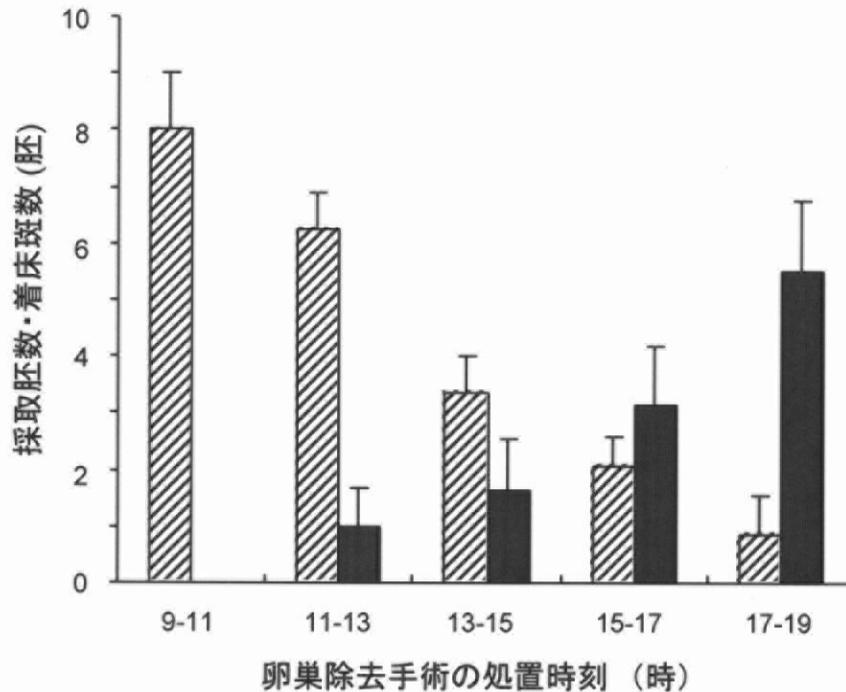


図 1-2 卵巢除去手術時刻と着床遅延との関係

卵巢除去手術の処置時刻と交配後 9.5 日の個体から採取された休眠胚の数、あるいは胚が着床した結果生じる着床斑の数の関係を示す。斜線のグラフは一腹から得られた休眠胚数、黒いグラフは一個体の両子宮角に観察された着床斑数を示している。グラフには平均値±標準誤差を示す。各時刻に用いた個体数は以下の通り。9-11 時;  $n=3$ 、11-13 時;  $n=20$ 、13-15 時;  $n=14$ 、15-17 時;  $n=19$ 、17-19 時;  $n=7$ 。

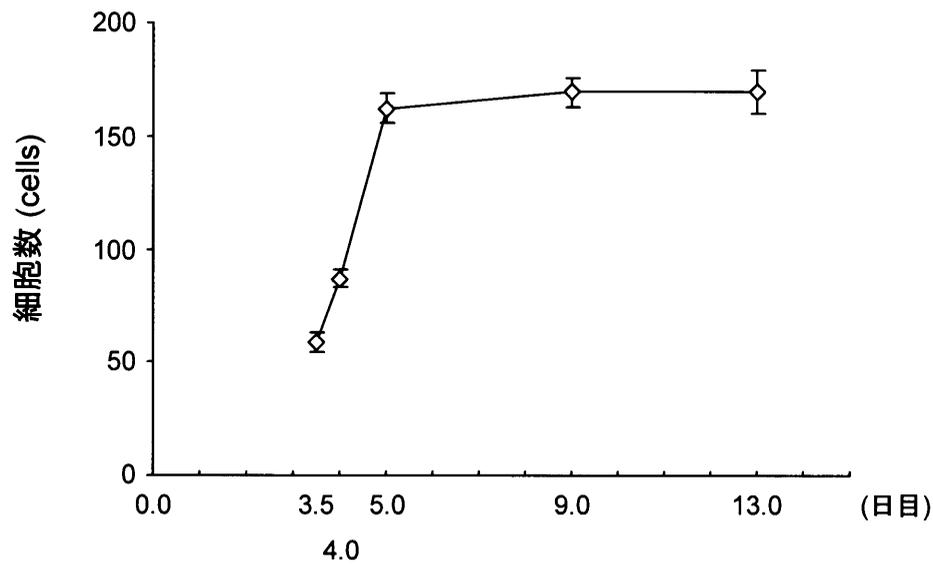


図 1-3 休眠胚の細胞増殖の変化

交配後 3 日目の午前中に卵巣除去を行い、母体に毎日  $P_4$  を投与して胚の休眠状態を維持した子宮から交配後 3.5 日目 ( $n=6$ )、4.0 日目 ( $n=27$ )、4.25 日目 ( $n=14$ )、5.0 日目 ( $n=28$ )、9.0 日目 ( $n=29$ )、13.0 日目 ( $n=7$ ) の胚を採取し、胚あたりの細胞数を計測した。グラフは各日目の細胞数の平均値±標準誤差を示す。

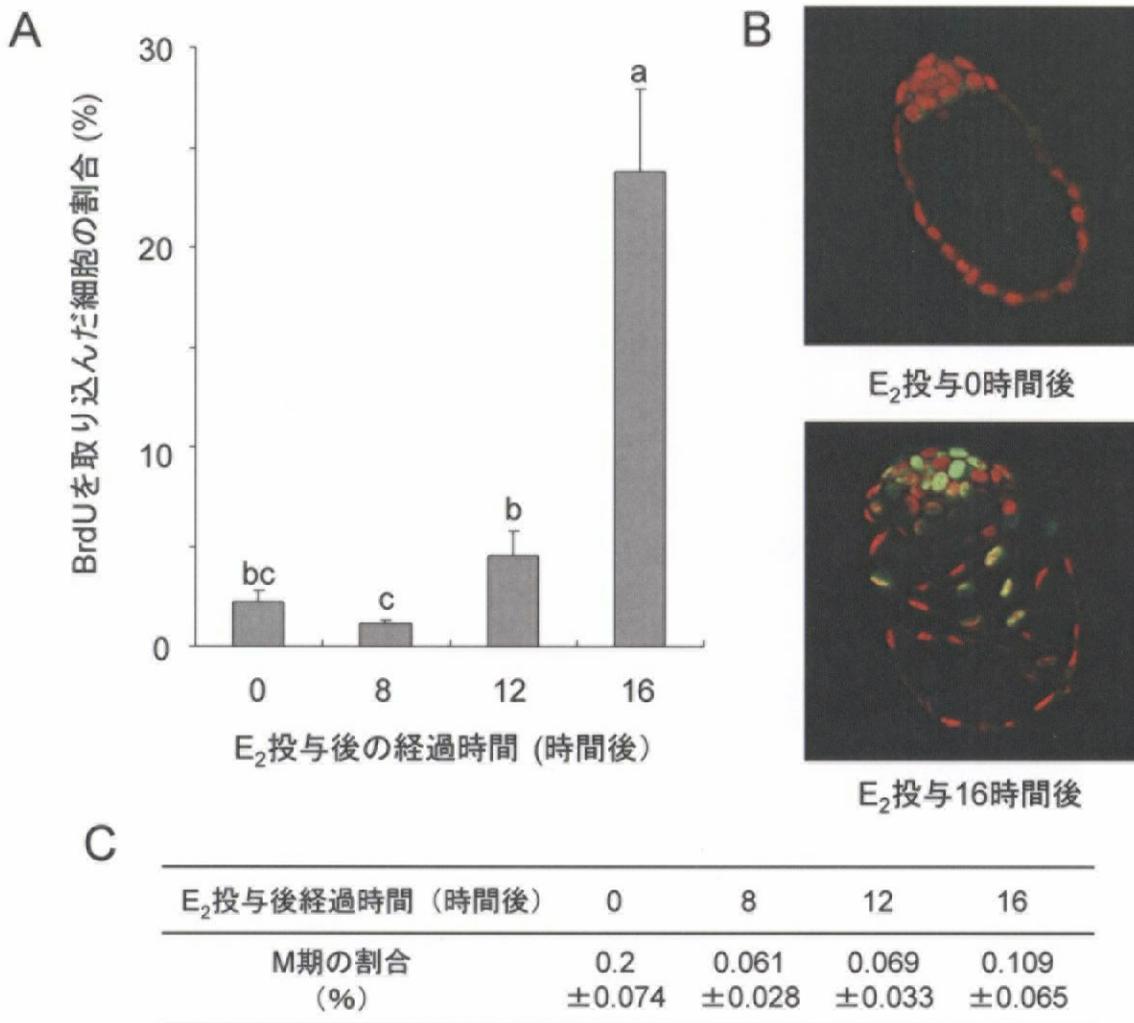


図 1-4 E<sub>2</sub> 投与後の胚の DNA 合成活性と M 期細胞数の変化

卵巣除去手術を施した交配後 9.5 日目のマウスに 25 ng の E<sub>2</sub> を皮下注射し、0, 8, 12, 16 時間後に子宮から胚を回収した ( $n = 27, 46, 29, 15$ )。胚は BrdU を含む WM 培地で 4 時間培養後 3.7% PFA/PBS で固定し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色により BrdU を取り込んだ細胞を検出した。同時に PI で核を染色し、胚あたりの細胞数および M 期の細胞数を求め、胚あたりの割合を算出した。(A) E<sub>2</sub> 投与後胚の DNA 合成の変化。グラフは 3 回の実験の平均値±標準誤差を示す。

(B) E<sub>2</sub> 投与後 0 時間後および 16 時間後の胚において BrdU を取り込んだ細胞のシグナルを示す。緑色は BrdU を取り込んだ細胞のシグナル、赤色は DNA を PI で染色したシグナルを示す。(C) E<sub>2</sub> 投与後の胚に存在する M 期細胞の割合を示した。値は平均値±標準誤差を示す。

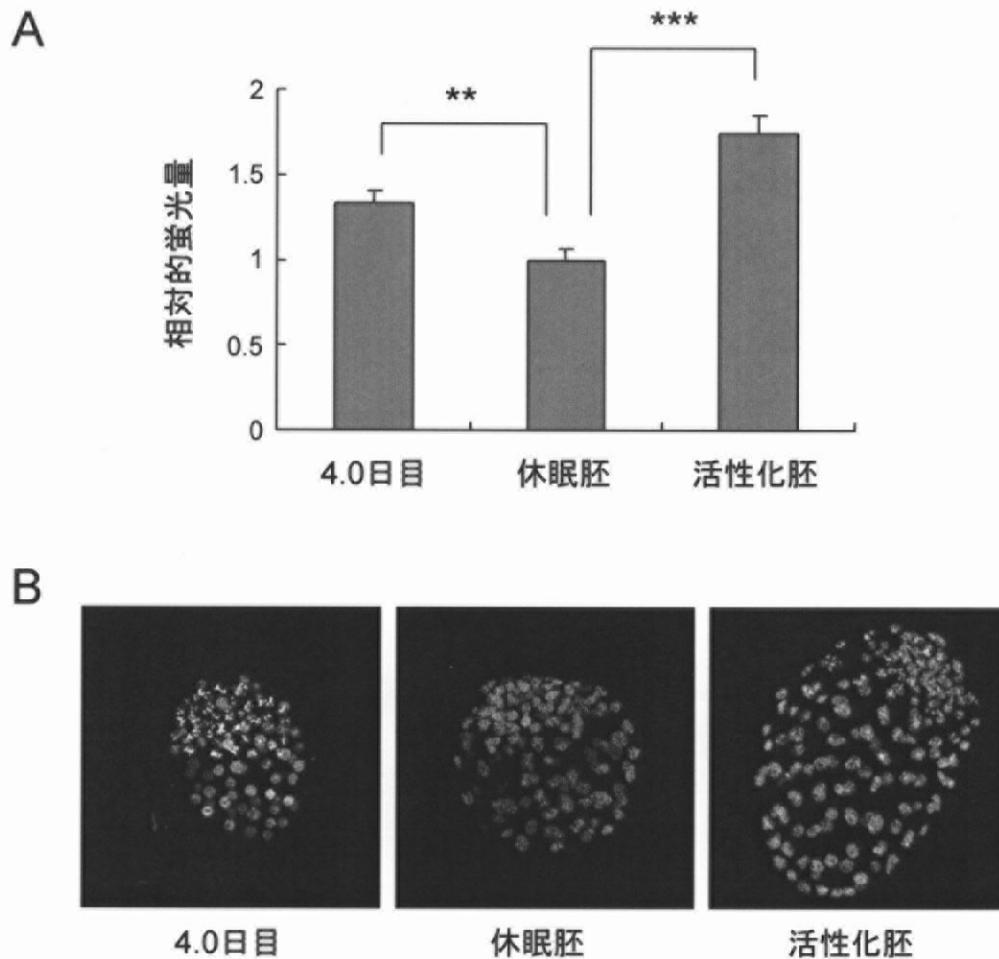


図 1-5 胚の細胞あたりの総転写活性の変化

交配後 4.0 日目の正常発生胚 ( $n=85$ ) と、卵巣除去手術および  $P_4$  投与により作成した交配後 9.5 日目の休眠胚 ( $n=39$ )、および  $E_2$  投与 16 時間後の交配後 9.5 日目の活性化胚 ( $n=37$ ) における総転写活性を BrU 取り込み量を指標にして求めた。取り込まれた BrU は抗 BrU 抗体を用いた免疫染色により検出し FITC の蛍光量を測定した。(A) グラフは休眠胚の値を 1 とした時のそれぞれの胚での細胞あたりの蛍光量の平均値±標準誤差を示す。 \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ 。

(B) 各胚に取り込まれた BrU を免疫染色により検出したシグナルを示す。

## 第二章

着床期胚における細胞周期制御因子の発現量の変化

## 緒言

体細胞の細胞増殖は、細胞分裂期（M 期）と間期を周期的に繰り返すことで進行する。間期はさらに前 DNA 複製期の Gap1（G1 期）、DNA 複製期（S 期）、および後 DNA 複製期の Gap2（G2 期）に分けられる。それぞれの時期には特異的なサイクリン-CDK が周期的に発現して細胞周期を調節する。細胞周期に直接関わるサイクリン-CDK 複合体としては、M 期サイクリンであるサイクリン A/B-CDK1、G1 期サイクリンであるサイクリン C-CDK3、サイクリン D-CDK4/6、サイクリン E-CDK2、S 期サイクリンであるサイクリン A-CDK2 などがある。外部環境に合わせて細胞増殖をコントロールしている体細胞では、外因性のシグナルを受容して細胞周期の進行を制御する G1 期と、その時期の細胞周期制御因子であるサイクリン D-CDK4/6-pRB の機能が重要となる(Matsushime et al. 1992)。体細胞が細胞増殖因子等の外因性シグナルを受容すると、JAK/STAT 系や Ras/Map キナーゼ系、PI3K/AKT キナーゼ系等のシグナル伝達経路を介してサイクリン D の発現や機能が活性化され、G1 期が進行する(Kerkhoff and Rapp 1997; Marshall 1999; Olson et al. 1998; Shaulian and Karin 2002; Squires et al. 2002)。これらのシグナル伝達系はサイクリン D の転写活性や CDK4/6 との結合を上昇させ、pRB をリン酸化することで、E2F の機能抑制状態を解除する(Nevins et al. 1991; Sherr and Roberts 1999)。pRB との結合から解放された E2F は、遺伝子のプロモーター部分で機能してサイクリン E、サイクリン A 等の S 期移行に関わる様々な因子の転写活性を高め、この結果 G1 期が進行し細胞増殖が促進される。新たに発現したサイクリン E やサイクリン A は pRB の別の残基をリン酸化して細胞周期をさらに進行させる。

これに対し、マウス初期胚における細胞増殖調節機構は、通常の体細胞と大

大きく異なっている。初期胚の細胞周期は G1 期をほとんど欠失しており、M 期と S 期を迅速に繰り返すことで、急速な細胞数の増加を可能にしている(Chisholm 1988; Molls et al. 1983; Moore et al. 1996; Smith and Johnson 1986; Streffer et al. 1980)。4 細胞期以降の初期胚では、サイクリン D1 や pRB の発現が見られず(Fuchimoto et al. 1994; Iwamori et al. 2002)、このことが、G1 期短縮による M 期と S 期の迅速な繰り返しを可能にし、外因性シグナル非依存的で分裂周期の短い細胞増殖の進行を可能にしていると考えられている。

しかし胚はこの外因性シグナル非依存的な細胞増殖をいつまでも維持し続けるわけではない。未分化な細胞の集塊であった初期胚が分化し、母体と協調しながら着床を成立させて妊娠を維持し、組織や器官といった複雑な構造を形成するようになるには、細胞が外因性のシグナルを認識し、周囲の環境に合わせて細胞増殖を調節できるようにならなければならない。このため、初期胚は細胞の分化が開始されるといわれる胚盤胞期から、初めて外部環境とのコミュニケーションを開始する着床期にかけて、内在的にプログラム化された細胞増殖から外因性シグナル依存的な体細胞型の細胞増殖調節機構へと転換するものと考えられる。

そこで本章では、このような細胞増殖機構の転換期にある胚に対して、母体からの E<sub>2</sub> のシグナルが胚の細胞増殖に果たす役割を明らかにするために、E<sub>2</sub> 由来のシグナルがその遺伝子発現に関与し、その結果細胞増殖の進行を変化させる原因となっている細胞周期制御因子を同定することを試みた。休眠胚は G1 期において細胞周期を停滞させていること、また同時に総転写活性も低下させていることから、E<sub>2</sub> からの刺激は外因性シグナルとして G1 期の進行を制御し、E<sub>2</sub> の刺激がない状態では、胚は G1 期の進行に必要な細胞周期制御因子の発現量が不足することでその機能を失ったのではないかと予測される。その一方で、

初期胚の細胞周期制御機構では G1 期の進行に関わる制御因子群は機能しておらず、別のメカニズムによって休眠胚の S 期前での停止が引き起こされたとも考えられる。そこで、本研究では G1 期の進行を制御する細胞周期制御因子に着目し、まず、着床直前期から着床期にある胚盤胞における発現を調べた。次に休眠胚及び活性化胚での遺伝子発現の変化を調べることで、休眠胚が G1 期で細胞周期を停止させるメカニズム、および活性化時に細胞周期を再開させるメカニズムを推定した。サイクリンは転写量の変化により機能調節を受けることから、G1 期サイクリン-CDK の活性の指標として G1 期サイクリンであるサイクリン D、及びサイクリン E の転写量を調べた。同時に、G1 期サイクリン-CDK 複合体の機能阻害因子として知られる p21 および p27 の発現も調べた(Cheng et al. 1999; Jackson et al. 1995)。また、休眠胚は G1 期で細胞周期を停止し、G0 期に移行していると考えられることから、G0 期から G1 期への脱出時に機能しているといわれるサイクリン C の発現も調べた(Ren and Rollins 2004)。

## 材料と方法

### (1) 胚の採取と RNA 抽出

交配後 3.5 日目、4.0 日目、4.25 日目の正常発生胚と、着床遅延モデルからの交配後 9.5 日目休眠胚、および E<sub>2</sub> 投与後 16 時間の交配後 9.5 日目活性化胚を WM を用いた子宮貫流により採取した。採取した胚は RNA 抽出に用いるため、迅速に約 30 胚ずつを 400  $\mu$ l の ISOGEN (Wako, Osaka, Japan) に回収し、-80°C にて凍結保存した。

RNA 抽出法は ISOGEN のプロトコールに若干の修正を加えて行った。-80°C から出したサンプルは室温にて融解し、50 pg のウサギ  $\alpha$  グロビン mRNA を外来コントロールとして添加した。攪拌して 4°C で 5 分間静置後、100  $\mu$ l のクロロホルムを添加して攪拌し、4°C で 5 分間静置後に 15,000 rpm、4°C にて 15 分間遠心した。遠心後、中間層を混入させないように注意しながら上層を新しいチューブに移し、2  $\mu$ l のグリコーゲンと 400  $\mu$ l のイソプロパノールを加え、混和して 4°C で 30 分間放置した後、15,000 rpm、4°C にて 15 分間遠心した。RNA の沈殿は 70% エタノールでリンスした後余分な溶液を風乾除去し、20  $\mu$ l の DEPC-H<sub>2</sub>O に溶かして、全量を逆転写反応に用いた。

### (2) RT-PCR

RNA サンプルに 2  $\mu$ l Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) と 2  $\mu$ l の 10 mM dNTP mix (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan) を加え、70°C で 5 分間反応させた。その後、4  $\mu$ l の 10 $\times$  RT reaction buffer、4  $\mu$ l の dithiothreitol、0.5  $\mu$ l の ReverScript II (Wako)、および 0.5  $\mu$ l の RNasin (Promega) を加え、DEPC 水で総量 40  $\mu$ l にして、42°C で 60 分—51°C で 30 分—70°C で 15 分の反応時間で逆

転写反応を行った。反応液は 0.5  $\mu\text{l}$  RNase H を加え、37°C で 40 分間インキュベートして RNA を分解した後、3 倍量のエタノールと 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムを加えてエタノール沈殿を行い、ペレットは 70%エタノールで洗浄して、風乾により余分な水分を除去した後、DDW に溶解して PCR に用いた。

作製した cDNA サンプルについて Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, USA. and TaKaRa, Shiga, Japan) を用いたリアルタイム PCR 法により定量を行った。1  $\mu\text{l}$  の cDNA サンプルに 2.5  $\mu\text{l}$  の 3 $\times$  SYBR Green (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME)、2.5  $\mu\text{l}$  の 10 $\times$  PCR buffer、0.75  $\mu\text{l}$  の 10 mM dNTP mix、0.3  $\mu\text{l}$  の 250 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.25  $\mu\text{l}$  の Ex Taq HS (Takara Bio Inc.)、1  $\mu\text{l}$  の 10  $\mu\text{M}$  各遺伝子プライマーのセンス側、アンチセンス側を加え、全量が 25  $\mu\text{l}$  になるように DDW を加え、PCR 反応液を作製した。用いたプライマーの配列とリアルタイム PCR 反応のアニーリング温度、検出温度条件を表 2-1 に示す。リアルタイム PCR 反応は、95°C 30 秒の変性の後、95°C 15 秒の変性—56~63°C 15 秒のアニーリング—72°C 20 秒の伸長反応—82~91°C 6 秒検出のサイクルを 40 サイクル繰り返して増幅・測定を行い、あらかじめ希釈列を用いて作製した検量線により cDNA 量を測定した。求めた値は、外来コントロールとして添加したウサギ  $\alpha$  グロビンの cDNA 量を元に補正し、各ステージの胚の平均細胞数で割って細胞あたりの値を求めた。

### (3) 統計処理

交配後 3.5 日目から 4.25 日目の着床期胚における遺伝子発現では、得られたデータは Student's *t*-test により条件区間の有意差の有無を検定した。危険率  $P < 0.05$  をもって有意差があるとした。

## 結果

### (1) 着床直前期から着床期の胚における遺伝子発現の変化

まず、着床前の交配後 3.5 日目の胚盤胞、着床期にあたる交配後 4.0 日目及び交配後 4.25 日目の胚盤胞における、G1 期細胞周期制御因子およびその他の遺伝子の発現を調べた。交配後 3.5 日目は、母体からの E<sub>2</sub> の刺激を受けていないと考えられる時期であり、胚は透明帯に包まれ、胞胚腔の比較的大きな中期胚盤胞から後期拡張胚盤胞の状態にある。交配後 4.0 日目は E<sub>2</sub> の刺激を受けていると考えられ、胚は透明帯脱出前後の時期にあたる。一部の子宮では脱落膜化が起きており、外側から着床部位を確認できた。交配後 4.25 日目の胚は透明帯がなく、一部の子宮では脱落膜化が起きており、外側から着床部位を確認できた。

### G3PDH, $\beta$ アクチン

G3PDH および  $\beta$  アクチンは、通常の体細胞では細胞あたりの発現量の変化が少なく、しばしばコントロールとして用いられる遺伝子である。そこで当初は、これらの遺伝子を内因性のコントロールとして用いる可能性も考慮して、それぞれの時期における発現量を調べた。その結果、G3PDH と  $\beta$  アクチンは、どちらも交配後 3.5 日目胚に比べて 4.0 日目、4.25 日目の胚で発現量の有意な増加が見られた (図 2-1)。この結果は当初の予測に反したものであり、おそらく G3PDH および  $\beta$  アクチンは着床後の急激な細胞数の増加に対応するために、転写量が増大しているのではないかと考えられる。この結果から、G3PDH および  $\beta$  アクチンの両遺伝子は内因性のコントロールとしては適切ではないと判断し、以降の実験では、外来のコントロールとして添加したウサギ  $\alpha$  グロブリンのみをコントロールとして、実験間のばらつきの補正に用いることとした。

### サイクリン D

D型のサイクリンには、サイクリン D1、D2、D3 の三種類が報告されている。これらのサイクリンは組織によって発現する種類が異なる(Tan et al. 2002; Wianny et al. 1998)。4細胞期以降胚盤胞期までの初期胚でも、これらの発現は大きく異なっていることが報告されている。すなわちサイクリン D1 は胚盤胞期までその発現が見られない。これに対し、サイクリン D3 は4細胞期では発現が低いものの以降胚盤胞期まで常に発現が検出されている(Fuchimoto et al. 1994)。初期胚におけるサイクリン D2 の発現はこれまでのところ報告がない。

今回、着床前から着床期にあたる時期の胚盤胞においてこれらのサイクリンの発現を調べた結果、交配後 3.5 日目ではサイクリン D1 の発現が見られず、交配後 4.0 日目で初めて発現が確認され、4.25 日目にかけて有意な増加が見られた(図 2-2)。サイクリン D2 は 4.0 日目から 4.25 日目にかけて増加する傾向が見られたが、値にばらつきが大きく有意な変化は見られなかった。サイクリン D3 は交配後 3.5 日目から 4.25 日目にかけて際立った変化は見られなかった。

### サイクリン E

サイクリン E にはサイクリン E1 と E2 の二種類のサブタイプが知られている(Lauper et al. 1998)。D型サイクリンとは対照的にこの二種類のサイクリンは発現のパターンが類似しており、アミノ酸配列の相同性が高く、細胞増殖をしているほとんどいずれの細胞も発現している(Geng et al. 2001; Gudas et al. 1999; Lauper et al. 1998; Zariwala et al. 1998)。

着床期の胚においてもサイクリン E1 とサイクリン E2 の発現パターンは比較的似通っており、どちらも交配後 3.5 日目に比べ交配後 4.0 日目には発現量が低

下し、交配後 4.25 日目には再び発現量が増加する傾向が認められた (図 2-3)。

### CDK 阻害因子

次に、G1 サイクリンの阻害因子である p21 および p27 の発現を調べた。これらの因子は *in vitro* ではすべての CDK に結合してその作用を阻害するが、*in vivo* においてはサイクリン E-CDK2 の機能を阻害する一方で、サイクリン D-CDK4/6 の機能は阻害せず、むしろ複合体の安定化に寄与しているといわれている。着床期における p21 の発現は、交配後 3.5 日目から発生が進むほど有意に減少した (図 2-4)。p27 の発現は交配後 3.5 日目から 4.0 日目まで一過的に増加した後、4.25 日目で減少する傾向が見られた。

### サイクリン C

サイクリン C は CDK3 と複合体を形成し、細胞内に蓄積して G0 期から G1 期の細胞周期へと復帰する際に機能することが報告された因子である (Ren and Rollins 2004)。しかし、この因子に関する研究は未だ少なく、G0 期脱出以外の機能や初期胚における発現については不明な点が多い。本結果では、サイクリン C の発現は交配後 3.5 日目から検出され、その後減少する傾向を示したがその変化は顕著ではなかった (図 2-5)。

### (2) 休眠胚および活性化胚における遺伝子発現の変化

次に、同じ G1 期細胞周期制御因子の発現に対する E<sub>2</sub> の作用を調べた。卵巣除去により E<sub>2</sub> の作用を阻害した結果生じる休眠胚と、休眠胚に E<sub>2</sub> を作用させた結果生じた活性化胚における、これらの因子の発現を調べた。

### G3PDH, $\beta$ アクチン

まず、一般的な遺伝子の代表として、ハウスキーピング遺伝子である、G3PDH および  $\beta$  アクチンの発現を調べた。その結果、G3PDH、 $\beta$  アクチンどちらも休眠胚における mRNA 量は、交配後 4.0 日目の正常発生胚と比較して顕著に低くなっていた (図 2-6)。E<sub>2</sub> により活性化された胚では、これらの遺伝子の転写量は再び増大し、細胞あたりの mRNA 量は交配後 4.0 日目の胚と同レベルに達していた。これらの遺伝子の発現量が休眠胚で低く活性化胚で上昇するという結果は、一章で述べた休眠胚および活性化胚の総転写活性の変化と一致するものである。さらにそれぞれの遺伝子の転写量の変化は、総転写活性の変化に比べて顕著だった。

### サイクリン D

サイクリン D1、D2、D3 のいずれも、休眠胚での mRNA 量は交配後 4.0 日目胚に比べて低く、活性化胚において再び交配後 4.0 日目胚と同レベルにまで上昇していた (図 2-7)。特に休眠胚におけるサイクリン D1 の mRNA 量は活性化胚の約 40 分の 1 ときわめて低くなっていた。休眠胚におけるサイクリン D2、D3 の発現量の低下はサイクリン D1 程顕著ではなかった。これより、サイクリン D1、D2、D3 の発現は E<sub>2</sub> の刺激により促進されることが示された。

### サイクリン E

サイクリン E1、E2 のどちらも、休眠胚における mRNA 量は交配後 4.0 日目胚に比べ顕著に低く、活性化胚では交配後 4.0 日目胚以上に上昇していた。どちらも活性化胚の mRNA 量は休眠胚の約 40 倍に増加していた (図 2-8)。これより、サイクリン E1、E2 の発現は E<sub>2</sub> の刺激により促進されることが示された。

### CDK 阻害因子

G1 期サイクリンや G3PDH などとは対照的に、p21 の mRNA 量は休眠胚では交配後 4.0 日目胚よりやや高く、活性化すると休眠胚の約 2 分の 1 に減少するという変化を示した。一方、同じ CIP/KIP ファミリーの CDK 阻害因子である p27 の転写量の変化は、p21 とは傾向が異なり、休眠胚での mRNA 量は交配後 4.0 日目胚の約 4 分の 1 に低下していた。休眠胚における転写量のレベルは活性化後もほとんど増加しなかった。これより、p21 の発現は E<sub>2</sub> の刺激により抑制されること、p27 の発現は E<sub>2</sub> の刺激に明確な影響を受けないことが示唆された。

### サイクリン C

休眠胚は E<sub>2</sub> の刺激により迅速に活性化し細胞周期の進行を回復することから、G0 期から G1 期への移行に参与するサイクリン C の発現が、休眠胚において維持されていることを予測していた。しかし、休眠胚でのサイクリン C の mRNA 量は顕著に低く、逆に活性化後に交配後 4.0 日目胚と同レベルにまで上昇していた。これより、サイクリン C の発現もまた E<sub>2</sub> の刺激によって促進されることが示された。

## 考察

第一章では、休眠胚は総転写活性が低下し、細胞周期は G1 期で停滞して細胞増殖が行われていないこと、E<sub>2</sub> を投与すると細胞周期の進行が再開することを報告した。そこで本章では、母体からの E<sub>2</sub> のシグナルが胚の細胞増殖に果たす役割を明らかにするために、E<sub>2</sub> 由来のシグナルによって遺伝子発現が変化する細胞周期制御因子の同定を試みた。まず、着床直前期から着床期にある胚盤胞における G1 期細胞周期制御因子の発現を明らかにし、次に、E<sub>2</sub> の刺激の遮断によって細胞増殖が停止している休眠胚、及び E<sub>2</sub> の刺激により細胞周期が再開した活性化胚での G1 期細胞周期制御因子の遺伝子発現の変化を調べた。

その結果、まず通常の胚発生においては、G1 期サイクリンは、D 型の三種類のサイクリンのうち二種類 (D1、D2) と、E 型の二種類のサイクリンのいずれも交配後 4.0 日目から 4.25 日目にかけて発現量が増加する傾向が見られた。交配後 3.5 日目まで発現が認められなかったサイクリン D1 は、着床直前の交配後 4.0 日目になって発現が開始され、E<sub>2</sub> の刺激によって発現量が上昇することが示唆された。また、サイクリン D-CDK4/6 によって活性を調節されている転写抑制因子 pRB も胚盤胞期前期まで発現がなく、胚盤胞期後期になって発現が開始することが報告されていることから(Iwamori et al. 2002)、この時期に G1 期の進行に関わるサイクリン D-pRB 系が確立されることが推測された。一方、CDK 阻害因子である p21 の発現は交配後 3.5 日目から 4.25 日目にかけて大きく低下しており、この p21 の発現の低下にも E<sub>2</sub> の刺激が関わっている可能性が示唆された。

次に、E<sub>2</sub> 分泌の人為的な制御によって作製した休眠胚及び活性化胚における遺伝子発現の結果から、着床期胚において、母体への E<sub>2</sub> 投与は G3PDH、β アク

チン、サイクリン C、サイクリン D、サイクリン E、のいずれの遺伝子発現も促進することが明らかとなった。交配後 3.5 日目から 4.25 日目までの胚の遺伝子発現を調べた結果では、サイクリン C、サイクリン D2 や D3、サイクリン E は発現の一時的な低下や、一時的な発現量の維持状態が見られたことから、E<sub>2</sub> の刺激がない状態ではこれらの遺伝子の発現は低下するが、交配後 3.5 日目から 4.0 日目にかけて加わる E<sub>2</sub> 由来の刺激が、その発現を上昇する方向に誘導しているものと考えられる。休眠胚では、G1 期の進行に関わるサイクリン D (D1, D2, D3) およびサイクリン E (E1, E2)、そして G0 期から G1 期への進行に関わるサイクリン C のいずれも、顕著に減少していた。これに対し、G1 サイクリン-CDK の阻害因子でサイクリン E-CDK2 の機能抑制に働く p21 の発現量は、サイクリンとは対照的に休眠胚で上昇し活性化胚で減少するという、特徴的な変化を示した。これより E<sub>2</sub> の刺激は p21 の発現を抑制する方向に働き、交配後 3.5 日目から 4.25 日目にかけての p21 の発現の減少も E<sub>2</sub> の作用によるものと考えられた。p21 と同じ Cip/Kip ファミリーに属する p27 の発現量は、休眠胚では減少したものの、活性化後もその発現量は低いままほとんど変化せず、E<sub>2</sub> の関与を示すことは出来なかった。これらの結果から、休眠胚ではサイクリン D およびサイクリン E のどちらも減少することで細胞周期が G1 期において停滞し、さらに p21 の発現が高まることでこの状態を維持しているものと推察された。またサイクリン C の発現も低下しており、休眠胚は必ずしも E<sub>2</sub> の刺激に合わせてすぐに G1 期に回復できる状態にあるわけではないと考えられた。

以上の結果から、着床期の胚における細胞周期制御機構に関して以下のような考察を行った (図 2-11)。4 細胞期から胚盤胞期までの着床期前の初期胚では pRB が存在せず (Iwamori et al. 2002)、内在性のプログラムされた遺伝子発現制御機構に基づく、外因性シグナル非依存的な細胞周期制御機構が働き、その結果、

M 期と S 期の迅速な繰り返しからなる等比級数的な細胞増殖が行われる (Chisholm 1988; Moore et al. 1996; Smith and Johnson 1986)。しかし交配後 3.5 日目を以降の着床期になると、胚は外因性シグナル依存的なサイクリン D-pRB-E2F 系の細胞増殖機構を新たに獲得する。すなわち、胚は胚盤胞期になって初めて pRB の発現を開始し (Iwamori et al. 2002)、この結果 pRB は E2F の転写活性化機能を抑制するようになる。このため、その抑制作用を解除するのに外因性の細胞増殖調節シグナルが必要となる。卵巣から分泌される E<sub>2</sub> 由来の刺激はサイクリン D の発現を促し、pRB をリン酸化して E2F の機能抑制を解除する。これによって、サイクリン E などの S 期の開始に必要な細胞周期制御因子の発現が誘導され、細胞周期が進行する。このように、胚では交配後 3.5 日目から 4.0 日目に pRB 依存的な外因性シグナル依存的細胞増殖機構が確立し、その調節に E<sub>2</sub> の刺激が必要とされると考えられる。卵巣からの E<sub>2</sub> 刺激がない場合、胚は休眠胚となるが、この時サイクリン D の発現は迅速に低下し、その結果として pRB と E2F との結合が維持され、サイクリン E の発現量も低下する。それと同時に p21 の発現量が上昇して、サイクリン E-CDK2 のリン酸化活性を阻害する (Jackson et al. 1995)。また、p21 の抗アポトーシス作用や DNA 複製阻害作用によって、細胞の休眠状態が安定的に維持される。休眠胚に E<sub>2</sub> 由来の刺激が与えられた場合は、まずサイクリン D の発現が上昇し、pRB のリン酸化によって G<sub>0</sub> 期からの DNA 複製のライセンス化に必要なサイクリン E の発現を上昇させ (Coverley et al. 2002; Geng et al. 2003)、細胞周期の進行を回復する。また、サイクリン E-CDK2 は E3 ユビキチンリガーゼである SCF<sup>Skip2</sup> と共同して p21 をユビキチン化し、分解を促進することで p21 の発現量を抑えると考えられる (Wang et al. 2005)。

子宮の胚受容能獲得には E<sub>2</sub> の刺激に由来する様々な遺伝子の発現を必要とする。また胚側も、着床能獲得のための様々な遺伝子発現に E<sub>2</sub> の刺激が必要であ

る。このため  $E_2$  の刺激がない、すなわち子宮と胚の双方の準備が整わない状態で胚の細胞増殖ばかりが進行してしまわないように、このような巧妙なメカニズムが働いているのではないだろうか。

表 2-1 リアルタイムPCRに用いたプライマー

Name	Primer	Primer sequence	Temperature (°C) annealing/ measurement
α-globin	sense	5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'	58.0/91.0
	antisense	5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAAT-3'	
G3PDH	sense	5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3'	59.0/88.0
	antisense	5'-CATGATGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	
β-actin	sense	5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'	56.0/90.0
	antisense	5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAAT-3'	
Cyclin D1	sense	5'-TCTACACTGACAACCTCTATCCG-3'	59.0/82.0
	antisense	5'-TTCCTCCACTTCCCCCTC-3'	
Cyclin D2	sense	5'-AGACCTTCATCGCTCTGTGC-3'	63.0/84.0
	antisense	5'-TAGCAGATGACGAACACGCC-3'	
Cyclin D3	sense	5'-CCCCACCCGAAAGGCGCAAT-3'	61.0/87.5
	antisense	5'-CATCCGCAGACATAGAGCAG-3'	
Cyclin E1	sense	5'-TGTTTTTGAAGACCCAGATGA-3'	63.0/84.0
	antisense	5'-AATCCAAGCTGTTGGTGTGG-3'	
Cyclin E2	sense	5'-TCTGTGCATTCTAGCCATCG-3'	59.0/82.0
	antisense	5'-GGTGGTGTGCATAATGCCTCC-3'	
Cyclin C	sense	5'-GCAGTATTATTCCATGGCAGGG-3'	61.0/84.5
	antisense	5'-ACAGGCTACATGTAGGCAAG-3'	
p21	sense	5'-AAGTGTGCCGTTGTCTCTTC-3'	63.5/86.0
	antisense	5'-TCTGCGCTTGGAGTGATAGA-3'	
p27	sense	5'-GAGAAGCACTGCCGGGATATG-3'	63.0/84.0
	antisense	5'-CTCCTGCCATTTCGTATCTG-3'	

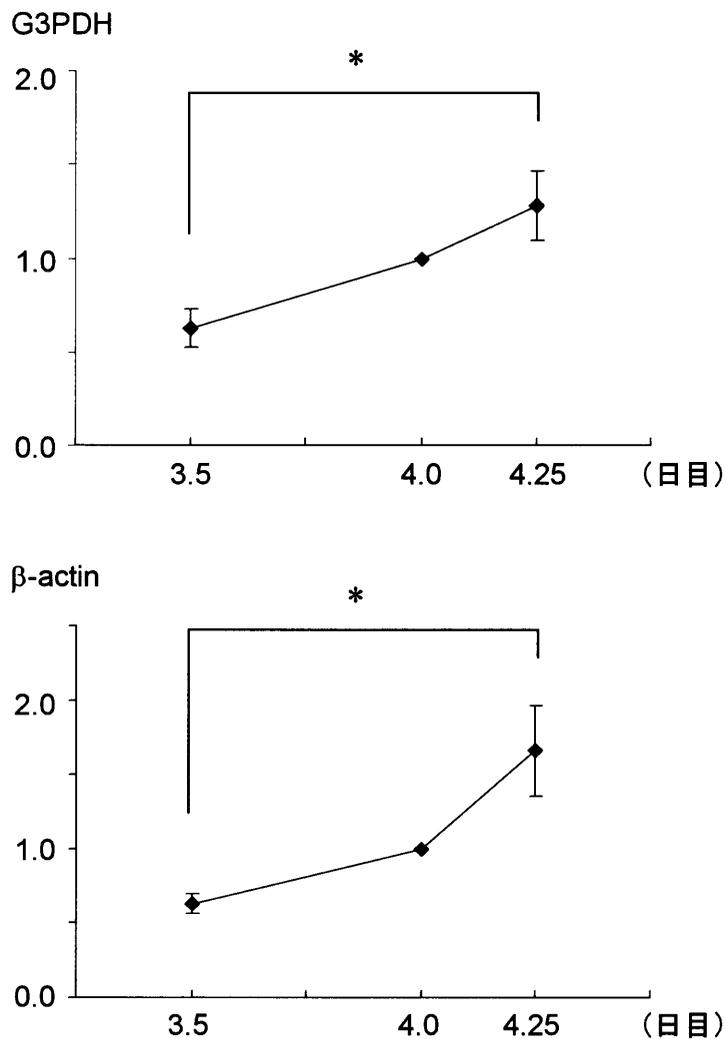


図 2-1 着床期胚における G3PDH とβアクチンの mRNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 3.5 日目 ( $n=5$ )、4.0 日目 ( $n=14$ )、4.25 日目 ( $n=5$ ) の胚における mRNA 量を求め、その平均値および標準誤差を 4.0 日目の平均値を 1 とした相対値で示した。\*印は交配後 3.5 日目と 4.25 日目の間で有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

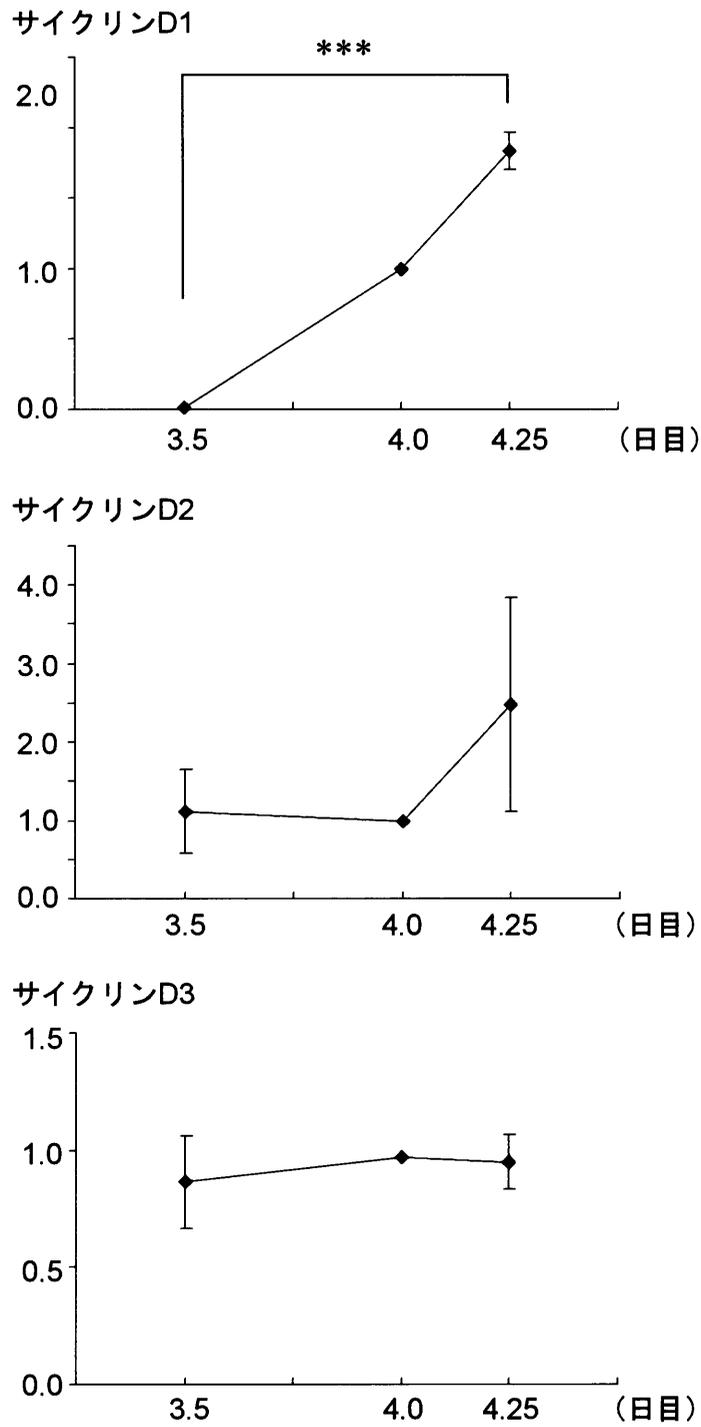
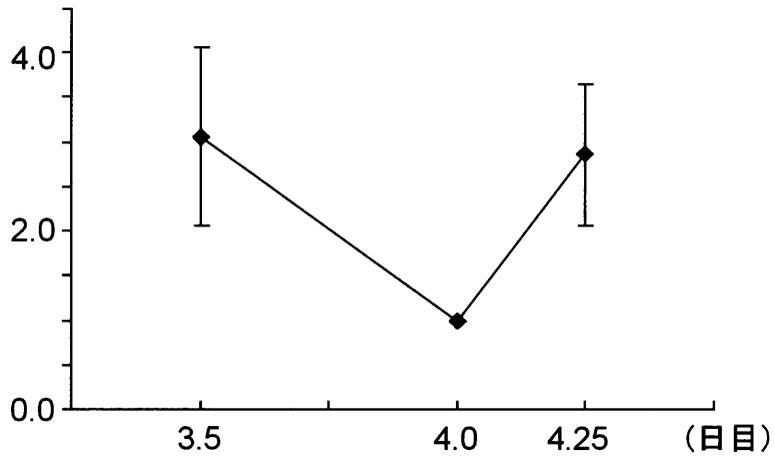


図 2-2 着床期胚におけるサイクリン D (D1、D2、D3) の mRNA 量の変化  
 RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 3.5 日目 (サイクリン D1、D2、D3 はそれぞれ  $n=3$ 、 $n=5$ 、 $n=4$ )、4.0 日目 (同  $n=12$ 、 $n=14$ 、 $n=13$ )、4.25 日目 (同  $n=3$ 、 $n=5$ 、 $n=5$ ) の胚における mRNA 量を求め、その平均値および標準誤差を 4.0 日目の平均値を 1 とした相対値で示した。\*\*\*印は交配後 3.5 日目と 4.25 日目の間で有意差があることを示す ( $P < 0.001$ )。

## サイクリンE1



## サイクリンE2

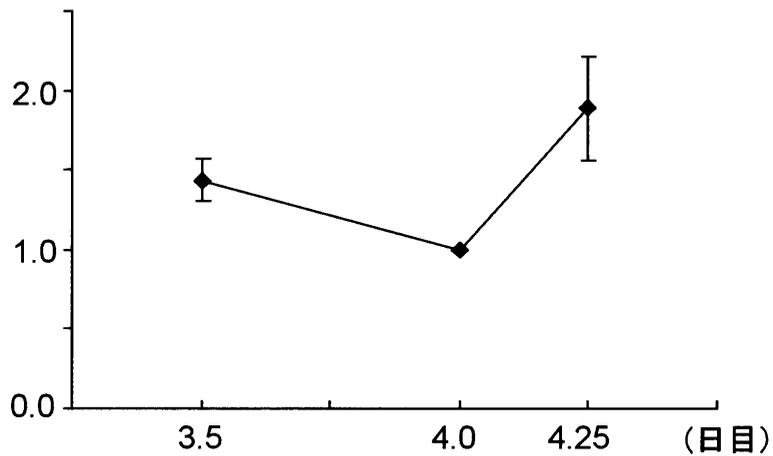


図 2-3 着床期胚におけるサイクリン E (E1、E2) の RNA 量の変化  
RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 3.5 日目 ( $n=5$ )、4.0 日目 ( $n=14$ )、4.25 日目 (サイクリン E1  $n=5$ 、サイクリン E2  $n=4$ ) の胚における mRNA 量を求め、その平均値および標準誤差を 4.0 日目の平均値を 1 とした相対値で示した。

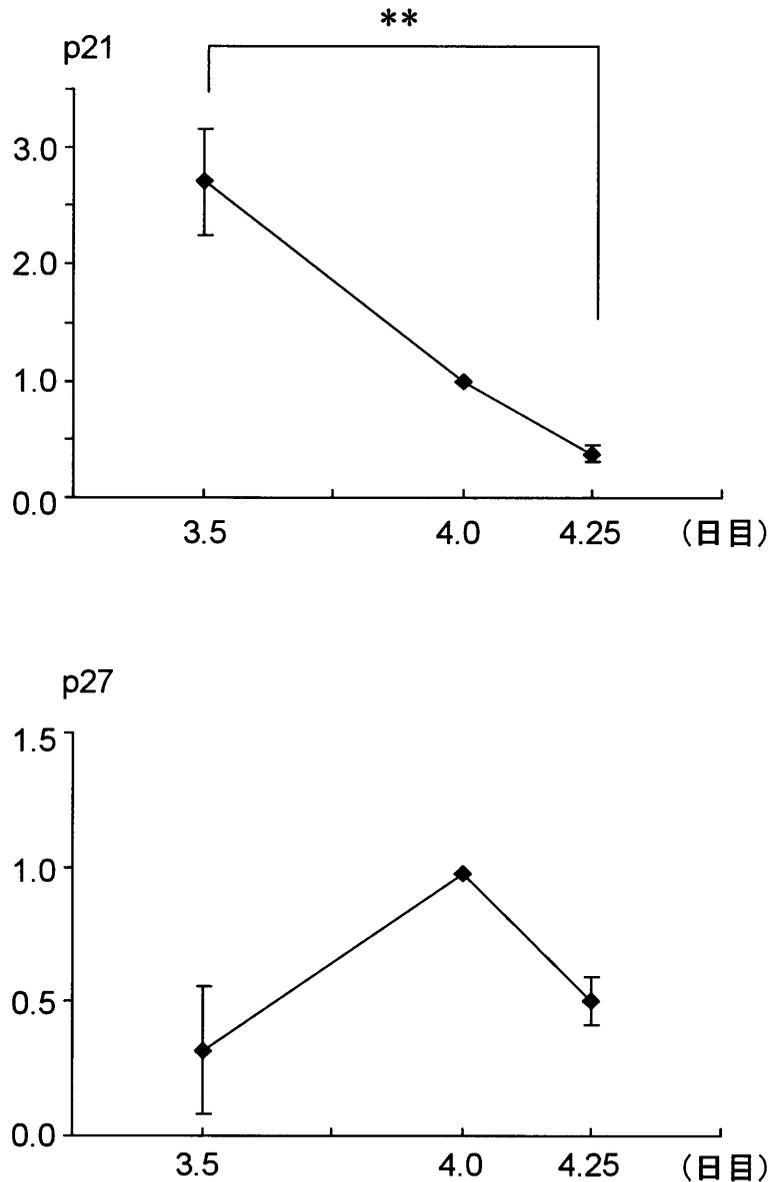


図 2-4 着床期胚における CDK 阻害因子 (p21、p27) の RNA 量の変化  
RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 3.5 日目 ( $n=3$ )、4.0 日目 (p21 は  $n=12$ 、  
p27 は  $n=8$ )、4.25 日目 (p21 は  $n=3$ 、p27 は  $n=2$ ) の胚における mRNA 量を求め、  
その平均値および標準誤差を 4.0 日目の平均値を 1 とした相対値で示した。 \*\*  
印は交配後 3.5 日目と 4.25 日目の間で有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

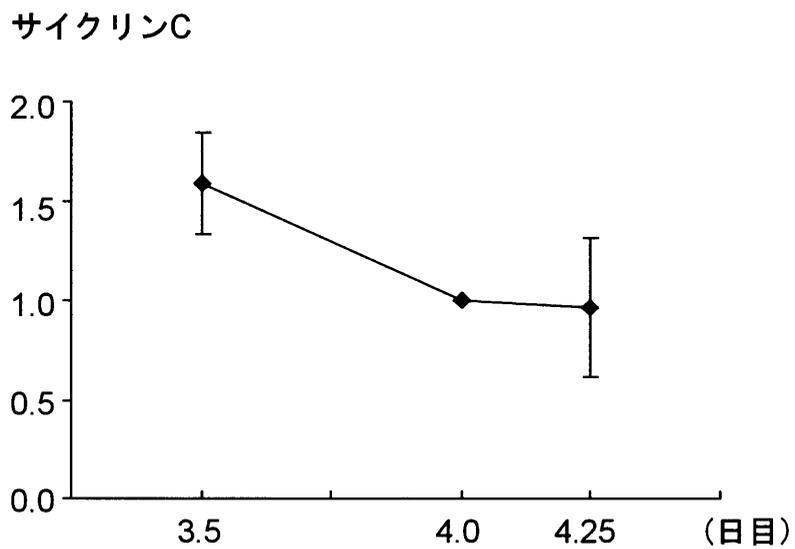


図 2-5 着床期胚におけるサイクリン C の RNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 3.5 日目 ( $n=5$ )、4.0 日目 ( $n=9$ )、4.25 日目 ( $n=5$ ) の胚における mRNA 量を求め、その平均値および標準誤差を 4.0 日目の平均値を 1 とした相対値で示した。

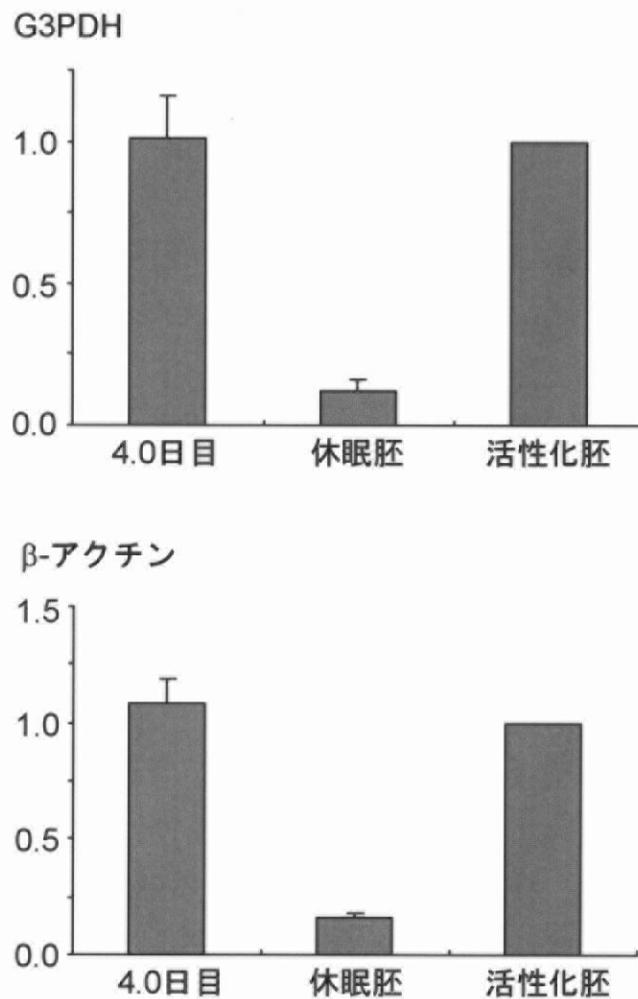


図 2-6 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における G3PDH とβアクチンの mRNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 4.0 日目胚 ( $n=12$ )、休眠胚 ( $n=6$ )、活性化胚 ( $n=10$ ) の mRNA 量を求め、活性化胚の値を 1 とした相対値で示した。グラフは平均値±標準誤差を示す。

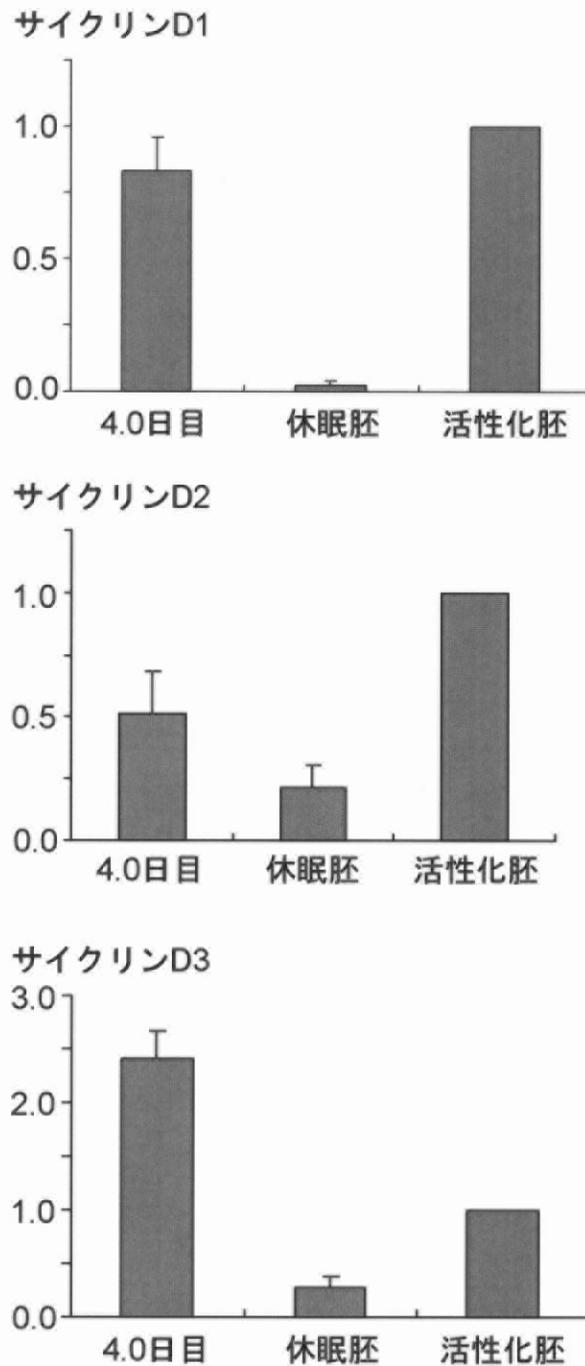


図 2-7 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるサイクリン D (D1、D2、D3) の mRNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 4.0 日目胚 (サイクリン D1、D2 は  $n=12$ 、サイクリン D3 は  $n=11$ )、休眠胚 ( $n=6$ )、活性化胚 ( $n=10$ ) の mRNA 量を求め、活性化胚の値を 1 とした相対値で示した。グラフは平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

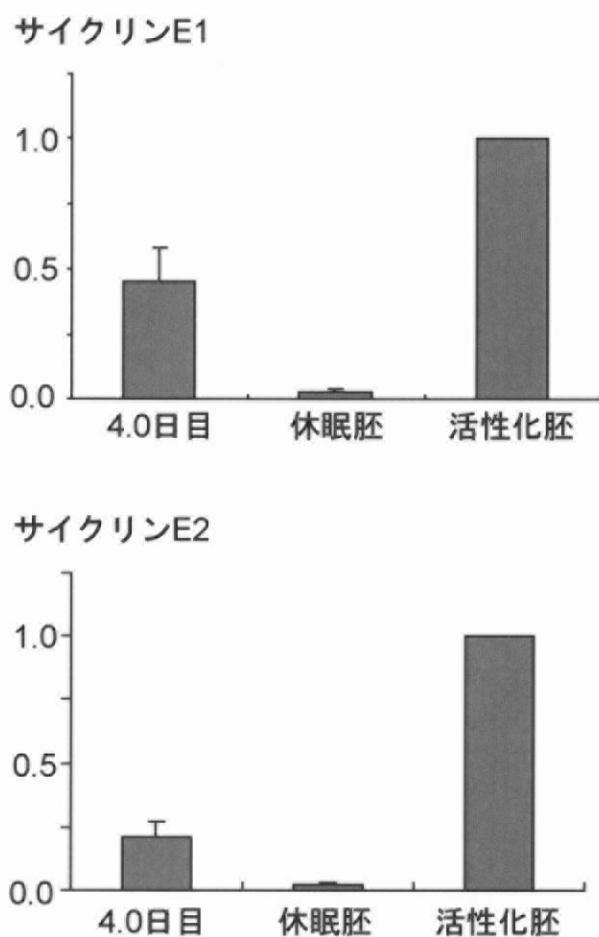


図 2-8 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるサイクリン E (E1、E2) の mRNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 4.0 日目胚 ( $n=12$ )、休眠胚 ( $n=6$ )、活性化胚 ( $n=10$ ) の mRNA 量を求め、活性化胚の値を 1 とした相対値で示した。グラフは、平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

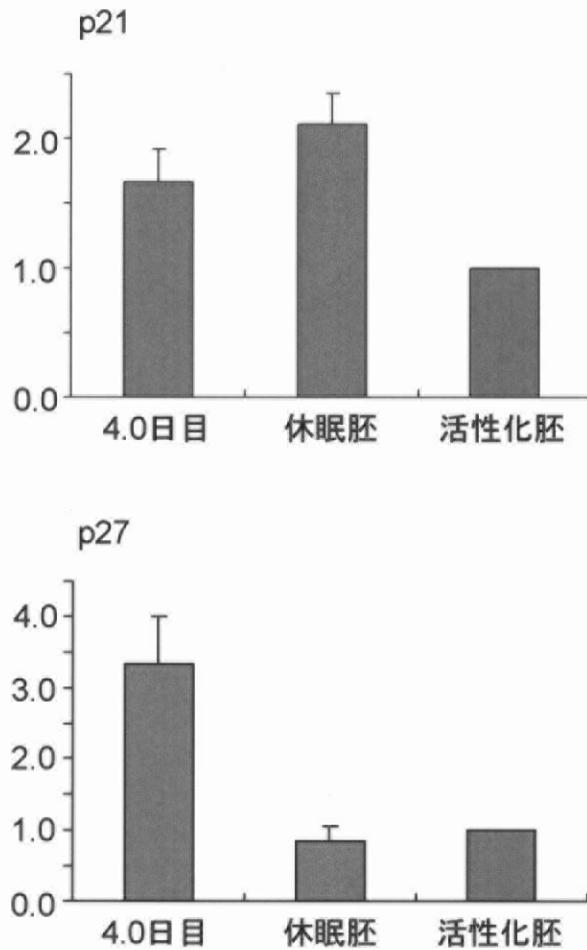


図 2-9 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚における CDK 阻害因子 (p21、p27) の mRNA 量の変化

RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 4.0 日目胚 (p21 は  $n=12$ 、p27 は  $n=8$ )、休眠胚 (p21 は  $n=8$ 、p27 は  $n=4$ )、活性化胚 ( $n=10$ ) の mRNA 量を求め、活性化胚の値を 1 とした相対値で示した。グラフは、平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

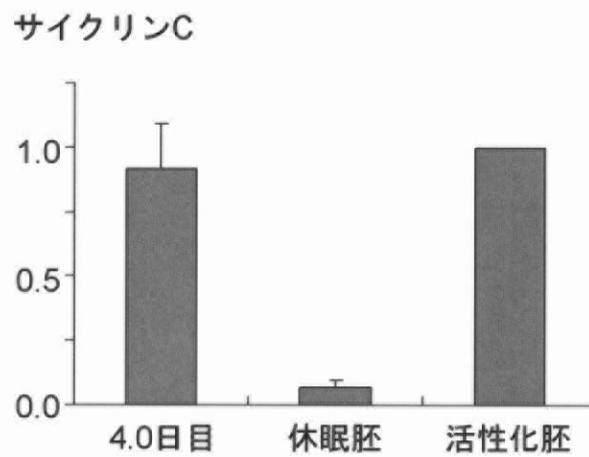
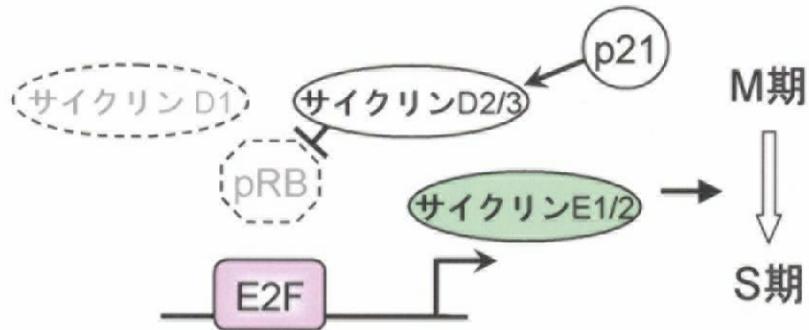


図 2-10 交配後 4.0 日目胚、休眠胚、活性化胚におけるサイクリン C の mRNA 量の変化

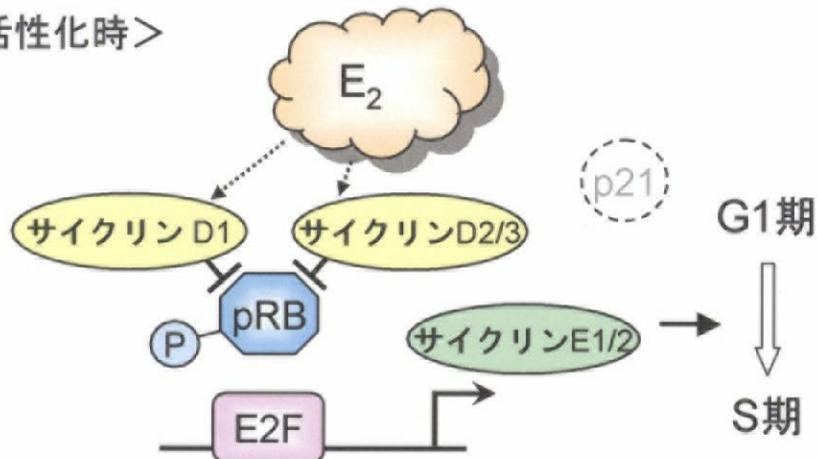
RT-リアルタイム PCR を用いて交配後 4.0 日目胚 ( $n=8$ )、休眠胚 ( $n=4$ )、活性化胚 ( $n=9$ ) の mRNA 量を求め、活性化胚の値を 1 とした相対値で示した。グラフは、平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

## A 着床期以前：外因性シグナル非依存的



## B 着床期以降：外因性シグナル依存的

&lt; 活性化時 &gt;



&lt; 休眠状態 &gt;

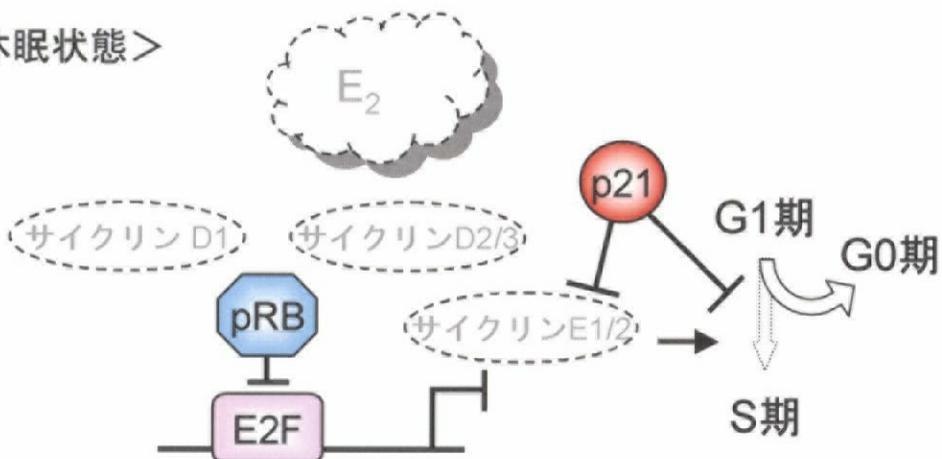


図 2-11

**図 2-11 着床前後期の胚における G1 期の細胞周期制御機構の変化**

(A) 着床期以前の初期胚は、外因性シグナル非依存的な細胞周期を持ち、内在的にプログラム化された遺伝子発現に制御された、迅速な細胞増殖を進行する。この時期の細胞は転写抑制因子である pRB を持たず、転写因子 E2F はサイクリン D-pRb 非依存的に遺伝子の転写を活性化する。この結果、細胞は G1 期をほとんど持たない、M 期と S 期の繰り返しからなる細胞周期を進行する。(B) 胚盤胞期後期の着床期胚になると、体細胞型すなわち外因性シグナル依存的な細胞周期制御機構を獲得する。すなわちまず pRB の発現が開始されるが、pRB は E2F の転写活性化機能を抑制することから、pRB の機能抑制にサイクリン D の発現が必要となる。卵巣由来の E<sub>2</sub> はサイクリン D の発現を上昇させ、サイクリン D は pRB をリン酸化することですること、E2F から pRB を除去する。この結果、E2F の転写活性が機能し、サイクリン E などの S 期開始に必要な細胞周期調節因子の発現が上昇して、細胞周期が G1 期から S 期へと進行する。こうして着床後の胚における細胞増殖が促進される。卵巣由来の E<sub>2</sub> の刺激が遮断された場合、胚ではサイクリン D の発現が低下し、その結果 pRB が不活化されず E2F への結合を維持して、E2F の転写活性を抑制する。このためサイクリン E など下流の遺伝子の発現も低下し、細胞周期が G1 期で停滞する。一方 p21 の発現は上昇し、サイクリン E の機能を抑制すると共に、DNA 複製を阻害し、細胞を G1/G0 期に安定的に維持する。E<sub>2</sub> 投与による休眠状態からの活性化時には、サイクリン D の発現が上昇することで下流のサイクリン E の発現も上昇し、G0 期から細胞周期を回復した場合の DNA 複製のライセンス化を引き起こす。