

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15664

研究課題名（和文）胚盤胞に由来する3幹細胞系譜を用いたin vitroでの多倍体胚の発生特性解析

研究課題名（英文）Developmental characterization of polyploid embryos in vitro using three stem cell lineages derived from blastocysts.

研究代表者

今井 啓之（Imai, Hiroyuki）

山口大学・共同獣医学部・助教（テニュアトラック）

研究者番号：60826155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、3つの幹細胞系譜を樹立し、倍数性変動が哺乳類胚発生に与える影響を遺伝子発現やゲノム修飾を含めてプロファイリングすることを目的とした。多倍体化胚のタイムラプス観察から、再多倍体化において最適なタイミングと融合プロトコルが確立した。多倍体胚から胚性幹細胞系譜を樹立することに成功した。倍数性の系列の胚性幹細胞と栄養膜幹細胞の樹立に成功したが、胚体外内胚葉細胞は困難であった。樹立した胚性幹細胞株の性状解析を行った。4倍体、8倍体胚性幹細胞のコロニー像はnaive型コロニーを呈し、アルカリフォスファターゼ陽性を示した。倍数性の系列の胚性幹細胞と栄養膜幹細胞の樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、哺乳類の多倍体化拒否機構の原因を探るための細胞株の樹立とスクリーニングを行なった。その結果、倍数性シリーズで複数の幹細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株はバイオリソースとして将来にわたって活用できる。またスクリーニングの結果、倍数性変動に伴って変動する遺伝子群を見出しており、多倍体化拒否機構を紐解くマイルストーンへ到達したと言える。

研究成果の概要（英文）：Vertebrates have evolved through whole-genome duplication, which has helped them acquire new functional gene sets and adapt to their environment. Polyploidization, which is generally beneficial for eukaryotes, is not present in mammals due to embryonic development abnormalities. This study aims to establish three stem cell lineages and profile the effects of ploidy changes on mammalian embryonic development. Optimal timing and fusion protocols were established for reduplication through time-lapse observation of polyploid embryos. The establishment of embryonic stem cell and trophoblast stem cell lineages was successful for polyploid lineages, with colonies exhibiting a naive-type colony morphology and showing alkaline phosphatase-positive screening markers. In summary, we established and analyzed a ploidy series of embryonic stem cells and trophoblast stem cells.

研究分野：獣医学

キーワード：初期胚 幹細胞 倍数性 多倍体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、全ゲノムが倍加することにより新たな機能の遺伝子群を獲得し、多様な動物種へ進化したとされる(Ohno, 1971)。特に、2016年に4倍体両生類であるアフリカツメガエルのゲノム情報が解読され(Session *et al.*, 2016)、進化の原動力として全ゲノム重複が注目された。実際に脊椎動物に限らず、真核生物一般において多倍体化によって環境適応能力が向上する(Selmecki *et al.*, 2015)。多倍体化について脊椎動物内における魚類においては特に多くの研究がなされており(Heier *et al.*, 2015)、生殖工学や遺伝育種への展開もなされている。既に一部のマス科魚類などにおいては、多倍体化に伴う早期成熟、巨大化といった形質付与に着目して国内外での水産業応用がなされている。このように多倍体化は、長期的には『余剰ゲノム獲得による生物進化』、短期的には『形質獲得による遺伝・育種』への展開が期待される。

一方で哺乳類において多倍体化個体は存在しない。人為的に作出した多倍体胚では、着床後の様々な段階で発育不全や発生異常となり、マウスにおける妊娠中期までの生存率は5%以下と極めて低い(Eakin *et al.*, 2005)。ヒトにおいては4倍体細胞優位なモザイク胎児が妊娠中期まで生存した報告があるが(Ozler *et al.*, 2015)、4倍体哺乳類が誕生した例はこれまでにない。以上のことから多倍体化胚拒否機構の存在が示唆されるが、実態を担う多倍体胚の発生異常に関する分子機構は未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胚盤胞から樹立可能な3種類の幹細胞系譜(胚性幹細胞:ESCs, 栄養膜幹細胞:TSCs, 胚体外内胚葉細胞:XENCs)を樹立し、様々な倍数性の別(2, 3, 4, 6, 8, 16倍体)で比較することで倍数性変動が哺乳類胚発生へ与える影響について、遺伝子発現・ゲノム修飾などを含めた基本的性状についてプロファイリングを行うことにより明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 胚の多倍体化の高効率な誘導方法の探索

胚の高次多倍体化の誘導方法の簡易化のために、多倍体化誘導方法の探索を行った。タイムラプス観察により卵割のタイミング倍数性の別に比較を行い、割球融合時期の探索を行った。その上で、割球の融合方法について電気融合法に加えて、不活化センダイウイルス(GenomONE-CF)およびポリエチレングリコール(Wako)を用いた、物理的・化学的・生物学的手法を用いた。胚はBDF1マウスから2細胞期において採取し、培養はM16(Sigma)培地を用いた。

(2) 系列多倍体胚からの幹細胞系譜の樹立

作出した多倍体胚を用いて胚性幹細胞、栄養膜幹細胞、胚体外内胚葉細胞の樹立を試みた。採取した2細胞期胚の多倍体化誘導を行いつつM16培地で胚盤胞期まで培養し、酸性タイロイド液(Sigma)で透明帯を除去した上で樹立を試みた。

(3) 樹立した幹細胞系譜の性状解析

樹立した倍数性系列の胚性幹細胞および栄養膜幹細胞の基本性状を解析した。細胞数測定およびBrdU取り込みのフローサイトメトリ解析により細胞増殖能を測定した。RT-PCR、免疫蛍光染色およびRNA-seq解析による遺伝子発現状態の把握を行なった。胚性幹細胞についてはさらに、浮遊培養による胚様体誘導とテラトーマ形成試験を行い、*in vitro*および*in vivo*における分化特性の解析を行なった。具体的には胚様体の遺伝子発現動態の把握と再接着培養による多倍体分化細胞の分取を、テラトーマの組織構造のヘマトキシリン-エオジン染色による解析と特殊組織化学染色による分化細胞の証明と定量的評価を試みた。

4. 研究成果

(1) 胚の多倍体化の高効率な誘導方法の探索

多倍体胚のタイムラプス観察を行ったところ、多倍体化後もコントロールと2倍体胚とほぼ同時期に卵割が起こることが明らかになった。一連の観察結果から、融合直後の卵割を標的とした再多倍体化について、4倍体化は2細胞期胚採取直後、8倍体化は4倍体化後16-18時間後、16倍体化は8倍体化後6-8時間後において2細胞期状態が多く観察され、暫定的な再融合プロトコルとして確立した。

次に従来の多倍体化誘導の方法を見直し、電気刺激による物理的手法に加えて不活化センダイウイルスを用いる生物学的手法およびポリエチレングリコールを用いる化学的手法を試み、比較した。その結果、不活化センダイウイルスおよびポリエチレングリコールを用いた場合、融

合が観察されなかった。胚の細胞を外部から隔離している透明帯を除去した上で再度不活化センダイウイルスによる割球融合を試みたところ、90-100%程度の効率で融合が認められたものの、直後に細胞の死滅が起こり、以降発生しなかった。以上から、透明帯を除去することで生物学的手法による細胞融合は実現できたものの、その後の生存率を考慮すると電気融合法が最も効率が良いことがわかった。

(2) 系列多倍体胚からの幹細胞系譜の樹立

既報に倣い、多倍体胚から幹細胞系譜の樹立を試みた。胚性幹細胞については LIF、CHIR99021、PD0325901 を含む培地で培養を行なった。その結果、2倍体および4倍体に加えて、8倍体胚からの8倍体胚性幹細胞の樹立に成功した。栄養膜幹細胞については、ActivinA、bFGF、XAV939、Y27632 を含む培地で培養行なった。その結果、2倍体および4倍体胚から栄養膜幹細胞の樹立に成功した。胚体外内胚葉細胞について、FGF4、ヘパリンを含む培地で培養を行なったものの、樹立には至らなかった。具体的な状況として、胚の細胞の増殖は認められるものの、栄養膜細胞由来の巨細胞様細胞が多く観察され、継代時の剥離と継代後の生存が困難であった。以上、倍数性の系列の胚性幹細胞と栄養膜幹細胞の樹立に成功した。

(3) 樹立した幹細胞系譜の性状解析

樹立した幹細胞株の基本正常の解析を行なった。4倍体、8倍体胚性幹細胞のコロニー像は naive 型コロニーを呈し、スクリーニングマーカーのアルカリフォスファターゼ陽性を示した。増殖速度は2倍体、4倍体、8倍体と倍数性の増加に従って低下するものの、BrdU 取り込み能力に有意な差は認められなかった。各細胞周期の割合の変動も見られず、1細胞周期にかかる時間が一様に延長したことが示唆された。

遺伝子発現解析では、主要な幹細胞マーカー遺伝子の発現量・局在に有意な差は見られず、基本的な幹細胞の特性を備えていることが明らかとなった。浮遊培養による胚様体誘導を行ったところ、全ての多倍体胚性幹細胞株で胚様体誘導に成功した。これらの胚様体を再度接着培養し、分化細胞の分取を試みたところ、7日間の培養後において8倍体胚様体では培養器へ十分に接着せず細胞の分取には至らなかった。幹細胞および胚様体における遺伝子発現動態の把握のために RNA-seq による網羅的解析を行なった。その結果、細胞株を特徴づける遺伝子群が多く検出される中、8倍体細胞株においては浮遊培養中の胚様体においても幹細胞マーカーの発現が持続することがわかった。また、ラミニンなどの一部の細胞外マトリクスの発現が倍数性の変動に従って攪乱されることが示唆された。以上、胚様体の接着能力と発現遺伝子動態から細胞外マトリクスへの反応が攪乱されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Imai Hiroyuki, Fujii Wataru, Kusakabe Ken Takeshi, Kiso Yasuo, Kano Kiyoshi. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Mouse embryonic stem cells maintain differentiation potency into somatic cell lineage despite alternation of ploidy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Zygote | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/s09671994210008000 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|