

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 2010

課題番号：21790300

研究課題名（和文） 幹細胞の分化能を改善する因子の同定
－単為発生細胞の性質改善技術の応用－

研究課題名（英文） Identification of a factor which improves the differentiation ability of a stem cell

研究代表者

引地 貴亮 (HIKICHI TAKAFUSA)

国立国際医療研究センター 細胞組織再生医学研究部 上級研究員

研究者番号：80392083

研究成果の概要（和文）：核移植前後で発現量が増加した遺伝子に対する siRNA をそれぞれ正常受精胚性幹細胞（ES）に導入したが、*in vitro* での神経細胞への分化能の変化は見られなかった。一方、核移植した細胞から発生した胎盤は、正常受精卵から発生した胎盤と同等に胎児を正常に発育させる能力を再獲得した。

研究成果の概要（英文）：Although siRNA to the gene which the amount of expression increased before and after the nuclear transplantation was introduced into the normal fertilized embryo nature stem cell (ES), respectively, change of the differentiation ability to the nerve cell in *in vitro* was not observed. And the placentas of parthenogenetic embryos can escape epigenetic regulation when developed using nuclear transfer techniques and can support fetal development to full gestation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
21 年度	1900000	570000	2470000
22 年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総 計	3300000	990000	4290000

研究分野：

科研費の分科・細目：医歯薬学 基礎医学 医科学一般

キーワード：単為発生 ゲノミックインプリンティング 核移植 胎盤形成 胚発生

1. 研究開始当初の背景

マウス単為発生胚性幹細胞（pES）は正常受精 ES と比べて極めて分化能が低い、pES の核を用いて核移植を行い樹立した ES 細胞（NT-pES）では、その分化能が劇的に改善されることを見いだしていた。また、この核移植前後で 6 つの遺伝子の特徴的な発現量変化が観察されていた。

2. 研究の目的

単為発生細胞という特殊な細胞の性質に着目した研究から得られた成果を元に、初期発生・分化に必要な因子を同定し、その初期分化における役割を明らかにすることを目的とする。また、胚発生において、核移植した単為発生細胞が胎児、胎盤それぞれで正常発生細胞と同等の機能を持ちうるかについて検証する。

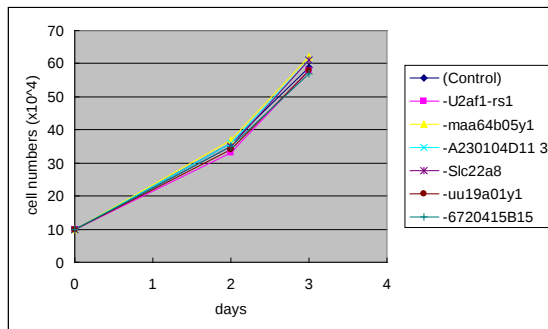
3. 研究の方法

(1) 正常受精卵由来の ES 細胞に pSilencer システムを用いた siRNA を導入し、ノックダウンによる細胞の分化能の変化を、神経系幹細胞への分化誘導により検定した。神経系細胞への分化は、ES 細胞を N2 および B27 サプリを含む培地にて浮遊培養させたのちシャーレに接着させ、N2 サプリを含む無血清培地にて培養することで行った。

(2) pES 細胞をドナーとした核移植を行い樹立された胚が胎児および胎盤へと正常に発生するかを検証した。この時、核移植して得られた胚が 2 細胞の時にフュージョンして 4 倍体キメラを作成することにより、この胚が確実に胎盤へのみ発生する様に設計した。さらに胎盤発生に重要であることの知られているインプリンティング遺伝子 *Peg10* の発現量とゲノムのメチル化についても検証を行った。ゲノムのメチル化については COBRA 法を用いた。

4. 研究成果

(1) 6 種類の siRNA をそれぞれ導入した細胞では、おおむね 40-70% 程度の発現量低下 (ノックダウン効果) が確認されたが、正常な ES 細胞と比べて細胞の増殖速度に変化は確認されなかった。

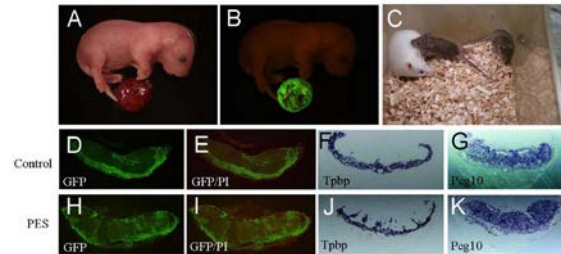


pES 細胞を用いて神経系細胞への分化を試みると、シャーレへと接着させた直後に死滅していくことが観察されていたが、上記のノックダウン ES 細胞ではこのような異常は観察されず、また形態の異常も認められなかった。よりノックダウン効率の高い細胞を樹立することも試みたが、これらの遺伝子の発現量が低下したことによる発生能への影響は観察されなかった。

(2) 単為発生 ES をドナーとした核移植胚が胎盤へのみ発生するようにしたキメラ胚において、正常な産子が得られた (Figure 1: 単為発生細胞は GFP 遺伝子を持ち、緑の蛍光を発することにより確認できる。)。ま

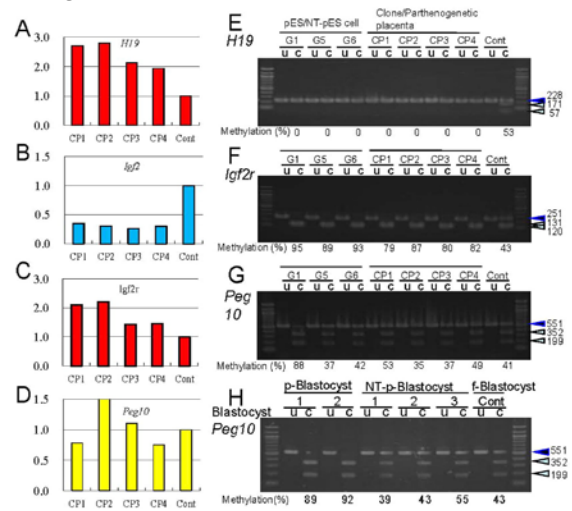
た、胎盤の切片についての抗体染色実験から、単為発生細胞由来の胎盤において *Trbpa*、および *Peg10* の発現が確認された。ただし、単為発生細胞由来の胎盤においてはラビリンス層の境界がやや乱れており、これは核移植によって樹立されたマウスクローン胚との共通点があることを示唆する。

(Figure 1)



切片の抗体染色結果から、単為発生杯では発現しないはずのインプリンティング遺伝子 *Peg10* の発現が観察されたが、他のインプリンティング遺伝子のエピジェネティック状態とあわせて検証した。母方発現遺伝子である *H19* および *Igf2r* は、どの胎盤でもコントロールの 2 倍程度の発現を示した (Figure 2A, C)。一方、父方発現遺伝子 *Igf2* はコントロールと比べて全てのサンプルにおいて低発現であった (Figure 2B)。ゲノムのメチル化状態についても単為発生細胞由来のサンプルはコントロールと異なり、核移植を繰り返してもエピジェネティック状態は単為発生細胞のものから変化していないことが示された (Figure 2E, F)。それに対して *Peg10* は正常受精卵から発生した胎盤と同程度にまで発現が回復しており (Figure 2D)、さらにはゲノムのメチル化状態も核移植を経ることで正常受精卵と同様のパターンへと変化していることが確認された (Figure 2G, H)。

(Figure 2)



一方で、正常な胚由来の胚盤胞へ核移植後の単為発生細胞を移植することで単為発生胚由来の胎児を得ることを試みた。細胞の核をドナーとして核移植を行うことを何世代か繰り返し（G1-G8）、それぞれの世代で胚発生の途中段階において観察を行った。単為発生胚は胎児期10日目までで死滅することが知られているが、核移植を繰り返すごとに胎児の発生が14.5日目まで進むものが現れるようになった（Table 1）。しかし、核移植5世代以降ではほぼ改善が見られず、残念ながら産子を得ることはできなかった。

(Table 1)

Donor cell type (SES generation)	Day examined (d.p.c.)	No. of NT	No. of 2-cell fetuses (E1)	No. of all fetuses	Approximate developmental stage of cloned fetuses (No. of fetuses with heartbeat)						
					Abnormal	16.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5
G1	10.5	490	124	8	3	5 (3)	-	-	-	-	-
	11.5	458	163	22	20	2 (0)	0	-	-	-	-
G2	10.5	362	76	11	5	6 (3)	-	-	-	-	-
	11.5	230	76	12	8	2 (0)	1 (1)	-	-	-	-
G3	12.5	182	49	7	0	4 (0)	1 (1)	2 (1)	-	-	-
	13.5	88	41	2	1	0	0	0	1 (0)	-	-
G4	13.5	198	69	9	0	0	1 (0)	1 (1)	7 (5)	-	-
	14.5	271	103	12	2	0	0	1 (0)	9 (0)	0	-
G5	14.5	318	139	14	4	0	0	2 (0)	3 (1)	5 (0)	-
	15.5	307	126	10	7	0	0	0	1 (0)	2 (0)	0
G6	14.5	65	30	0	0	0	0	0	0	0	-
	15.5	214	113	13	8	0	0	0	1 (0)	4 (0)	0
G7	15.5	210	84	10	5	0	0	0	1 (0)	4 (0)	0
	14.5	218	91	10	1	0	0	0	5 (0)	4 (3)	-
G8	15.5	96	29	4	3	0	0	0	0	1 (0)	-
	18.5	177	39	5	5	0	0	0	0	0	0
G5-F-mES	15.5	369	171	11	11	0	0	0	0	0	0
G6-F-mES	15.5	268	110	8	7	0	0	0	0	0	0

これまで、単為発生胚においては胎盤の発生不良が胎児の生育を妨げており、インプリンティング遺伝子の制御領域に手を加えないと単為発生の産子は得られないと考えられてきた。本研究では、正常に発生することの無い単為発生胚の発生能が核移植によって改善され得ることを示した。特に胎盤に関しては、インプリンティング遺伝子 *Peg10* の発現制御が正常受精胚の状態に近づき、それによって胎児の正常発生を支えられる能力を獲得できることを示した。これらの結果から、単為発生胎盤に限らず発生能の低い組織の性質を改善する技術として核移植を応用していくことが可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)
引地貴亮 大田浩 若山清香 若山照彦
Functional full-term placentas formed from parthenogenetic embryos using serial nuclear transfer. *Development* 2010 査読有 ;137(17):2841-7

〔学会発表〕(計1件)
引地貴亮
“A nuclear transfer affects the epigenetic factors which control stem cell differentiation. “ The 7 th annual meeting of the Asia Reproductive Biotechnology Society / カンボジア 2009

6. 研究組織
(1)研究代表者
引地貴亮 (HIKICHI TAKAFUSA)
国立国際医療研究センター 細胞組織再生医学研究部 上級研究員
研究者番号：80392083