

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658084

研究課題名（和文） 内部細胞塊を起源としない細胞から分化多能性を有する幹細胞の樹立と評価

研究課題名（英文） Establishment of pluripotent stem cells from trophoblast stem cells

研究代表者

小川 英彦（OGAWA HIDEHIKO）

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20339089

研究成果の概要（和文）：胎盤にしか分化できない栄養膜細胞が胎子組織へ分化する能力を再獲得できるかを明らかにするために、栄養膜幹細胞をドナーとした核移植胚を構築し、発生能を調べた。その結果、核移植胚の多くは 2 細胞期に発生停止した。しかし、一部の胚は着床期の胚盤胞期まで発生し、胎子組織の起源である内部細胞塊を形成した。したがって、栄養膜細胞は、胎子組織へ分化する能力を再獲得できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To identify whether trophoblast stem cells regain the pluripotency, the developmental ability of the reconstructed embryos transferred trophoblast stem cells as donors has been examined. Though many those reconstructed embryos were arrested at 2 cell stage, some embryos developed into blastocysts and formed inner cell mass that expressed *Oct3/4*. These results suggest that trophoblast stem cells have a potential to form the pluripotent cells by using the nuclear transfer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：発生・分化、再生医療、核移植、リプログラミング

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の個体発生は、卵子と精子とが受精することにより開始する。受精卵は、細胞増殖・分化し、胎子・胎盤を形成することから、受精卵は胎子・胎盤を構成する全ての組織・臓器へと分化する能力すなわち「全能性」を有しているといえる。これら受精卵由来細胞が将来胎子・胎盤のどちらに分化するかは、着床直前の胚盤胞期に決定する。胚盤胞期には、二種類の細胞集団、内部細胞塊と栄養膜細胞が存在し、着床後、内部細胞塊は胎子へ栄養膜細胞は胎盤へ分化することから、胚盤胞期が初期発生において最初に細

胞分化が明確に区別できる時期と位置づけることが出来る。内部細胞塊からは、胎子組織に分化出来る「分化多能性」をもつ胚性幹細胞(embryonic stem cells, 以下 ES 細胞)がマウスで初めて樹立された (Evans and Kaufman, Nature 1981)。ES 細胞は、再生医療の強力なツールとして注目を浴び続けている。さらに、2006 年に Yamanaka (Cell 2006) らは、体細胞に 4 種類の転写因子を導入することにより ES 細胞様の「分化多能性」を有する iPS 細胞を樹立した。さらに、核移植技術を駆使して作出した ES 細胞クローン胚から個体が作出されたことは、「分化多能性」

をもつ ES 細胞の核が「全能性」を獲得できることを示している。さらに、体細胞クローン胚由来個体作出により、終末分化した細胞核でも「全能性」を獲得しうることが示された。これらの研究から、一度「全能性」を失い終末分化した体細胞核は、「全能性」「分化多能性」を再獲得できるようリプログラミングされることが明らかとなった。このうち、核をリプログラミングさせることにより「全能性」を再獲得出来る手法は、唯一核移植技術だけである。しかし、これまでの全能性・多能性を有する細胞の樹立は、内部細胞塊由来細胞を起源として分化した細胞に限局されている。

胚盤胞期にみられるもう 1 つの細胞集団である栄養膜細胞からは、栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cells, 以下 TS 細胞) を樹立することが可能である (Tanaka et al., Science 1998)。TS 細胞は胎盤を構成する全ての細胞に分化出来るが、胎子組織への分化は不可能であることが知られている。しかし、TS 細胞の核が全能性・多能性を獲得出来る能力を有するかどうかは不明である。もし、TS 細胞核も核移植により全能性・多能性を再獲得することが可能であるならば、栄養膜細胞由来の細胞からでも個体作出が可能となり、さらに、内部細胞塊由来細胞“以外”の細胞の核がリプログラミングにより全能性を再獲得出来ることを証明出来る。

## 2. 研究の目的

本研究では、胎盤にしか分化出来ない TS 細胞に着目し、発生工学的手法を用いた TS 細胞クローン胚を作出し、その発生能および分化能の検証を通して、TS 細胞の全能性再獲得能を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) TS 細胞の樹立

ドナーに用いる TS 細胞は、ICR、B6D2F1 および B6CBF1 の計 3 系統のマウスの胚盤胞から定法に従い樹立した。

### (2) TS 細胞の分化能評価

TS 細胞の分化誘導は、定法にしたがって行った。分化誘導後 0 および 6 日目の細胞から、ISOGEN を用いて total RNA を抽出し、super script を用いて定法に従い cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型に、PCR による遺伝子発現解析を行った。解析対象遺伝子は、TS 細胞の未分化マーカー遺伝子である *Cdx2* および *Eomes*、分化マーカー遺伝子で栄養膜巨細胞特異的遺伝子である *Pl-1* および *Pl-2*、ES 細胞マーカー遺伝子である *Oct3/4* とした。

### (3) 核移植

TS 細胞の細胞周期を M 期に同調するために、ノコダゾールで 3 時間培養した。培養後、浮遊した細胞をドナー細胞として核移植に供試した。核移植胚を KSOM 培地中で 2 時間インキュベートした後、 $\text{SrCl}_2$  添加  $\text{Ca}^{2+}$  (-) M16 培地に構築胚を移し、6 時間培養することで活性化処理を行った。活性化処理後、1 極体 1 偽前核が確認できた胚を活性化されたと判断し、それらの胚を KSOM 培地に移し、胚盤胞期胚まで体外培養を行った。核移植胚のコントロールとして、ES 細胞をドナーに用いて核移植胚を作出し、同様に胚盤胞まで体外培養を行った。

### (4) ホールマウント標本作製

核移植後 3 時間の構築胚を、PBS (-) で洗浄し、スライドガラス上に少量の PBS (-) と一緒にのせて、カバーガラスで押さえて動かないようにした後、カバーガラスとスライドガラスの隙間からカルノア固定液 (メタノール: 酢酸 = 3:1) を注ぎ胚を固定し、1 時間カルノア固定液に浸した。その後、隙間から 100% エタノールを注ぎ洗浄し、酢酸オルセイン液で染色体を染色して、アセトグリセロール溶液 (グリセロール: 酢酸: 水 = 1:1:3) で脱色した後、マニキュアで封入し、顕微鏡で観察を行った。

### (5) 胚盤胞期胚における細胞数測定

0.5% 酸性タイロッド処理により胚盤胞期胚の透明帯を除去し、M2 培地で洗浄した後、M2 培地で 10 倍希釈したウサギ抗マウス血清に移し 37 °C で 40 分間インキュベートした。その後、M2 培地で再び洗浄し、M2 培地で 200 倍希釈したモルモット補体に移し、37 °C で 40 分間インキュベートした。補体処理後、M2 培地で 1 mg/1ml に希釈した hoechst33342 および 0.5 mg/ml に希釈した PI で 40 分ずつ胚を染色した後、スライドガラス上に移して蛍光顕微鏡での顕鏡を行った。

### (6) 胚盤胞期胚における Oct3/4 の局在解析

胚を M2 培地で洗浄し、0.5% 酸性タイロッド処理によって透明帯を除去し、4% パラホルムアルデヒドで 1 時間固定した。その後胚を膜透過液 (0.25% TritonX-100 / PBS) 中で 1 時間透過処理を行い、洗浄液 (0.1% TritonX-100、0.3% BSA/PBS) で洗浄し、ブロッキング液 (0.1% TritonX-100、1% スキムミルク、5% FBS/PBS) 中で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、抗マウスヒトモノクローナル Oct3/4 抗体 (SANTA CRUZ: SC-5279) での一次抗体反応を 2 時間行い、洗

浄液で洗浄し、Alexa594 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) による二次抗体反応を 30 分行った後、洗浄液で洗浄し、DAPI による核染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) TS 細胞の樹立

核移植のドナーに用いる TS 細胞は、ICR、B6D2F1 および B6CBF1 の計 3 系統のマウスの胚盤胞から樹立した。その結果、ICR では 7 ライン、B6D2F1 では 6 ライン、B6CBF1 では 9 ラインの TS 様細胞が樹立できた。これら樹立した細胞が TS 細胞であるかを確認するために、分化誘導後 0 日目における未分化マーカー遺伝子の発現と、分化誘導後 6 日目における栄養膜巨細胞特異的遺伝子の発現を解析した。その結果、分化誘導後 0 日目では、TS 細胞の未分化マーカー遺伝子である *Cdx2* や *Eomes* の発現が認められた。一方、分化誘導後 6 日目では、未分化マーカー遺伝子の発現が認められず、栄養膜巨細胞特異的発現遺伝子 *Pl-1* や *Pl-2* の発現が確認された。また、ES 細胞のマーカー遺伝子である *Oct3/4* の発現は分化誘導後 0 および 6 日目共に認められなかった。以上の結果から、樹立した細胞は、栄養外胚葉由来の細胞であり、分化誘導により栄養膜巨細胞へ分化することから TS 細胞の特徴を有することが明らかとなった。したがって、樹立した細胞は TS 細胞であると判断し、以下の実験に供した。

##### (2) TS 細胞をドナーとした核移植胚の発生率

樹立した TS 細胞のうち、ICR 由来の 1 ライン、B6D2F1 および B6CBF1 由来の各 2 ラインをドナーとして核移植胚を構築し、胚盤胞への発生率をマウスの系統間で比較した。ES 細胞をドナーとした核移植胚の 2 細胞期胚への発生率は 94%、4-8 細胞期胚への発生率は 88%、胚盤胞期胚への発生率は 65%であった。一方、ICR 由来 TS 細胞をドナーとした核移植胚の 2 細胞期への発生率は 74%、4-8 細胞期胚への発生率は 39%、胚盤胞期胚への発生率は 16%であった。B6CBF1 由来 TS 細胞 2 ラインをドナーとした核移植胚の 2 細胞期への平均発生率は 81%、4-8 細胞期胚への平均発生率は 27%、胚盤胞期胚への平均発生率は 7%であった。また、B6D2F1 由来 TS 細胞 2 ラインをドナーとした核移植胚の 2 細胞期胚への平均発生率は 59%、4-8 細胞期胚への平均発生率は 4%、胚盤胞期胚への平均発生率は 1.5%であった。以上の結果から、TS 細胞をドナーとした核移植胚の胚盤胞期胚への発生率は、マウスの系統間でばらつきがみられるものの、ES 細胞をドナーとした核移植胚と比較して著しく低いことが明らかとなっ

た。また、TS 細胞をドナーとした核移植胚の発生率の著しい低下は、2 細胞期での発生停止に起因すると考えられた。

##### (3) 核移植胚の紡錘体形成

TS 細胞をドナーとした核移植胚の紡錘体形成を観察するために、核移植後 3 時間の胚を用いてホールマウント標本を作製した。その結果、観察した 15 個の胚のうち 12 個で紡錘体の形成が見られ、その形成率は 80% (12/15) であった。形成された紡錘体のうち、正常なものが 10 個確認でき、正常な紡錘体の形成率は 66.6% (10/15) であった。一方、ES 細胞をドナーとした核移植胚では、観察した 10 個の胚のうち、9 個で紡錘体の形成が見られ、その形成率は 90% (9/10) であった。形成された紡錘体のうち、正常なものが 8 個確認でき、正常な紡錘体の形成率は 80% (8/10) であった。以上の結果から、核移植後の紡錘体形成にはドナー細胞間で違いは認められなかった。

##### (4) 核移植胚由来胚盤胞期胚における細胞数の比較

胚盤胞期胚への発生率が最も高かった ICR 由来 TS 細胞をドナーとした核移植胚の、胚盤胞期胚における内部細胞塊および栄養外胚葉の細胞数を測定した。その結果、内部細胞塊の細胞数は平均  $12.1 \pm 3.0$  個、栄養外胚葉の細胞数は平均  $31.9 \pm 4.6$  個であった。ES 細胞をドナーとした核移植胚の胚盤胞期胚における内部細胞塊の細胞数は平均  $12.8 \pm 3.3$  個、栄養外胚葉の細胞数は平均  $29.2 \pm 7.9$  個であった。これらの細胞数は、受精卵由来胚盤胞期胚における各細胞数 (内部細胞塊: 平均  $15.1 \pm 5.2$  個、栄養外胚葉: 平均  $33.8 \pm 7.0$  個) と比較して、有意差はみられなかった。以上の結果から、TS 細胞をドナーとした核移植胚は、胚盤胞への発生率が著しく低下するものの、発生した胚盤胞の細胞数は正常であり、内部細胞塊も正常に形成されることが明らかとなった。

##### (5) 核移植胚由来胚盤胞期胚における Oct3/4 の局在

ICR 由来 TS 細胞をドナーとした核移植胚の胚盤胞期胚における Oct3/4 の局在を免疫染色法を用いて解析した。その結果、Oct3/4 は内部細胞塊特異的に局在していた。この Oct3/4 の局在パターンは、受精卵由来胚盤胞と同じであった。以上の結果から、TS 細胞をドナーとした核移植胚から形成された内部細胞塊は Oct3/4 を発現していることが明らかとなり、分化多能性を有している可能性が示唆された。

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)

[学会発表](計1件)  
渡邊紘之、小川英彦、河野友宏  
核移植における栄養膜幹細胞ゲノムの全能性再獲得能の評価  
第52回日本哺乳動物卵子学会  
平成23年5月21日 国際医療福祉大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 英彦 (OGAWA HIDEHIKO)  
東京農業大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号：20339089

(2)研究分担者

河野 友宏 (KONO TOMOHIRO)  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：80153485