

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号： 15501
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2012～2012
 課題番号： 24658237
 研究課題名（和文） マウス胚盤胞からの4倍体ES細胞の樹立とその応用に関する研究

研究課題名（英文） Establishment of mouse tetraploid ES cells

研究代表者

加納 聖 (KANOHI KIYOSHI)
 山口大学・共同獣医学部・准教授
 研究者番号： 40312516

研究成果の概要（和文）：マウス4倍体胚は、ジーンターゲティングにおけるテトラプロイドレスキュー法として一般的に用いられる。これは4倍体胚が胎子の発生へ寄与しないことを利用した、ES細胞のみに由来する個体を得ることを目的とした方法である。このようにマウス4倍体胚を補助的に利用する報告は多くあるが、4倍体細胞ならびに4倍体胎子自体の発生能力に着目した研究はない。そこで、4倍体細胞の初期発生における挙動に注目するために、次のような方法を用いてマウス4倍体ES細胞の樹立を試みたところ、複数のマウス4倍体ES細胞様培養細胞ラインの作出に成功した。

研究成果の概要（英文）：Tetraploid mouse embryos is commonly used as tetraploid rescue method in gene targeting. Tetraploid rescue is a method that was designed to utilizing that tetraploid embryos does not contribute to the fetus, intended to obtain pups derived from ES cells, but studies focused on the developmental capacity of tetraploid embryos have not been reported. We have established mouse tetraploid ES cell in order to analyze the early development of tetraploid embryos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：発生工学

1. 研究開始当初の背景

ゲノムセットを3個以上持つ倍数体は魚類や両生類において正常な個体として発生が可能である一方、哺乳類において4倍体個体は胎生致死とされ、その原因は不明である。マウスES細胞はノックアウトマウス作出の際に多能性をもつ細胞として利用可能であるため、本研究ではマウス4倍体胚盤胞から4倍体ES細胞の樹立を試み、その特性を調べることによって4倍体胎子が致死となる原因を見出し、将来的にマウス4倍体胎子誕生の可能性を探ることを目的とする。さらに、哺乳類におけるゲノムセット数と個体発生の関連についても考察する。

マウス4倍体胚は、ジーンターゲティングにおけるテトラプロイドレスキュー法として一般的に用いられる。これは、4倍体胚が胎子の発生へ寄与しないことを利用した、ES細胞のみに由来する個体を得ることを目的とした方法であり、2倍体であるES細胞を4倍体胚盤胞に移植することによって2倍体/4倍体キメラ胚を作出し、その結果4倍体細胞のほとんどは胎盤へ移行し、ES細胞由来の細胞が胎子を構成する。しかし、このようにマウス4倍体胚を補助的に利用する報告は多くあるが、4倍体細胞ならびに4倍体胎子自体の発生能力に着目した研究はない。そこで4倍体細胞の初期発生における挙動に

注目するために4倍体ES細胞の樹立を試みた。

2. 研究の目的

ゲノムセットを3個以上持つ倍数体は魚類や両生類において正常な個体として発生が可能である一方、哺乳類において4倍体個体は胎生致死とされ、その原因は不明である。マウスES細胞はノックアウトマウス作出の際に多能性をもつ細胞として利用可能であるため、本研究ではマウス4倍体胚盤胞から4倍体ES細胞の樹立を試み、その特性を調べることによって4倍体胎子が致死となる原因を見出し、将来的にマウス4倍体胎子誕生の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス4倍体ES細胞の樹立



① マウス4倍体胚の作出

BDF1 X BDF1 (F2) マウスから得た2細胞期胚(2倍体)から電気融合法を用いて割球同士を融合させ、1細胞期胚(4倍体)を作出する。

② 胚盤胞期までの培養

電気融合法によって作出した4倍体胚を胚盤胞期までkSOMaa+BSA培地にて培養を行う。

③ 4倍体胚盤胞期胚の内部細胞塊からのES細胞の樹立

胚盤胞期胚の透明帯を酸性タイロイド液で融解除去し、それらをESGRO Complete PLUS Clonal Grade Medium (Millipore, SF001-100P)+20% KSR培地にて、ICRマウスの13.5日胎子から樹立した線維芽細胞をマイトマイシンCによって処理したフィーダー細胞上に播種し、5-6日培養する。

5-6日後、現れた細胞塊をガラスピペットで回収し、Trypsin-EDTA処理によって細胞をばらばらにし、同条件下で1週間培養する。

1週間後、再び現れた細胞塊をガラスピペットで回収し、0.25% Trypsin + 1mM EDTA in PBSによって処理後に同条件下で培養を行う。

④ コロニーの形態の観察

1-2日後にES細胞様コロニーが現われているかどうか観察を行う。これ以降毎日培地交換し、2-3日に一度継代する。もし形態的にこの時点で典型的なES細胞様コロニーが見られれば、4倍体ES細胞様細胞の樹立とする。

(2) 4倍体ES細胞のプロファイリング

樹立した4倍体ES細胞がどのような性質を持つ細胞であるかについて以下の方法で

確認する。

① 4倍体ES細胞における細胞周期

i. 染色体像の観察

まず単純な核の形態観察としてDAPI染色によって4倍体ES細胞様細胞の核染色を行い、核の大きさについて2倍体ES細胞の核と比較する。続いてより正確な観察として、染色体標本を作成し、染色体数の計測を行う。また、継代によって4倍体ES細胞その染色体セット数に変化がないかどうかの確認を行う。

ii. DNA量測定および倍数性確認

PIによって核染色を行ったのちに、フローサイトメトリーを用いて4倍体ES細胞様細胞のDNA量を測定し、全体的な細胞倍数性の確認を行う。

iii. 細胞分裂の観察

抗 α -tubulin抗体による免疫染色によって分裂期のスピンドル形成を観察し、細胞分裂が正常に行われているかどうかについて確認する。

② 4倍体ES細胞における未分化状態の維持

i. アルカリフォスファターゼ染色

マウス4倍体ES細胞様細胞に対して、アルカリフォスファターゼ染色を行い、未分化状態を同定する。

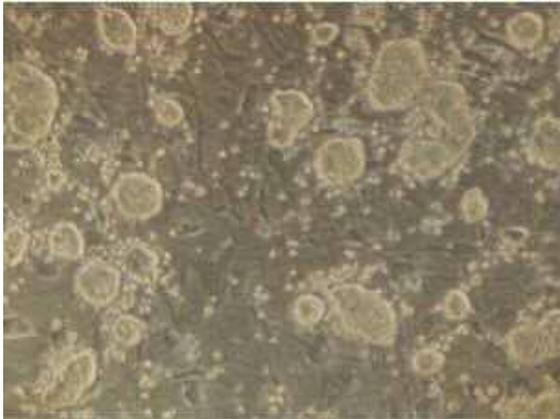
ii. ES細胞特定のマーカーの発現確認

Oct4 (Pou5f1), *Sox2*, *Nanog*などのES細胞特定のマーカー遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCRにより確認する。

4. 研究成果

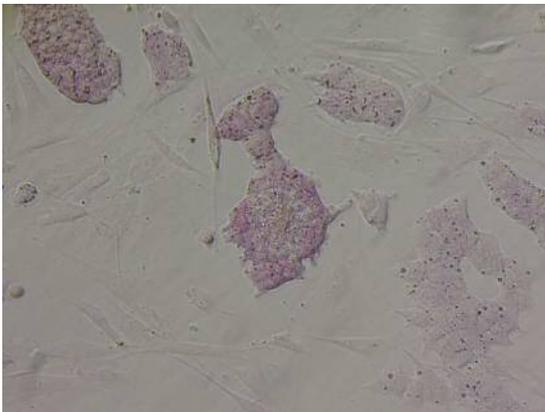
マウス4倍体胚は、ジーンターゲットングにおけるテトラプロイドレスキュー法として一般的に用いられる。これは4倍体胚が胎子の発生へ寄与しないことを利用した、ES細胞のみに由来する個体を得ることを目的とした方法である。このようにマウス4倍体胚を補助的に利用する報告は多くあるが、4倍体細胞ならびに4倍体胎子自体の発生能力に着目した研究はない。そこで、4倍体細胞の初期発生における挙動に注目するために、次のような方法を用いてマウス4倍体ES細胞の樹立を試みた。すなわち、マウス胚盤胞期胚の透明帯を酸性タイロイド液で融解除去し、それらをESGRO Complete PLUS Clonal Grade Medium+20% KSR培地にて、ICRマウスの13.5日胎子から樹立した線維芽細胞をマイトマイシンCによって処理したフィーダー細胞上に播種し、5-6日培養し、現れた細胞塊をガラスピペットで回収し、Trypsin-EDTA処理によって細胞をばらばらにし、同条件下で1週間培養した。1週間後、再び現れた細胞塊をガラスピペットで回収し、0.25% Trypsin

+ 1mM EDTA in PBS によって処理後に同条件で培養を行ったところ、複数のマウス 4 倍体 ES 細胞様培養細胞ラインの作出に成功した (下写真)。



次に、ES 細胞の継代を経てその性質が維持されるのかについて、フローサイトメトリーによって核形観察を確認したところ、4 倍体 ES 細胞様細胞は 2 倍体 ES 細胞の 2 倍量の DNA を有することが明らかになった。

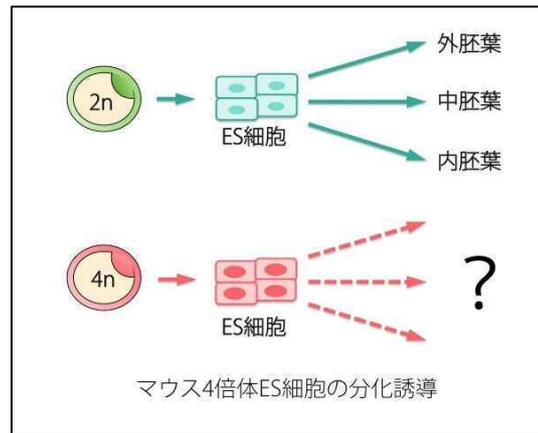
次に、抗 α -tubulin 抗体による免疫染色によって分裂期のスピンドル形成を観察したところ、細胞分裂が正常に行われていることが明らかになった。また、今回樹立したマウス 4 倍体 ES 細胞様細胞はアルカリフォスファターゼ陽性を示した (下写真)。



以上の結果により、今回樹立したマウス 4 倍体 ES 細胞様細胞は 2 倍体 ES 細胞とほぼ同様の性質を持つことが予想された。

今後は、4 倍体 ES 細胞が胚葉への分化能を有するかどうかについて、胚様体形成や、activin などの誘導因子を培地に添加し、それぞれの胚葉特異的マーカーの発現の観察や、4 倍体 ES 細胞をヌードマウスへ注入移植することによって分化誘導し、テラトーマ形成後の組織切片作成ならびに詳細な観察に

よってその分化状態を確認し、4 倍体 ES 細胞の分化能を解析する予定である。



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 2 件)

①Hisaki T, Naito K, Suigura K, Kano K. Regulation of embryonic size in early mouse development in vitro culture system. Zygote 18: 1-8 (Epub ahead of print) (2013) 査読有り

②Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K Repeatable Construction Method for Engineered Zinc Finger Nuclease Based on Overlap Extension PCR and TA-cloning. PLoS One 8: e59801 (2013) 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

①動物のサイズ制御機構の分子メカニズムの解明と応用 (How to determine "the targeted size"?) 加納 聖

平成 25 年 3 月 28 日

第 155 回 日本獣医解剖学会 サテライトフォーラム 東京大学 (文京区)

②マウス 4 倍体胚の着床後の発生について 加納 聖、久木友花、藤井 渉、内藤邦彦、日下部健、木曾康郎

平成 24 年 10 月 21 日

日本解剖学会 第 67 回中国・四国支部学術集会 山口大学 (宇部市)

③マウス 4 倍体胚の着床後における発生について

加納 聖、久木友花、藤井 渉、内藤邦彦、日下部健、木曾康郎

平成 24 年 6 月 15 日

第 26 回モロシヌス研究会 東京大学 (東京都 文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 聖 (KANO KIYOSHI)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：40312516

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：