

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14880

研究課題名(和文) マウス4倍体ES細胞を用いた哺乳類独自の発生システムの探索

研究課題名(英文) Studies of unique system in mammalian development using mouse tetraploid embryonic stem cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳動物において4倍体などの多倍体胚は胎生致死となる。ゲノム倍加によるES細胞の生体への寄与の変化を調べるために、EGFP陽性4倍体ES細胞と2倍体胚桑実胚のキメラ胚を作成した。胚盤胞期胚の内部細胞塊において4倍体ES細胞由来の細胞の分布がEGFP陽性細胞として確認された。また、着床胚や胎子付属物における4倍体ES細胞由来の細胞の分布を観察したところ、胎齢12.5日の胎子の組織内や卵黄嚢においてEGFP陽性細胞が多く見られ、4倍体ES細胞由来の細胞が局在していることが明らかとなった。以上、倍数性の変動にかかわらず、マウス胚性幹細胞の多能性は失われないが、分化指向性は異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Polyploid embryos such as tetraploid are lethal in mammalian. In this study, we aimed to elucidate how genome duplication affects tissue distribution of embryonic stem cells in early mammalian development. Tetraploid embryonic stem cells-derived cells were observed in the inner cell mass of blastocysts and in various tissue and yolk sac at E12.5. Thus, our findings suggested that mouse ESCs maintained intrinsic pluripotency and tissue distribution despite genome duplication, but directionality and distribution of embryonic stem cells altered by genome duplication. These results provide insights into our understanding of developmental elimination in polyploid mammals.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：倍数体 ゲノム倍加 4倍体 マウス 着床胚 多倍体 胚性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、マウス 4 倍体胚着床胚は致死となり最終的に多倍体個体は得られなかったが、着床前の 4 倍体マウス初期胚は 2 倍体胚とほぼ同様に発生し、マウス 4 倍体胚盤胞における網羅的遺伝子解析によっても、胚性致死となる直接的な原因は認められないことを見出した (Kawaguchi *et al.*, *J Reprod Dev* 2005)。そこで 4 倍体細胞の初期発生における挙動を解析するために、マウス 4 倍体胚盤胞からマウス 4 倍体 ES 細胞の樹立を試みたところ、4 倍体 ES 細胞の複数ラインの作出に成功し、幹細胞マーカー遺伝子 (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2* など) の発現や ES 細胞に特異的なアルカリフォスファターゼ染色陽性など、胚性幹細胞としての基本的性質を有することを見出した。

## 2. 研究の目的

ゲノムセットを 3 個以上持つ多倍体は、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、哺乳動物において 4 倍体などの多倍体胚は胎生致死となる。申請者は最近、マウス 4 倍体胚盤胞から 4 倍体 ES 細胞の樹立に成功するとともに、胚性幹細胞としての基本的性質を持つことを新たに見出した。このマウス 4 倍体 ES 細胞を利用することによって、胚性致死となる 4 倍体胚細胞を ES 細胞という形で維持し、子宮内での解析が困難なステージの多倍体胚の解析を模擬的に生体外で行うことが可能となる。本研究では申請者らが樹立したマウス 4 倍体 ES 細胞を用いることによって、哺乳動物における多倍体胚の正常な発生条件を考察した。

## 3. 研究の方法

BDF1 X BDF1 (F2) マウスから得た 2 細胞期胚 (2 倍体) 1 個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) を作出し、この 4 倍体胚盤胞期胚の内部細胞塊からの ES 細胞の樹立を行った。

この樹立した 4 倍体 ES 細胞の基本的な性状について解析し、マウス 4 倍体 ES 細胞の胚性幹細胞としての胚体への分化能ならびに分子的特性についての解析を行った。

### **マウス 4 倍体胚盤胞からの 4 倍体 ES 細胞の樹立**

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し、1 細胞期胚 (4 倍体) を作出する。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 培地にて培養を行った。

胚盤胞期胚の透明帯を酸性タイロード液で融解除去し、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 日培養した。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下で培養を行った。1-2 日後に ES 細胞様コロニーが現れているかどうか観察した。これ以降毎日培地交換し、2-3 日に一度継代した。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たものを、4 倍体 ES 細胞様細胞とした。

### **胚様体の誘導と分化状態の解析**

4 倍体 ES 細胞が *in vitro* において胚性幹細胞同様としての多能性を有しているかどうかについてさらに調べるために、浮遊培養により胚様体 (EB: Embryoid Bodies) の誘導を試みた。

### **テラトーマ形成と解析**

4 倍体 ES 細胞をヌードマウスの皮下へ注入移植することによってテラトーマ形成を誘導し、テラトーマに対して組織切片を作成し、組織化学的な解析を行った。

### **染色体像の観察**

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 細胞の核と比較した。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った。また、継代によって 4 倍体 ES 細胞様細胞の染色体セット数に変化がないかどうかの確認を行った。

### **1 細胞当たりの遺伝子発現量の解析**

*Gapdh*, *Actb* などのハウスキーピング遺伝子と細胞周期遺伝子 *Cdk1*, *Ccnb1* などの発現を細胞当たり一定量の外来 RNA を添加して RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR により解析した。さらに、4 倍体 ES 細胞 1 細胞の大きさ (直径、面積) をフローサイトメトリーにより測定し、1 細胞当たりの体積を推測した。

### **4 倍体 ES 細胞キメラ胚の作成**

EGFP 陽性 4 倍体 ES 細胞と 2 倍体胚桑実胚を凝集法によって集合キメラ胚を作成し、胚盤胞まで培養した。またこのキメラ胚を偽妊娠マウス子宮に移植し、着床胚の作出を行った。

### **網羅的遺伝子発現解析**

RNA シークエンス法によって 4 倍体 ES 細胞と 2 倍体 ES 細胞間の網羅的な遺伝子発現量の比較解析を行った。

## 4. 研究成果

1 個の胚盤胞期胚をフィーダー細胞上に播

種し、内部細胞塊由来の細胞集塊を選択し、それらを培養することにより樹立した。また、4倍体胚は2細胞期胚を電気融合することにより作出し、前述の方法により1個の胚盤胞から4倍体ES細胞を樹立した。また、コントロールとして2倍体ES細胞を樹立し、実験に用いた。

4倍体ES細胞のコロニー形態とアルカリホスファターゼ(ALP)染色は、2倍体ES細胞のコロニー形態と類似していた。さらに4倍体ES細胞は、胚性幹細胞の特徴の1つであるALP染色においても陽性を示した。このことにより4倍体ES細胞は、胚性幹細胞の基本的な性質を有していることが示された。

以前の研究と同様に、4倍体ES細胞が*in vitro*において胚性幹細胞同様としての多能性を有しているかどうかについて調べるために、浮遊培養により胚様体(EB: Embryoid Bodies)の誘導を試みた。その結果、2倍体ES細胞からの胚様体(2nEBs)と同様に、4倍体ES細胞においても胚様体(4nEBs)の形成に成功した。4倍体ES細胞は*in vitro*における分化能を有していることがわかった。4倍体ES細胞の*in vivo*における分化能を調べるためにテラトーマの形成を試みた。免疫不全マウスの皮下に4倍体ES細胞を接種するとテラトーマの形成が見られた。形成したテラトーマから薄切切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン染色により組織像を解析した結果、外胚葉性組織の角化上皮様構造、中胚葉性組織の骨格筋様構造および内胚葉性組織の管腔様構造が見られ、三胚葉由来の組織が観察された。以上の結果から、2倍体ES細胞と同様に4倍体ES細胞が胚性幹細胞としての分化能をもつことがわかった。

次に、1細胞当たりのゲノム量の倍加が1細胞当たりの遺伝子発現にどのような影響を与えるか調べるために、細胞当たり一定量の外来RNAを添加してRNAを抽出することによって1細胞当たりの遺伝子発現解析を行ったところ、4倍体ES細胞において、*Gapdh*は2倍体ES細胞の2.15倍、*Actb*は2.27倍、*Cdk1*は2.45倍、*Ccnb1*は2.18倍であることがわかった。また、フローサイトメトリーによる細胞の直径比や面積比から4倍体ES細胞の体積を推測したところ、2倍体ES細胞の約2.29~2.52倍であることがわかった。以上の結果により、倍数性の変動にかかわらず、細胞内のmRNA濃度は一定であることがわかった。

4倍体細胞の生体への寄与を調べるために、EGFP陽性4倍体ES細胞と2倍体胚桑実胚の集合キメラ胚を作成した。まず胚盤胞期胚の内部細胞塊において4倍体ES細胞由来の細胞の分布がEGFP陽性細胞として確認された。さらに4倍体ES細胞由来のEGFP陽性細胞を持つ2倍体胚桑実胚の集合キメラ胚盤胞を

偽妊娠マウスの子宮に移植し、着床胚や胎子付属物における4倍体ES細胞由来の細胞の分布を観察した。胎齢12.5日の胎子付属物においては、卵黄嚢においてEGFP陽性細胞が多く見られ、4倍体ES細胞由来の細胞が局在していることが明らかとなった。また胎子組織においても、肝臓や消化管などの消化器系、脊髄などの神経系、生殖腺や造血系など幅広い組織においてEGFP陽性細胞が多く見られ、4倍体ES細胞由来の細胞が局在していることが明らかとなった。卵黄嚢は胚盤胞内部の内部細胞塊、特に下胚盤葉、そして胎子組織は内部細胞塊の上胚盤葉から派生するため、キメラ胚における4倍体ES細胞はまず内部細胞塊に局在し、そこから胚体組織ならびに胚体外組織に分化することが明らかになった。以上の結果から、4倍体胚とは異なり、4倍体ES細胞は2倍体ES細胞と同様に将来胎子組織となり得る基本的な多分化能を十分に持ち合わせていることが明らかとなった。

また次世代シーケンサーによって4倍体ES細胞と2倍体ES細胞間の遺伝子発現の相違を解析し、さらにオントロジー解析を行ったところ、両者の遺伝子発現は非常に似ていることがわかった。

以上、ゲノム倍加によっても胚性幹細胞はその基本的な性質は変化しないものの、その組織への分化指向性の変化があることも明らかとなった。

#### 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2件)

Imai H, Fujii W, Kusakabe KT, Kiso Y, Kano K.

Effects of whole genome duplication on cell size and gene expression in mouse embryonic stem cells.

J Reprod Dev 62: 571-576 (2016) (査読有)

Imai H, Kano K, Fujii W, Takasawa K, Wakitani S, Hiyama M, Nishino K, Kusakabe KT, Kiso Y.

Tetraploid embryonic stem cells maintain pluripotency and differentiation potency into three germ layers.

PLoS One (e0130585)(2015) (査読有)

[学会発表](計4件)

四倍体化によるゲノムの倍数性変動がマウス胚性幹細胞に与える細胞生物学的影響  
今井啓之、藤井 渉、日下部健、木曾康郎、加納 聖

平成26年11月30日

第39回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

ゲノム量倍加がマウス胚性幹細胞に与える影響について  
今井啓之、藤井 渉、日下部健、木曾康郎、  
加納 聖  
平成 26 年 9 月 7 日  
第 159 回獣医学会学術集会  
日本大学生物資源学部（神奈川県藤沢市）

四倍体化によるゲノムの倍数性変動がマウス胚性幹細胞に与える細胞生物学的影響  
今井啓之、藤井 渉、日下部健、木曾康郎、  
加納 聖  
平成 25 年 12 月 3 日  
第 38 回日本分子生物学会年会  
神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

四倍体マウス胚性幹細胞の細胞生物学的特性の解析  
今井啓之、藤井 渉、日下部健、木曾康郎、  
加納 聖  
平成 25 年 10 月 24 日  
日本解剖学会第 70 回中国・四国支部学術集会  
愛媛大学（愛媛県松山市）

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://ds0.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~kanokiyoy/index.html>

## 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：