

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660254

研究課題名(和文) マウス4倍体ES細胞の発生能解析とその応用に関する研究

研究課題名(英文) Tetraploid embryonic stem cells maintain pluripotency and differentiation potency into three germ layers

研究代表者

加納 聖 (Kano, Kiyoshi)

山口大学・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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類において多倍体胚は着床後致死となることから、多倍体化により胚発生が停止する哺乳類独自の発生システムの存在が予想される。そこでゲノムの倍数性の変動が哺乳類の胚発生への影響について調べるため、マウス四倍体胚性幹細胞の樹立を試み、その性質を解析した。マウス四倍体胚性幹細胞における幹細胞マーカーの特徴は、マウス二倍体胚性幹細胞とほぼ同等であった。さらに、胚様体およびテラトーマの形成実験より、マウス四倍体胚性幹細胞から三胚葉へ分化誘導がなされ、マウス二倍体胚性幹細胞と同等の分化能を有することが示された。以上、倍数性の変動によりマウス胚性幹細胞の多能性は失われないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Polyploid amphibians and fishes occur naturally in nature, while polyploid mammals do not. Thus, polyploidization is thought to be harmful during early mammalian development. However, the mechanisms through which polyploidization disrupts development are still poorly understood. In this study, we aimed to elucidate how genome duplication affects early mammalian development. We demonstrated that TESCes possessed essential pluripotency and differentiation potency to form teratomas, which differentiated into the three germ layers, including diploid embryonic stem cells. TESCes also exhibited sufficient expression and localization of pluripotent markers and retained the normal epigenetic status of relevant reprogramming factors. Thus, our findings suggested that mouse ESCs maintained intrinsic pluripotency and differentiation potential despite tetraploidization, providing insights into our understanding of developmental elimination in polyploid mammals.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：4倍体 ES細胞 マウス 多倍体 多能性

1. 研究開始当初の背景

マウス 4 倍体胚は、ジーンターゲットイ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 倍体キメラ胚を作成し、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。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 倍体胚自体の発生能力に着目した研究はこれまで存在しない。

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、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 細胞ラインの作出に成功した。

2. 研究の目的

哺乳類において、4 倍体などの多倍体胚は胎生致死となり、多倍体個体はほぼ存在しない。

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、哺乳類において多倍体は胎生致死となり、哺乳類において多倍体化が厳密に拒絶される機構の存在が予想される。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 倍体胚盤胞から樹立した 4 倍体 ES 細胞の特性を調べることによって、4 倍体 ES 細胞の分子的特性の解析を行い、多倍体胚の正常な発生、さらには産子を得ることが可能な条件を検討することとした。

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) 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) を作成し、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。

樹立した 4 倍体 ES 細胞の基本的な性状について、以下の方法で確認した。

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。

DNA 量測定および倍数性確認

Hoechst 33342 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った。

ES 細胞特定のマーカーの発現確認

Oct4, *Sox2*, *Nanog* などの未分化能維持に関する 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 により確認した。

エピジェネティックな状態の確認

Oct3/4 遺伝子プロモーター領域やインプリンティング遺伝子の DNA メチル化状態などのエピジェネティックな状態の確認を行った。具体的な方法として、プロモーター領域の CpG island に着目し、COBRA 法によって DNA メチル化パターンを解析することによって、2 倍体 ES 細胞と 4 倍体 ES 細胞ゲノムにおけるエピジェネティックな状態の比較解析を行った。

細胞増殖能の解析

ゲノムの倍数性の変動が細胞増殖能に与える影響を調べるため、樹立した 2 倍体 ES 細胞および 4 倍体 ES 細胞の細胞増殖曲線を作成した。

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。

4. 研究成果

細胞は、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 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 細胞の樹立効率は 2 倍体 ES 細胞の樹立効率に比べて有意に低いことがわかった。また、樹立した 15 細胞株の 2 倍体 ES 細胞および 9 細胞株の 4 倍体 ES 細胞からそれぞれ 3 細胞株ずつ選択し、ESC#1、ESC#2、ESC#3 ならびに TESC#1、TESC#2、TESC#3 とした。

まず、4 倍体 ES 細胞の基本的な形態学的特徴を解析するため、2 倍体 ES 細胞と 4 倍体 ES 細胞のコロニー形態の比較ならびにアルカリホスファターゼ (ALP) 染色を行った。その結果、4 倍体 ES 細胞のコロニー形態は、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。

次に樹立した4倍体ES細胞の倍数性を解析するために、フローサイトメトリおよび染色体標本による解析を行った。樹立した胚性幹細胞をPI溶液によって染色し、フローサイトメトリを用いてDNA量を解析した。なおFL2による蛍光強度をDNA量の相対値とした。その結果、ESCsと比べて4倍体ES細胞においては2倍のDNA量をもつことがわかった。さらに、4倍体ES細胞の継代数を増やした後に、同様にPI染色によるDNA量を解析したところ、4倍体ES細胞はそのDNA量を維持していた。また、ギムザ染色により作成した染色体標本により、ESC#1(2n=40)と比べて、TESC#1はその2倍の80本の染色体をもつことがわかった。以上の結果から、ゲノム量が安定した4倍体ES細胞の樹立に成功したと判断した。

ゲノムの倍数性の変動が細胞増殖能に与える影響を調べるため、樹立した2倍体ES細胞および4倍体ES細胞の細胞増殖曲線を作成した。同じ細胞数を播種した日を0日とし、1.5日、3.0日、4.5日、6.0日において2倍体ES細胞と4倍体ES細胞の細胞数を比較すると、3.0日、4.5日、6.0日における4倍体ES細胞の細胞数はESCsの細胞数と比べて有意に低いことがわかった。また、2倍体ES細胞および4倍体ES細胞の細胞数を底2の対数にとり線形近似することにより倍加時間を算出したところ、4倍体ES細胞の倍加時間は2倍体ES細胞のものに比べて2-8時間長いことがわかった。以上の結果から、胚性幹細胞の4倍体化による倍数性の変動は増殖速度の低下を引き起こすことがわかった。また、4倍体ES細胞においては2倍体ES細胞と比較してゲノム量が2倍であるが、細胞分裂に要する時間は2倍以下であることがわかった。

まず、胚性幹細胞としての多分化能を有しているかどうか調べるため、リアルタイムPCRを用いて胚性幹細胞のマーカー遺伝子の発現を定量的に解析した。なお、標的遺伝子の発現量は内部標準の*Gapdh*を用いて標準化した。その結果、4倍体ES細胞における*Sox2*の発現は2倍体ES細胞の発現に比べて有意に低かったが、*Nanog*および*Oct3/4*の発現は2倍体ES細胞における発現と同程度であることがわかった。以上の結果から、4倍体ES細胞における*Sox2*の発現が低いものの、より特異的な胚性幹細胞のマーカー遺伝子である*Nanog*および*Oct3/4*の発現はESCsと同程度の発現であったことから、4倍体ES細胞は胚性幹細胞として2倍体ES細胞と同様に多分化能を有している可能性が示唆された。

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。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。次に、リアルタイムPCRを用いて形成した胚様体における分化マーカー遺伝子の発現を定量的に解析した。その結果、2nEBsと比較したとき、4nEBsにおいて、中胚葉マーカー遺伝子である*Brachyury*の発現が有意に高く、栄養外胚葉マーカー遺伝子である*Hand1*の発現が有意に低かったが、その他の分化マーカー遺伝子の発現に有意な差は認められなかった。この結果から、2nEBsと4nEBs間の比較において、胚葉の分化誘導に差が見られたものの、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。

次に、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および解析を試みた。免疫不全マウスの皮下にTESC#1を接種することにより、ESC#1と同様に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、TESC#1からのテラトーマにおいて、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。さらに、組織中の細胞形態が類似した外胚葉性組織および中胚葉性組織の核の断面積を計測したところ、TESC#1由来の核の断面積は、ESC#1由来の核の断面積よりも有意に大きいことがわかった。TESC#1からテラトーマが形成されたことから、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。

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)

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 (in press)

[学会発表](計3件)

マウス四倍体胚性幹細胞における倍数性変動の影響

今井啓之、加納 聖、藤井 渉、高澤 建、脇

谷晶一、西野光一郎、日下部健、木曾康郎
平成 26 年 11 月 30 日
第 37 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）

マウス 4 倍体胚性幹細胞の樹立と解析
今井啓之、加納 聖、藤井 渉、日下部健、
木曾康郎
平成 26 年 8 月 21 日
第 107 回日本繁殖生物学会
帯広畜産大学（北海道帯広市）

Analysis of tetraploid embryonic stem
cells in mice.
Imai H, Kano K, Fujii W, Kusakabe K, Kiso
Y.
平成 26 年 5 月 30 日
The 12th stem cell research symposium
九州大学医学部（福岡県福岡市）

〔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：