

学 位 論 文 要 旨

氏名 今井 啓之

題 目：マウス胚性幹細胞を用いた哺乳類における多倍体細胞の解析とその応用

論文要旨：

脊椎動物は多倍体化によるゲノム量増大によって新たな機能の遺伝子を獲得することによって、進化したとされ、これは **2R** 仮説と呼ばれ、ゲノム配列の解析による研究から支持されている。また酵母を使った研究においては、4 倍体化が環境適応に有利にはたらくことも明らかになっている。脊椎動物においては、魚類や両生類、鳥類の多倍体個体が存在することが知られているが、哺乳類においては多倍体化により胚発生が停止するため、多倍体個体は存在しない。また一方で、腫瘍組織においては多くの多倍体化した腫瘍細胞が含まれ、遺伝子発現や細胞増殖などの異常により組織のホメオスタシス破綻に関与している。これらのことから哺乳類における多倍体細胞は、組織内において正常 2 倍体細胞とは異なる性質を有することが予想され、本研究では哺乳類における多倍体に関する実験法の構築をはじめ、その特性について明らかにし、多倍体細胞の応用の可能性を探ることを目的とした。

まず、哺乳類における多倍体化胚の形態および遺伝子発現の解析を行うために、マウス胚を用いて電気融合法により多倍体化誘導を行った。その結果、4 倍体、8 倍体および 16 倍体胚の作出に成功した。これらの多倍体胚は胚盤胞期胚まで発生し、倍数性を増加させるに従って、胚を構成する細胞数は減少していた。これらの多倍体胚盤胞期胚を詳細に解析した結果、16 倍体胚盤胞期胚において内部細胞塊が観察されなかった。次に 4 個の 16 倍体胚を接着して集合胚を作成したところ、集合 16 倍体胚において内部細胞塊の形成が観察された。これらのことからマウス初期胚における形態形成は、ゲノム量の変動に対して高い柔軟性を有しているものの、胚盤胞形成においては胚全体を構成する細胞数が重要であることが示唆された。

次に、哺乳類の多倍体細胞をより簡便に培養細胞株として維持し、解析するため、マウス多倍体胚から多倍体胚性幹細胞の樹立を試みた。その結果、マウス 4 倍体胚からマウス 4 倍体胚性幹細胞の樹立に成功した。この 4 倍体胚性幹細胞の解析にあたり、コントロールとしてマウス 2 倍体胚性幹細胞を用いた。樹立した 4 倍体胚性幹細胞のゲノム量を解析した結果、 $2n=40$ の 2 倍体胚性幹細胞と比較して、その 2 倍のゲノム量を持つことがわかった。また 4 倍体胚性幹細胞はゲノム量の変動したにもかかわらず多能性マーカー遺伝子を発現し、2 倍体胚性幹細胞と同様に胚性幹細胞に基本的な胚性幹細胞の性質を有していることが明らかとなった。一方で、4 倍体胚性幹細胞の増殖速度は有意に低かった。

続いて、4 倍体胚性幹細胞が胚性幹細胞の性質を有しており、1 個の胚由来の均質な細胞株であることに着目し、倍数性の変動が細胞のサイズならびに 1 細胞あたりの遺伝子発現量与える影響について解析を行った。まず、4 倍体胚性幹細胞と 2 倍体胚性幹細胞における細胞の体

(別紙様式第 3 号)

積比について検討するために細胞の直径比および面積比を測定し、体積比を算出した。その結果、4 倍体胚性幹細胞は 2 倍体胚性幹細胞と比較して細胞の体積が増大し、体積比率は 2.3 - 2.5 であった。続いて 1 細胞あたりの遺伝子発現量を比較するために外部標準 RNA を用いて定量 PCR を行ったところ、4 倍体胚性幹細胞 1 細胞あたりの遺伝子発現量は 2 倍体胚性幹細胞の発現量と比較して上昇し、その発現比率は 2.2 - 2.5 であった。細胞の体積比と 1 細胞あたりの遺伝子発現量の比率から、倍数性の変動にかかわらず、細胞内における mRNA の濃度は一定であることが明らかとなり、細胞内の転写産物の濃度においても 4 倍体胚性幹細胞は 2 倍体胚性幹細胞と同程度であることが示唆された。

さらに、この 4 倍体胚性幹細胞を用いて分化誘導を行った。その結果、*in vitro*において複雑な分化過程をたどるさまざまな細胞系譜への分化誘導が可能であることが明らかとなった。また、分化誘導後においても 4 倍体胚性幹細胞に由来する細胞はその倍数性を維持していることが明らかとなった。また、*in vivo*においてテラトーマ形成を試みたところ、4 倍体胚性幹細胞からもテラトーマ形成に成功し、分化した細胞で構成された組織像が観察された。これらのことから倍数性を維持しつつ多分化能を維持することが明らかとなった。さらに、生体内において胎子組織に寄与できるか調べるためにキメラ胚形成を行ったところ、ホストの胚の 2 倍体細胞と混在して 4 倍体胚性幹細胞由来の細胞が組織に構築に寄与することがわかった。

倍数性の変動した 4 倍体胚性幹細胞は 2 倍体胚性幹細胞と同等の分化能を有することが明らかになったことから、最後に、哺乳類細胞における多倍体細胞の技術を用いた応用として、マウス胚性幹細胞と家畜ならびに野生動物の線維芽細胞を用いて異種融合細胞を作出し、融合細胞の多能性の維持と応用の可能性について検討した。その結果、マウス胚性幹細胞と家畜および野生動物由来の線維芽細胞との融合細胞において胚性幹細胞様のコロニーの出現が観察された。ウサギ線維芽細胞との融合細胞を詳細に解析した結果、特にウサギの多能性マーカー遺伝子の発現が観察されたことから、ウサギの体細胞はマウス胚性幹細胞の影響を受け、多分化能を獲得したことが示唆された。

以上、本研究において哺乳類における多倍体細胞の解析を行うために、さまざまな倍数性のマウス多倍体胚を作出した。さらに作出したマウス多倍体胚から多倍体胚性幹細胞の樹立を試み、4 倍体胚性幹細胞の樹立に成功した。その基本的な性状を解析することによって、哺乳類細胞細胞は多倍体化に対して高い可塑性を有する可能性が示唆された。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	今井啓之
審査委員	主査：山口大学 准教授 加納 聖
	副査：山口大学 教授 木曾康郎
	副査：山口大学 教授 佐藤晃一
	副査：鳥取大学 教授 保坂善真
	副査：山口大学 准教授 西垣一男
題目	マウス胚性幹細胞を用いた哺乳類における多倍体細胞の解析とその応用
審査結果の要旨： 脊椎動物は多倍体化によるゲノム量増大によって新たな機能の遺伝子を獲得することによって進化したとされている。魚類や両生類、鳥類の多倍体個体が存在するが、哺乳類においては多倍体化により胚発生が停止し、多倍体個体は存在しない。また一方で、腫瘍組織においては多倍体化した腫瘍細胞が含まれ、組織のホメオスタシス破綻に関与している。これらのことから哺乳類における多倍体細胞は、組織内において2倍体細胞と異なる性質を有することが予想され、本研究では哺乳類多倍体細胞に関する実験法の構築をはじめ、その特性について明らかにし、多倍体細胞の応用の可能性を探ることを目的とした。 まず、哺乳類における多倍体化胚の形態および遺伝子発現の解析を行うために、マウス胚の電気融合により多倍体化誘導を行った。その結果、4、8および16倍体胚の作出に成功し、胚盤胞期胚まで発生した。これらの多倍体胚盤胞を解析した結果、16倍体胚盤胞において内部細胞塊が観察されなかった。次に4個の16倍体胚から集合胚を作出したところ、集合16倍体胚において内部細胞塊が形成された。これらからマウス初期胚の形態形成は、ゲノム量の変動に対して高い柔軟性を有しているものの、胚全体の細胞数が重要であることが示唆された。 次に、多倍体細胞を簡便に培養細胞株として維持・解析するため、マウス多倍体胚から多倍体胚性幹細胞の樹立を試みた。その結果、4倍体胚から4倍体胚性幹細胞の樹立に成功した。4倍体胚性幹細胞の解析にあたり、コントロールとして2倍体胚性幹細胞を用いた。4倍体胚性幹細胞のゲノム量を解析した結果、2倍体胚性幹細胞と比較して、その2倍のゲノム量を有していた。また4倍体胚性幹細胞はゲノム量の変動にかかわらず多能性マーカー遺伝子を発現し、2倍体胚性幹細胞と同様に胚性幹細胞の性質を有していた。一方で、4倍体胚性幹細胞の増殖速度は有意に低かった。	

(別紙様式第 10 号)

続いて、1 個の胚由来の均質な細胞株であることに着目し、倍数性の変動が細胞のサイズおよび 1 細胞あたりの遺伝子発現量与える影響について解析を行った。まず、4 倍体胚性幹細胞と 2 倍体胚性幹細胞の細胞の直径比および面積比を測定し、体積比を算出した。その結果、4 倍体胚性幹細胞は 2 倍体胚性幹細胞と比較して細胞の体積が増大し、体積比は 2.3・2.5 であった。続いて 1 細胞あたりの遺伝子発現量を比較するために外部標準 RNA を用いて定量 PCR を行ったところ、4 倍体胚性幹細胞 1 細胞あたりの遺伝子発現量は 2 倍体胚性幹細胞の発現量と比較して上昇し、その発現比は 2.2・2.5 であった。細胞の体積比と 1 細胞あたりの遺伝子発現量の比から、倍数性の変動にかかわらず、細胞内における mRNA の濃度は一定であることが明らかとなり、転写産物濃度において 4 倍体胚性幹細胞は 2 倍体胚性幹細胞と同程度であることが示唆された。

さらに、4 倍体胚性幹細胞を用いて分化誘導を行った。その結果、*in vitro* において複雑な分化過程をたどるさまざまな細胞系譜への分化誘導が可能であることが明らかとなった。また、分化誘導後においても 4 倍体胚性幹細胞はその倍数性を維持していることが明らかとなった。また、*in vivo* においてテラトーマ形成を試みたところ、4 倍体胚性幹細胞からもテラトーマ形成に成功し、さまざまな組織像が観察された。これらのことから倍数性を維持しつつ多分化能を持つことが明らかとなった。さらに、生体内において胎子組織に寄与できるか調べるためにキメラ胚形成を行ったところ、ホスト胚の 2 倍体細胞と混在して 4 倍体胚性幹細胞由来の細胞が組織に構築に寄与することがわかった。

倍数性の変動した 4 倍体胚性幹細胞は 2 倍体胚性幹細胞と同等の分化能を有することが明らかになったことから、最後に、哺乳類細胞における多倍体細胞の技術を用いた応用として、マウス胚性幹細胞と家畜ならびに野生動物の線維芽細胞を用いて異種融合細胞を作出し、融合細胞の多能性の維持と応用の可能性について検討した。その結果、マウス胚性幹細胞と家畜および野生動物由来の線維芽細胞との融合細胞において胚性幹細胞様コロニーの出現が観察された。融合細胞を詳細に解析した結果、各動物種の多能性マーカー遺伝子の発現が観察されたことから、体細胞は多分化能を獲得したことが示唆された。

以上、本研究において哺乳類における多倍体細胞の解析を行うために、さまざまな倍数性のマウス多倍体胚を作出した。さらに作出したマウス多倍体胚から多倍体胚性幹細胞の樹立を試み、4 倍体胚性幹細胞の樹立に成功した。その基本的な性状を解析することによって、哺乳類細胞は多倍体化に対して高い可塑性を有する可能性が示唆された。

以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値があり、優秀であることを認める。