

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

山口大学大学院 連合獣医学研究科

獣医解剖学研究室

今井 啓之

2018

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出したところ、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

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。

目次

序章	1
<hr/>	
第 1 章 マウス多倍体胚の形態学的解析	4
<hr/>	
緒言	5
材料と方法	8
結果	17
考察	21
図表	27
第 2 章 マウス 4 倍体胚性幹細胞の樹立とその性質の解析	41
<hr/>	
緒言	42
材料と方法	44
結果	54
考察	59
図表	65

第 3 章 倍数性の変動によるマウス胚性幹細胞の細胞生物学的影響の解析

	<u>82</u>
緒言	83
材料と方法	85
結果	91
考察	93
図表	97

第 4 章 分化誘導による 4 倍体胚性幹細胞の性状の解析

緒言	107
材料と方法	110
結果	127
考察	133
図表	141

第 5 章 異種 4 倍体多能性幹細胞の樹立とその応用	162
序論	163
材料と方法	165
結果	174
考察	176
図表	182
総合考察	191
参考文献	199
謝辞	217

序章

脊椎動物の進化において、全ゲノムが倍化することにより *Hox* 遺伝子群をはじめとするさまざまな機能を有する遺伝子群を獲得し、多種多様な動物種へ分岐したとされている (Ohno, 1971)。また、両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus Laevis*) においてはネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) と近縁であるが、種分岐の過程において全ゲノムの倍化が起こったとされている (Burgres, 2016)。また、ネッタイツメガエル以外にも魚類のギンブナ (*Carassius auratus*) においてゲノム量の倍化した系統が存在することが知られている。このように脊椎動物の進化において、ゲノム量の倍化は遺伝的背景を多様化させることがわかっている。

しかしながら、全ゲノムが倍化した現存の哺乳類個体は知られていない。哺乳類の胚発生において、姉妹染色分体を 1 対ずつ有する精子および卵が受精し、2 倍体の受精卵になることが必須である。2 倍体の受精卵より発生することで、個体や組織を構成するほとんどの体細胞は 2 倍体のゲノム量を保持し、生殖細胞において次世代に染色体セットの半数を受け継ぐ減数分裂が行われ、再び次世代の個体が 2 倍体として誕生する。しかし、細胞融合や細胞分裂および極体放出のエラーなどにより染色体セットが倍化した胚が出現することがあり、これら全ゲノムの倍化した胚を多倍体胚とい

う。哺乳類の多倍体胚は、マウスやラット、ウサギなどの多くの動物種できわめてまれに出現することが知られている (McFeely, 1969)。人為的に作出したマウス 4 倍体胚は、着床後、さまざまな発生段階で発育不全や致死となり、妊娠中期までの 4 倍体胚の生存率は 1.7 - 4.2 % ときわめて低い (Tarkowski *et al.*, 1977 ; James *et al.*, 1992)。また、妊娠中期まで生存したマウス 4 倍体胚においては、脳や目、脊椎、心臓などの形成異常が見られる (Kaufman *et al.*, 1990 ; Kaufman *et al.*, 1991)。このように哺乳類 4 倍体胚は胚性致死となるが、胚性致死となる根本的な原因は未だ明らかでない。

一方で、個体を構成する体細胞においては、肝細胞や神経細胞の一部は、全ゲノム量の倍化した多倍体細胞であることが知られている。体細胞において生理的に存在する多倍体細胞の一部の出現機序についての解析は行われているものの (Tanaka *et al.*, 2003)、体細胞における多倍体細胞の数はきわめて少数であり、生体内における多倍体細胞の機能の解析は困難であるために、その生物学的特性については明らかになっていない。また、ヒトのさまざまな腫瘍組織中における細胞の 37 % が倍数性の変動した多倍体細胞あり、遺伝子発現や細胞増殖などの以上により組織のホメオスタシスの破綻に関与している (Zack *et al.*, 2013)。

以上のことから哺乳類において、ゲノム量の倍化した多倍体細胞は、個体発生や組織構築などにおいて2倍体細胞とは異なる挙動を示すことが示すことが予想される。

本論文においては、哺乳類における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、さらに、多倍体細胞の応用の可能性を探ることを目的とした。

第1章

マウス多倍体胚の形態学的解析

緒言

哺乳類の胚発生において、半数体の精子および卵が受精し、2 倍体の受精卵となることが必須である。しかしながら、受精後の割球の融合や不分離により染色体セットが倍化し、染色体数が正常 2 倍体胚と比較して整数倍化した多倍体胚が出現することがある。自然界における哺乳類の胚では、マウスやラット、ウサギなどにおいて約 0.5 % の割合で多倍体胚の出現する報告 (McFeely, 1969 ; Dyban *et al.*, 1987) がある。このように実験室内において偶然出現する哺乳類の多倍体胚を扱うことができる可能性は非常に低い。そのため、微小管重合阻害剤のサイトカラシン B による細胞分裂を阻害する方法 (Niemierko, 1975) や、ウイルスベクターによる細胞融合を誘導する方法 (Graham, 1971)、電気刺激により細胞融合を誘導する方法 (Berg, 1987) などにより人為的に多倍体胚を作出する必要がある。これらの方法で作出した 4 倍体胚は一般的な体外培養法により胚盤胞期胚まで培養することができる (Koizumi *et al.*, 1996)。このように作出したマウス 4 倍体胚は、着床後、様々な発生段階で発育不全や致死となり (Tarkowski *et al.*, 1977 ; James *et al.*, 1992)、15.5 日齢までにほぼ全ての胚が致死となる (Eakin *et al.*, 2003)。また、妊娠中期まで生存した 4 倍体胚においては脳や目、脊椎、心臓などの形成異常が見られる (Kaufman *et al.*, 1990 ; Kaufman, 1991,

1992)。ヒトにおいても妊娠中期においてさまざまな発生異常を示した胎児の絨毛検査を行ったところ、2倍体と4倍体のモザイク個体であったという報告 (Ozler *et al.*, 2015) もある。哺乳類において4倍体のげっ歯類 (*Tympanoctomys barrerae*) が発見されたという報告 (Gallardo *et al.*, 1999) があるが、厳密な4倍体ではなく、一部の染色体の欠失が起きていた。また、マウス多倍体胚においては遺伝的にはインプリンティング遺伝子などのゲノム修飾様式が2倍体胚と異なるという報告 (Yamazaki *et al.*, 2016) もある。しかしながら、哺乳類における多倍体胚の根本的な致死原因は未だ明らかでない。

一方で魚類や両生類、鳥類などにおいては、多倍体個体は生殖腺が発達せず不妊となるが、成熟した個体へと発生が可能である種が存在する (Piferrer *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 1995 ; Cleveland *et al.*, 2014 ; Heier *et al.*, 2015)。また、人為的に多倍体個体を作成する試みも多く存在し、魚類においては4倍体化誘導した培養細胞を用いた体細胞核移植による育種 (Zhou *et al.*, 2016) や多倍体魚類における生殖巣の発生 (Yu *et al.*, 2015) についての研究が行われている。これらのことから胚の多倍体化により胚発生が停止する、または停止させる哺乳類独自の発生メカニズムの存在が示唆される。

本章では、マウス胚を用いて様々な倍数性の多倍体胚を誘導し、着床前の胚盤胞期胚

において、2 倍体胚と比較することにより哺乳類における多倍体胚の発生初期の特性について解析を行うこととした。

材料と方法

1. 実験動物

本研究で用いた B6D2F1 マウスおよび ICR マウス（日本エスエルシー）は、温度制御下（20 - 29℃）、明時間 12 時間、暗時間 12 時間で飼育し、マウスを購入後、1 週間飼育して馴致させ、各実験を行った。

2. 培地および試薬の作成

生理食塩水

塩化ナトリウム（Wako）0.9 g を蒸留水に溶かし、全量を 1,000 mL とした。オートクレーブによって滅菌後、室温で保存した。

hCG 液

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（ゴナトロピン；あすか製薬）を生理食塩水 20 mL に溶かし、1 mL ずつ分注し、-20 °C で保存した。

電気融合用 e-fusion buffer 溶液

マンニトール (Sigma) 5.46 g、BSA (Sigma) 300 mg、ポリビニルピロリドン (Sigma) 100 mg を蒸留水に溶かし、全量を 100 mL とした。0.2 μm 径フィルター (Sartorius) を用いて濾過滅菌後、4 $^{\circ}\text{C}$ または -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

酸性タイロード液

ポリビニルピロリドン 100 mg を酸性タイロード (Tyrode's Solution Acidic; Sigma) に溶かし、全量を 100 mL とした。0.2 μm 径フィルターを用いて濾過滅菌後、4 $^{\circ}\text{C}$ または -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

PBS 溶液

蒸留水に PBS Tablet (Takara) 50 粒を溶かし、全量を 500 mL とした。オートクレーブによって滅菌し、10x PBS 溶液として室温で保存した。10x PBS 溶液を蒸留水で 10 倍に希釈し、1x PBS 溶液として室温で保存した。

PET (PBS-EDTA-Trypsin) 溶液

1x PBS 溶液 500 mL に EDTA2Na (Wako) 186 mg、トリプシン (Gibco) 1.25 g を溶かし、0.2 μ m 径フィルター濾過滅菌後、4 $^{\circ}$ C または -20 $^{\circ}$ C で保存した。

DMEM 培養液

DMEM 粉末 (Gibco) を蒸留水に溶かし、炭酸水素ナトリウム (関東化学) を加えて pH を調整した。400x ペニシリン G カリウム (Meiji) 2.5 mL、2,000x 硫酸ストレプトマイシン (Meiji) 0.5 mL を加え、蒸留水を加えて 1,000 mL にし、0.2 μ m 径フィルターを用いて濾過滅菌後、4 $^{\circ}$ C で保存した。FBS を最終濃度 10% となるように加えて、DMEM 培養液とした。

DMEM 培養液に最終濃度 10% となるように DMSO HYBRI-MAX (Sigma) を加えて細胞凍結液とした。

ES 樹立培養液

ESGRO-2i medium (Merck) 8.0 mL に Knockout Serum Replacement (Gibco) 2.0 mL を加え、4 $^{\circ}$ C で保存した。

0.2 %ゼラチン溶液

ゼラチン (Sigma) 1.0 g を蒸留水に溶かし、全量を 500 mL とした。オートクレーブによって滅菌し、室温で保存した。

マイトマイシン C 溶液

マイトマイシン C (Wako) を 1.0 mg/mL となるように蒸留水に溶かし、-80 °C で保存した。使用時は、最終濃度 100 µg/mL となるように培養液に添加した。

3. マウス多倍体胚の作出

過排卵処置および交配

B6D2F1 メスマウスに 100 µL の Hyperova (九動) を腹腔内投与し、その 4 8 時間後に 300 µL の hCG 液を腹腔内投与し、過排卵処理を行った。hCG 液投与後、別ケージの B6D2F1 オスマウスと自然交配させた。

受精卵の採取と体外培養

過排卵処理および自然交配翌日に臍栓が確認できた日を 0.5 日齢とし、1.5 日齢において M2 培養液 (Sigma) を用いて卵管灌流法により 2 細胞期胚を採取した。採取した胚は M2 培養液中で洗浄・馴致し、流動パラフィン (ナカライテスク) 下の 30 μ L の M16 培養液 (Sigma) ドロップに移し、CO₂ インキュベーター内で体外培養した。

電気融合法による多倍体胚の作出

採取した 2 細胞期胚を電気融合用 e-fusion buffer 溶液で洗浄・馴致し、同液を入れた電気融合チャンバー (LF501G0.5 ; ベックス) に移した。電気融合装置 (LF301 ; ベックス) を用いて、5 V の交流電圧を 5 秒間、100 V の直流電圧を 40 μ 秒間通電した。通電 1 時間後、細胞の融合が完了した胚のみを選択し、4 倍体胚とした。4 倍体胚が卵割し、2 細胞となった時点で同様の方法で 8 倍体胚を作出した。さらに同様にして 16 倍体胚の作出を行った。作出した多倍体胚は、30 μ L の M16 培養液ドロップに移し、培養した。 4.5 日齢において胚を観察し、生存率を算出した。

16 倍体集合キメラ胚の作出

融合が完了した 16 倍体胚を選択し、酸性タイロード溶液ドロップ中に移し、透明体

を除いた。透明帯を除いた 4 個の 16 倍体胚を 30 μ L の M16 培養液ドロップ内にアグリゲーションニードル (DN-9 ; BLS) により作成したアグリゲーションホール内に移し、互いに接着させて培養した。

4. 多倍体胚盤胞における遺伝子発現解析

胚盤胞期胚の蛍光免疫染色

4.5 日齢の胚を 0.1 % ポリビニルピロリドン添加 PBS 溶液 (PVP-PBS) ドロップ中で 3 回洗浄し、4 % パラホルムアルデヒド (Wako) 添加 PVP-PBS 中に 1 時間静置し固定した。PVP-PBS ドロップ中で洗浄し、1 % Triton-X (Wako) 添加 PVP-PBS 中に 30 分間静置し膜透過処理を行った。その後、10 % 動物血清添加 PVP-PBS 中に 30 分間静置しブロッキングを行った後、PVP-PBS ドロップ中で洗浄し、一次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。PVP-PBS ドロップ中で洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、Hoechst33342 (Dojindo) 添加 PVP-PBS (最終濃度 : 5.0 μ g/mL) 中で核染色を行い、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence) で観察した。

一次抗体として、ウサギ抗 CDX2 抗体 (ab220779 ; abcam) を 500 倍で希釈した

ものおよびマウス抗 OCT3/4 抗体 (sc-5279 ; Santa Cruz) を 50 倍で希釈したものを
用いた。二次抗体として、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (#234 ; MBL) を 160 倍で希釈
したものおよびロバ抗マウス IgG 抗体 (ab150105 ; abcam) を 500 倍で希釈したも
のをういた。

total RNA の抽出

total RNA の抽出は、ReliaPrep RNA Cell MiniPrep System (Promega) を用いて
付属プロトコルに従い行った。胚 1 個から抽出できる total RNA が少なくその後の解
析が困難なため、4.5 日齢の胚 20 個から total RNA の抽出を行なった。16 倍体集合
キメラ胚については、4.5 日齢の集合胚 5 個から total RNA の抽出を行なった。抽出し
た total RNA は、NanoDrop2000 (Thermofisher Scientific) により濃度を測定し、
-80 °C で保存した。

RT-PCR

抽出した total RNA を鋳型として、QuantiTect Reverse Transcription Kit(QIAGEN)
を用いて付属プロトコルに従い逆転写反応を行なった。得られた cDNA は-20 °C で保

存した。

iCycler (Biorad) および PrimeSTAR HS (Takara) を用いて表 1-3 に記載した条件で RT-PCR を行なった。プライマー配列は表 1-4A および表 1-4B に示した。PCR 産物は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色を行い、観察した。

5. 多倍体胚から多倍体胚性幹細胞の樹立の試み

フィーダー細胞の樹立

妊娠 12.5 日齢の ICR メスマウスから胎子を摘出し、胎子の頭部、四肢、内臓を除去し、PBS 溶液中で洗浄した。18G 注射針 (Terumo) に通し、さらに PET 溶液中で胎子組織片が溶解するのを確認し、DMEM 培養液を加え、1,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除いた後に DMEM 培養液に再懸濁し、0.2%ゼラチン溶液でコーティングした 10 cm Dish (日本 BD) へ播種し、マウス胎子線維芽細胞 (MEF : Mouse Embryonic Fibroblast) として培養した。

増殖した MEF をマイトマイシン C 添加 DMEM 培養液中で 2.5 時間培養し、フィー

ダー細胞とした。作出したフィーダー細胞は細胞凍結液に懸濁し、-80 °C で保存した。

胚性幹細胞の樹立

4.5 日齢の胚を酸性タイロイド液ドロップ中に移し、透明帯を除去した。透明帯を除いた胚をフィーダー細胞上へ播種し、ES 樹立培養液で培養した。増殖した内部細胞塊由来の細胞塊を PET 溶液で懸濁し、新たにフィーダー細胞上に播種し、ES 樹立培養液で培養した。数日後、円形のコロニーの出現を指標として胚性幹細胞の樹立と判断した。樹立した胚性幹細胞は Stem Sure Freezing Medium (Wako) に懸濁し、-80 °C で保存した。

6. 統計学的処理

多倍体胚の発生率および胚性幹細胞の樹立効率について二項検定を行い、 $P < 0.05$ を統計的に有意差があると判定した。

結果

1. マウス多倍体胚の作出と培養

過排卵処理をした B6D2F1 マウスから卵管灌流法により回収した 2 細胞期胚を、電気融合法により融合することで 4 倍体化を誘導し、体外培養を行った。誘導した 4 倍体胚が卵割により 2 細胞期になった時点でさらに電気融合を行い、8 倍体化を誘導した。さらに同様の方法で 16 倍体化の誘導を行った (図 1-1)。これらの誘導した多倍体胚は、4.5 日齢まで培養を行い、各実験に用いた。コントロールとして 2 倍体胚を用いた。

4.5 日齢において、2 倍体胚を含めた多倍体胚は卵割腔を有する胚盤胞へと発生した (図 1-2)。しかしながら 4.5 日齢の 16 倍体胚においては、変性や発生停止などが起こり、2 倍体胚、4 倍体胚および 8 倍体胚と比較して、胚盤胞への発生率が有意に低いことがわかった (表 1-1)。

2. マウス多倍体胚の遺伝子発現解析

次に、マウス多倍体胚盤胞を構成する細胞について詳細に解析するために、胚盤胞マ

一カー遺伝子の発現解析を行った。蛍光免疫染色により栄養外胚葉マーカーの CDX2 タンパクおよび内部細胞塊マーカーの OCT3/4 タンパクの発現および局在について解析を行った。その結果、栄養外胚葉マーカーの CDX2 発現は、2 倍体胚を含めた全ての多倍体胚で観察された (図 1-3A)。一方で、内部細胞塊マーカー遺伝子の OCT3/4 は 2 倍体胚、4 倍体胚および 8 倍体胚においては観察されたが、16 倍体胚においては観察されなかった (図 1-3B)。また、倍数性の増加に伴い、細胞 1 個あたりの大きさは増加し、一方、胚盤胞を構成する細胞数は減少することがわかった。

さらに多倍体胚盤胞期胚における栄養外胚葉および内部細胞塊の存在についてより詳細に解析するため、RT-PCR 法により胚盤胞期特異的な mRNA の発現の解析を行った。胚 1 個あたりから抽出できる RNA 量はわずかであるため、本研究では、20 個の胚から RNA を抽出し実験を行なった。その結果、全ての多倍体胚において栄養外胚葉マーカー遺伝子の *Cdx2* の発現が検出された。一方で、内部細胞塊マーカー遺伝子の *Oct3/4*、*Nanog* および *Gata6* の発現は、2 倍体胚、4 倍体胚および 8 倍体胚においては検出されたが、16 倍体胚において内部細胞塊マーカー遺伝子は検出されなかった (図 1-3)。

3. 集合 16 倍体胚の作出と解析

次に、16 倍体胚盤胞期胚を構成する細胞数が少ないことに着目して、構成する細胞数を増加させた胚盤胞期胚を解析するために、前述の方法で 16 倍体胚を作出し、4 個の 16 倍体胚を接着培養することにより、集合 16 倍体胚の作出を試みた (図 1-4)。胚どうしの接着培養を行うためにアグリゲーションホールを作出し、その中に透明帯を除去した 16 倍体胚を 4 個静置した。この集合胚の培養を行い、接着培養 12 時間後において、集合 16 倍体桑実胚の形成が観察された (図 1-5A)。さらに 4.5 日齢まで培養し、蛍光免疫染色および RT-PCR 法により胚盤胞期胚特異的な因子の解析を行った。蛍光免疫染色の結果、1 個の 16 倍体胚では観察されなかった OCT3/4 が、集合 16 倍体胚において観察された (図 1-5B)。また集合 16 倍体胚において、胚盤胞を構成する細胞数は、16 倍体胚のものより多かった。

RT-PCR 解析にあたり、回収を期待できる RNA 量を揃えるために、5 個の集合 16 倍体胚から RNA を抽出し実験に用いた。その結果、1 個の 16 倍体胚において検出されなかった内部細胞塊マーカー遺伝子 (*Oct3/4*、*Nanog* および *Gata6*) の発現が、集合 16 倍体胚においては確認された (図 1-5C)。

4. 多倍体胚性幹細胞樹立の試み

倍数性の変動と胚発生における細胞の分化について調べるために、透明帯を除去した 4.5 日齢の胚盤胞期胚をフィーダー細胞上に播種し培養した。内部細胞塊由来の細胞集塊を選択し、培養することで細胞株の樹立を行った。2 倍体胚から胚性幹細胞を樹立に成功する場合と比較し、4 倍体胚から 4 倍体胚性幹細胞を樹立できる割合は低かった（表 1-2）。また、8 倍体胚および 16 倍体胚からも胚性幹細胞の樹立を試みたものの、うまく樹立ができなかった。

考察

本章ではマウス初期胚を用いて多様な倍数性の多倍体化胚を誘導し、その形態を比較し、発現する特異的マーカーについて解析を行なった。その結果、4 倍体、8 倍体および 16 倍体胚においても胚盤胞形成が観察されたが、16 倍体胚においては内部細胞塊の形成が認められなかった。しかしながら、16 倍体胚の集合胚を作出することにより内部細胞塊の形成が観察された。

マウス多倍体胚の誘導方法は、サイトカラシン B により細胞分裂を阻害する方法 (Tarkowski *et al.*, 1977)、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスにより細胞融合を誘導する方法 (Martin *et al.*, 1981)、2 倍体の体細胞を受精卵へ移植する方法 (Modlinski, 1978) などのさまざまな方法がある。本章では、融合率が高く、溶媒への暴露時間の短い電気融合法 (Berg, 1982 ; Kubiak *et al.*, 1985) により胚の多倍体化誘導を行った。この方法を用いることでマウス胚において高率に多倍体化誘導できるだけでなく、マウス以外の動物においても多倍体化を誘導できる (Krivokharchenko *et al.*, 2002)。電気刺激による細胞質の融合においては、核の融合は起こらずに M 期において両細胞核においてそれぞれ複製された染色体セットがリモデリングし、娘細胞へ引き継がれることにより多倍体化することが知られている (Park *et al.*, 2011)。また、

これまではマウス多倍体胚の研究において、4倍体以外の多倍体胚を用いた研究報告は少なく、多くが2倍体胚と4倍体胚を比較するものであった。本章のように2倍体胚、4倍体胚、8倍体胚および16倍体胚の4つの異なる多倍体胚を用いた解析は例はこれまででない。

本章では世界で初めてマウス16倍体胚の作出に成功した。また、電気融合により胚全体の細胞数が減少するにも関わらず、同じ日齢において卵割腔の有する胚盤胞期胚へと発生した。胚盤胞期胚においては内部細胞塊系譜と栄養外胚葉系譜では発現遺伝子が異なる (Weidgang *et al.*, 2016)。3.5日齢の初期胚盤胞期胚において *Cdx2* を発現する栄養外胚葉の細胞の一部は、内部細胞塊への可塑性を有していると報告 (Toyooka *et al.*, 2015) があるため、本研究では細胞運命の可塑性をできるだけ排除するために4.5日齢の胚盤胞を実験に用いた。多倍体胚の遺伝子発現解析の結果、今回3回にわたる電気融合により作出したマウス16倍体胚において内部細胞塊の存在が認められなかった。しかしながら4個の16倍体胚を凝集した集合胚を作出することで内部細胞塊の形成が確認された。これらの結果から16倍体胚においても胎子組織への多能性を有した細胞系譜が誘導されることがわかった。胚盤胞形成時において、その前段階である桑実胚期胚において胚を構成する細胞に内側と外側の極性が生じ、Hippo シグナル経路によ

り胚を構成する細胞のうち内側に存在する細胞が YAP のリン酸化修飾を受けることにより細胞極性の違いが生じ、胚盤胞期の内部細胞塊および栄養外胚葉の運命を決定つけることが明らかとなっている (Hirate *et al.*, 2013 ; Manzanares *et al.*, 2013)。本研究においても 1 個の 16 倍体胚において内部細胞塊の存在が認められなかった原因として、桑実胚期胚を構成する細胞において内側に存在する細胞がごく少数しか存在せず、極性が生まれなかった可能性が考えられる。集合 16 倍体胚を作出することによって内部細胞塊の形成が確認されたのは、胚全体の細胞数が増加したことによって細胞極性が復元し、内部細胞塊の形成につながったと考えられる。また、発生工学におけるキメラ胚の作出においては、胚全体の細胞数が重要であることも明らかとなっており (Ohta *et al.*, 2008)、本研究によっても初期胚を構成する細胞数が重要であることが示唆された。

また、今回作出した多倍体胚はほぼ同時期において胚盤胞期胚へ発生した (Data not shown)。これまでに 2 倍体 8 細胞期胚において、8 つの割球を分離して培養することにより通常より小さいサイズの胚盤胞期胚を誘導した報告があり、それぞれの割球が胚盤胞期胚へ発生するタイミングは、通常の胚と同じである (Korotkevich *et al.*, 2017)。また、胚の運命決定とキメリズムの効率を解析した実験において、2 倍体と 4 倍体胚を

用いた実験において桑実胚期胚へ発生するためのコンパクションのタイミングは同時期であった (Lin *et al.*, 2010)。これらのことから桑実胚期胚への分化は胚全体の細胞数よりは、受精または卵割後の時間的な因子や母性または父性因子により時間的に制御されている可能性が示唆される。

また、電気融合法により作出されたマウス多倍体胚の胚盤胞期までの発生率は、4倍体胚、6倍体胚および8倍体胚における報告があり、2倍体胚と比較して倍数性を増加させるに従って発生率が低下することが知られている (Lei *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2016)。この原因についてはアポトーシスやオートファジー、エピゲノムの異常が挙げられており、本研究においてはこれらの因子に関する実験は行なっていないものの、16倍体胚の胚盤胞期胚への発生率が有意に低かったのは、これらの原因による可能性が十分に考えられる。

また、マウス胚盤胞期胚において2倍体と4倍体の発現遺伝子を網羅的に解析した報告 (Kawaguchi *et al.*, 2009 ; Park *et al.*, 2012) があるが、発現遺伝子の違いに関して統一的な見解はまだ得られていない。2倍体胚盤胞期胚と比較する対象として、4倍体だけでなく、さらにゲノム量の倍化した8倍体や16倍体、さらには半数体などを考慮に入れることで、ゲノムの倍数性の変動が初期胚の遺伝子発現に与える影響が明らか

になると考える。

胚性幹細胞の樹立にあたって、以前までは樹立可能なマウス系統が限られていたが、2i 培養法により多くのマウス系統で効率的にマウス胚性幹細胞の樹立が可能となった (Ying *et al.*, 2008)。本研究においても2i 培養法によりマウス2倍体胚から複数株の胚性幹細胞を樹立した。マウス4倍体胚からの胚性幹細胞の樹立は、その効率が有意に低いものの、樹立に成功したことから、哺乳類においては1細胞あたりのゲノム量に関して可塑性を持つ可能性が考えられる。しかし一方、8倍体胚および16倍体胚からは樹立することができなかった。胚盤胞期胚におけるマウス四倍体胚では、内部細胞塊で発現するOCT3/4陽性の細胞数が減少するまたは存在しないことがあるという報告がある (Liu *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2011)。本研究における4倍体胚においてOCT3/4を発現する細胞が存在しない胚は観察されなかったが、胚性幹細胞の樹立に際して内部細胞塊の細胞数は重要な要因であることが示唆された。本研究で樹立できなかった8倍体胚および16倍体胚においても、集合胚を形成させた上で試みることで胚性幹細胞の樹立ができる可能性がある。

以上のことより本章においては、マウスの胚盤胞期胚の分化において、倍数性の変動に関わらず、内部細胞塊および栄養外胚葉を有する胚盤胞へ分化できることを明ら

かにした。内部細胞塊形成においては初期胚盤胞期胚や桑実胚期胚における細胞数が重要な要素であり、ゲノム量変動に対してマウス初期胚は形態形成における高い柔軟性を有していると考えられる。

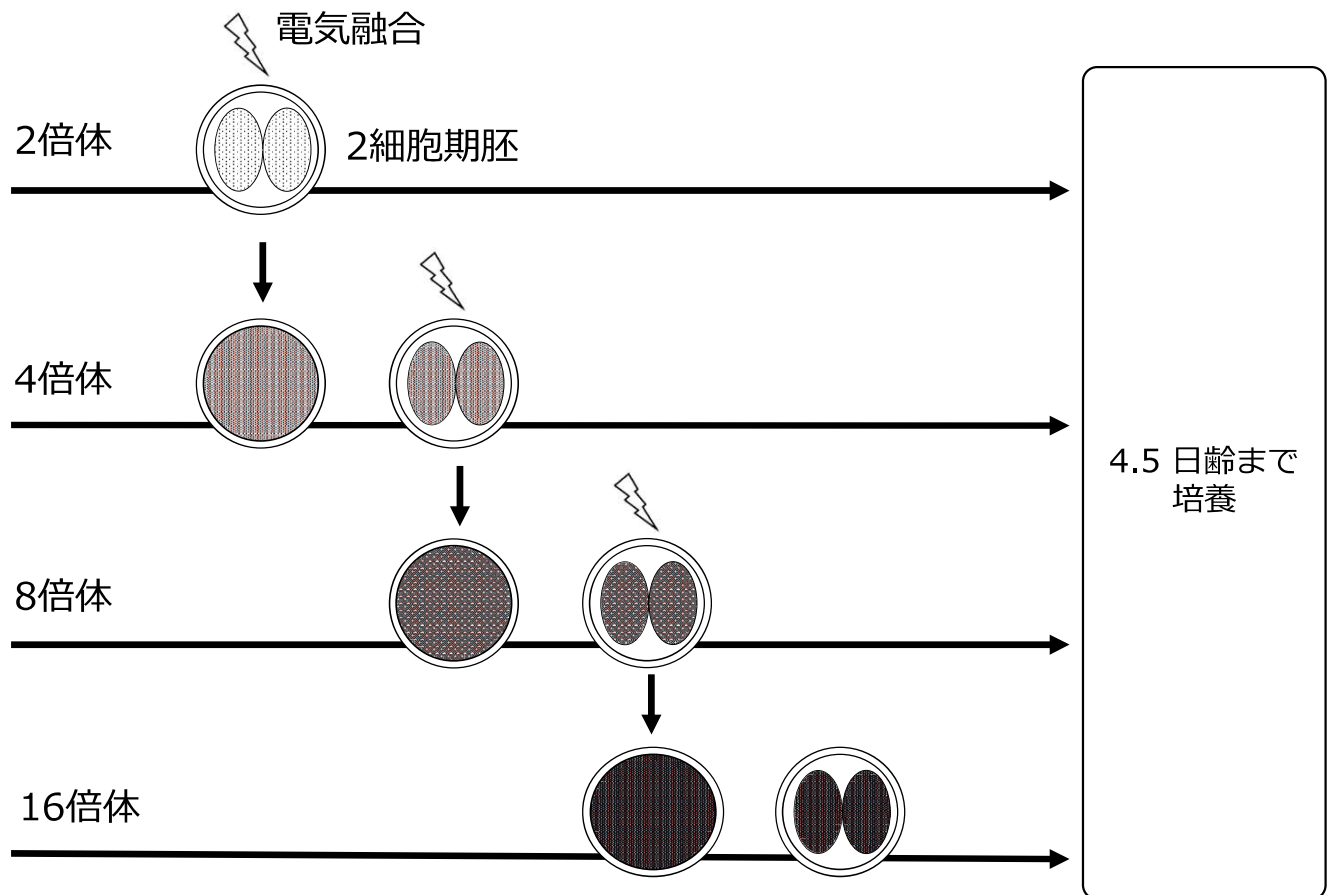


図1-1 マウス多倍体胚の作出方法の概略

マウス胚の多倍体化誘導の方法を示す。2細胞期胚において電気融合により4倍体胚を作出した。作出した4倍体胚が2細胞期胚になった時点でさらに電気融合により8倍体化誘導を行い、同様に16倍体胚まで作出した。

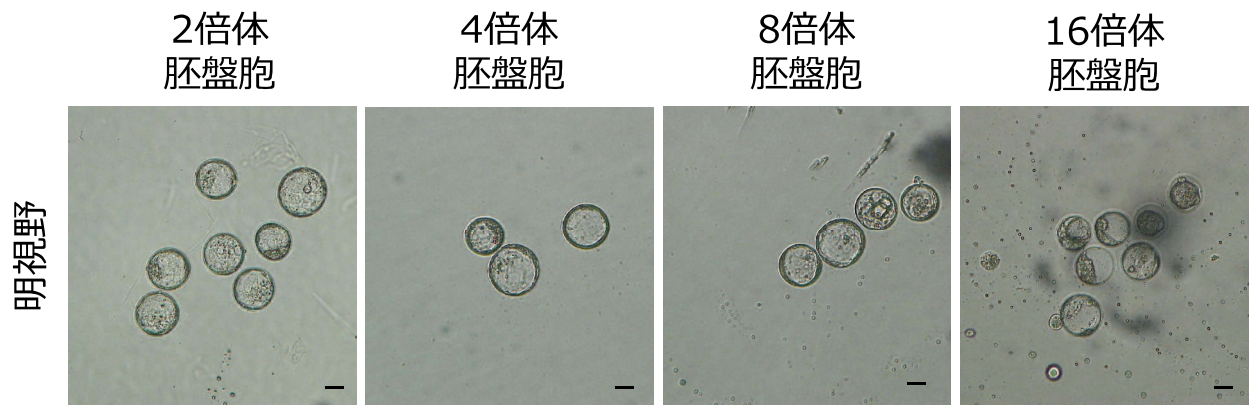


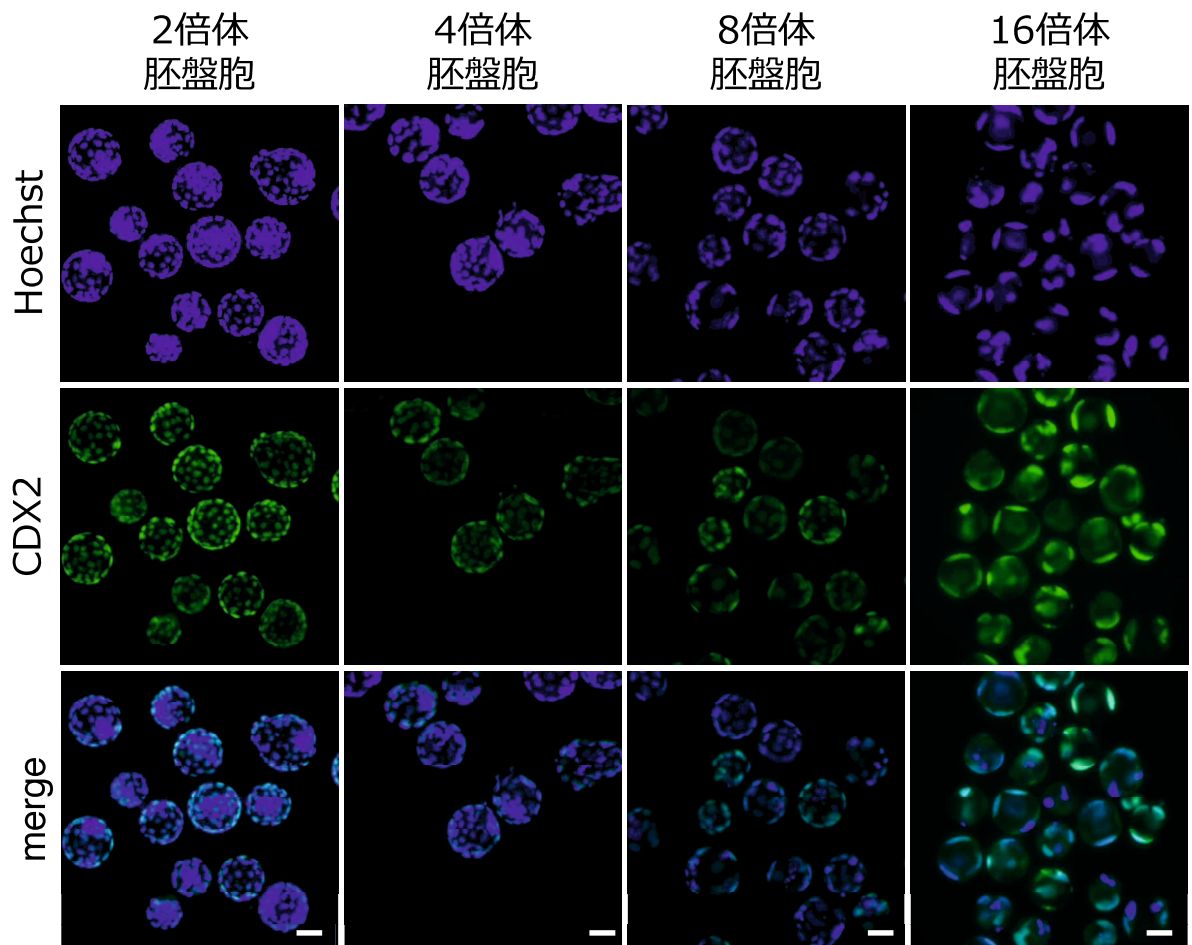
図1-2 4.5日齢におけるマウス多倍体胚の形態

4.5日齢におけるマウス多倍体胚（左から2倍体、4倍体、8倍体、16倍体胚）の明視野像を示す。卵割腔を有する胚盤胞へ発生した。bar= 50 μ m

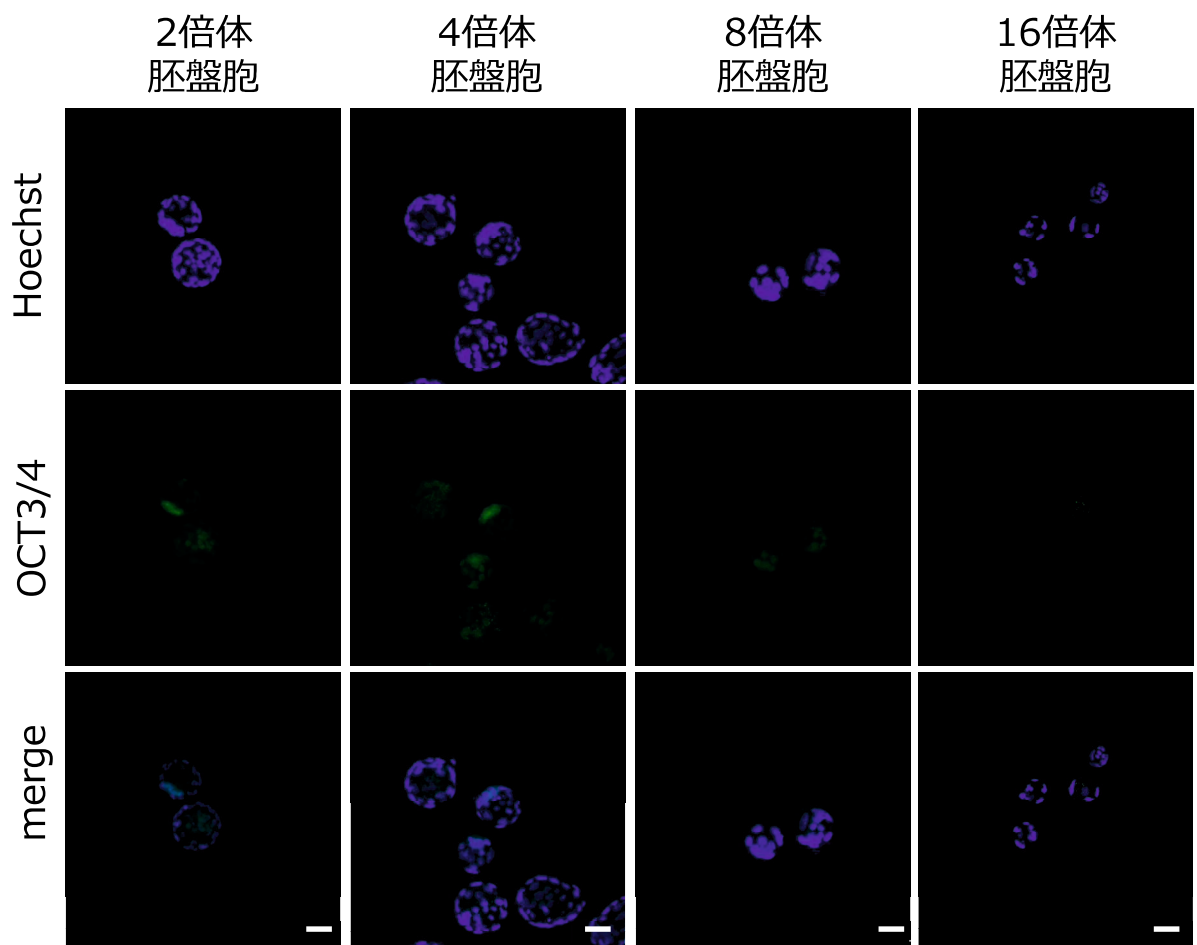
図1-3 4.5日齢のマウス多倍体胚盤胞における特異的タンパクならびに遺伝子発現解析

- (A) 蛍光免疫染色により4.5日齢におけるマウス多倍体胚盤胞の栄養外胚葉マーカー (CDX2) の局在を観察した。bar= 50 μ m
- (B) 蛍光免疫染色により4.5日齢におけるマウス多倍体胚盤胞の内部細胞塊マーカー (NANOG) の局在を観察した。bar= 50 μ m
- (C) RT-PCRによりマウス多倍体胚盤胞の内部細胞塊マーカー遺伝子 (*Oct3/4*、*Nanog*および*Gata6*) と栄養外胚葉マーカー遺伝子 (*Cdx2*) の発現を解析した。*Gapdh*を内在性コントロールとした。

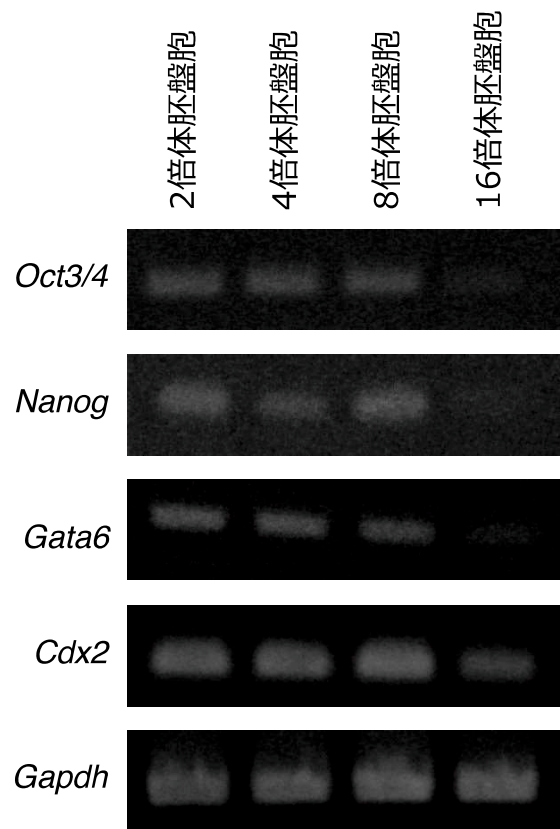
A



B



C



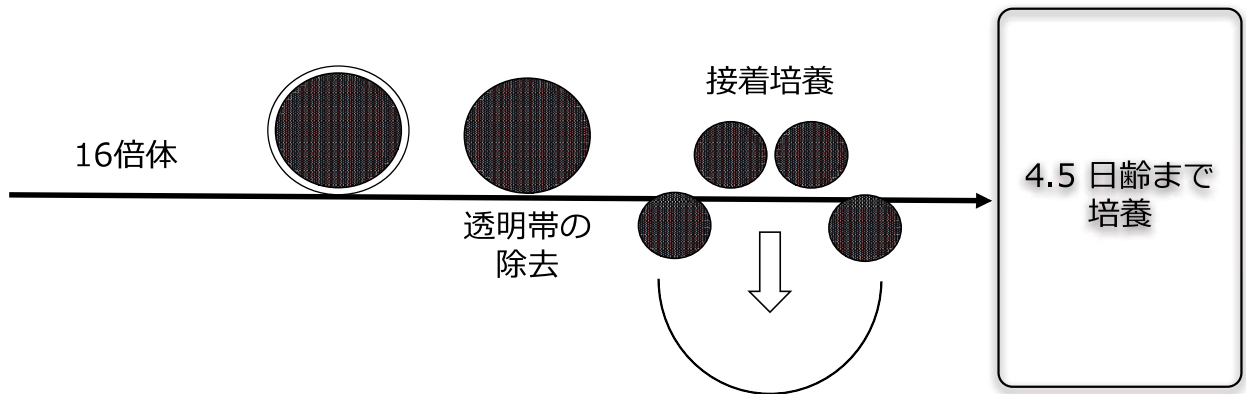


図1-4 マウス16倍体胚の集合胚作出の概略

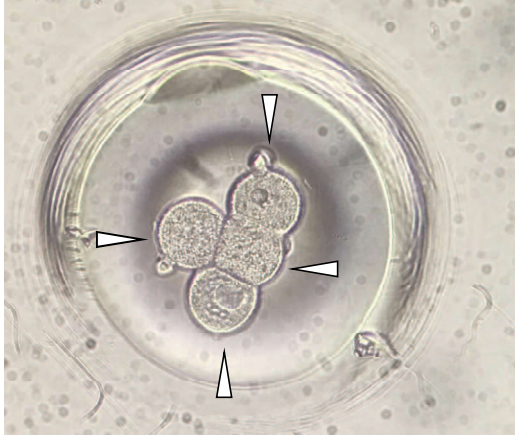
マウス16倍体胚の集合胚の作出方法を示す。前述の方法で作出した16倍体胚から透明帯を除き、アグリゲーションホール内で4個の16倍体胚を互いに接着培養することで集合胚の作出を試みた。

図1-5マウス集合16倍体胚作出と遺伝子発現解析

- (A) 4個の16倍体胚（白矢頭）の接着培養を行い（左）、接着後において集合16倍体桑実胚（右）の形成が観察された。
- (B) 蛍光免疫染色により4.5日齢における集合16倍体胚盤胞の内部細胞塊マーカー（NANOG）の局在を観察した。bar= 50 μ m
- (C) RT-PCRにより集合16倍体胚盤胞の内部細胞塊マーカー遺伝子（*Oct3/4*、*Nanog*および*Gata6*）と栄養外胚葉マーカー遺伝子（*Cdx2*）の発現を解析した。*Gapdh*を内在性コントロールとした。

A

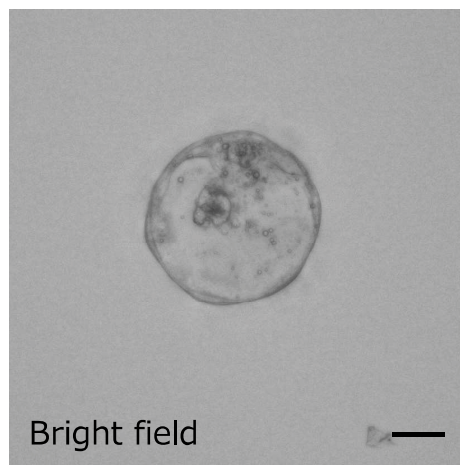
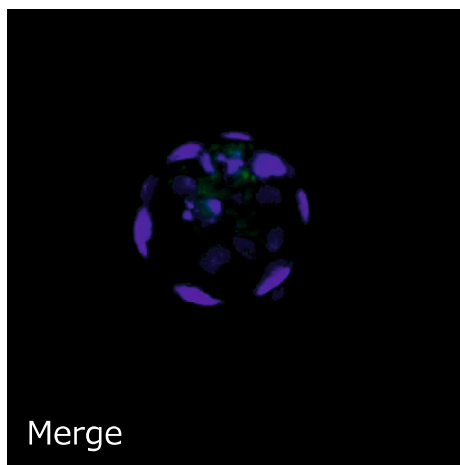
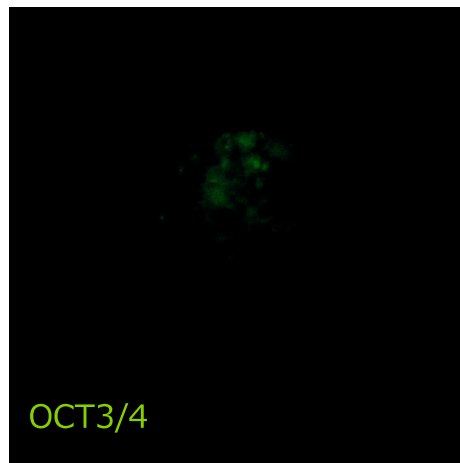
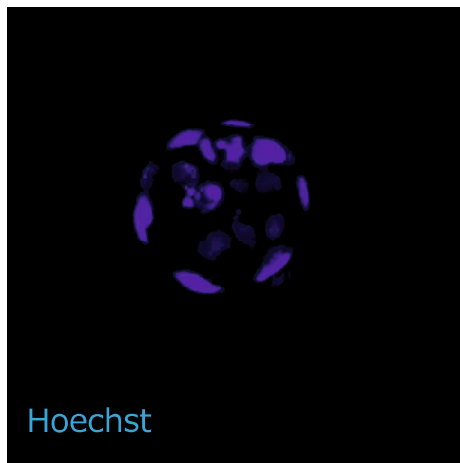
4 個の16倍体胚の接
着培養



集合16倍体
桑実胚



B



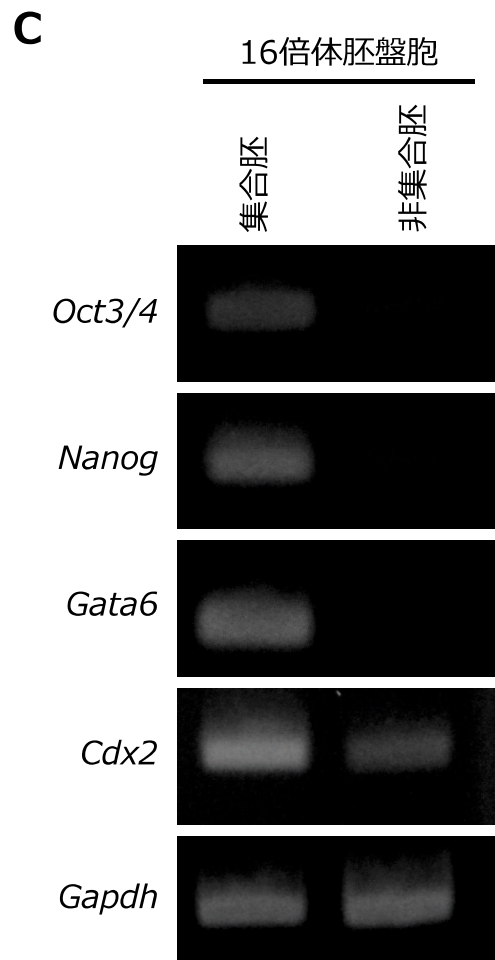


表1-1 マウス多倍体胚の胚盤胞への発生率

	normal (%)	abnormal (%)	total
2倍体	77 (89.5)	9 (10.5)	86
4倍体	52 (85.2)	9 (14.8)	61
8倍体	59 (85.5)	10 (14.5)	69
16倍体	32 (56.1*)	25 (43.9)	57

* : $P < 0.01$

表1-2 マウス多倍体胚から胚性幹細胞の樹立

	胚盤胞数	ES細胞株数	樹立効率 (%)
2倍体	17	15	88
4倍体	61	9	15*
8倍体	52	0	0
16倍体	48	0	0

* : $P < 0.01$

表1-3 RT-PCR条件

表1-3A 反応液組成

組成	容量 (μ L)
PrimeSTAR HS	5.0
10 μ M Primer F	0.2
10 μ M Primer R	0.2
cDNA	0.5
H ₂ O	4.1
total	10.0

表1-3B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	98 °C	30 秒	1
	98 °C	10 秒	
	72 °C	15 秒	
	(-1 °C/サイクル)		
②	72 °C	30 秒	12
	98 °C	10 秒	
	60 °C	15 秒	
③	72 °C	30 秒	23
④	72 °C	60 秒	1
⑤	15 °C	∞	1

表1-4 使用したプライマー

遺伝子		プライマー配列 (5'→ 3')
<i>Oct3/4</i>	F	GCATACGAGTTCTGCGGAGGGATG
	R	GGACTCCTCGGGAGTTGGTTCCAC
<i>Nanog</i>	F	CCTGCAGTTTTTCATCCCGAGAAC
	R	GAGAACACAGTCCGCATCTTCTGC
<i>Gata6</i>	F	AGGGTGAGCCTGTGTGCAATGCTT
	R	CTACCCCTGAGGTGGTCGCTTGTG
<i>Cdx2</i>	F	AAGATAGCTGGACTGACCGAAG
	R	CTCTACCCATGGATCAAGAAGG
<i>Gapdh</i>	F	GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R	CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG

第2章

マウス4倍体胚性幹細胞の樹立と

その性質の解析

緒言

マウス着床前胚である胚盤胞期胚は、胚体組織と胚体外組織へ分化する細胞系譜はすでに決定されている (Dietrich *et al.*, 2007)。胚盤胞期胚において将来の胚体組織へ分化する内部細胞塊から樹立された胚性幹細胞 (ESCs : Embryonic Stem Cells) は胚体組織への多能性を有し (Evans *et al.*, 1981)、将来の胚体外組織へ分化する栄養外胚葉から樹立された栄養膜幹細胞 (TSCs : Trophoblast Stem Cells) は胚体外組織への多能性を有する (Tanaka *et al.*, 1998)。

倍数性の変動した胚性幹細胞株の樹立の試みとして、マウス未受精卵 ($1n=20$) を 7% エタノールや塩化ストロンチウムにより活性化させ、単為発生させた胚盤胞から樹立された半数体の多能性細胞株の作出を試みた報告がある (Kaufman *et al.*, 1983)。しかしながら活性化により単為発生した未受精卵は桑実胚期胚において約 20% の細胞が2倍体化し、また細胞株の初回継代時にはほとんど全ての細胞が2倍体化する。同様の方法で活性化した単為発生の胚盤胞期胚を用いてマウス半数体胚性幹細胞の樹立が行われた (Elling *et al.*, 2011 ; Leeb *et al.*, 2011) が、Kaufmanらの報告とは異なり、初回継代時における半数体の細胞数は増加したものの、長期間の培養などにより2倍体化する。さらにこの方法を改良し、Wee1阻害剤のPD166285を培

養液に添加することにより自発的な2倍体化を制御できることが報告された

(Takahashi *et al.*, 2014)。これらの半数体胚性幹細胞において多能性マーカー遺伝子の発現は2倍体胚性幹細胞と同様に観察された。しかしながら半数体胚性幹細胞のゲノムの倍数性の不安定性に関する詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

一方、微小管重合阻害剤のデメコルシンを用いてマウス胚性幹細胞の細胞分裂を阻害させることにより多倍体化を誘導した報告 (Fujikawa-Yamamoto *et al.*, 2007) があるが、4倍体や8倍体のみならず、5倍体や6倍体、12倍体などの 2^n 倍ではなく通常出現しないと考えられる多倍体の出現も観察された (Fujikawa-Yamamoto *et al.*, 2010 ; Fujikawa-Yamamoto *et al.*, 2013)。これらの報告においても多能性マーカー遺伝子の発現は観察されているものの、細胞分裂の阻害による多倍体化誘導によって遺伝的な均質性が損なわれていると考えられる。さらに、ゲノムの不安定について直接的な原因については言及されておらず、哺乳類細胞においてゲノムの倍数性の変化がどのような影響を与えるかについてはわかっていない。

本研究では、1つの受精卵に由来する胚盤胞期胚から樹立した遺伝的に均質なマウス4倍体胚性幹細胞 (Tetraploid Embryonic Stem Cells : TESCs) を用いて、倍数性の変動が細胞の基本的な性状に与える影響について検討した。

材料と方法

1. 実験動物

本研究で用いた B6D2F1 マウスおよび ICR マウス（日本エスエルシー）は、温度制御下（20 - 29 °C）、明時間 12 時間、暗時間 12 時間で飼育した。マウスを購入後、1 週間飼育して馴致させ、各実験を行った。

2. 培地および試薬の作成

PBS 溶液

第 1 章材料と方法に記載した方法に従った。

TBS 溶液

蒸留水に Tris（Toyobo）1.21 g、塩化ナトリウム（Wako）4.38 g を溶かし、HCl（Wako）を加えて pH を 7.4 に調整し、全量を 500 mL とした。0.2 μm 径フィルター（Sartorius）濾過滅菌後、室温で保存した。

PET (PBS-EDTA-Trypsin) 溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

DMEM 培養液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

ES 培養液

ESGRO Complete PLUS Clonal Grade Medium (MERCK) 8.0 mL に Knockout Serum Replacement (Gibco) 2.0 mL を加え、4 °C で保存した。

0.2 %ゼラチン溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

マイトマイシン C 溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

10 %中性緩衝ホルマリン液 (Lilly ホルマリン液)

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (Wako) 16.5 g、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (Wako) 4.5 g、ホルムアルデヒド (Sigma) 100 mL、蒸留水 900 mL を混合し、室温で保存した。

カルノア固定液

メタノール (Wako) 3.0 mL と酢酸 (Wako) 1.0 mL を混合して使用した。カルノア固定液は使用直前に調整した。

3. 胚性幹細胞の培養

フィーダー細胞の樹立と培養

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

胚性幹細胞の培養

フィーダー細胞を解凍し、ゼラチンコーティングした 35 mm Dish (Sumilon)、12

ウェルプレート (Sumilon) または 24 ウェルプレート (Trueline) で 12 時間以上培養した。DMEM 培養液を除き、1x PBS 溶液で洗浄した後、細胞数を調整した胚性幹細胞を ES 培養液に懸濁し、フィーダー細胞上へ播種し培養した。ES 培養液は 24 時間ごとに交換した。胚性幹細胞が増殖し、コンフルエントになる前に培養を止め、各実験に用いた。

アルカリフォスファターゼ染色 (ALP 染色)

胚性幹細胞を培養し、培養液を除去し、Lilly ホルマリン液を加えて 2 分間静置し固定した。Lilly ホルマリン液を除き、Tween20 (ナカライテスク) 添加 TBS 溶液 (最終濃度 : 0.5 μ L/mL) で 2 回洗浄した。ALP 染色液 (Alkaline Phosphatase Detection Kit ; Merck) を加え、室温で 15 分間暗所反応。ALP 染色液を除き、1x PBS 溶液を加えて観察した。

4. 胚性幹細胞の核型解析

PI 染色による DNA 量の測定

胚性幹細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、細胞数が 1.0×10^6 個になるように調整し、1,000 rpm で5分間遠心し、上清を捨てた。冷 1x PBS 溶液 600 μ L を加え、振盪しながら冷 100% エタノール (-20 $^{\circ}$ C) 1.4 mL を滴下し、4 $^{\circ}$ C で1時間静置した。遠心して上清を除き、RNase 添加 1x PBS 溶液 (最終濃度 : 100 μ g/mL) 1.0 mL を加え、室温で30分間静置した。PI solution (Wako) を40 μ L 加え、暗所で5分間静置した後、BD Accuri C6 Flow Cytometer (日本 BD) により DNA 量を測定した。

ギムザ染色による G バンド染色体標本の作成

胚性幹細胞を培養し、コルヒチン (Wako) を最終濃度 0.05 μ g/mL となるように ES 培養液に添加した。CO₂ インキュベーター内で5時間静置し、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で5分間遠心し上清を捨て、1.0% クエン酸ナトリウム水溶液に懸濁し、37 $^{\circ}$ C で30分間低張処理を行った。その後、カルノア固定液を加えて固定し、冷 50% エタノール (-20 $^{\circ}$ C) に浸漬したスライドガラス上に展開し、風乾した。

風乾したスライドを PET 溶液に1分間浸した後、ギムザ染色を行った。得られた標本を観察し、染色体の長さやバンドパターンによって染色体セットを同定した。

5. 胚性幹細胞の細胞増殖能の比較

胚性幹細胞の増殖能の比較

培養開始時を 0 日目とし、胚性幹細胞を 2.0×10^4 個ずつ 12 ウェルプレート中のフィーダー細胞上へ播種し培養した。培養後、1.5、3.0、4.5、6.0 日目に PET 溶液を用いて剥離し、TC20 全自動セルカウンター（Biorad）を用いて細胞数の計測を行った。

生存率の測定

胚性幹細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、0.5 % トリパンブルー添加 PBS と等量になるように混合し、TC20 全自動セルカウンターを用いて細胞の生存率を計測した。

6. 細胞周期の解析

PI 染色による DNA 量の測定

前述の方法により BD Accuri C6 Flow Cytometer（日本 BD）により DNA 量を測定

し、ヒストグラムにおける各細胞周期のピークに含まれる細胞の割合を測定した。

7. 遺伝子発現解析

total RNA の抽出

第1章材料と方法に記載した方法で行った。

リアルタイム RT-PCR

抽出した total RNA を鋳型として、QuantiTect Reverse Transcription Kit(QIAGEN) を用いて付属プロトコルに従い逆転写反応を行なった。得られた cDNA は-20 °C で保存した。

Applied Biosystems StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) および Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて表 2-2A および表 2-2B の条件でリアルタイム RT-PCR を行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法で解析を行った。標的遺伝子の相対発現量は、*Gapdh* 遺伝子を内部標準として標準化した。プライマー配列は表 2-3 に示した。

RNA シーケンス解析

抽出した total RNA を用いて、RNA シーケンスを行った。シーケンスはフィルジェン社の受託サービスを使用した。データの解析は東京大学大学院農学生命研究科応用遺伝研究室の藤井渉先生が行った。

ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出は Nucleospin TissueXS (Takara) を用いて付属プロトコルに従って行った。抽出したゲノム DNA は、NanoDrop2000 (ThermoFisher Scientific) により濃度を測定し、-20 °C で保存した。

COBRA 解析

抽出したゲノム DNA のバイサルファイト処理は EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) を用いて付属プロトコルに従って行った。MultiNA (Shimadzu) を用いて DNA メチル化レベルの定量を行った。データの解析は宮崎大学農学部獣医学科の西野光一郎先生、脇谷晶一先生、高澤健先生が行った。プライマー配列は表 2-4 に示

した。

胚性幹細胞の蛍光免疫染色

胚性幹細胞を培養し、培養液を除去し、3.5 % パラホルムアルデヒド溶液を加えて 4 °C で 30 分間固定した。0.2% TritonX 添加 PBS 溶液で 20 分間膜透過処理を行い、2% FBS 添加 PBS 溶液中で 15 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体を 4 °C で一晩反応させ、FITC またはローダミン標識二次抗体を室温で 45 分間反応させた。VECTASHIELD mounting medium (Vector laboratories) で封入を行い、共焦点顕微鏡 LSM700 (オリンパス) で観察した。

一次抗体として、抗 NANOG 抗体 (N3088 ; Sigma)、抗 OCT4 抗体 (SAB2701960 ; Sigma)、抗 SSEA1 抗体 (ab16285 ; abcam)、抗 E-cadherin 抗体 (U3245 ; Sigma) および抗 PECAM1 抗体 (sc8306 ; santa cruz) を用いた。

8. 統計学的処理

Mann-Whitney 検定により 2 倍体胚性幹細胞と 4 倍体胚性幹細胞の結果の有意差の

検定を行った。 $P < 0.05$ を統計的に有意差があると判断した。

結果

1. マウス 4 倍体胚性幹細胞の作出と培養

第1章において作出した4倍体胚性幹細胞を用いた。また、以降、4倍体胚性幹細胞は、Tetraploid Embryonic Stem Cells を略して TESC_s と示す。2倍体胚性幹細胞 (ESC_s) をコントロールとして用いた。樹立した細胞株からそれぞれ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、TESC_s の基本的な形態学的解析を行うために、ESC_s および TESC_s のコロニー形態およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性について調べた。その結果、TESC_s のコロニー形態は、ESC_s と類似したコロニー形態を示した。さらに、胚性幹細胞の特徴の1つである ALP 活性を有することもわかった (図 2-1)。

2. 胚性幹細胞の核型解析

次に、樹立した TESC_s の倍数性を解析するために、フローサイトメトリーおよび染色体標本による解析を行った。樹立した ESC_s および TESC_s を PI 溶液により染色し、フローサイトメトリーを用いて DNA 量を比較した (図 2-2A)。なお、FL2 による蛍光

強度を DNA 量の相対値とした。その結果、ESC_s と比較して TESC_s は、2 倍の DNA 量を持つことがわかった (図 2-2B)。

また、ギムザ染色による G バンド染色体標本から、ESC#1 (2n= 40) と比べて、TESC#1 においては、その 2 倍の 80 本の染色体セットが観察された (図 2-2C)。

3. 胚性幹細胞の細胞増殖能の比較

次に、倍数性の変動が ESC_s および TESC_s の細胞増殖能に与える影響を調べるため、ESC_s および TESC_s を用いて増殖曲線を作成した。細胞を播種した日を 0 日とし、1.5 日、3.0 日 4.5 日および 6.0 日において細胞数を比較すると、3.0 日、4.5 日および 6.0 日の TESC_s の細胞数は ESC_s と比較して有意に少ないことがわかった (図 2-3A)。また作成した増殖曲線を用いて、底 2 の対数に線形近似することにより細胞の倍化時間の算出を行ったところ、TESC_s の倍化時間は ESC_s と比較して 2 - 8 時間長いことがわかった (表 2-1)。

さらに TESC_s の増殖速度が低いことと関連して、細胞死による影響を検討するため、カスパーゼ 3 の遺伝子発現量の定量ならびにトリパンブルー排出試験による死細胞の

割合の測定を行った。その結果、ESCs と T ESCs においてカスパーゼ 3 の遺伝子発現量に差は認められなかった (図 2-3B)。また、トリパンブルー排出試験では、主観を排除するために TC20 全自動セルカウンターを用いた。その結果、ESC#1 および T ESCs#1 に差は認められなかった (図 2-3C)。

4. マウス胚性幹細胞の細胞周期の解析

倍数性の変動が胚性幹細胞の細胞周期へ与える影響を調べるため、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析を行った。ESCs および T ESCs を PI 溶液により染色し、フローサイトメトリーを用いて DNA 量を測定し、各ピークからそれぞれの細胞周期の割合を算出した (図 2-4A)。その結果、ESCs と比較して T ESCs は、2 倍の DNA 量を有するものの、各細胞周期に有意な差は認められなかった (図 2-4B)。

5. 胚性幹細胞の分子生物学的特性の解析

まず、胚性幹細胞として多能性を有しているか調べるため、リアルタイムRT-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、TESCsにおける *Sox2* の発現は、ESCs の発現に比べて有意に低かったものの、*Nanog*、*Oct3/4* および *Tet1* の発現はESCsにおける発現と同程度であることがわかった（図2-5A）。ネガティブコントロールとしてマウス胎子線維芽細胞を用いたが、これらの細胞においては胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現はほとんど見られなかった。また、ESC#1およびTESC#1を長期間培養し、継代数5（p5）と継代数20（p20）のESC#1およびTESC#1における遺伝子発現を比較したところ、*Sox2*を含めた胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現に顕著な差は見られなかった（図2-5B）。さらに、*Oct3/4*および *Nanog* のプロモーター領域のメチル化可変領域（DMR ; Differentially Methylated Region）のメチル化の解析を行ったところ、TESC#1のDMRはESC#1と同様にメチル化レベルが低く保たれていることがわかった（図2-5C）。ポジティブコントロールとしてマウス心臓および脳組織から抽出したゲノムDNAを用いた。

続いて、インプリンティング遺伝子のメチル化解析を行ったところ、母性インプリンティング遺伝子の *IG-D1*、*H19* および *Rasgrf1* ならびに *Meg1* 父性インプリンティン

グ遺伝子の*U2af1-rsl*、*Peg3*、*Impact*、*Peg10*、*Nespas*、*Zac1*および*Igf2r-2*のメチル化比率に有意な差があった。具体的にはTESC#1と比較してESC#1の*U2af1-rsl*、*Peg3*、*Impact*、*Peg10*、*IG-D1*、*Nespas*、*Zac1*、*Igf2r-2*、*H19*および*Tasgrf1*のメチル化レベルが有意に低く、*Meg1*のメチル化レベルが有意に高かった。また、全体としてESC#1のメチル化レベルがTESC#1と比較して低かった（図2-5D）。

さらに、蛍光免疫染色により幹細胞マーカータンパクの局在を比較したところ、TESC#1においてESC#1と同様に、OCT3/4およびNANOGの核内における局在が観察された（図2-4E）。また、TESC#1においてSSEA1、E-CADHERIN、PECAM1といった胚性幹細胞のマーカー遺伝子の局在も観察された（図2-5F）。

考察

本章では、倍数性の変動した多倍体胚から樹立に成功した胚性幹細胞の基本的な性状を解析するために、4倍体胚性幹細胞（TESCs）と2倍体胚性幹細胞（ESCs）を比較した。その結果、TESCsは倍数性の変動にかかわらず、多能性を有していることが明らかとなった。

樹立したTESCsおよびESCsの倍数性を解析したところ、染色体標本およびフリーサイトメトリーの結果からそれぞれ4倍体および2倍体を維持していた。誘導多能性幹細胞（iPS細胞）の樹立において、一部の染色体数に異常のある2倍体トリソミーの線維芽細胞を用いた場合、リプログラミングの過程で余剰な染色体が失われ、正常な2倍体の核型のiPS細胞の誘導がなされた報告（Hitota *et al.*, 2017）があるが、本研究ではそのような2倍体化は観察されなかった。また、正常な2倍体を認識するメカニズムの詳細は不明であるが、21トリソミーのダウン症および18トリソミーのエドワーズ症のヒトより分離した培養細胞に*Zscan4* 遺伝子を発現させることにより一部の細胞のトリソミーが解消されたことも報告され、余剰な染色体を認識するメカニズムがあることが報告された（Amano *et al.*, 2015）。本研究で用いたTESCsは全ての染色体セットが倍化した4倍体であったため、余剰な染色体として認識されずに4倍体を維持で

きたと考える。

多能性幹細胞は naïve 型と primed 型の2つに大別される (Nichols *et al.*, 2009)。
naïve 型は着床前胚から樹立され、形態学的にはドーム状のコロニーを形成し、遺伝子発現パターンは胚盤胞期胚の内部細胞塊に相当するとされ、primed 型は着床後胚から樹立することができ、扁平なコロニー形態を示し、着床後のエピブラストに相当し (Brons *et al.*, 2007 ; Tesar *et al.*, 2007)、多能性を維持する分子機構も異なる (丹羽 2012)。本研究において樹立し、実験に用いた TESC は、コロニーの形態が naïve 型で、典型的なマウス胚性幹細胞の形態であった。Primed 型の幹細胞の場合、トリプシンなどで細胞を培養器から剥離するとほぼ全ての細胞がアポトーシスにより死滅することが知られている (Watanabe *et al.*, 2007) が、TESCs においては ESCs と同様に顕著な細胞死は起こらず、naïve 型の多能性幹細胞の特徴と一致した。さらに、マウス胚性幹細胞の特徴の1つでもあるアルカリフォスファターゼ (Pease *et al.*, 1990) は、胚性幹細胞と同様に TESC においても陽性を示した。さらに、幹細胞マーカー遺伝子の発現解析において、TESCs は ESCs と同程度の *Nanog*、*Oct3/4* および *Tet1* の発現が見られたが、*Sox2* の発現が ESCs と比べて低かったが、継代前後で遺伝子発現量を比較したところ、有意な差は見られなかった。ESCs の培養はフィーダー細胞上で、

阻害剤を添加した特殊な培養液を用いるため、培養の条件に繊細に影響を受ける可能性
がある。また、*Sox2* は初期神経系細胞のマーカー遺伝子としても用いられるため
(Zhang *et al.*, 2012)、胚性幹細胞のマーカー遺伝子としての特異性は低いことが考
えられる。また、倍数性の変動したヒトの胚性幹細胞の樹立とその解析についての報告
もなされたが、その報告においても多能性を維持していたことが明らかとなった
(Rungsiwiwut *et al.*, 2016)。本研究において主要な胚性幹細胞マーカー遺伝子の
Oct3/4 および *Nanog* のプロモーターのメチル化可変領域のメチル化についても低メ
チル化状態が維持されており、胚性幹細胞マーカー遺伝子のタンパクとしての局在も観
察されたことから、TESCs は胚性幹細胞の基本的な性質を維持していることが示され
た。

一方で TESCs の細胞増殖速度は ESCs と比較して低く、倍化時間も長いことがわか
った。マウス 2 倍体胚と 4 倍体胚の発現遺伝子の網羅的解析から、細胞周期に関連す
る因子の発現が低下しているとの報告もあるが (Kawaguchi *et al.*, 2009)、本研究に
おける ESCs と TESCs の比較においては細胞周期に有意な差は見られなかった。本研
究と同様の方法で 4 倍体胚性幹細胞を樹立した報告があり、本研究と同じく増殖速度
が低下したことが示されている (Horii *et al.*, 2015 ; Wen *et al.*, 2017)。その原因と

して *p53* 遺伝子や *Wee1* 遺伝子の発現に異常があることが関連づけられているが、本研究で複数の細胞株を使った結果、それらの遺伝子の発現に有意な差は見られなかった (Data not shown)。また、融合して作出した4倍体培養細胞では融合前と比較して増殖速度が有意に低下するとの報告もある (McGill *et al.*, 1992) ことから、倍数性の増加により増殖速度が低下するのは胚性幹細胞に限って観察される現象ではないと考えられる。本研究において培養中のアポトーシスなどの細胞死の可能性は低いことから、ゲノム量が増大したことにより、細胞周期のそれぞれに必要な時間が一様に延長した可能性が考えられる。

インプリンティング遺伝子の解析において、全体的に TESC_s に比べて ESC_s でメチル化レベルが有意に低下していた。マウス胚性幹細胞では、インプリンティング遺伝子をはじめとするゲノム修飾は、胚盤胞期胚の内部細胞塊に類似し、父方由来または母方由来のアレルの一方がメチル化修飾を受けることが知られている (Marks *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2017) ため、多くのインプリンティング遺伝子では理論上はメチル化レベルが 50%となる。しかしながら、胚性幹細胞の維持に用いられる LIF、GSK3 β 阻害剤および MEK1/2 阻害剤を含む培養液は、胚性幹細胞を安定的に維持できる (Ying *et al.*, 2008) 一方で、一部の DNA のメチル化が消失してしまうことが知られている

(Yagi *et al.*, 2017)。本章の解析にあたって、同じ継代数の ESCs と TESC のゲノム DNA を用いたが、細胞の増殖速度、すなわち樹立から解析までの細胞分裂の回数が異なっていたことが考えられ、TESCs と ESCs のゲノム DNA のメチル化修飾に差が生じたことも考えられる。より詳細な解析をするためには、継代数ではなく細胞分裂の回数や細胞増殖に着目した解析が必要であると考えられる。

倍数性を変動させた胚性幹細胞の研究は、次に挙げるような研究が挙げられる。まず半数体 ESCs に関する研究では、遺伝子機能のスクリーニングやインプリンティング遺伝子などに注目した研究が行われている (Elling *et al.*, 2011 ; Leeb *et al.*, 2011 ; Jang *et al.*, 2016)。半数体胚性幹細胞において倍数性は不安定であるものの、遺伝子のノックアウトなどにおいてヘテロ型が出現しないという遺伝学的メリットがある。倍数性を比較的安定的に培養する条件について報告 (Takahashi *et al.*, 2014) がなされたが、半数体胚性幹細胞のみを培養するためにはセルソーターにより定期的に半数体胚性幹細胞のみを分取する必要がある。次に、微小管の重合阻害剤による細胞分裂を阻害することにより誘導した多倍体胚性幹細胞に関する研究 (Fujikawa-Yamamoto *et al.*, 2007) では、培養中に倍数性の変動や崩壊などが自発的に起こり、5 倍体や 6 倍体胚性幹細胞が出現するとされる (Fujikawa-Yamamoto *et al.*, 2010 ; Fujikawa-

Yamamoto *et al.*, 2013)。これらの研究は、ゲノムの不安定性の解析には有用であるが、均質な細胞集団の分取とその解析は困難であることが考えられる。さらに、ゲノムの倍数性の変動と胚発生の関係に着目して胚性幹細胞に線維芽細胞をポリエチレングリコールにより融合させ、4倍体化させた報告もある (Kruglova *et al.*, 2008 ; Matveeva *et al.*, 2015)。これらの報告においては、融合した胚性幹細胞が多能性を維持しているが、胚性幹細胞と体細胞の融合であるため厳密に胚性幹細胞とは断言できない。また細胞融合の操作によって、理論上は8倍体やそれ以上の倍数性を有する細胞が出現する可能性が否定できない。これらの研究と比較して、本研究における TESC の樹立方法は、2細胞期胚において電気融合法を用いて染色体のリモデリングを経た倍数性の安定した4倍体胚を作出する技術 (Park *et al.*, 2011) と同じ方法を用いており、樹立した TESC の均質性も高いと考える。

本章の結果から、倍数性の変動にかかわらず TESC は多能性を維持しており、*in vitro* においては2倍体 ESC と同様な胚性幹細胞としての性質を有することが明らかとなった。前章の方法で8倍体や16倍体胚性幹細胞の樹立がなされれば、倍数性の変動が細胞増殖能以外に与える影響についてもより明確になることが期待される。

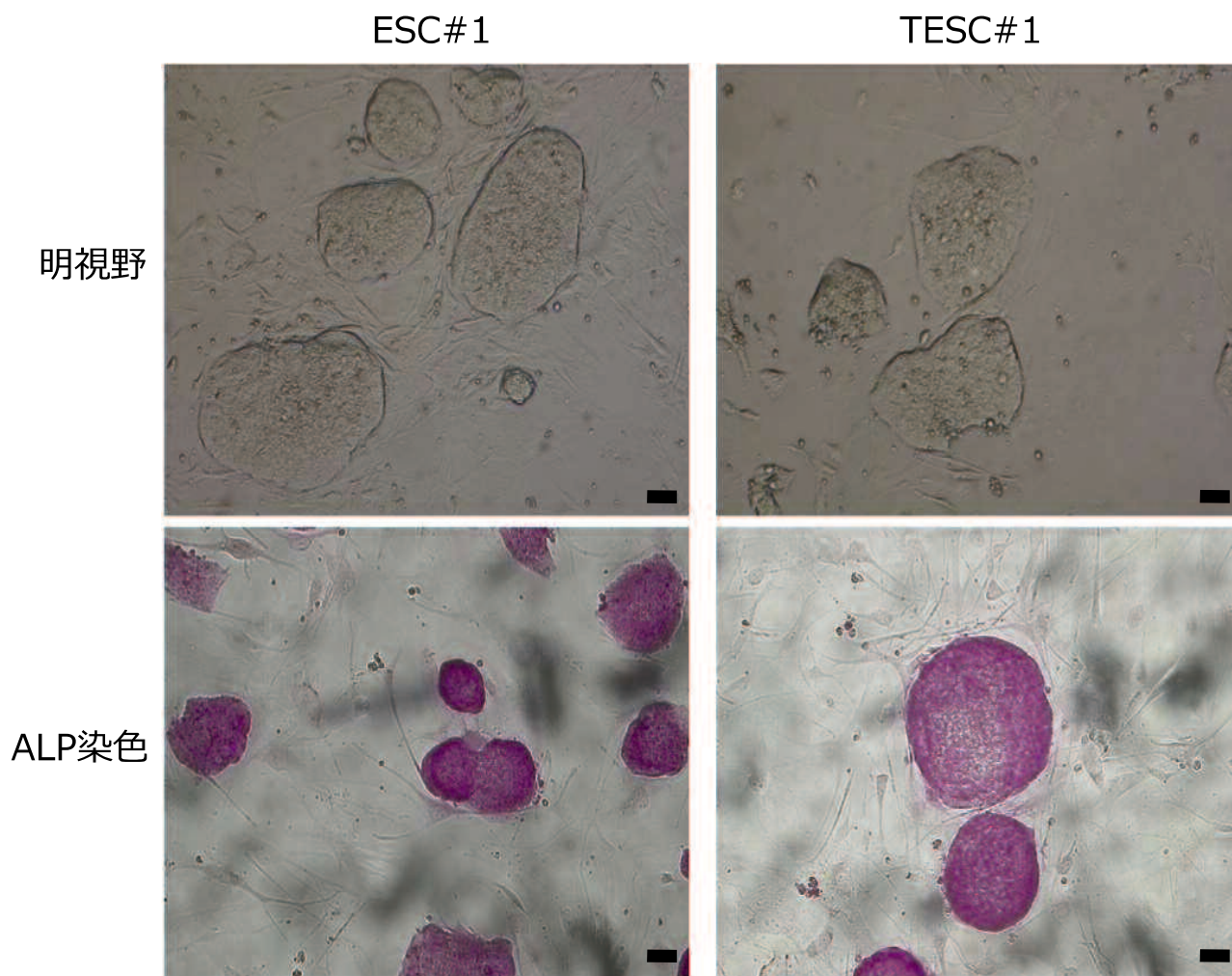


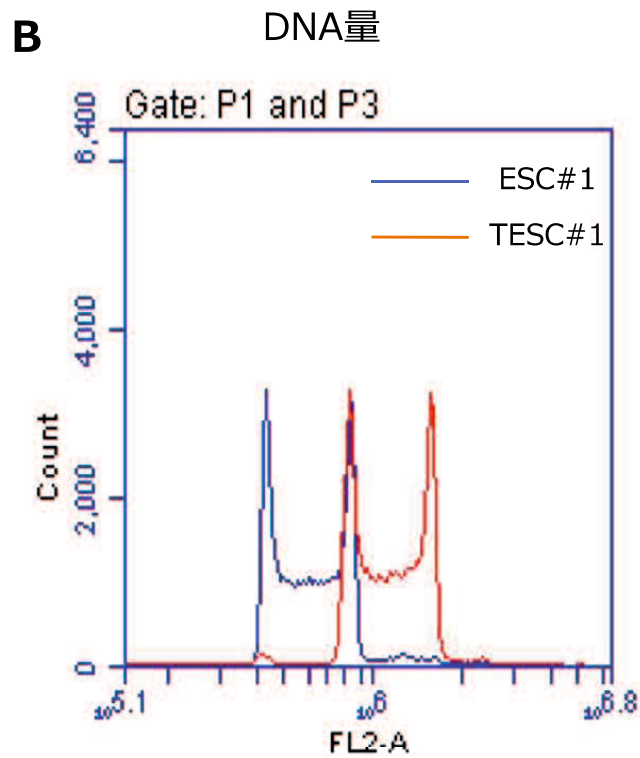
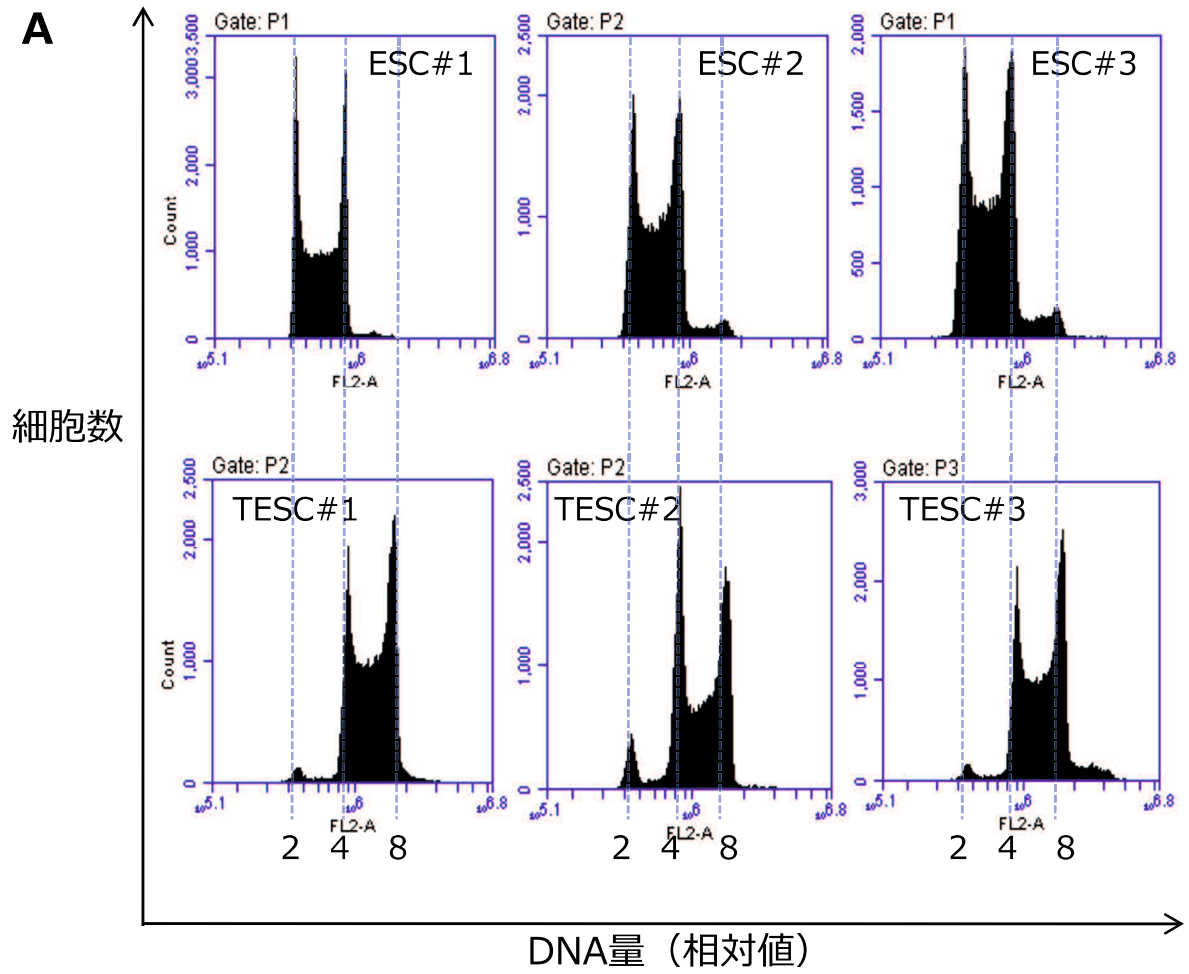
図2-1 マウス四倍体胚性幹細胞 (Tetraploid Embryonic Stem Cells : TESCOs) のコロニー形態

マウス2倍体胚性幹細胞 (ESC#1) とマウス4倍体胚性幹細胞 (TESC#1) のコロニー形態 (上段) およびALP染色像 (下段) を示す。TESCsのコロニー形態はESCsのものと類似し、胚性幹細胞の特徴の1つであるALPも陽性を示した。

Bar= 50 μ m

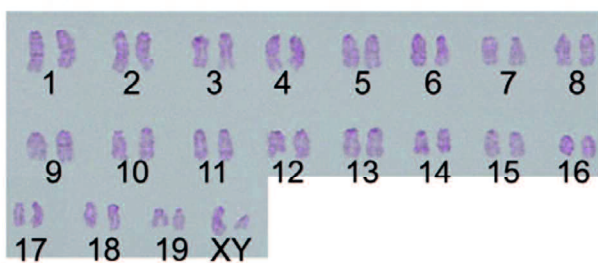
図2-2 TESCOsのDNA量と染色体数の解析

- (A) PI染色によるフローサイトメトリ解析によってESCsとTESCOsのDNA量を測定した。横軸の数値はDNA量の相対値を示す。
- (B) ESC#1とTESCO#1のDNA量を比較した。青線はESC#1のDNA量を示し、赤線はTESCO#1のDNA量を示す。
- (C) ギムザ染色によりESC#1とTESCO#1の染色体標本作製し、それぞれの染色体数を比較した。ESC#1の染色体数は $2n=40$ であるのに対して、TESCO#1の染色体数は $4n=80$ であった。



C

ESC#1



TESC#1

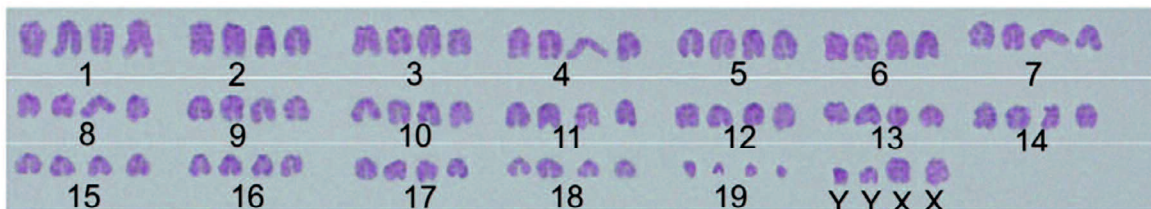
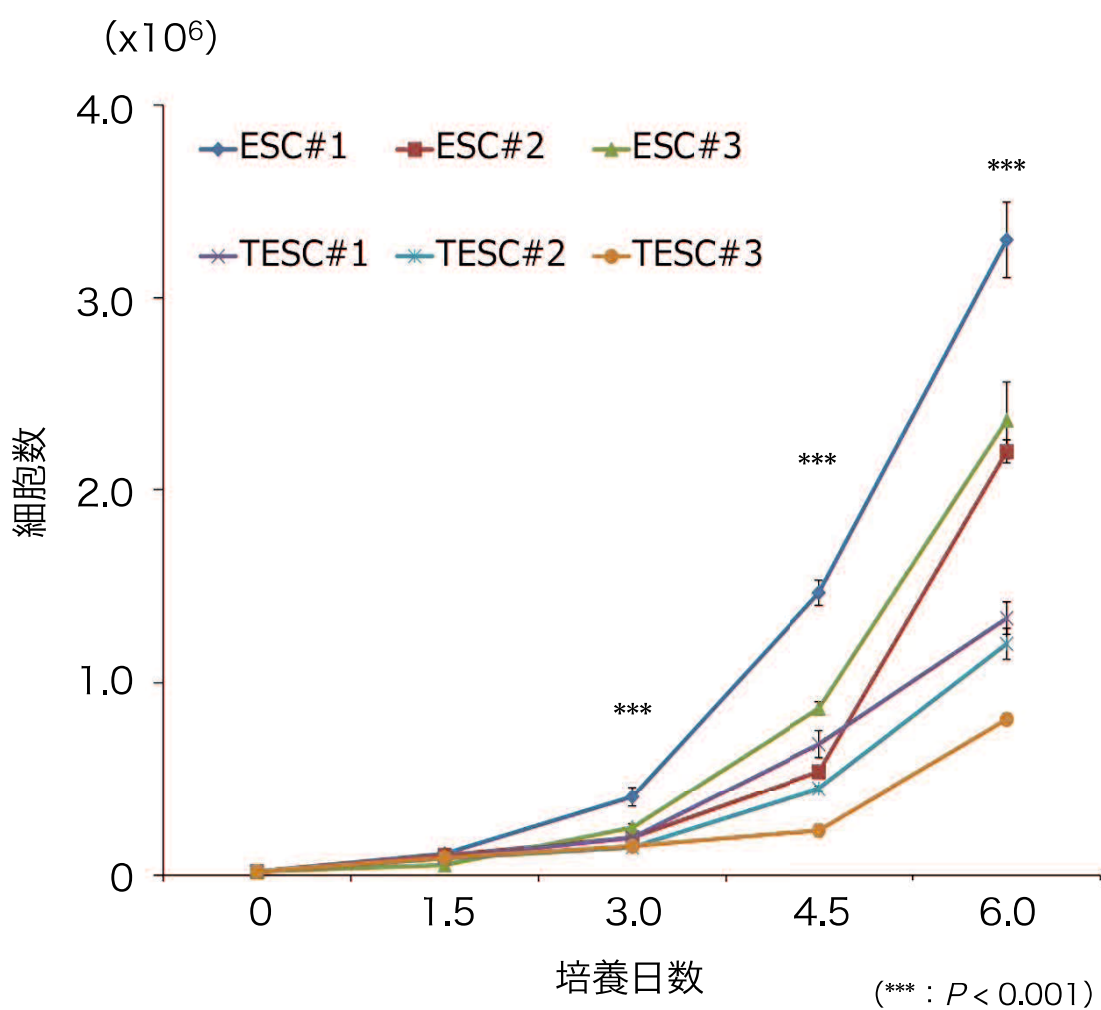
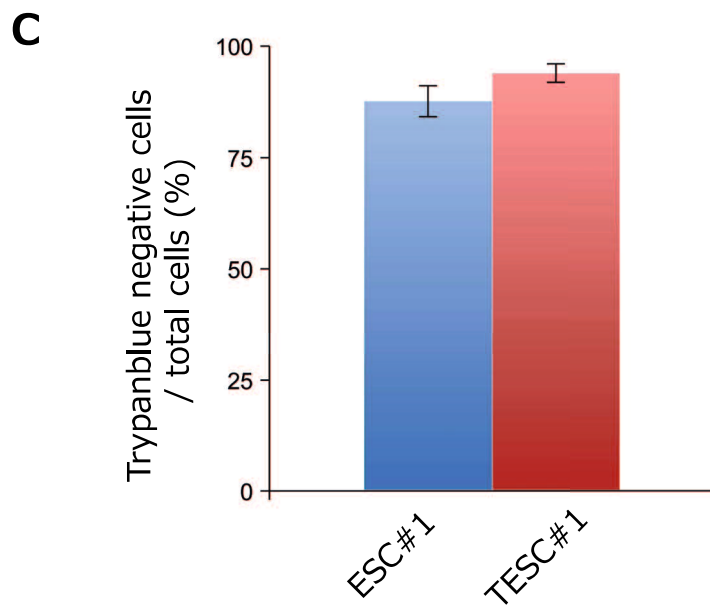
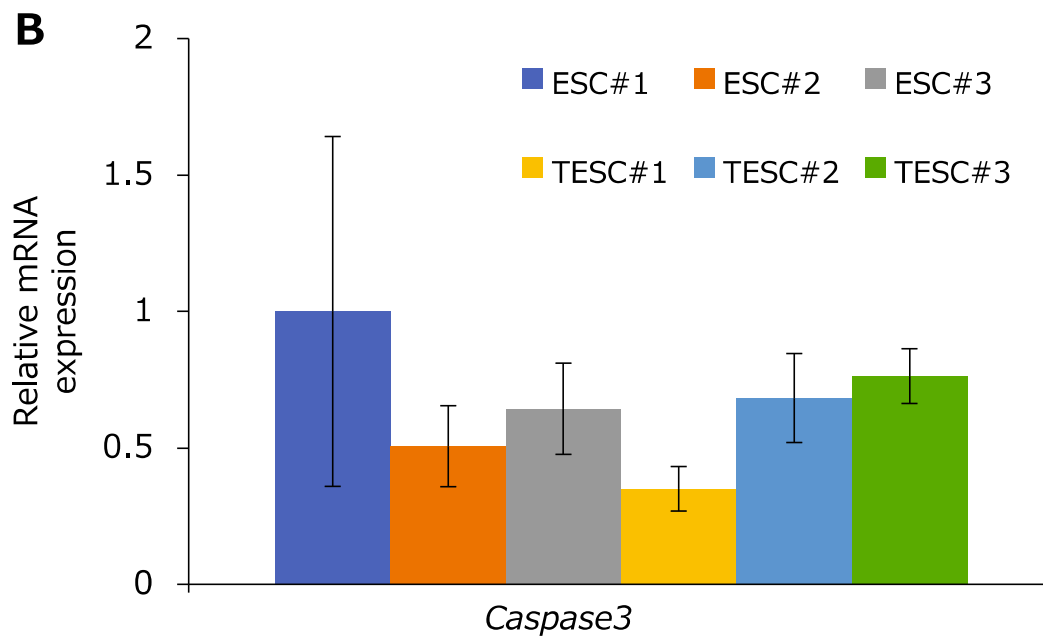


図2-3 胚性幹細胞の増殖速度の比較

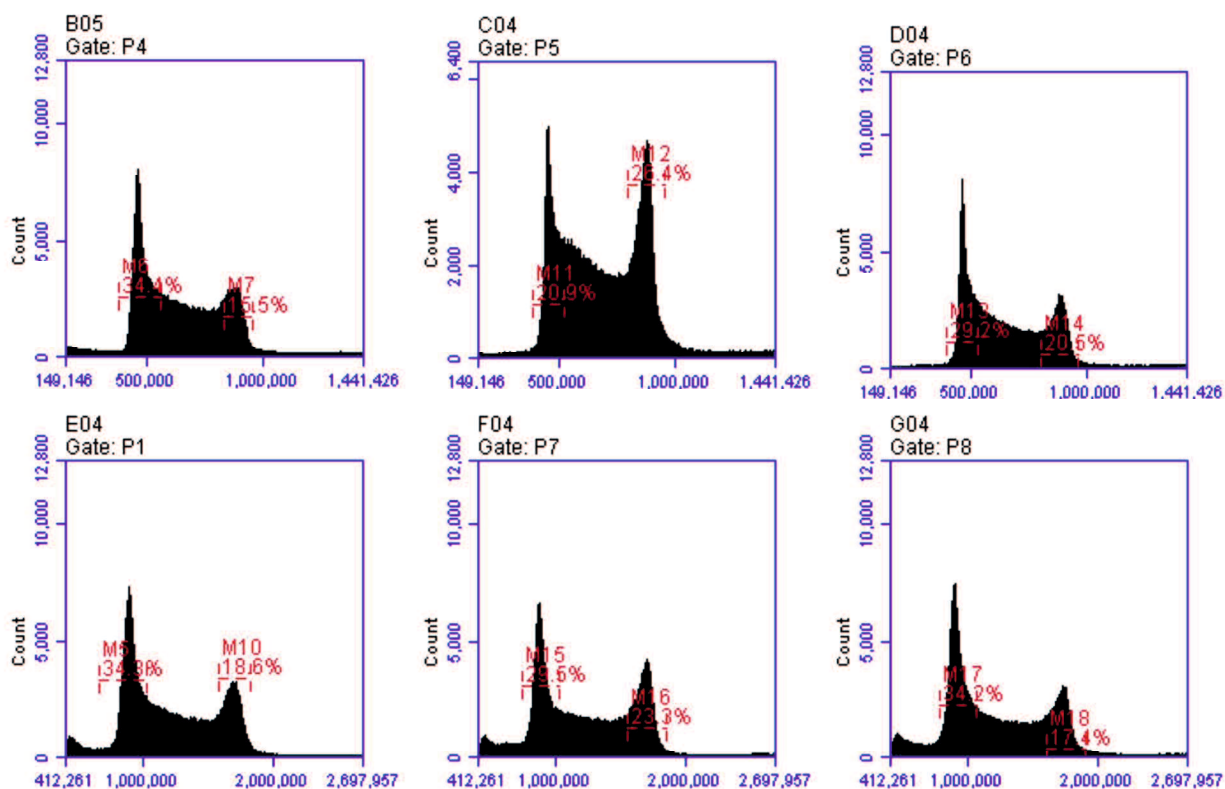
- (A) 2×10^4 細胞を播種し、培養1.5、3.0、4.5、6.0 日において細胞数を測定した。
- (B) ESCsおよびTESCsにおける*Caspase3*遺伝子発現量の比較を行った。
- (C) トリパンプルー排出試験によって細胞生存率を算出した。

A





A



B

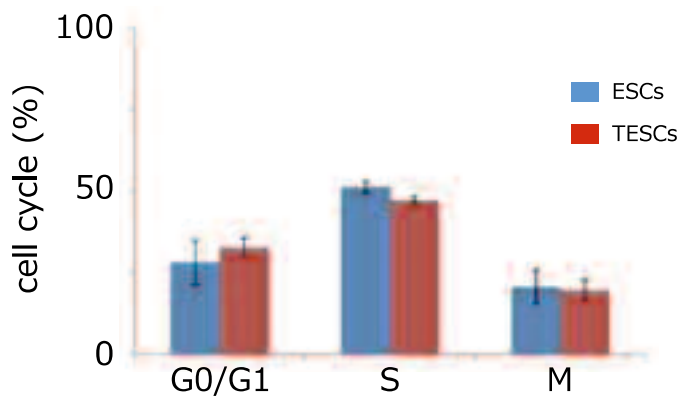


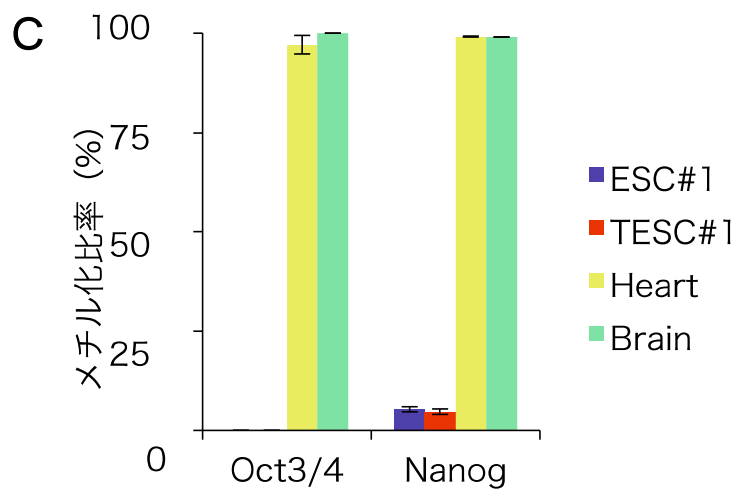
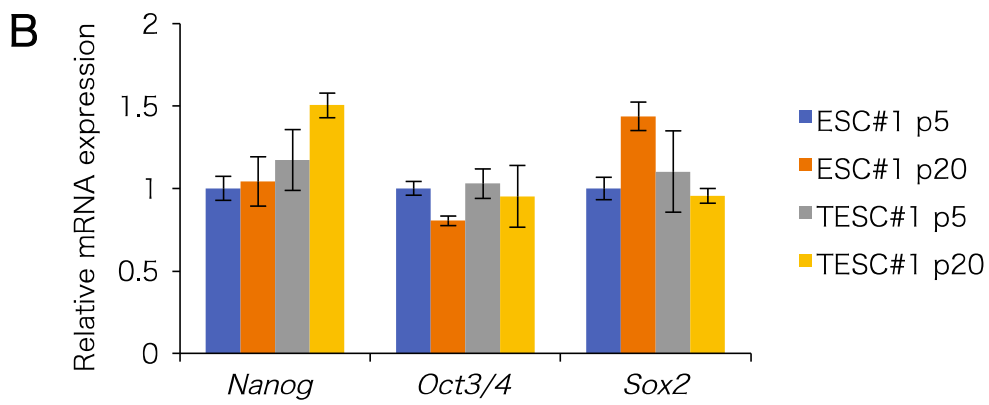
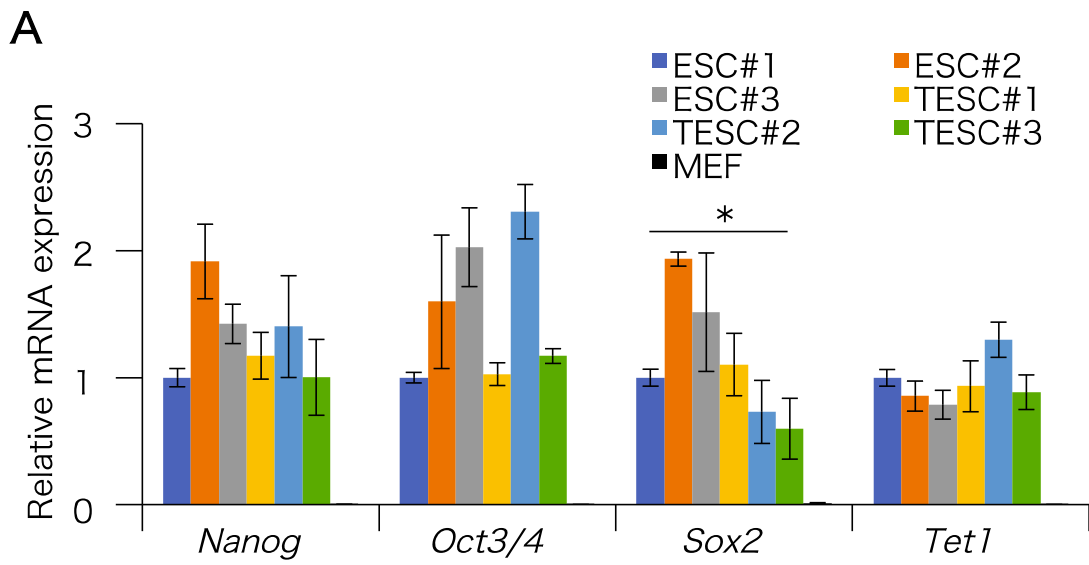
図2-3 胚性幹細胞の細胞周期解析

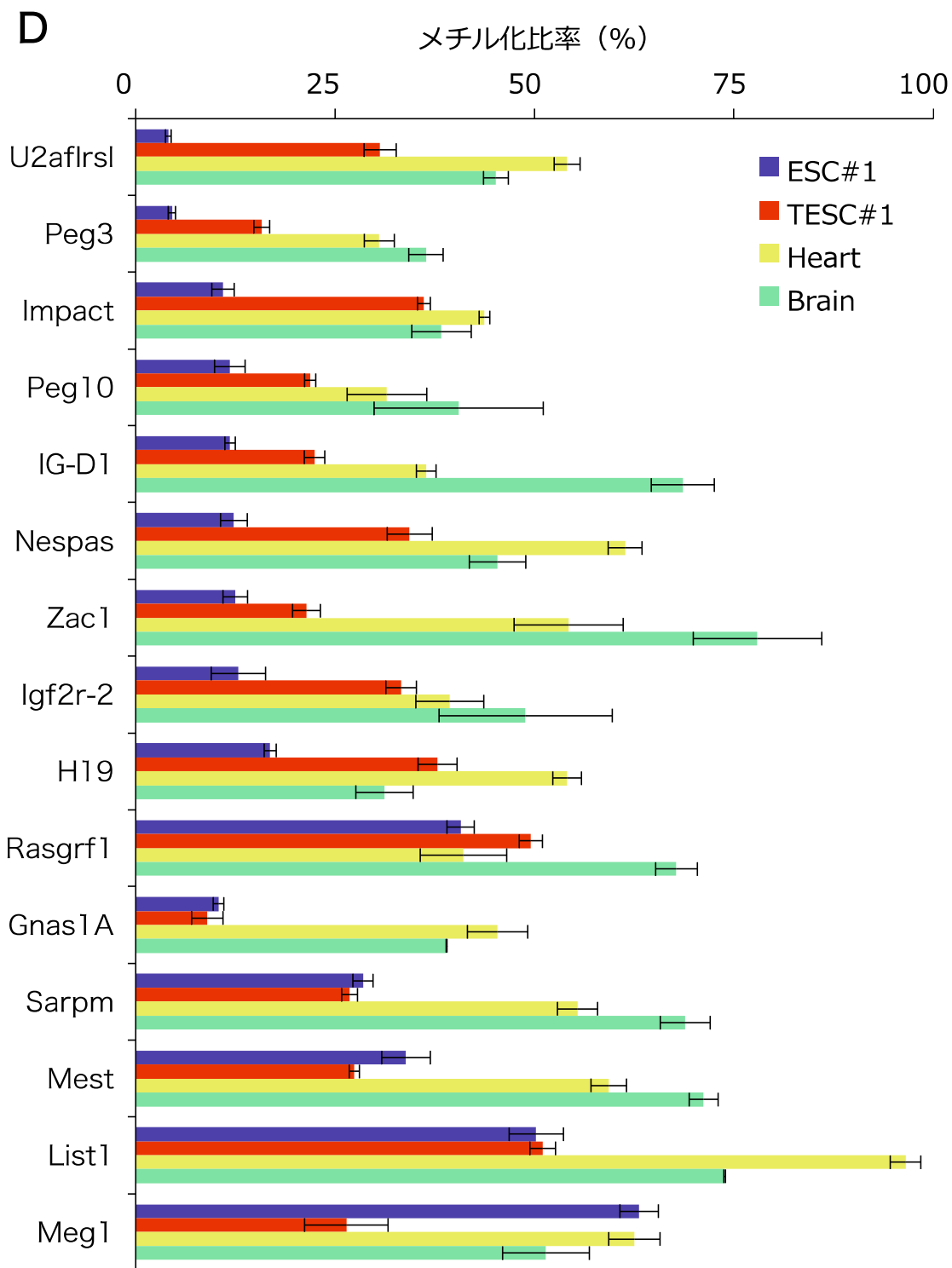
(A) PI染色によりそれぞれの細胞株における細胞周期を測定した。

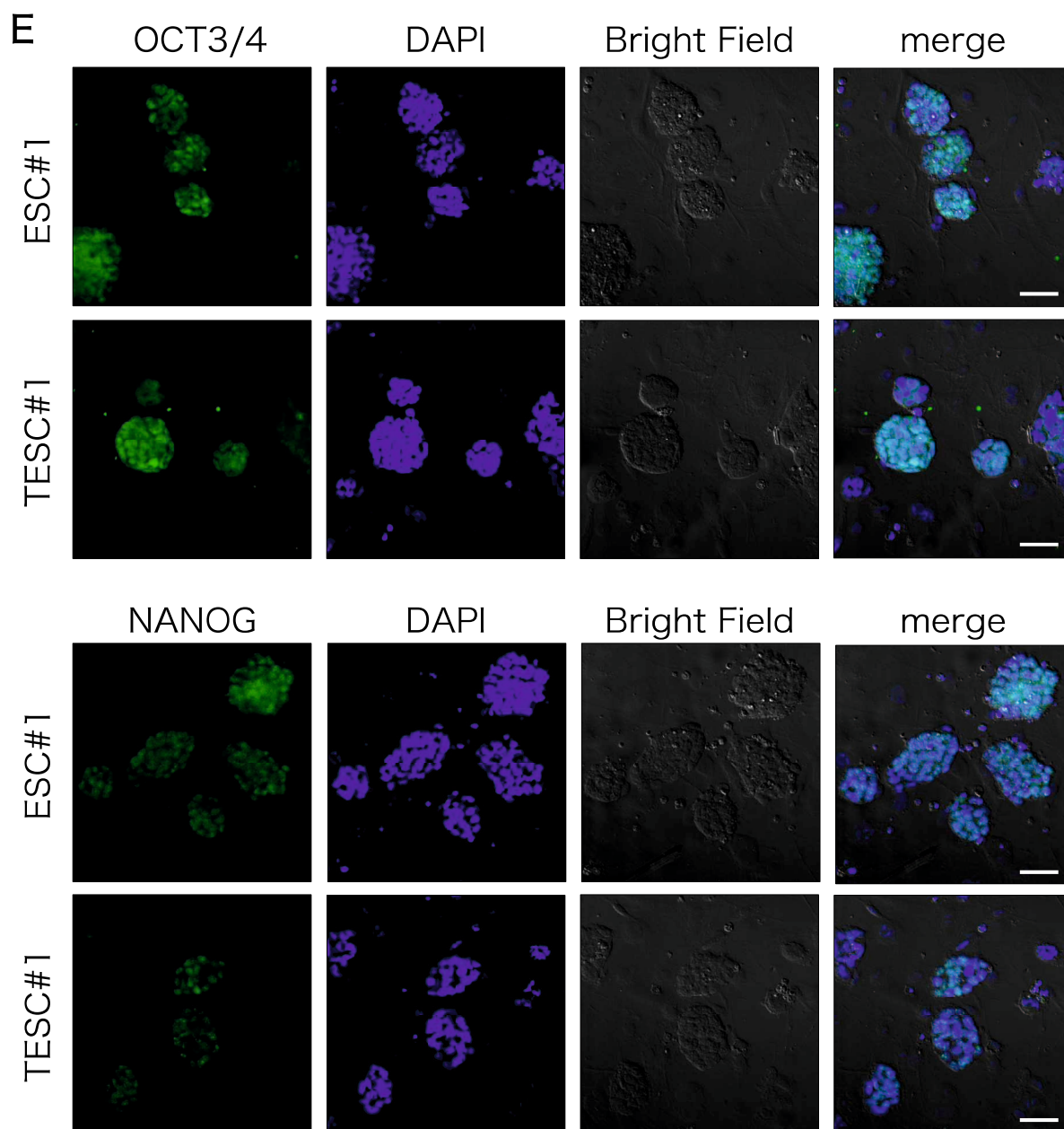
(B) ESCsおよびT ESCsにおける各細胞周期の割合の比較した。

図2-5 TESCの遺伝子発現解析

- (A) リアルタイムRT-PCRを用いてESCsおよびTESCsにおける胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現を比較した。
- (B) リアルタイムRT-PCRを用いて培養期間の違うESCsおよびTESCsにおける胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現を比較した。
- (C) COBRA法を用いてESCsおよびTESCsにおける胚性幹細胞マーカー遺伝子のプロモーター領域のメチル化比率を比較した。
- (D) COBRA法を用いてESCsおよびTESCsにおけるインプリンティング遺伝子のメチル化比率を比較した。
- (E) 蛍光免疫染色によりSCsおよびTESCsにおける胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現と局在の比較した。bar=50 μ m
- (F) 蛍光免疫染色によりTESCsにおける胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現を観察した。
bar=50 μ m







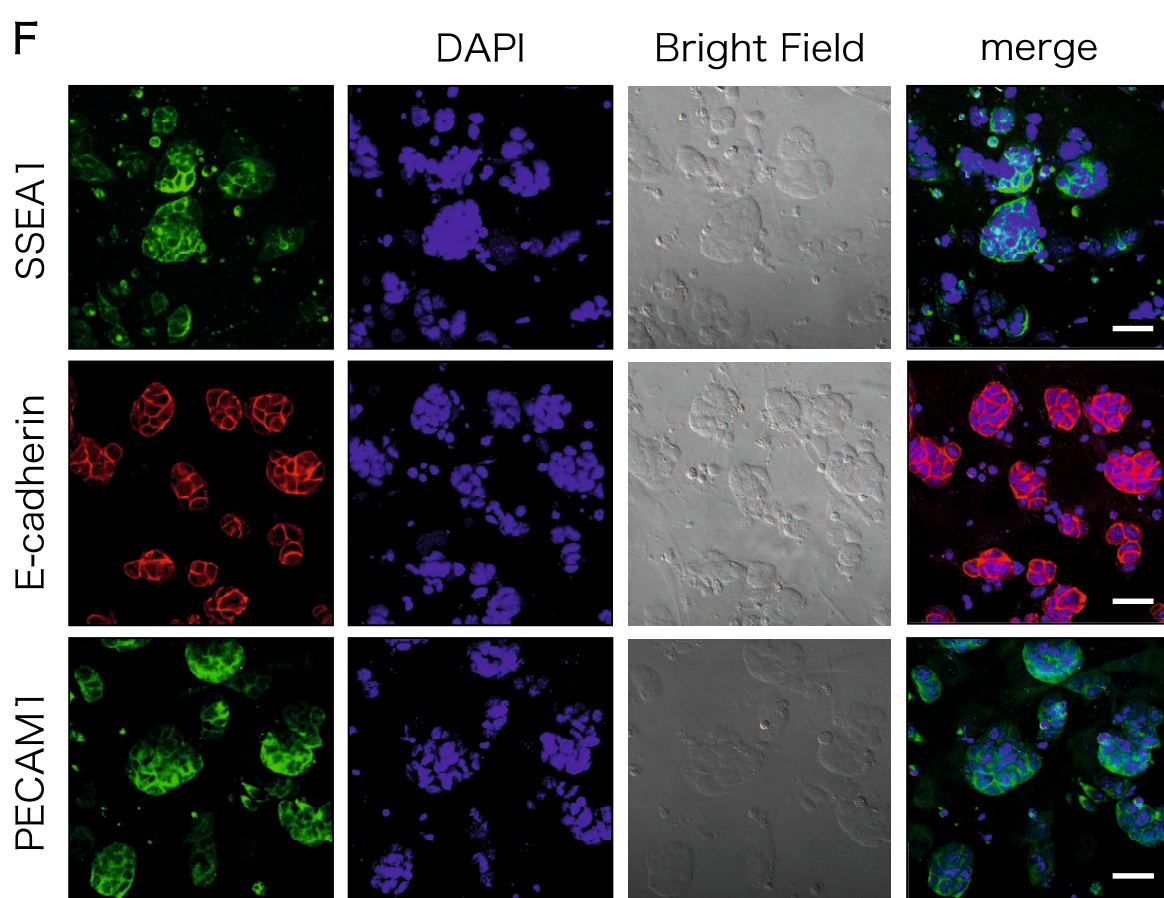


表 2-1 ESCsおよびTESCsの倍化時間

細胞株	倍化時間 (h)
ESC#1	18.23
ESC#2	21.46
ESC#3	20.55
TESC#1	22.37
TESC#2	24.02
TESC#3	26.96

表2-2 リアルタイムRT-PCR条件

表2-2A 反応液組成

組成	容量 (μ L)
Master Mix	5.0
10 μ M Primer F	0.2
10 μ M Primer R	0.2
cDNA	0.2
H ₂ O	4.4
total	10.0

表2-2B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	96 °C	15 分	1
	98 °C	30 秒	
②	60 °C	20 秒	45
	72 °C	20 秒	
③	95 °C	0 秒	1
	70 °C	15 秒	
	95 °C	0 秒	
④	40°C	30 秒	1
⑤	15 °C	∞	1

表2-4 リアルタイムRT-PCRに使用したプライマー

遺伝子		プライマー配列 (5'→ 3')
<i>Oct3/4</i>	F	GCATACGAGTTCTGCGGAGGGATG
	R	GGACTCCTCGGGAGTTGGTTCCAC
<i>Nanog</i>	F	CCTGCAGTTTTTTCATCCCGAGAAC
	R	GAGAACACAGTCCGCATCTTCTGC
<i>Sox2</i>	F	GCACATGAAGGAGCACCCGGATTA
	R	TGCATCATGCTGTAGCTGCCGTTG
<i>Tet1</i>	F	GCAAACGGTACGCGAGCTGAGAAG
	R	CATGGACATCGCTGTGGCTTTGAC
<i>Casp3</i>	F	TACGGAGCTGGACTGTGGCATTGA
	R	GATGAACCACGACCCGTCCTTTGA
<i>Gapdh</i>	F	GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R	CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG

表2-5 COBRA法に使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5'→ 3')
U2af1-rs1	F GTAGGAGTATTTTTATTGTAGGGGG R ACACAACCTAACCTATAACAATTACCC
Peg3	F TGTAGAGGATTTTGATAAGGAGGTG R CATACTACAAAACAACCAAATAACC
Impact	F TGTTTTGAAGGATGAGTATGAGAGTTTT R CCCTACTAAAACCTTACCTACCTCTAAC
Peg10-Sgce	F GGATTTTTTTATATAAGGTAAGTAGTT R CCACTAAAACTTAACAAAATTTAC
Dlk1-Gtl2 (IG-DMR)	F TGTGTTGTGGATTTAGGTTGTAGTTTA R TAATCCCATTCCAATCTATAAAAATA
Nespas	F TGAATTTTGGTTTAAAGTTTGGTTAAT R AATAATCCATAAAAATCCCTAACCTTC
Zac1/Plagl1	F TGGTTTTTGGTTTATAAAGTATTTTTT R ATCCCAACCCAACTAAATAACAA
Igf2r DMR2	F TGGAGTTGTGTTAAAATTTTTTGAA R TCAACACTAAAATACCCCACTACTC
H19	F TTTATGGTAAAGTTGGGGTTTATTT R CCACACTAACTAATTTTAAAATTCAATAAC
Rasgrf1	F AGTGTATTGTGTTTTTATTGGTTATTTTAAAGGATAGAAT R AAACCATCACAAAAAACCACACAACCTC
Gnas 1A	F TGGTTAAATTTATTTAAATAAGGTTTT R ACTAAAATCTAAAACCCCAATCTC
Snrpn DMR1	F TTTTTATTTTTATTAATTTTTTTTGATAT R CCCAACCCCAATCTATACTAATA
Peg1/Mest	F TGGTTTTTTTAATTTAGTTATAGGTTAGTT R AAATTTTAAAATCAAATACAAATTCATAC
Lit1/Kcnq1ot1 (KvDMR1)	F ATAAACAACACCCTCCTTTCTACATA R GAATGTTTAAATGGGGAAATGAGTTGT
Meg1/Grb10	F TGTAATGGTTTAAAGTGGTGGGTAGT R CCATATCTACTTACAACCCAAACTA
Oct3/4 DMR	F GCATACGAGTTCTGCGGAGGGATG R GGAATCCTCGGGAGTTGGTTCCAC
Nanog DMR	F GCACATGAAGGAGCACCCGGATTA R TGCATCATGCTGTAGCTGCCGTTG

第3章

倍数性の変動によるマウス胚性幹細胞の 細胞生物学的影響の解析

緒言

哺乳類における4倍体を含めた多倍体の体細胞は、生理的にさまざまな組織内に存在することが知られている (Morillo *et al.*, 2012 ; López-Sánchez *et al.*, 2013)。例えば肝臓においては多くの多倍体細胞が存在し、遺伝的な多様性を持つことによって損傷などをはじめとした環境変化への適応度を高め (Duncan *et al.*, 2010)、さらには肝臓において肝細胞と造血幹細胞が融合した細胞が組織の一部に存在する報告もある (Vassilopoulos *et al.*, 2003)。このように生体内においてはさまざまな機序により体細胞の多倍体化が起こっていることが示唆される。また、一部の多倍体細胞についてはその出現する機構についての解析は行われている (Tanaka *et al.*, 2015) が、多倍体細胞の数はきわめて少数であり、生体内において追跡および機能の解析は困難であるために、その生物学的特性については未だ明らかでない。

また、ヒトの腫瘍組織中における細胞の37 %が倍数性の変動した多倍体細胞であると報告された (Zack *et al.*, 2013)。腫瘍組織中における多倍体細胞の出現は、*p53*遺伝子の変異や異常発現と関連する (Davaadelger *et al.*, 2014) とされながらも、染色体の欠失や増幅などを伴う場合が多いため、クローナルな細胞集団ではなく、個別の染色体型ごとでの解析が困難であることが予想される。腫瘍細胞に含まれる多倍体

細胞からクローン化を行い、均質な細胞の分離に成功した報告もあるが、染色体の一部が欠失していた (Gundimeda *et al.*, 2014)。以上のことから倍数性の変動による細胞生物学的影響の解析にあたり、腫瘍細胞を用いることでは細胞集団の均質性に問題があると考えた。

そこで本章においては、前章までで樹立した4倍体胚性幹細胞 (TESCs) の細胞集団の均質性とゲノムの倍数性の安定性に着目し、倍数性の変動が与える影響について1細胞レベルで解析することを目的とした。

材料と方法

1. 培地および試薬の作成

PBS 溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

PET (PBS-EDTA-Trypsin) 溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

DMEM 培養液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

ES 培養液

第2章材料と方法に記載した方法に従った。

0.2 %ゼラチン溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

カルノア固定液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

2. 胚性幹細胞の培養

フィーダー細胞の樹立と培養

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

胚性幹細胞の培養

第2章材料と方法に記載した方法に従った。

3. 細胞の大きさの解析

塗抹標本の作成と解析

胚性幹細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で5分間遠心し上清を捨て、カルノア固定液を加えて固定した。冷 50 % エタノールに浸漬したスライドガラス上に展開・風乾し、塗抹標本とした。

ギムザ染色およびヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を定法に従って行った。

染色した細胞は ImageJ ソフトウェア (NIH) を用いて染色された細胞の面積を測定し、細胞の大きさの相対値として用いた。

フローサイトメーターによる細胞のサイズ解析

胚性幹細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で5分間遠心し上清を捨て、PBS 溶液 1.0 mL に懸濁した。BD Accuri C6 Flow Cytometer (日本 BD) により前方散乱光 (FSC : Forward Scatter) を細胞の直径の相対値として解析に用いた。

細胞の体積比の算出

細胞を球体とみため、フローサイトメトリーおよび塗抹標本において計測した細胞の直径比および面積比より細胞の体積比を算出した。細胞の体積を V 、面積を S 、半

径を r とし、以下に数式を示す。球体の体積および面積と半径の関係は以下の式で与えられる。

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3$$

$$S = 4\pi r^2$$

以上の式より、球体の体積と面積の関係は、以下の式で示すことができる。

$$V = \frac{S\sqrt{S}}{6\sqrt{\pi}}$$

以上の式より体積比を面積および半径を用いて表すと、以下の式で示すことができる。

$$V_1/V_2 = \frac{\frac{4}{3}\pi r_1^3}{\frac{4}{3}\pi r_2^3} = (r_1/r_2)^3$$

$$V_1/V_2 = \frac{\frac{S_1\sqrt{S_1}}{6\sqrt{\pi}}}{\frac{S_2\sqrt{S_2}}{6\sqrt{\pi}}} = (S_1/S_2)^{\frac{3}{2}}$$

以上の式を用いて、細胞の体積比の解析を行った。

4. 遺伝子発現解析

total RNA の抽出

total RNA の抽出は、ReliaPrep RNA Cell MiniPrep System (Promega) を用いて行った。 2.0×10^5 細胞の胚性幹細胞を調整し、その細胞溶解液に 1.2×10^8 コピ

一の外部標準 RNA (External Standard Kit (λ polyA) for qPCR : Takara) を加え、以降は付属プロトコルに従って行った。抽出した total RNA は、NanoDrop2000 (Thermofisher Scientific) により濃度を測定し、-80 °C で保存した。

リアルタイム RT-PCR

第1章材料と方法に記載した方法で逆転写反応を行った。得られた cDNA は-20 °C で保存した。

Applied Biosystems StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) および Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて表 3-3A および表 3-3B の条件でリアルタイム RT-PCR を行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法で解析を行った。標的遺伝子の相対発現量には、外部標準 λ polyA を用いた。プライマー配列は表 3-4 に示した。

5. 統計学的処理

Student の t 検定により ESCs と TESCs の結果の有意差の検定を行った。 $P < 0.05$

を統計的に有意差があると判断した。

結果

1. 倍数性の変動が細胞のサイズに与える影響

倍数性の変動により細胞核の大きさは約 2 倍となることが明らかとなったが、細胞自体の大きさに与える影響を調べるため、細胞塗抹標本およびフローサイトメトリーにより ESCs および TESC の細胞のサイズの解析を行った。

まず、細胞塗抹標本を作成し、細胞の染色域について比較したところ、TESC#1 の染色域は ESC#1 の染色域と比較して、大きかった (図 3-1A)。ImageJ ソフトウェアにより染色域の面積を測定したところ、TESC#1 の染色域は ESC#1 と比較して有意に大きく、またそれぞれの平均値は ESC#1 が $352.6 \mu\text{m}^2$ および TESC#1 が $613.2 \mu\text{m}^2$ であり、その比率は 1.74 であった (図 3-1B)。

また、フローサイトメトリーにより前方散乱光 (FSC : Forward Scatter) を細胞の直径の相対値として測定したところ、TESC#1 の細胞の直径は ESC#1 の細胞の直径と比較して大きく、それぞれの FSC 値は ESC#1 が 4.98×10^6 および TESC が 6.78×10^6 であり、その比率は 1.36 であった (図 3-2)。

以上の細胞の直径の相対値および面積の測定値それぞれから、ESC#1 と TESC#1 の細胞の体積比を算出したところ、直径比 (TESC#1/ ESC#1) の 1.36 および面積比

(TESC#1/ ESC#1) の 1.74 から体積比はそれぞれ 2.53 および 2.29 と算出された (表 3-1)。

3. 倍数性の変動が 1 細胞あたりの遺伝子発現量に与える影響

第 2 章において標的遺伝子/ 内在性コントロール遺伝子 (*Gapdh*) により遺伝子発現解析を行ったが、本章では細胞 1 個あたりの遺伝子発現量を比較することを目的とし、 2.0×10^5 細胞の細胞溶解液に外部標準 RNA を添加し、リアルタイム RT-PCR 法により標的遺伝子を外部標準 RNA で補正することで 1 細胞あたりの遺伝子発現量の定量を試みた (図 3-3A)。

本章では内在性コントロール遺伝子の *Gapdh* および *Actb* (β -actin)、胚性幹細胞マーカー遺伝子の *Nanog* および *Oct3/4* ならびに細胞周期関連遺伝子の *Cdk1* および *Ccnb1* (Cyclin B1) について解析を行った。その結果、細胞株ごとのばらつきは認められたものの、ESCs と比較して TESC 1 細胞あたりの遺伝子発現量は有意に高いことがわかった (図 3-3B, C, D)。また、ESCs と比較して TESC の 1 細胞あたりの遺伝子発現量の平均値を算出した結果、2.15 - 2.45 倍であった (表 3-2)。

考察

本章では、倍数性の変動が1細胞レベルにおいて与える影響を調べるために、4倍体胚性幹細胞（TESCs）1細胞の大きさおよび1細胞あたりの遺伝子発現量に着目して解析を行った。その結果、倍数性の変動によりTESCsは1細胞の大きさは大きいことが明らかとなったが、同時に遺伝子発現量も比較的高いことから、倍数性の変動にかかわらず細胞の恒常性を維持するメカニズムの存在が示唆された。

酵母を用いた実験から、ゲノムの倍数性の変動は生物の環境適応に有利にはたらくことがわかっている（Selmecki *et al.*, 2015）。また、多細胞生物においてもマウスにおける肝細胞では倍数性の変動と生体内環境の適応度は密接に関連する（Duncan *et al.*, 2010）。しかしながら、生体内に存在する多倍体細胞については少数であるため解析方法が限られている。また、腫瘍組織中に存在する多倍体細胞は、染色体の欠失や増幅、遺伝的多様性が存在するため（Davaadelger *et al.*, 2014 ; Gundimedda *et al.*, 2014）、厳密な解析が困難であることが予想される。そこで本章では、本研究で樹立したTESCsの均質性とゲノムの安定性に着目し、倍数性の変動が細胞自体に与える生物学的影響について検討するために、細胞のサイズおよび1細胞あたりの遺伝子発現量の解析を行った。

細胞のサイズの解析から直径比 (TESC#1/ ESC#1) が 1.36 倍、面積比 (TESC#1/ ESC#1) が 1.74 倍となることが明らかとなった。すなわち次式で表すことができる。

$$r_{TESC\#1}/r_{ESC\#1} = 1.36$$

$$S_{TESC\#1}/S_{ESC\#1} = 1.74$$

体積比は直径比の 3 乗および面積比の 3/2 乗に相当するため、それぞれ以下の式で求めることができる。

$$V_{TESC\#1}/V_{ESC\#1} = (1.36)^3 = 2.53$$

$$V_{TESC\#1}/V_{ESC\#1} = (1.74)^{\frac{3}{2}} = 2.29$$

両値間に差があるのはフローサイトメトリー解析において細胞断片などを除くためにゲーティングを行う必要があるが、小さい細胞の一部が除外された可能性が考えられる。これらのデータから、ゲノム量が 2 倍となっても細胞全体としては厳密に 2 倍ではなく、およそ 2.3 - 2.5 倍となることが明らかとなった。厳密に 2 倍とならない原因については不明であるため、透過型電子顕微鏡を用いた超微細構造の解析が有用であると考えられる。

リアルタイム RT-PCR 解析では 1 細胞あたりの遺伝子発現量を定量するために既報に従い、外部標準 RNA を用いた解析を行った (Gilsbach *et al.*, 2006)。まず、1 細胞あたりの内在性コントロール遺伝子発現を比較するにあたり、マウス胚や培養細胞で発現が安定しており、一般的に用いられている (Mamo *et al.*, 2007 ; Smits *et al.*, 2009 ;

Lin *et al.*, 2013) ことから *Gapdh* および *Actb* を選択した。さらに多能性マーカー遺伝子のうち、上流に存在しマスター遺伝子ともされる *Nanog* 遺伝子および *Oct3/4* 遺伝子 (Mitsui *et al.*, 2003; Niwa *et al.*, 2000) について解析を行った。また、Kawaguchi らの 2 倍体と 4 倍体の胚盤胞期胚を比較した結果から 4 倍体胚において細胞周期関連因子の発現が低下していたという報告 (Kawaguchi *et al.*, 2009) から、細胞周期関連遺伝子の *Cdk1* および *Ccnb1* について解析を行った。その結果、内在性コントロール遺伝子および多能性マーカー遺伝子、細胞周期関連遺伝子で TSCs 1 細胞あたりの発現量が高いことがわかり、その比率は約 2.2 - 2.5 倍であった。

以上、TSCs および ESCs を用いた細胞の大きさと 1 細胞あたりの遺伝子発現量の結果から、倍数性の変動にかかわらず、1 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った。以上のことから、哺乳類細胞において、倍数性の変動により細胞核および細胞質の大きさが変動しても、細胞内の RNA やタンパクなどの濃度を一定に保つメカニズムの存在が示唆された (Imai *et al.*, 2016)。また、細胞の大きさの制御に関して、哺乳類細胞はラパマイシンの暴露により mTOR 活性が阻害され、細胞の大きさが縮小することが知られている (Finger *et al.*, 2002)。また、遺伝学的なスクリーニングにより細胞内の mRNA の翻訳やミトコンドリアにおける代謝を活性化する

遺伝子として、*Largen* 遺伝子が同定されている (Yamamoto *et al.*, 2014)。これらの細胞ではゲノムの倍数性は変動しないものの、細胞内における mRNA 量が増加する点と 1 細胞あたりのサイズが増大する点において、本研究により示唆された細胞内の恒常性を維持する機構の存在を支持すると考えられる。

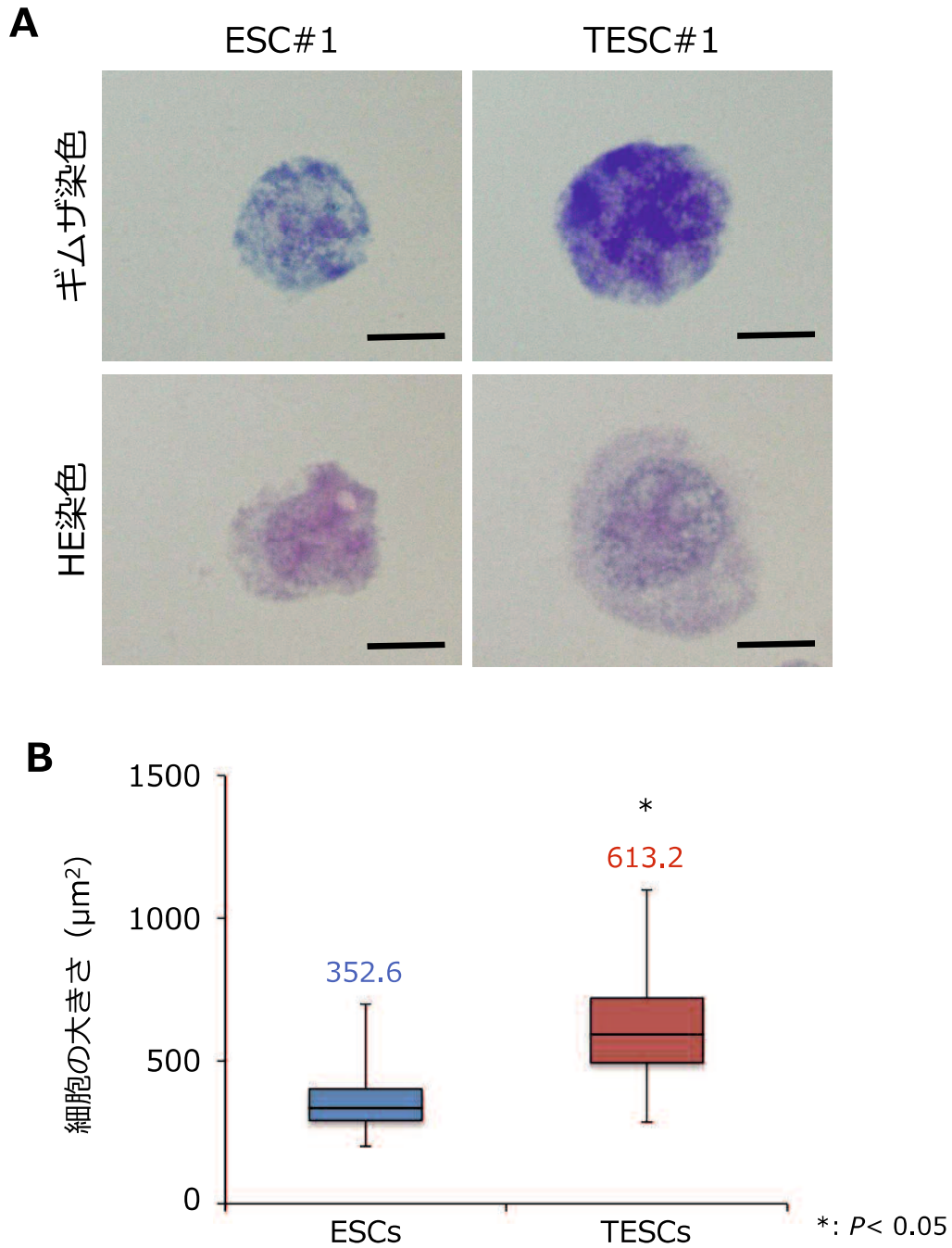


図3-1 細胞塗抹標本による1細胞あたりの大きさの解析

(A) ESCsおよびTESCsの細胞塗抹標本をギムザ染色（上段）およびHE染色により染色し、観察した。bar= 10 μm

(B) ギムザ染色による細胞塗抹標本の染色域の面積を測定した。面積の平均値をそれぞれ示した。

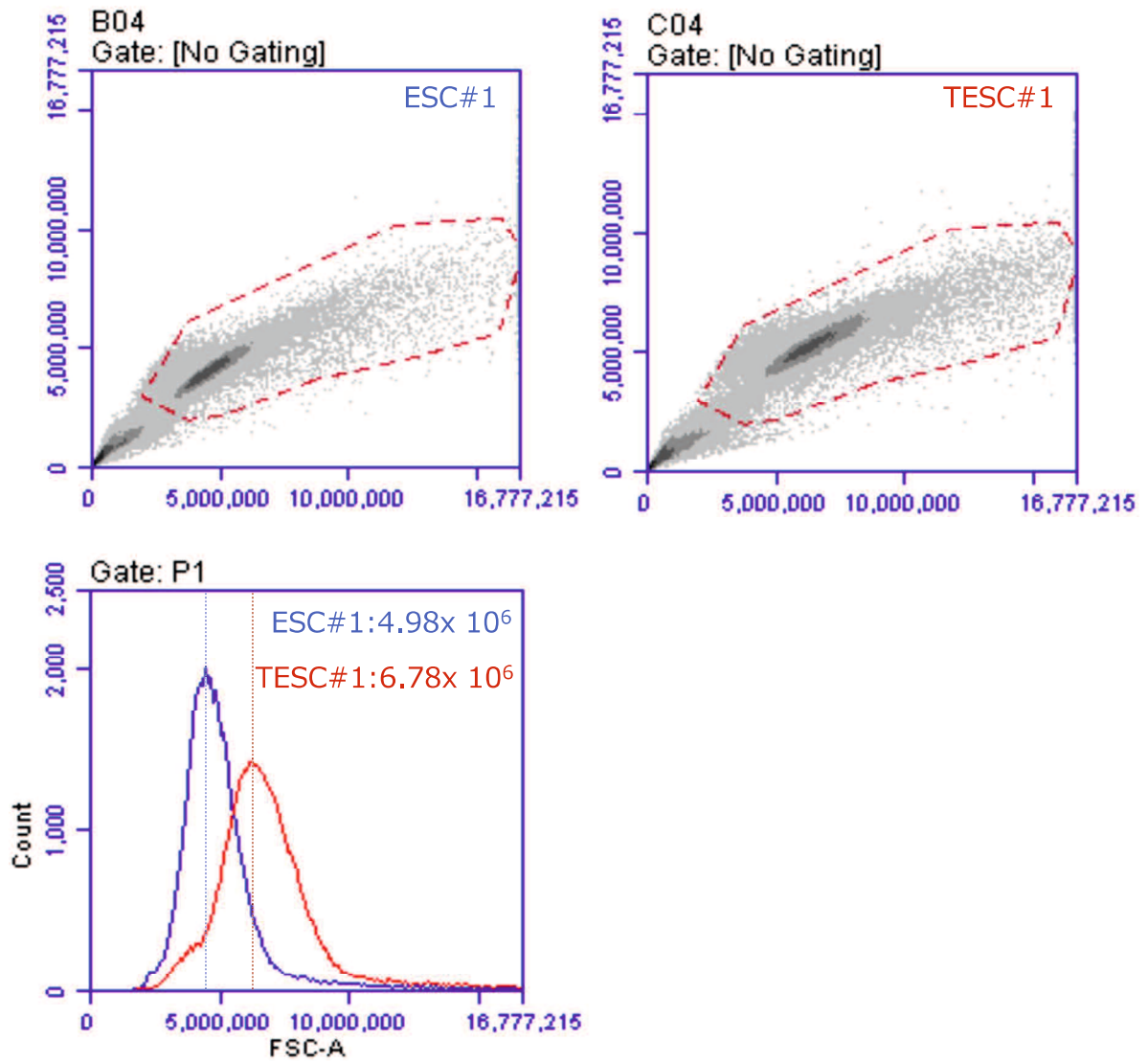
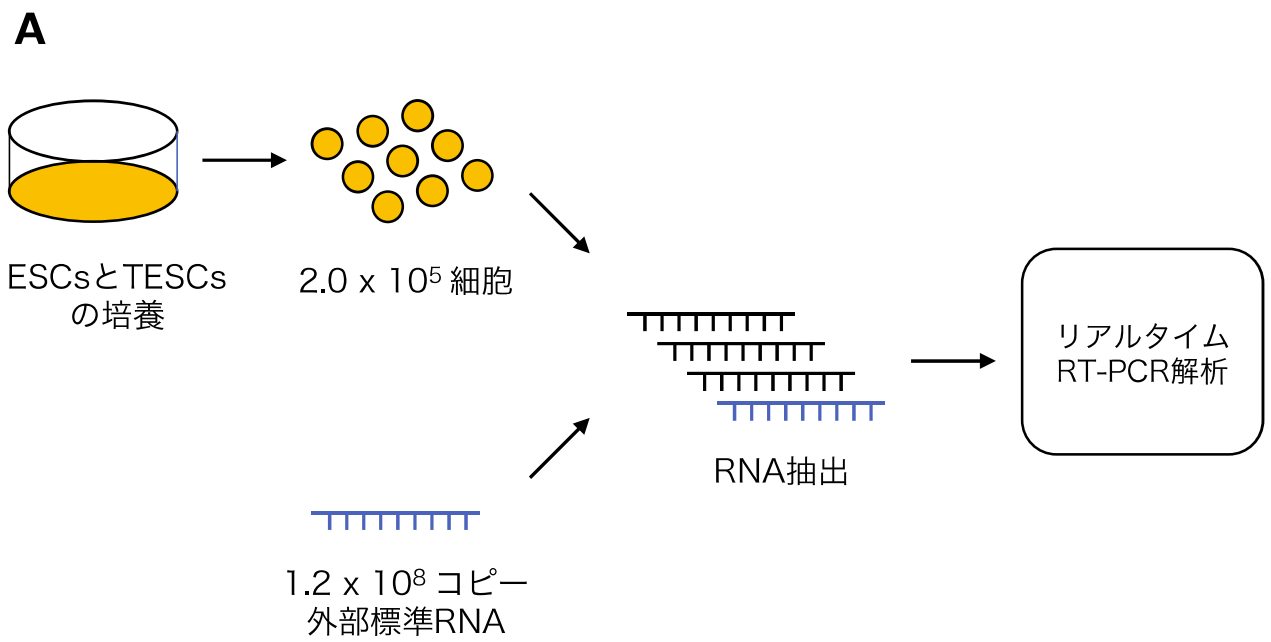


図3-2 フローサイトメトリーによる1細胞あたりの大きさの解析

フローサイトメトリーにより前方散乱光（FSC）を細胞の直径の指標とした。青線をESCsおよび赤線をTESCsとし、それぞれのFSC値を示した。

図3-3 リアルタイムRT-PCRによる1細胞あたりの遺伝子発現量の定量

- (A) 細胞あたりの遺伝子発現量定量のための実験概略図を示した。
- (B) ESCsおよびTESCsにおける内在性コントロール遺伝子の*Gapdh*および*Actb*について細胞あたりの発現量を比較した。
- (C) ESCsおよびTESCsにおける幹細胞マーカー遺伝子の*Nanog*および*Oct3/4*について細胞あたりの発現量を比較した。
- (D) ESCsおよびTESCsにおける細胞周期関連遺伝子の*Cdk1*および*Ccnb1*について細胞あたりの発現量を比較した。



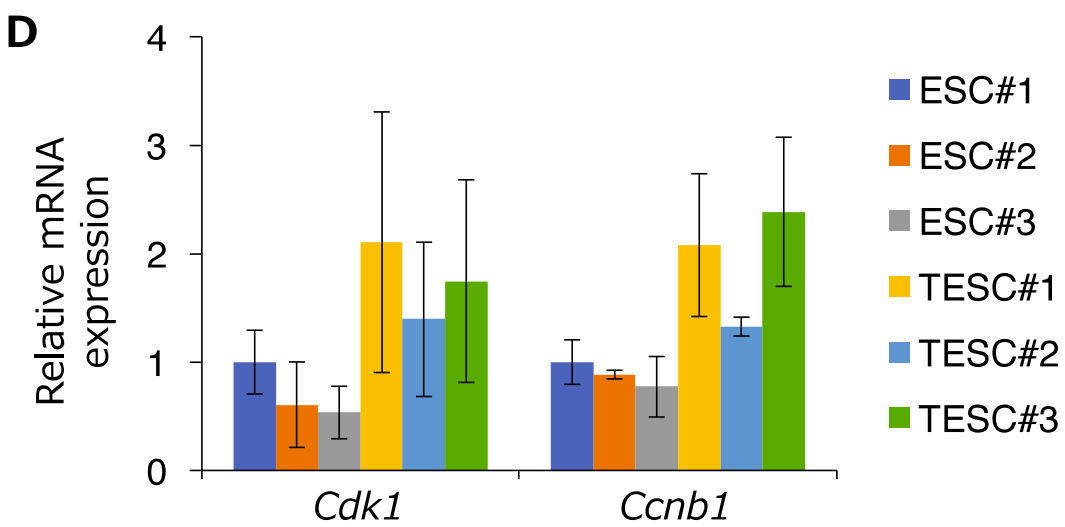
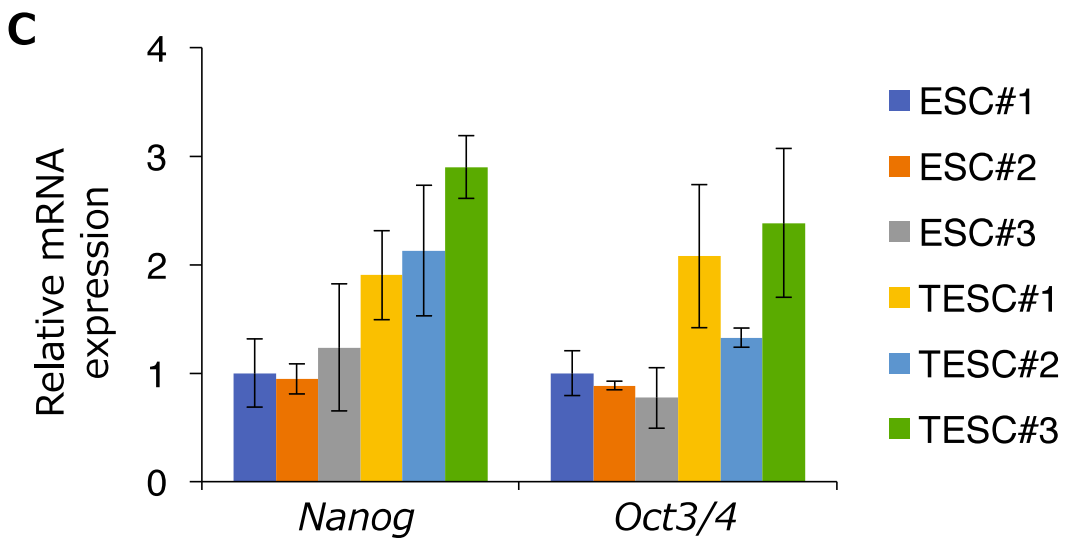
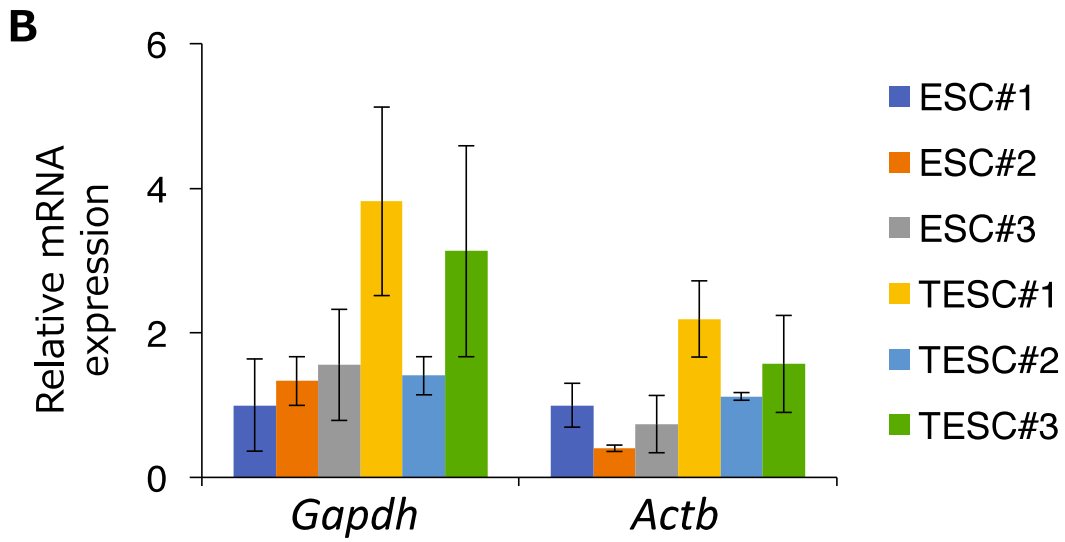


表3-1 マウス胚性幹細胞の体積の算出

	TESCs/ESCs		
	直径比	面積比	体積比
フローサイトメトリー	1.36	N.D.	2.53
細胞塗抹標本	N.D.	1.74	2.29

表3-2 細胞あたりの遺伝子発現量の比較

遺伝子	発現比率 (TESCs/ ESCs)
<i>Gapdh</i>	2.15
<i>Actb</i>	2.27
<i>Nanog</i>	2.18
<i>Oct3/4</i>	2.18
<i>Cdk1</i>	2.45
<i>Ccnb1</i>	2.18

表3-3 リアルタイムRT-PCR条件

表3-3A 反応液組成

組成	容量 (μ L)
Master Mix	5.0
10 μ M Primer F	0.2
10 μ M Primer R	0.2
cDNA	0.2
H ₂ O	4.4
total	10.0

表3-3B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	96 °C	15 分	1
	98 °C	30 秒	
②	60 °C	20 秒	45
	72 °C	20 秒	
③	95 °C	0 秒	1
	70 °C	15 秒	
	95 °C	0 秒	
④	40°C	30 秒	1
⑤	15 °C	∞	1

表3-3 リアルタイムRT-PCRに用いたプライマー

遺伝子		プライマー配列 (5'→ 3')
<i>Gapdh</i>	F	GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R	CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG
<i>Actb</i>	F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>Nanog</i>	F	TCCTTGCCAGGAAGCAGAAGATGC
	R	CACTGGTTTTTCTGCCACCGCTTG
<i>Oct3/4</i>	F	GCATACGAGTTCTGCGGAGGGATG
	R	GGACTCCTCGGGAGTTGGTTCCAC
<i>Cdk1</i>	F	AGGCCTCGTGATGCTTTCAAGTGC
	R	ATCCTCGGGTCTTTGGCCTTCTCA
<i>Ccnb1</i>	F	ATTCCCTCGGTGGGATTCAAGTGC
	R	TTCAAAGCACACCCCTGGAAGAGC
<i>λpolyA</i>	F	Real Time Primer for λpolyA (Takara)
	R	

第4章

分化誘導による

4 倍体胚性幹細胞の性状の解析

緒言

マウス胚性幹細胞は胚盤胞期胚の内部細胞塊から樹立された細胞株で、多能性を有する (Evans *et al.*, 1981)。また、胚盤胞期胚の栄養膜細胞からは胎盤をはじめとする胚体外組織に対して多分化能を有する栄養膜幹細胞の樹立がされた (Tanaka *et al.*, 2002 ; Ohinata and Tsukiyama, 2014)。さらに胚性幹細胞に遺伝子導入を行うことにより細胞運命の異なる栄養膜幹細胞を誘導した報告 (Cambuli *et al.*, 2014) もある。またマウス胚性幹細胞と栄養膜幹細胞の共培養条件下において、分化する細胞を継時的にモニタリングすることにより、*in vitro* でマウスの胚発生に類似した構造を作出できるという報告 (Harrison *et al.*, 2017) もある。

胚性幹細胞の分化誘導の研究は次にあげるようなさまざまな方法で行われている。まず、フィーダー細胞上などで接着した培養した状態の胚性幹細胞を剥離させ、未分化を維持するサイトカインなどを除いた培養液中で浮遊培養を行うことにより、さまざまな分化した細胞が混在した細胞塊である胚様体を誘導することができる (Kurosawa, 2007)。また分化誘導を促進するさまざまなサイトカインや小分子を添加して培養することで、心筋や肺胞上皮細胞、神経細胞といったさまざまな体細胞への分化を誘導することができる (Yasuda *et al.*, 2011 ; Ninomiya *et al.*, 2013 ;

Ying *et al.*, 2003)。さらに精子や卵といった生殖細胞への分化も誘導することも可能である (Hayashi *et al.*, 2011)。

また、*in vivo* における分化能の評価の指標として、胚性幹細胞を免疫不全マウスの皮下や精巣へ接種することにより、分化した細胞により構築された組織を含む腫瘤の形成を誘導するテラトーマ試験がある (Martin, 1980)。テラトーマ形成試験は免疫不全マウスやニワトリ胚において胚性幹細胞の多分化能を評価する手法としても重要である (Haraguchi *et al.*, 2016) が、近年では誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの多能性幹細胞を分化誘導した細胞を用いた再生医療分野において、分化誘導を行った細胞の腫瘍形成能の判定による安全性においても重要である (Miura *et al.*, 2009 ; Tang *et al.*, 2012)。

また、胚性幹細胞を初期胚へ注入または接着させて培養することによって、キメラ胚を作出し、移植したキメラマウスの解析を行うことにより、胚性幹細胞の個体レベルでの多能性を評価することができる (Rossant *et al.*, 1993)。

前章までにおいて、4 倍体胚性幹細胞 (TESCs) は多能性を維持し、細胞レベルにおいても恒常性を維持していることが明らかとなった。本章では、ゲノムの倍数性の変動が細胞の分化に与える影響を詳細に解析することを目的とし、*in vitro* および *in*

vivo における分化誘導、さらにキメラ胚の作出を行った。

材料と方法

1. 実験動物

本研究で用いた Balb/c Slc-nu/nu マウス（日本エスエルシー）は、温度制御下（20 - 29 °C）、明時間 12 時間、暗時間 12 時間下のクリーンラック内で飼育した。

また、B6D2F1 マウスおよび ICR マウス（日本エスエルシー）は、温度制御下（20 - 29 °C）、明時間 12 時間、暗時間 12 時間で飼育した。

マウスを購入後、1 週間飼育して馴致させ、各実験を行った。

2. 培地および試薬の作成

生理食塩水

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

hCG 液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

三種混合麻酔薬

塩酸メドトミジン（ドミツール；日本全薬工業）0.75 mL、ミダゾラム（ドルミカム；アステラス製薬）2.0 mL および酒石酸ブトルファノール（ブトルファール；Meiji）2.5 mL を蒸留水と混合し、全量を 25 mL とし、4 °C で保存した。

酸性タイロード液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

PBS 溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

PET (PBS-EDTA-Trypsin) 溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

DMEM 培養液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

ES 培養液

第2章材料と方法に記載した方法に従った。

SFEB 培養液

Knockout Serum Replacement (Gibco) 10 mL、MEN Non-essential amino acid solution 100x (Sigma) 1.0 mL、2-メルカプトエタノール (Merck) 1.0 mL を DMEM に加えて全量を 100 mL とした後、0.2 μ m 径フィルター (Sartorius) を用いて濾過滅菌後、4 $^{\circ}$ C で保存した。

EB 培養液

DMEM80 mL に Knockout Serum Replacement 10 mL および FBS 10 mL を加え、4 $^{\circ}$ C で保存した。

骨分化誘導培養液

αMEM (ナカライテスク) 180 mL に FBS 20 mL、10 mM デキサメタゾン (Sigma) 2.0 μL および 1 M βグリセロリン酸二ナトリウム (ナカライテスク) 2.0 mL を加え、4 °C で保存した。使用時に 100 mM アスコルビン酸 (ナカライテスク) を 1,000 倍希釈となるように加えて使用した。

0.2 %ゼラチン溶液

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

10 %中性緩衝ホルマリン液 (Lilly ホルマリン液)

第2章材料と方法に記載した方法に従った。

カルノア固定液

第2章材料と方法に記載した方法に従った。

3. 胚性幹細胞の培養と分化誘導

フィーダー細胞の樹立と培養

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

胚性幹細胞の培養

第2章材料と方法に記載した方法に従った。

胚様体 (EB : Embryoid Body) 誘導と胚様体遊走細胞 (EB 遊走細胞) の樹立

胚性幹細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で5分間遠心し、上清を捨てた。SFEB 培養液または EB 培養液に懸濁し、PrimeSurface 96U プレート (MS-9096U ; Sumilon) へ播種し培養した。培養液は2日おきに半量ずつ交換し、EB 形成を誘導した。

形成された EBs を5日間培養し、EB 培養液に懸濁し、ゼラチンコーティングした 10 cm Dish (日本 BD) で接着培養し、EBs から遊走してくる細胞を確認し、適宜継代しながら培養した。この細胞を EB 遊走細胞として Culture Sure Freezing Medium (Wako) に懸濁し、-80 °C で保存、または各実験に用いた。

分化誘導後の増殖曲線

EB 遊走細胞を培養し、培養開始時を 0 日目とし、 8.0×10^4 個ずつ 12 ウェルプレート中へ播種し、EB 培養液で培養した。培養後 1.5、3.0、4.5、6.0 日目に PET 溶液を用いて剥離し、TC20 全自動セルカウンター（Biorad）を用いて細胞数の計測を行った。

フローサイトメーターによる細胞のサイズ解析

第3章材料と方法に記載した方法に従った。

神経系細胞への分化誘導

胚性幹細胞をフィーダー細胞上へ播種し、12 時間後に NDiff227 培養液（Takara）へと培養液を交換し、培養した。培養液は 2 日おきに交換した。

骨細胞への分化誘導

EB 遊走細胞を培養し、 3.0×10^5 個となるように 6 ウェルプレートへ播種し培養し、12 時間後に骨分化誘導培養液へと培養液を交換し、培養した。培養液は 2 日おきに交換した。

4. 分化誘導後の核型解析

PI 染色による DNA 量の測定

EB 遊走細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、細胞数が 1.0×10^6 個になるように調整し、以降は、第 2 章材料と方法に記載した方法で行った。

ギムザ染色による染色体標本の作成

EB 遊走細胞を培養し、コルヒチンを最終濃度 $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように EB 培養液に添加した。CO₂ インキュベーター内で 8 時間静置し、EB 遊走細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で 5 分間遠心し上清を捨て、1.0 % クエン酸ナトリウム水溶液に懸濁し、37 °C で 30 分間低張処理を行った。その後、カルノア固定液

を加えて固定し、冷 50 % エタノール (-20 °C) に浸漬したスライドガラス上に展開し、風乾した。

風乾したスライドにギムザ染色を行い、得られた標本を観察した。

5. 分化誘導後の表現型および遺伝子発現解析

アリザリンレッド S 染色

EB 遊走細胞の骨細胞への分化誘導後、14 日目において 100 % エタノールを加え 10 分間細胞を固定した。固定後、エタノールを除いて室温で乾燥させ、0.1%アリザリンレッド S 水溶液を加えて 10 分間染色した。蒸留水により洗浄し、観察した。

フォンコッサ染色

EB 遊走細胞の骨細胞への分化誘導後、14 日目において 4 % パラホルムアルデヒドを加えて 15 分間細胞を固定した。固定後、パラホルムアルデヒドを除いて 0.5 % 硝酸銀水溶液を加えて遮光下で 2 時間カルシウムを置換した。その後、3.0 % 炭酸ナトリウムホルマリンを加えて 2 分間定着させた。蒸留水により洗浄し、観察した。

total RNA の抽出

第1章材料と方法に記載した方法に従った。

RT-PCR および

第1章材料と方法に記載した方法で逆転写反応を行った。

iCycler (Biorad) および PrimeSTAR HS (Takara) を用いて表 4-1A および表 4-1B に記載した条件で RT-PCR を行なった。PCR 産物は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色を行い、観察した。プライマー配列は表 4-4 に示した。

Applied Biosystems StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) および Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて表 4-2A および表 4-2B の条件でリアルタイム RT-PCR を行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法で解析を行った。標的遺伝子の相対発現量は、*Gapdh* 遺伝子を内部標準として標準化した。プライマー配列は表 4-4 に示した。

6. テラトーマ形成試験とその解析

テラトーマ形成

胚性幹細胞を培養し、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で5分間遠心し、上清を捨て、細胞数を 1.0×10^6 個に調整した。BD Matrigel hESC-qualified Matrix (日本 BD) に懸濁し、*Balb/c Slc-nu/nu* マウスの皮下へ注入した。4 - 8 週間後、処置したマウスをイソフルランによる深麻酔下において灌流固定により安楽死させ、腫瘍を摘出し、Lilly ホルマリン液中で固定した。

パラフィン包埋および薄切切片の作成

浸漬固定後、脱水 (70 % エタノール一晩、80 % エタノール、90 % エタノール、100 % エタノール3回、各2時間) を行い、透徹 (キシレン3回、各1時間) を行い、パラフィンに浸漬 (パラフィン3回、各1時間、60 °C) した。金属製包埋プレートおよび包埋リングを用いてパラフィン中に包埋し、一晩静置した。

薄切切片の作成は、ミクロトーム（大和光機工業）を用いて厚さ 4 μm に薄切し、水上で皺を伸ばし、さらに 37 - 40 $^{\circ}\text{C}$ の温水中で伸展させた後にスライドガラスに貼り付け、37 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレート上で一晩以上乾燥させた。

ヘマトキシリン- エオジン (HE) 染色

薄切切片を脱パラフィン処理（キシレン 3 回、100 % エタノール 2 回、90 % エタノール、70 % エタノール各 3 分間、蒸留水 1 分間）した後、ヘマトキシリン溶液中に 1 分間浸漬し、流水中で 15 分間洗浄した。エオジン溶液に 5 分間浸漬し、その後、脱水（70 % エタノール 30 秒間、90 % エタノール 1 分間、100 % エタノール 2 回 2 分間および 3 分間、キシレン 3 回、各 3 分間）し、エンテランニュー（Merck）で封入し、観察した。

染色した標本は ImageJ ソフトウェア（NIH）を用いて染色された細胞核の断面積を測定した。

リンタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色

薄切切片を脱パラフィン処理した後、4.0 % クロム酸水溶液中で1時間クロム化を行った。流水洗浄後、1.0 % 亜硫酸水素ナトリウム水溶液中で1分間還元させ、蒸留水で洗浄し、1.0 % 過マンガン酸カリウム水溶液中で5分間酸化させ、蒸留水で洗浄し、2.0 % シュウ酸水溶液中で3分間還元させた。流水洗浄および蒸留水で洗浄後、PTAH染色液中で5時間染色した。その後、脱水（95 % エタノール2回、100 % エタノール2回、キシレン3回、各3分間）し、エンテランニューで封入し、観察した。

7. キメラ胚形成とその解析

精管結紮マウスの作出

三種混合麻酔薬を用いてICRオスマウスを麻酔した（Dose : 0.1 mL/10 g BW）。麻酔下のマウスの腹部を切開し、両側の精巣および精管を剖出させ、両側の精管の一部を切除した。精巣および精管を腹腔内に戻し、筋層および皮膚と縫合した。リマダイルを背側皮下へ接種した後にアチパメゾールを腹腔内投与して覚醒させた。処置後1週間以降に使用した。

偽妊娠マウスの作出

ICR メスマウスと精管結紮マウスを交配させ、翌朝に膣栓を確認できたものを偽妊娠 0.5 日目とした。

過排卵処置および交配

第 1 章材料と方法に記載した方法で行った。

受精卵の採取と体外培養

第 1 章材料と方法に記載した方法で行った。

集合キメラ胚の作出

マウス胚を培養し、8 細胞期胚から桑実胚になった時点で酸性タイロイド液ドロップ中に移し、透明体を除いた。透明体を除いた胚を 30 μ L の M16 培養液ドロップ内にアグリゲーションニードル (DN-9 ; BLS) により作成したアグリゲーションホール内に 1 個ずつ移し静置した。

続いて培養した EGFP 導入胚性幹細胞を、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てた。M16 培養液 50 μ L に懸濁し、キャピラリーマウスピペットを用いてアグリゲーションホール内のマウス胚と接着させて接着させて一晩培養した。

キメラ胚移植

作出した集合キメラ胚を蛍光アダプター付き (SFA-RB ; ベックス) の実体顕微鏡下で選別し、30 μ L の M16 培養液ドロップに移した。

三種混合麻酔薬を用いて偽妊娠 3.5 日目のマウスを麻酔し、背側より後肢頭側を切開し、卵巣・卵管・子宮を剖出した。26G 注射針 (Terumo) を用いて子宮上部に穴をあけ、その穴から選別したキメラ胚を移植した。移植後、卵巣・卵管・子宮を腹腔内に戻し、筋層および皮膚を縫合した。リマダイルを背側皮下へ接種した後にアチパメゾールを腹腔内投与して覚醒させた。

手術中は携帯用カイロでマウスを保温し、覚醒するまで白熱灯下で保温した。

キメラ胚のサンプリング

キメラ胚移植後、妊娠 12.5 日齢において頸椎脱臼により安楽死させた。開腹して着床の有無を確認した。胎子を摘出し、蛍光実体顕微鏡 (SXZ16 ; オリンパス) 下で観察した。また、PBS 溶液中で胎子の内臓を摘出し、それぞれについてオールインワン蛍光顕微鏡 Biozero (Keyence) で観察した。

観察後、Lilly ホルマリン液で固定しパラフィン包埋または DMEM 培養液中で培養した。

パラフィン包埋および薄切切片の作成

パラフィン包埋および薄切切片の作成は、前述の方法で行った。

薄切切片の蛍光免疫染色

薄切切片を脱パラフィン処理した後、PBS 溶液で洗浄した。10 % ヤギ血清添加 PBS 溶液を用いて 1 時間ブロッキングを行なった後に、一次抗体を 4 °C で一晩反応させた。反応後、PBS 溶液で洗浄し、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。その後、PBS 溶液で洗浄し、5.0 µg/mL DAPI (Dojindo) 添加封入剤 (Tris Cl : グリセロール = 1 : 1) で封入し、共焦点顕微鏡 LMS710 (オリンパス) で観察した。

一次抗体としてウサギ抗 GFP 抗体（#598 : MBL）を 500 倍で希釈したものを、二次抗体とヤギ抗ウサギ IgG 抗体（#234 : MBL）を 160 倍で希釈したものを用いた。

薄切切片からゲノム DNA の抽出と PCR

厚さ 4 μm の薄切切片を 10 枚作成し、1.5 mL チューブへ回収した。Nucleospin TissueXS (Takara) を用いて付属プロトコルに従いゲノム DNA の抽出を行なった。抽出したゲノム DNA は、NanoDrop2000 (Thermofisher Scientific) より精製度を測定し、-20 $^{\circ}\text{C}$ または 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

iCycler (Biorad) および Biotaq (Bioline) を用いて 表 4-3A および表 4-4B に記載した条件で PCR を行なった。プライマー配列は表 4-4 に示した。PCR 産物は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色を行い、観察した。

キメラ組織片の培養と観察

サンプリングしたキメラ胚の組織片を DMEM 培養液中に入れ、培養した。組織片から遊走してくる細胞を確認後、オールインワン蛍光顕微鏡 Biozero で観察した。

さらに、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で5分間遠心し上清を捨て、PBS 溶液に懸濁し、サイトスピン4 (ThermoFisher Scientific) を用いて1,000 rpm で5分間遠心することで遊走した細胞をスライドガラスに貼り付け、Hoechst33342 添加封入剤で封入し、オールインワン蛍光顕微鏡 Biozero で観察した。

8. 統計学的処理

Mann-Whitney 検定により2倍体細胞と4倍体細胞の結果の有意差の検定を行った。 $P < 0.05$ を統計的に有意差があると判断した。

結果

1. 胚様体 (EBs: Embryoid Bodies) 誘導と胚様体遊走細胞 (EB 遊走細胞) の作出と解析

胚性幹細胞の多分化能について検討するために、*in vitro* で分化誘導を行った。まず、胚性幹細胞を浮遊培養することにより胚様体 (EBs: Embryoid Bodies) 誘導を試みたところ、ESCs と同様に T ESCs から 2 倍体 EBs (2nEBs) および 4 倍体 EBs (4nEBs) の形成に成功し、2nEBs および 4nEBs の形状に差は認められなかった (図 4-1A)。さらに詳細な解析を行うために接着培養を行ったところ、2nEBs と同様に 4nEBs から胚様体遊走細胞 (EB 遊走細胞) の作出に成功した。また、2nEB 遊走細胞と 4nEB 遊走細胞の細胞形態に差は認められなかった (図 4-2B)。

次に、分化誘導後における 2nEB 遊走細胞および 4nEB 遊走細胞の倍数性の解析を行うために、フローサイトメトリーおよび染色体標本による解析を行った。樹立した 2nEB 遊走細胞および 4nEB 遊走細胞を PI 溶液により染色し、フローサイトメトリーを用いて DNA 量を比較したところ、2nEB 遊走細胞と比較して 4nEB 遊走細胞は、2 倍の DNA 量を有していた (図 4-2A)。また、ギムザ染色による染色体標本から、2nEB 遊走細胞は ESCs と同様に $2n = 40$ の染色体セットを維持しており、4nEB 遊走細胞に

においても TESCOs と同様に $4n=80$ の染色体セットを維持していることがわかった (図 4-2B)。

次に、倍数性の変動が分化誘導後の EB 遊走細胞の細胞増殖能に与える影響を調べるため、2nEB 遊走細胞および 4nEB 遊走細胞を用いて増殖曲線を作成した。細胞を播種した日を 0 日とし、1.5 日、3.0 日、4.5 日および 6.0 日において細胞数を比較すると、3.0 日においては有意に、4.5 日および 6.0 日においては顕著に有意に 4nEB 遊走細胞の細胞数が 2nEB 遊走細胞と比較して少なかった (図 4-3)。

また、フローサイトメトリーにより FSC 値を細胞の直径の相対値として 2nEB 遊走細胞と 4nEB 遊走細胞の 1 細胞の大きさを比較したところ、4nEB 遊走細胞は 2nEB 遊走細胞と比較して大きかった (図 4-4)。

さらに、リアルタイム RT-PCR を用いて、2nEBs および 4nEBs における初期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 および 4nEBs において分化マーカー遺伝子が発現していることがわかり、2nEBs と比較して 4nEBs においては中胚葉マーカー遺伝子の *Brachyury* の発現が有意に高く、栄養外胚葉マーカー遺伝子の *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 (図 4-5)。

特定の細胞系譜への分化誘導を行うため、胚性幹細胞および EB 遊走細胞を用いて 14 日間の分化誘導を行った。NDiff227 培養液を用いて胚性幹細胞の神経系細胞への分化誘導を行ったところ、ESCs および T ESCs 由来のコロニーから線維状の構造を持つ細胞が伸長していることが確認された (図 4-6A)。これらの細胞において発現する遺伝子を RT-PCR により解析した結果、神経細胞マーカーである *Nestin* や *Tuj1* の発現が見られた (図 4-6B)

また、骨分化誘導培養液を用いて 2nEB 遊走細胞および 4nEB 遊走細胞の分化誘導を行ったところ、14 日目において肉眼的に透明度の低い細胞コロニーの出現が観察された。これらの細胞を用いてカルシウム塩を染色するアリザリンレッド染色およびフォンコッサ染色を行ったところ、細胞コロニーがアリザリンレッド染色においては赤色に、およびフォンコッサ染色においては黒色に染色された。ネガティブコントロールとして MEF (マウス胎子線維芽細胞) を用いた。MEF においてはアリザリンレッド染色およびフォンコッサ染色のどちらの染色によっても染色性を示さなかったことから、EB 遊走細胞は分化誘導の過程においてカルシウム塩が多量に生成されたことが明らかとなった (図 4-7)。

2. テラトーマ形成試験とその解析

次に、ESC#1 および TESC#1 の *in vivo* における多分化能について解析するために、テラトーマ形成を試みた。免疫不全マウスの皮下へ TESC#1 を接種することにより、ESC#1 と同様にテラトーマが形成された。形成したテラトーマをパラフィン包埋し、薄切切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行いその組織像を観察した。その結果、ESC#1 由来および TESC#1 由来のテラトーマの両方において、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腸管上皮様構造を含めた三胚葉に由来する分化した組織像が観察された (図 4-8A)。また、リンタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色により筋線維の染色を試みたところ、ESC#1 由来および TESC#1 由来のテラトーマの組織内において、筋線維の存在が確認された (図 4-8B)。

さらに、HE 染色における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 ImageJ ソフトウェアにより測定したところ、TESC#1 由来のテラトーマの核の断面積は、ESC#1 由来のものとは有意に大きかった (図 4-8C)。

3. キメラ胚（二倍体胚↔四倍体胚性幹細胞）の作出とその解析

倍数性の変動が TESC の生体内における分化に与える影響を調べるため、キメラ胚の作出を試みた。透明帯を除いた 8 細胞期胚ないし桑実胚と EGFP 発現 TESC を接着させて培養することで集合キメラ胚の作出を行った。その結果、EGFP 発現 ESC と同様に、EGFP 発現 TESC を用いたキメラ胚においても、宿主胚の内部細胞塊への寄与が認められた（図 4-9）。

次に、これらの集合キメラ胚の胚発生を詳細に解析するために、偽妊娠マウス子宮への胚移植を行った。その結果、12.5 日齢の EGFP 発現 TESC を用いたキメラ胎子組織および卵黄嚢において、EGFP の蛍光が観察された（図 4-10A）。キメラ胎子を実体顕微鏡下で解剖し、肝臓、胃、腸管および卵黄嚢に分離して観察した結果、それぞれの組織において EGFP の蛍光が観察された（図 4-10B）。

また、得られた胎子のキメリズムを判定するために、胎子組織片またはパラフィン包埋した薄切切片からゲノム DNA を抽出し、PCR を行った。ポジティブコントロールとして EGFP 発現 TESC のゲノム DNA を用いた。その結果、得られた胎子 12 個体のうち 8 個体において EGFP のゲノム DNA が検出された（図 4-11）。

さらにこのキメラ胎子組織を培養し、組織片から遊走してくる細胞を観察したところ、EGFP 陽性細胞が観察された (図 4-12A)。サイトスピン 4 を用いて、組織片から遊走した細胞をスライドガラス上で個別に観察した結果、遊走した細胞は 2 種類に分けられることがわかった。すなわち、EGFP を発現していない細胞と EGFP を発現する細胞が存在した (図 4-12B)。

さらに、蛍光免疫染色によりパラフィン包埋したキメラ胎子組織における EGFP 陽性細胞の局在を調べたところ、EGFP 陽性細胞はキメラ胎子組織の全体に広範に分布していた (図 4-13A)。さらに詳細に EGFP 発現細胞の分布を解析したところ、EGFP 陽性細胞は EGFP 陰性のホスト細胞と混在して組織を形成していた (図 4-13B)。

考察

本章では、ゲノムの倍数性の変動したマウス4倍体胚性幹細胞 (TESCs : Tetraploid ESCs) の分化能を調べるために、*in vitro* および *in vivo* において分化誘導を行った。その結果、*in vitro* において TESCs は、さまざまな細胞系譜への分化誘導が可能であることがわかった。さらに *in vivo* においても TESCs は、分化した細胞で構成された組織を含むテラトーマを形成し、さらには生体内においてキメラ胎子の組織形成に寄与し、ホストの2倍体細胞と混在して組織構築する能力を有することがわかった。

多能性幹細胞を用いた *in vitro* において分化誘導の研究では、さまざまな細胞系譜への分化誘導方法が確立されている (Yasuda *et al.*, 2011 ; Ninomiya *et al.*, 2013 ; Ying *et al.*, 2003)。本性においてはまず *in vitro* における ESCs および TESCs の分化能を解析するために、外胚葉由来である神経系細胞、ならびに中内胚葉由来である骨細胞への分化誘導を行った。まず、浮遊培養による ESCs および TESCs の胚様体誘導を行ったところ、ESCs と同様に TESCs からの胚様体誘導に成功した。TESCs においては一部の分化マーカー遺伝子の発現に有意差は認められたものの、さまざまな初期分化マーカー遺伝子の発現が確認されたことから、ゲノム量の変動にもかかわらず分化能を有することが明らかとなった。López-Sánchez らの報告にあるように、正常の胚発生

過程において一部の神経細胞は *p75* 遺伝子依存的に4倍体化することが知られており (López-Sánchez *et al.*, 2013)、神経細胞は倍数性の変動を比較的受け入れやすいと考え、まず神経系細胞への分化誘導を試みた。その結果、TESCs から分化した細胞においても神経系マーカー遺伝子の発現が確認され、さらに細胞のコロニーから線維状の構造が伸長していた。多能性幹細胞から神経系の細胞の分化誘導を行うと、神経突起を伸長することが知られている (Okada *et al.*, 2008)。本研究においても伸長が観察された線維状の構造は神経突起であると考えられ、ゲノム量の変動した胚性幹細胞からも *in vitro* での神経系への分化誘導が可能であることが明らかとなった。

続いて、より生体内において複雑な発生過程を経る骨細胞の分化誘導を行った。従来骨発生は中胚葉に由来するとされてきたが、近年中内胚葉という分化ステージが存在し、神経堤や神経系の細胞や中胚葉組織へ分化できる体軸幹細胞 (Axial Stem cells) から発生すると報告されている (Takemoto *et al.*, 2011; Kondoh and Takemoto, 2012)。本章においては、初期分化状態である EBs を接着培養し、EBs から遊走した細胞 (EB 遊走細胞) をさらに方向付けて分化誘導を行う松本らのプロトコル (松本ら、2014) に従って、ESCs および TESCs の骨細胞への分化誘導を行った。その結果、2nEBs および 4nEBs の接着培養により 2nEB 遊走細胞および 4nEB 遊走細胞の誘導に成功し

た。さらに分化誘導 14 日目においては透明度の低い細胞コロニーが観察された。これらの細胞において、カルシウム塩の検出を行うため、アリザリンレッド染色およびフォンコッサ染色を行ったところ、カルシウム塩の沈着が確認できた。この結果から、透明度の低い細胞コロニーはカルシウム塩の沈着した骨細胞を含む細胞コロニーであることが明らかとなった。以上の結果から、TESCs においても生体内において複雑な分化過程を必要とする骨への分化誘導が可能であることが明らかとなった。一方、*in vitro* において生殖細胞系譜への分化誘導方法も知られている (Hikabe *et al.*, 2016) が、分化誘導に用いる多能性幹細胞の細胞株のサイトカインなどへの反応性について検討が必要である点や分化状態のモニタリングをするためにレポーター遺伝子を導入する必要がある点から、本研究では行わなかった。

次に、*in vivo* における ESCs および TESCs の多分化能を解析するために、免疫不全マウスの皮下へ接種することによって形成されるテラトーマの形成を試み、一般的な方法で解析を行った (Nelakanti *et al.*, 2016)。その結果、ESC#1 と同様に TESC#1 からのテラトーマの形跡に成功した。ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色による組織化学的解析から TESC#1 由来のテラトーマにおいても ESC#1 由来のテラトーマと同様に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

腸管上皮様構造を含む三胚葉に由来する組織像が観察された。また、より詳細な組織化学的解析を行うために、リンタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色により筋線維の染色を試みたところ、ESC#1 由来および TESC#1 由来のテラトーマにおいて筋線維の存在が確認できた。これらの結果から、TESCs は ESCs と同様に分化組織の形成を有することが明らかとなった。

また、分化誘導後の細胞について倍数性の維持および細胞増殖速度に着目して解析を行った。まず *in vivo* におけるテラトーマにおいて、組織中における細胞形態が類似した角化上皮様構造および骨格筋様構造の細胞の核の断面積を測定したところ、TESC#1 由来のテラトーマの核は ESC#1 のものと比べて大きな面積であった。また、*in vitro* において 2nEB 遊走細胞および 4nEB 遊走細胞は分化誘導後においてもそれぞれ $2n=40$ および $4n=80$ の染色体セットを維持していた。これらの結果から、分化誘導後においても TESCs はその倍数性を維持していることが明らかとなった。これまでに倍数性の変動したマウス半数体胚性幹細胞においては分化誘導することによりほぼ全ての細胞が2倍体化することが知られており (Elling *et al.*, 2011 ; Leeb *et al.*, 2011)、倍数性の変動した胚性幹細胞は分化誘導後に倍数性のより安定した2倍体へと変化する可能性が示唆されている。また、マウス胚性幹細胞の多倍体化誘導を行った報告では、

分化誘導後の倍数性についてはこれまで検討されていない (Horii *et al.*, 2015 ; Imai *et al.*, 2015)。分化誘導後の EB 遊走細胞の細胞増殖速度および細胞のサイズについても、4nEB 遊走細胞は 2nEB 遊走細胞に比べて増殖速度が有意に低く、また 1 細胞の大きさも増大することがわかり、本研究における第 2 章および第 3 章と同様の結果であった。また、融合して作出した 4 倍体培養細胞では融合前と比較して増殖速度が有意に低下するとの報告 (McGill *et al.*, 1992) があるほか、外来 DNA を細胞内に導入することにより増殖速度が低下したとする報告 (Von Hoff *et al.*, 1990) もある。これらのことから、倍数性の増加により増殖速度が低下するのは第 2 章のような胚性幹細胞だけでなく、分化誘導後の細胞においてもゲノム DNA の量を反映していることが明らかとなった。また、細胞のサイズについて、第 3 章で示した ESCs と TESC の大きさの関係が、分化誘導後においても維持されていることが明らかとなった。倍数性の変動と細胞のサイズの変動の関連性に関する解析のためには、今後電子顕微鏡などを用いたさまざまな細胞小器官の分布や定量が必要となると考える。

本章ではさらに倍数性の変動した TESC が生体内において胚発生へ寄与できるか調べるために、キメラ胚の作出を行った。キメラ胚の作出にあたり、ESCs および TESC の局在を追跡するために EGFP 発現マウス (Okabe *et al.*, 1997) から樹立した EGFP

発現 ESCs および EGFP 発現 TESC_s を用いて実験を行った。その結果、EGFP 発現 TESC_s と 2 倍体胚を用いた胚盤胞期キメラ胚においてホスト胚の内部細胞塊への局在が認められ、さらに偽妊娠マウス子宮へ胚移植することで得られた胎子（12.5 日齢）を観察した結果、胎子組織全体および卵黄嚢において EGFP 陽性 TESC_s 由来の細胞が局在したキメラ胎子が得られた。これまでのキメラ胚に関する報告では、2 倍体胚または 2 倍体胚性幹細胞と 4 倍体胚を用いたキメラマウス作出においては 4 倍体胚由来の細胞は胎盤などをはじめとする胚体外組織にのみ寄与し、胚体組織は 2 倍体胚由来の細胞のみで構成されることが知られている（Nagy *et al.*, 1993）。この性質を利用することによってマウス 4 倍体胚は、4 倍体補完法としてミュータントマウスやトランスジェニックマウスの作出に有用である（Wang *et al.*, 1997）ほか、ラットにも応用されている（Hirabayashi *et al.*, 2012）。しかしながらこの方法によって作出したキメラマウスの発生率は低く、ホストの 4 倍体胚の細胞数を増やすことや、キメラ胚の作出のタイミングを 4 - 8 細胞期胚にするなど高効率にキメラ胚を得るためにさまざまな研究が行われている（Ohta *et al.*, 2008 ; Wen *et al.*, 2014）。本章における解析では、4 倍体胚と胚性幹細胞のキメラではなく、4 倍体胚性幹細胞と 2 倍体胚を組み合わせたキメラ胚を作出し解析を行った。従来の研究においては 4 倍体の細胞は胚体外組織にのみ分化

すると考えられてきたが、本研究においては、4倍体胚性幹細胞を用いることによって4倍体細胞が内部細胞塊に由来する胎子組織に分化することが初めて示された。キメラ胚形成において一般的に着床後胚のエピブラストから樹立された primed 型の多能性幹細胞は、キメラ形成能を持たないことが知られている (Brons *et al.*, 2007) が、キメラ形成能のある naïve 型の多能性幹細胞で発現する接着因子の E カドヘリンを primed 型の幹細胞に発現させることにより、primed 型の多能性幹細胞がキメラ形成能を獲得した報告 (Ohtsuka *et al.*, 2012) があり、キメラ胚の形成においては多能性幹細胞に発現する接着因子が重要であることが明らかとなっている。本研究において用いた TESC は naïve 型の多能性幹細胞であり、E カドヘリンも発現していることが、倍数性の変動にもかかわらずキメラ胚に寄与することができた一因であると考えられる。また、近年では異種間の細胞および胚を用いてキメラ胚の作出に成功した報告もある。ヒト iPS 細胞をマウス胚へ注入することで、ごく少数ながらヒト iPS 細胞由来の細胞がマウス胎子へ定着した報告 (Masaki *et al.*, 2015) や、ラット多能性幹細胞を遺伝的に脾臓が欠損したマウス胚へ注入することにより、生体内においてラットの細胞で構成された脾臓を有するマウスの作出に成功した例 (Kobayashi *et al.*, 2010) もある。さらに、マウス胚とラット胚性幹細胞を用いたキメラマウスにおいては、作出されたマ

ウスの精巣内においてラットの精子形成が観察された報告 (Isotani *et al.*, 2016) もあり、さまざまな動物種の多能性幹細胞がマウス胚においてキメラ形成能を有する可能性が示唆されている。今後より詳細にキメラ胚形成の機序について解析するためには、ホストの胚の倍数性と細胞数およびドナーの胚性幹細胞の倍数性と細胞数に着目した定量的な解析が必要であると考え。

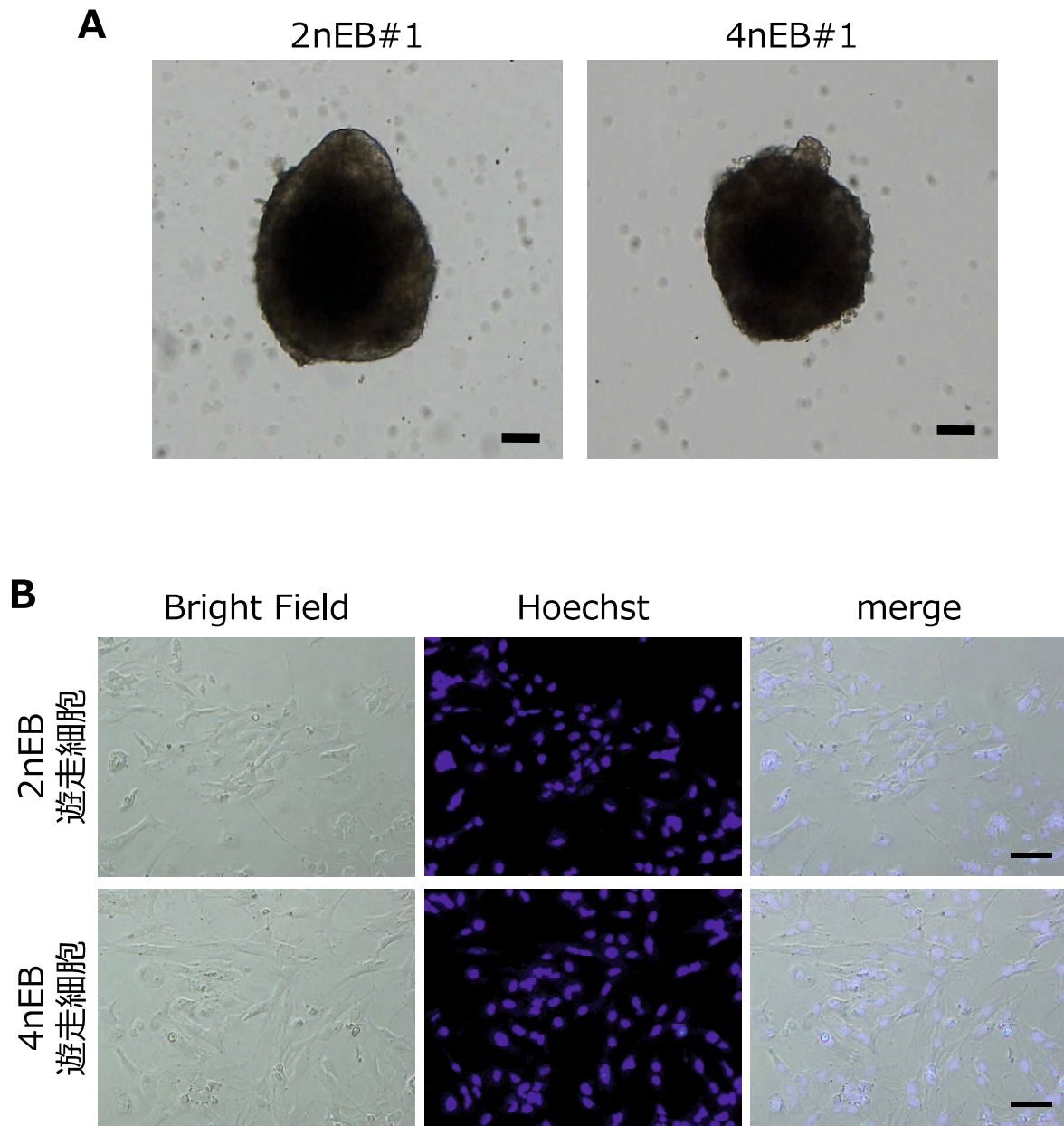


図4-1 胚様体 (EB : Embryoid Body) 形成と胚様体遊走細胞 (EB遊走細胞) の作成

(A) 浮遊培養法によりESCsとTESCsから胚様体 (EB : Embryoid Body) を誘導した。誘導した胚様体をそれぞれ2nEBs、4nEBsと表す。胚様体誘導10日目の胚様体 (2nEB#1、4nEB#1) を示す。bar=100 μ m

(B) 接着培養によりEBからEB遊走細胞を誘導した。bar=100 μ m

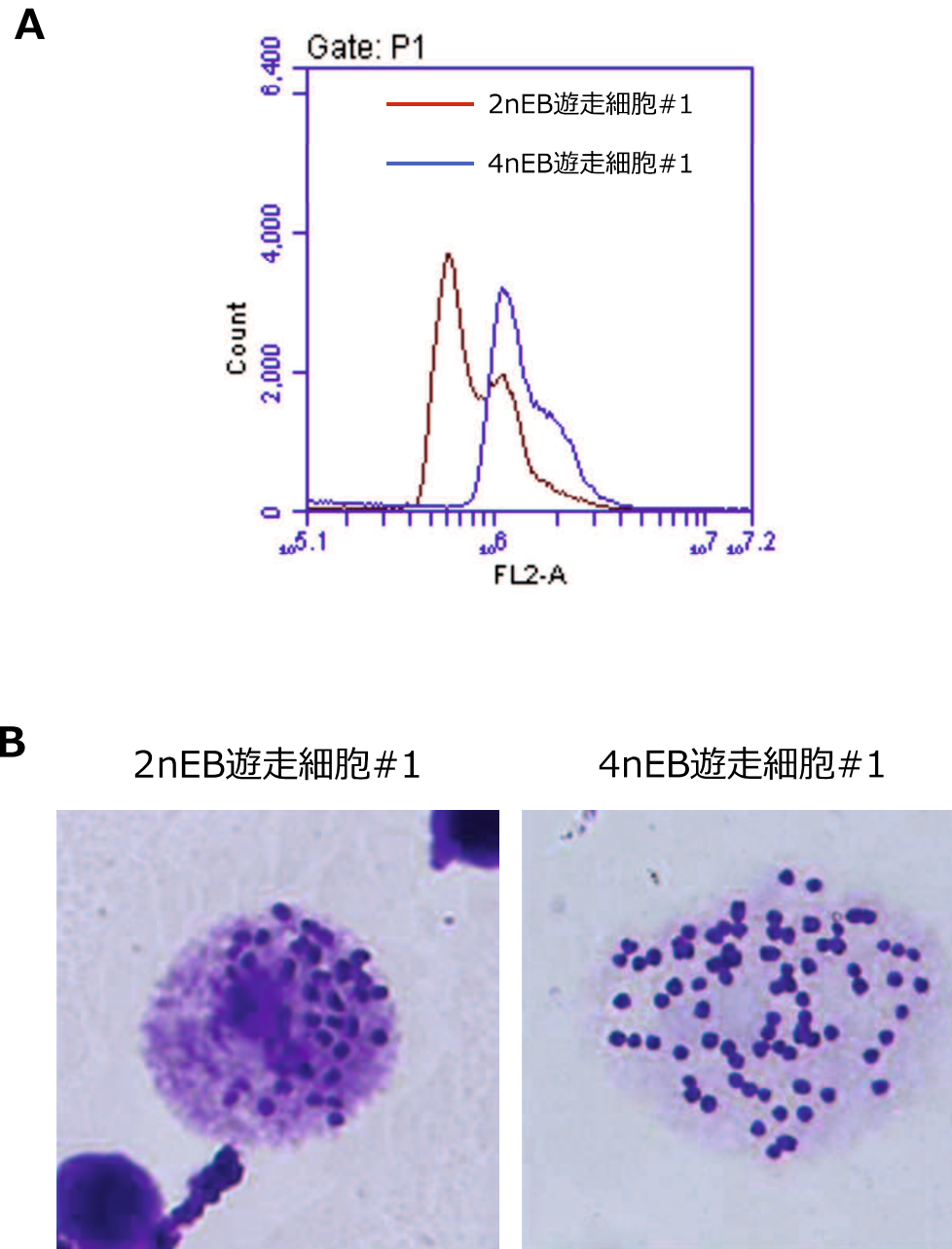


図4-1 EB遊走細胞の倍数性の解析

(A) 2nEB遊走細胞#1と4nEB遊走細胞#1のDNA量を比較した。赤線は2nEB遊走細胞#1のDNA量を示し、青線は4nEB遊走細胞#1のDNA量を示す。

(B) ギムザ染色により2nEB遊走細胞#1と4nEB遊走細胞#1の染色体標本を作製し、それぞれの染色体数を比較した。2nEB遊走細胞#1の染色体数は $2n=40$ であるのに対して、4nEB遊走細胞#1の染色体数は $4n=80$ であった。

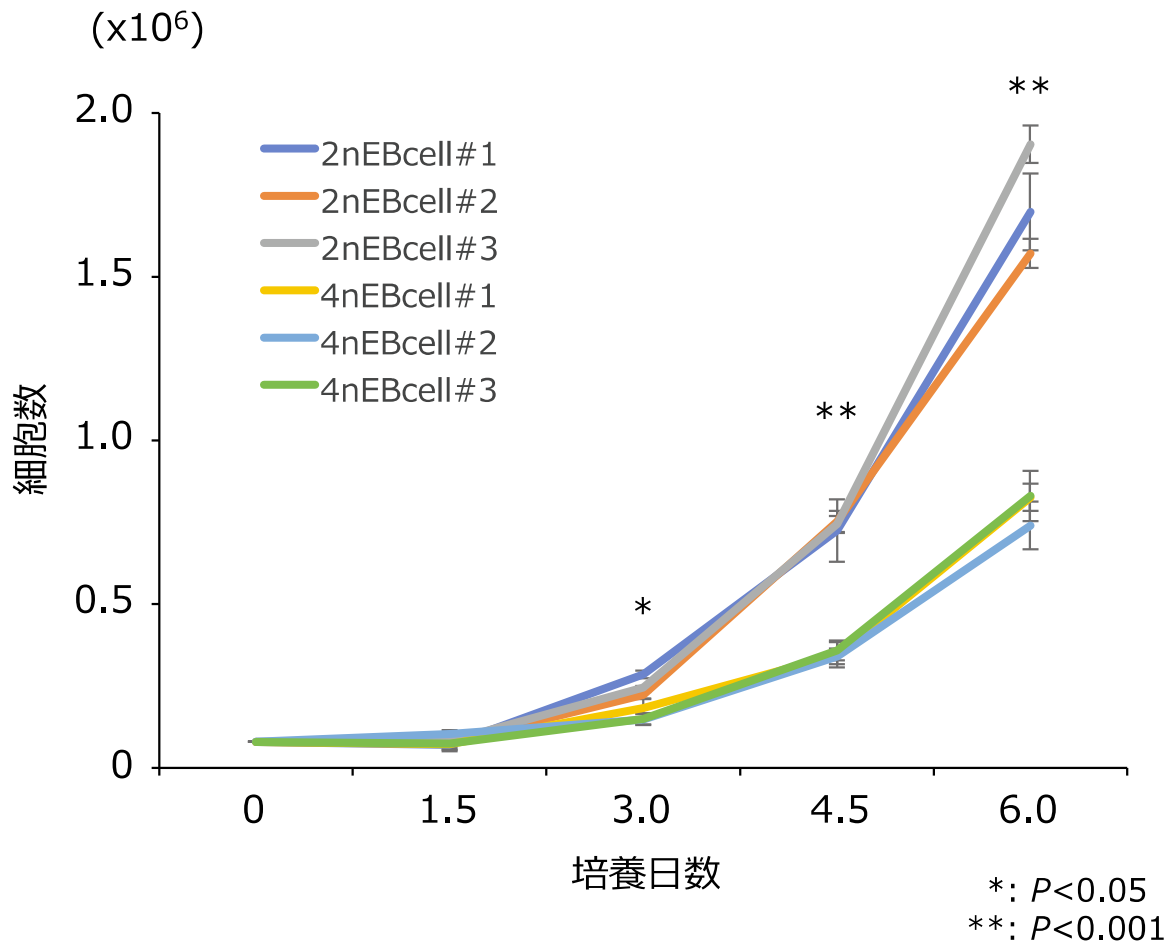


図4-3 EB遊走細胞の増殖速度の比較

8.0 × 10⁴ 細胞を播種し、培養1.5、3.0、4.5、6.0 日目において細胞数を測定した。

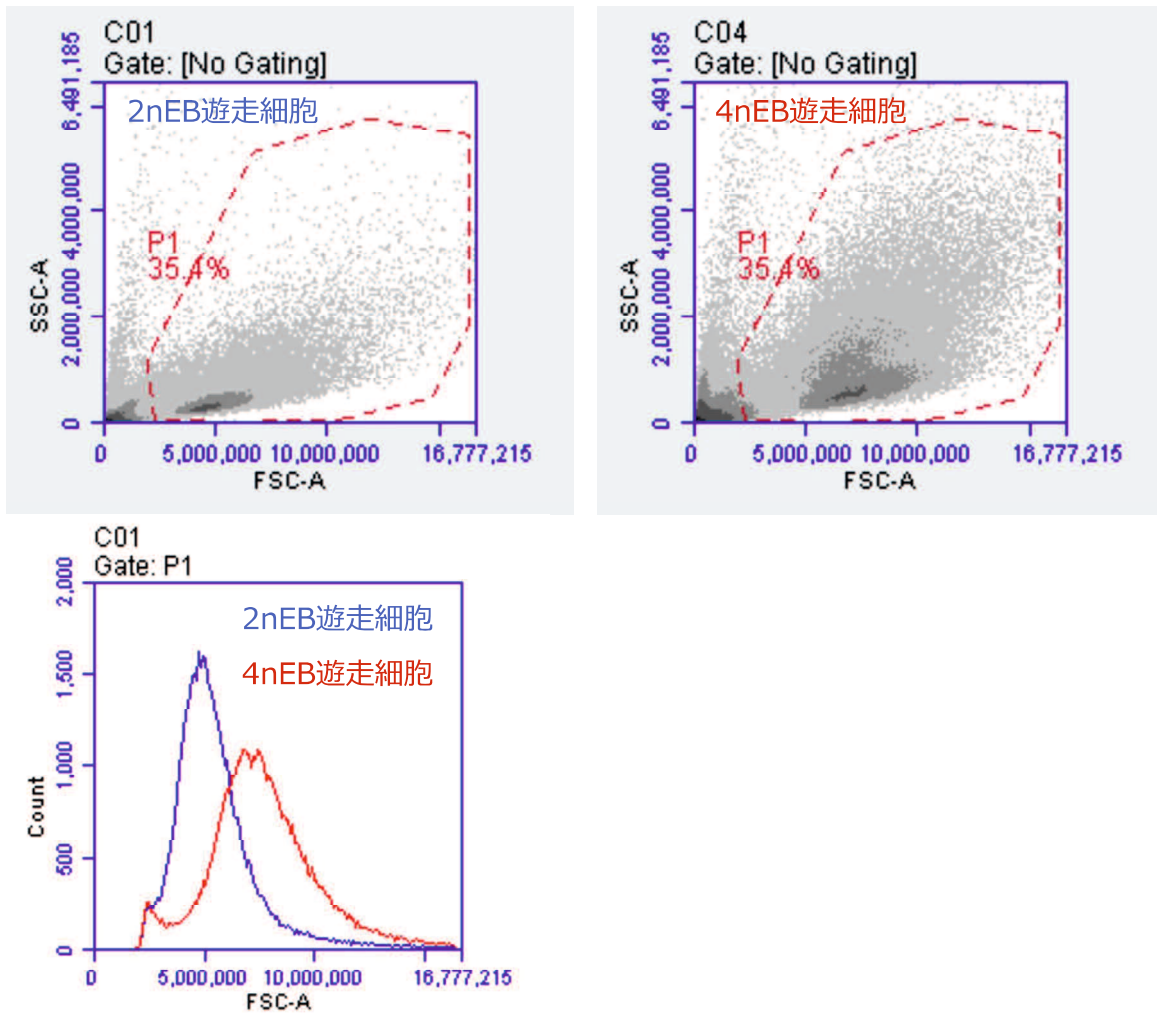


図4-4 フローサイトメトリーによるEB遊走細胞の大きさの解析

フローサイトメトリーにより前方散乱光（FSC）を細胞の直径の指標とした。青線を2nEB遊走細胞および赤線を4nEB遊走細胞とした。

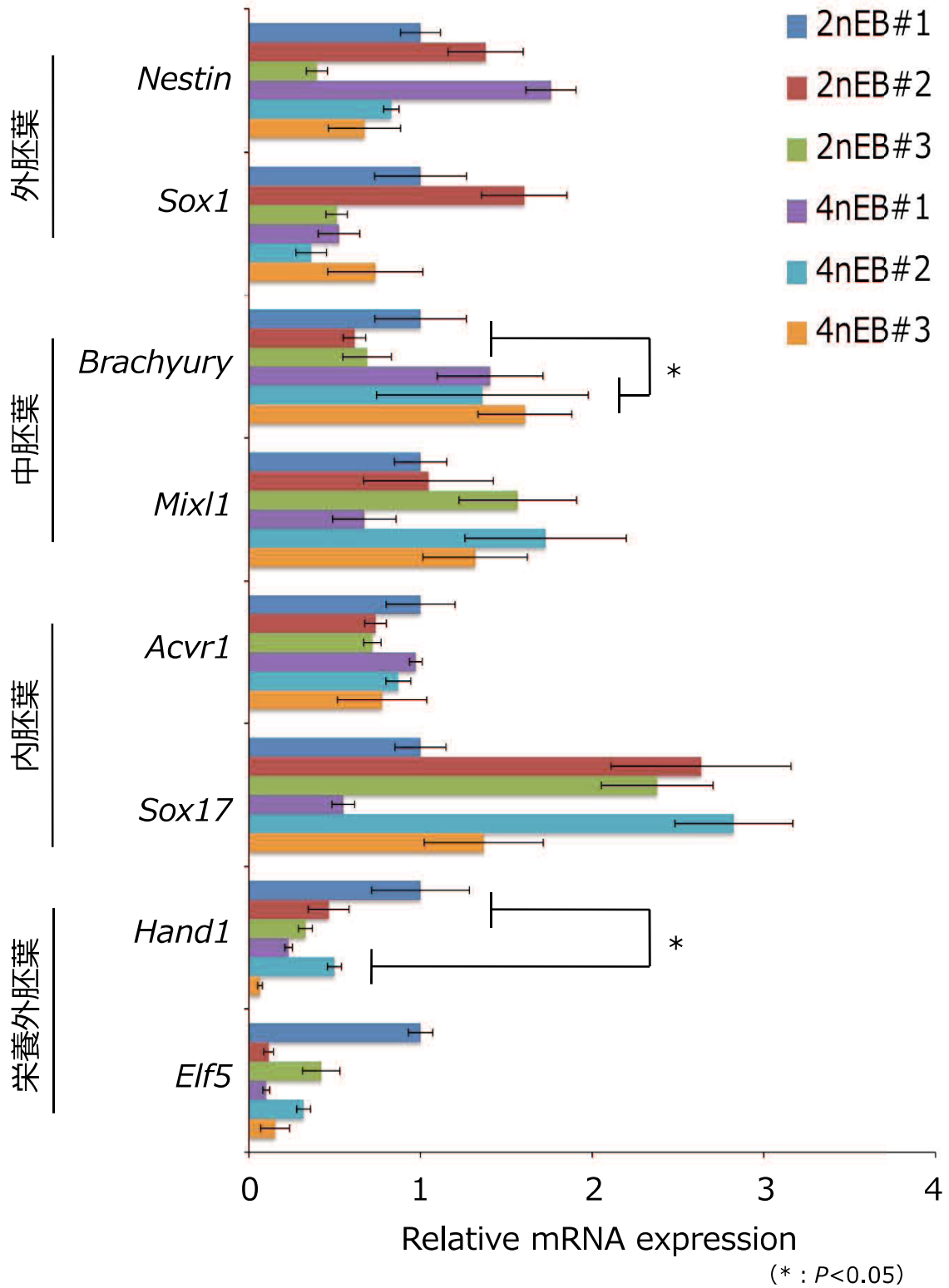


図4-5 胚様体における分化マーカー遺伝子発現解析

リアルタイムRT-PCRにより2nEBsおよび4nEBsにおける分化マーカー遺伝子発現を解析した。

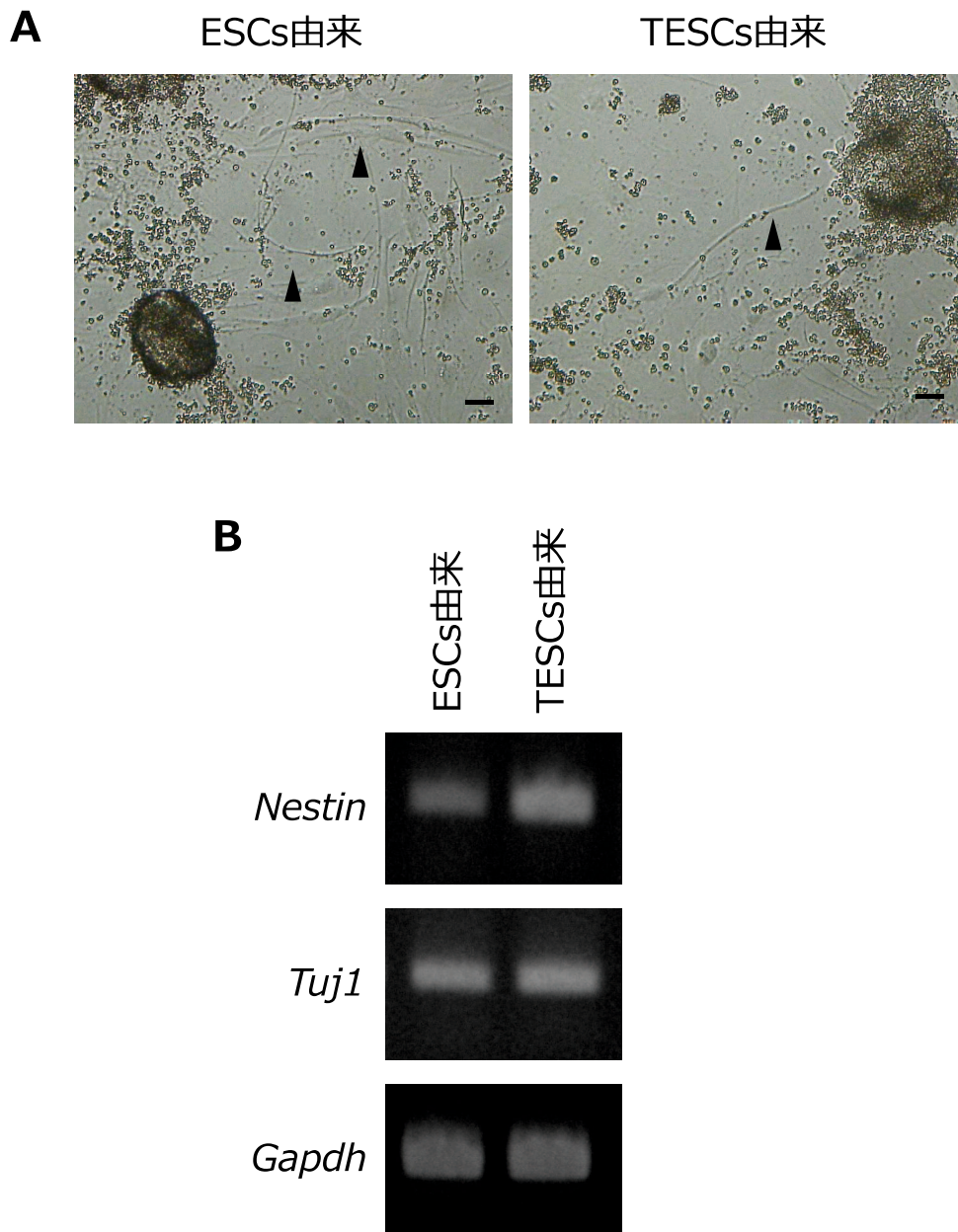


図4-6 神経系細胞への分化誘導

- (A) 神経系細胞への分化誘導後、14日目において観察を行った。矢頭：細胞塊から伸びる線維状の細胞 bar= 50 μ m
- (B) RT-PCRにより神経細胞マーカー遺伝子の発現を解析した。

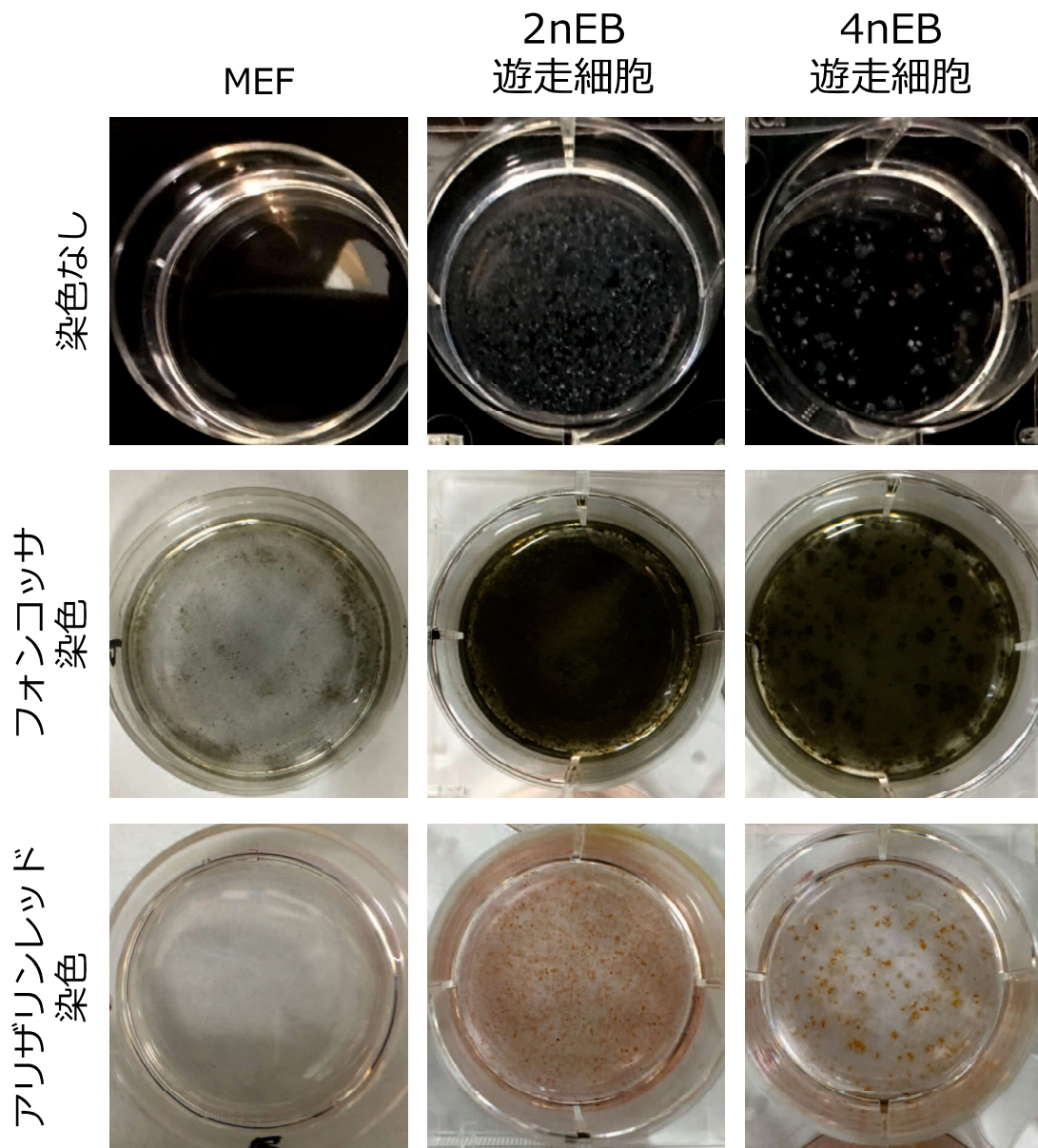
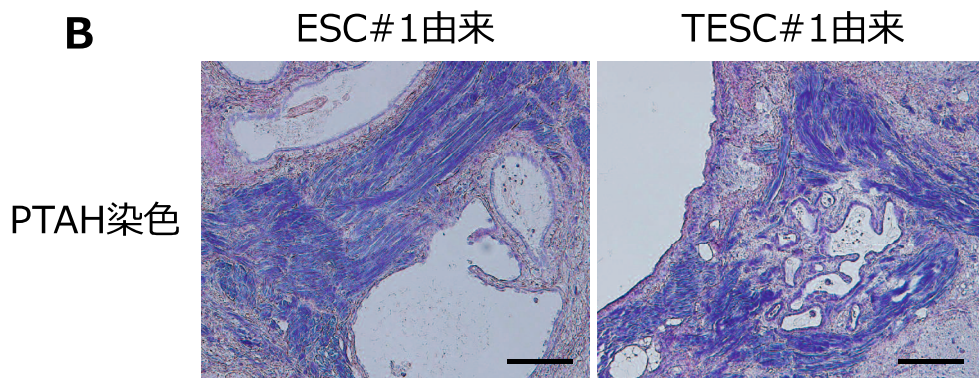
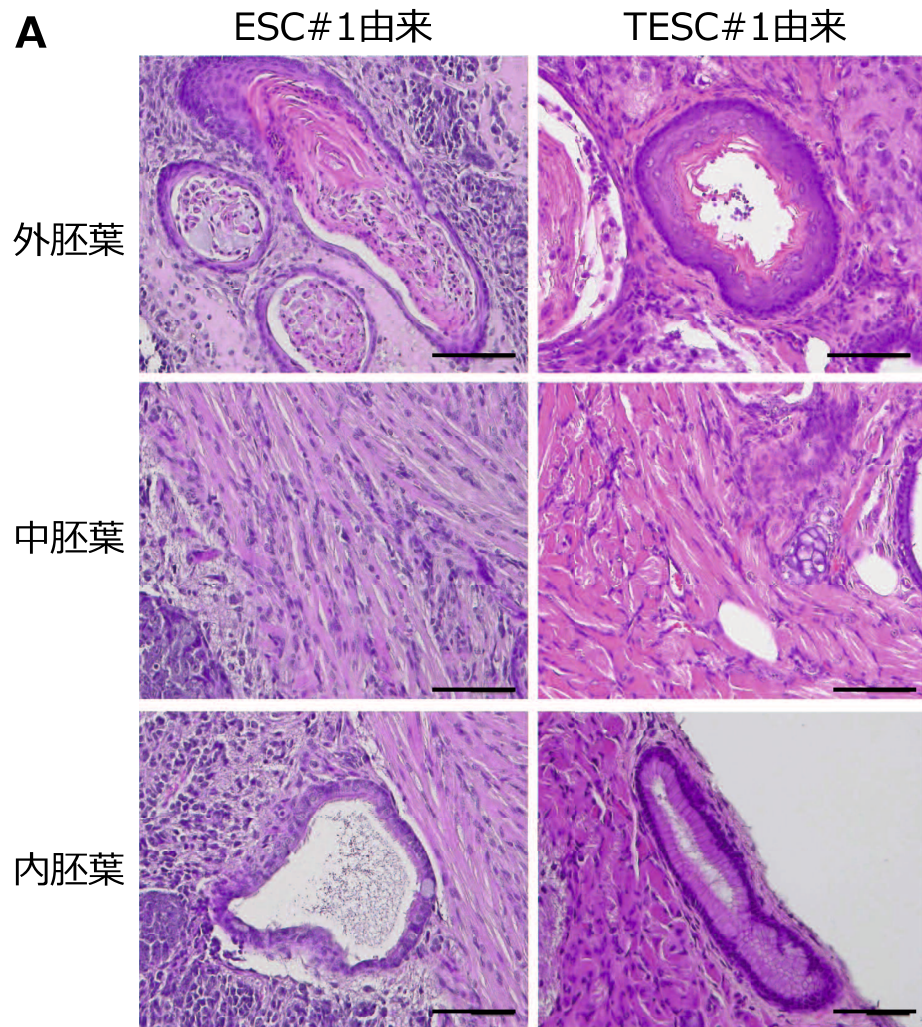


図4-7 骨細胞への分化誘導

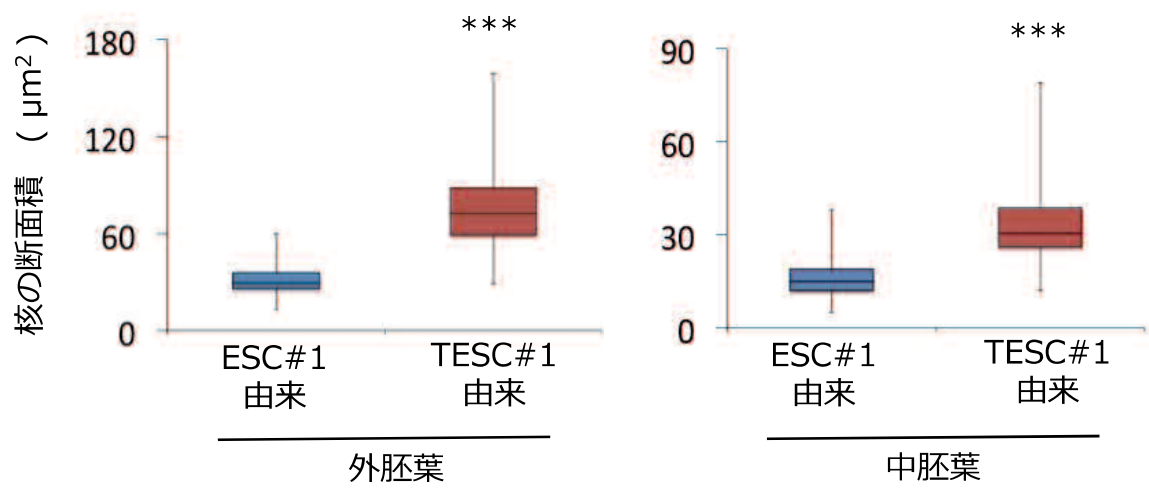
骨細胞への分化誘導開始後、14日目のコロニー像およびフォンコッサ染色、アリザリンレッド染色像を観察した。ネガティブコントロールとしてMEF(マウス胎子線維芽細胞)を用いた。

図4-8 テラトーマの解析

- (A) HE染色によりESC#1およびTESC#1由来のテラトーマの組織化学的解析を行った。それぞれ外胚葉性（上段）、中胚葉性（中段）、内胚葉性（下段）組織を示す。bar=100 μ m
- (B) PTAH染色によりESC#1およびTESC#1由来のテラトーマの組織化学的解析を行った。
bar=100 μ m
- (C) ESC#1およびTESC#1に由来するテラトーマに含まれる細胞の核の断面積を測定した。組織中の細胞の形態が類似した外胚葉性組織の角化上皮様構造および中胚葉性組織の骨格筋様構造における核の断面積を測定した。



C



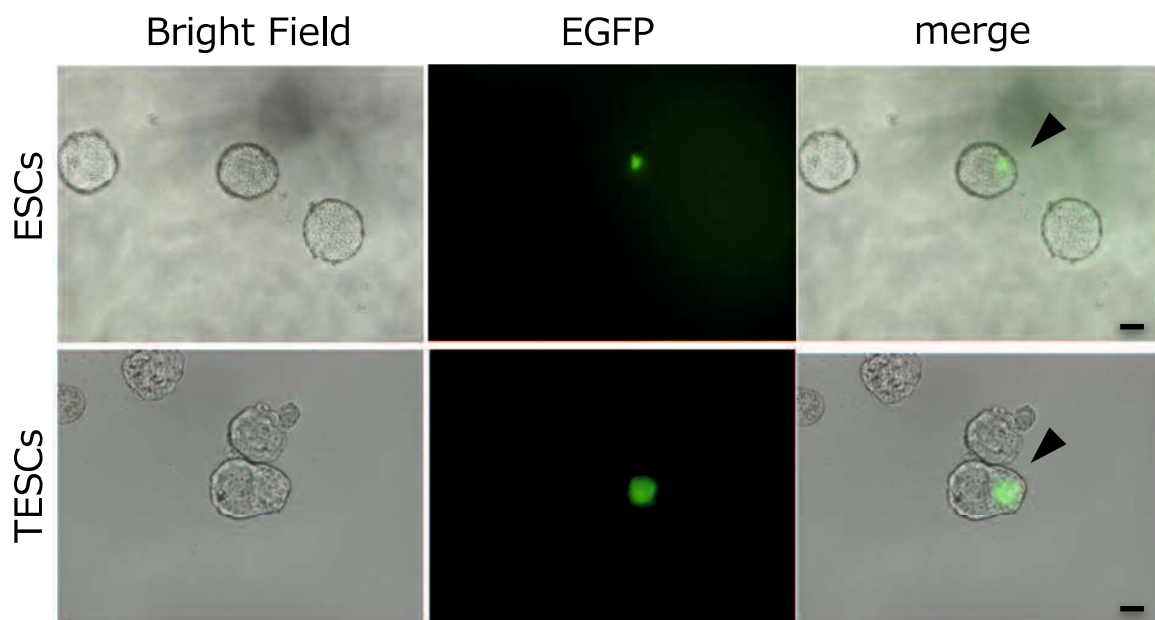
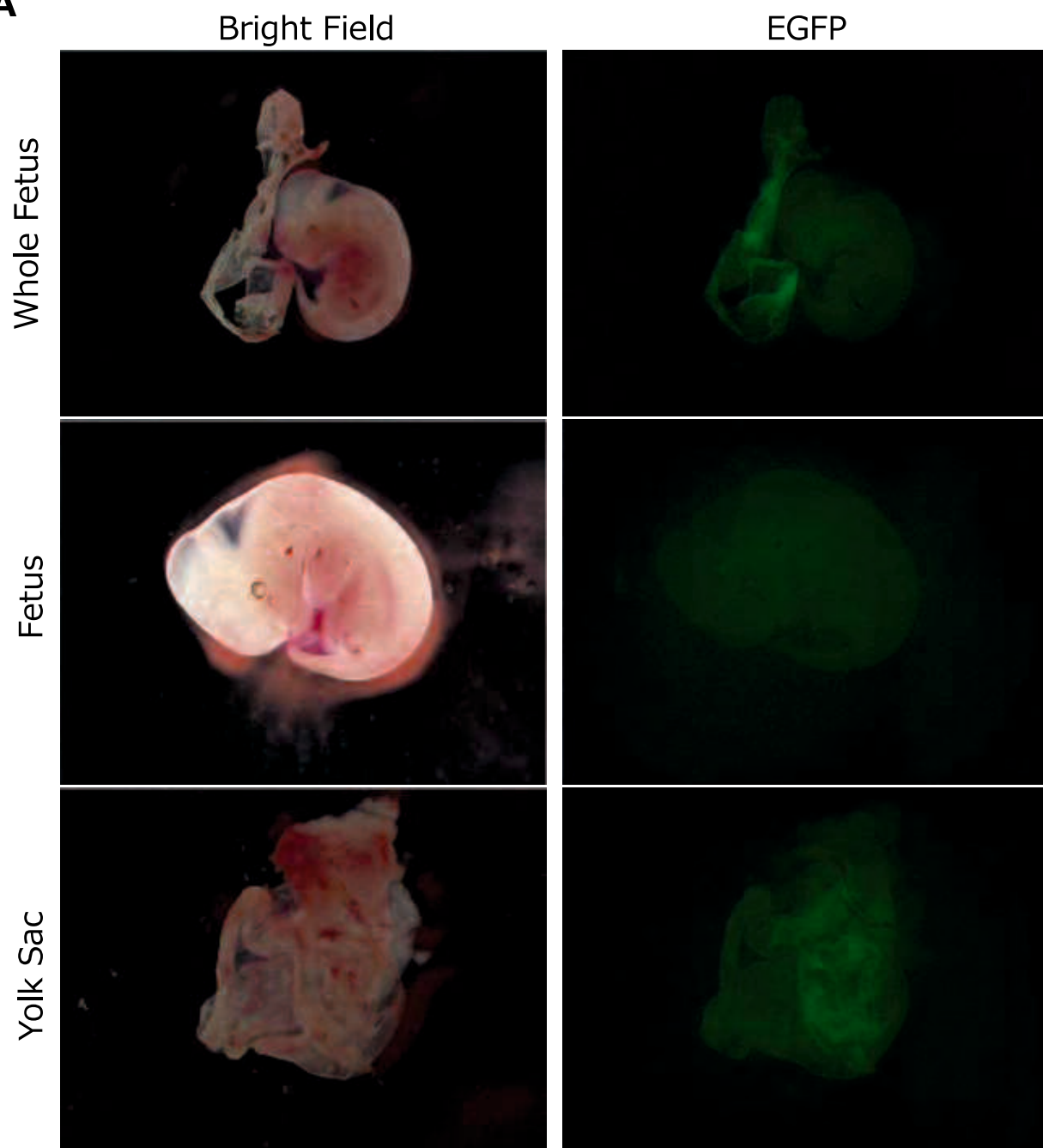


図4-9 初期キメラ胚の作出

EGFPを導入したESCsおよびTESCsを用いて作出した初期キメラ胚を観察した。矢頭：EGFP陽性細胞 bar= 50 μ m

A



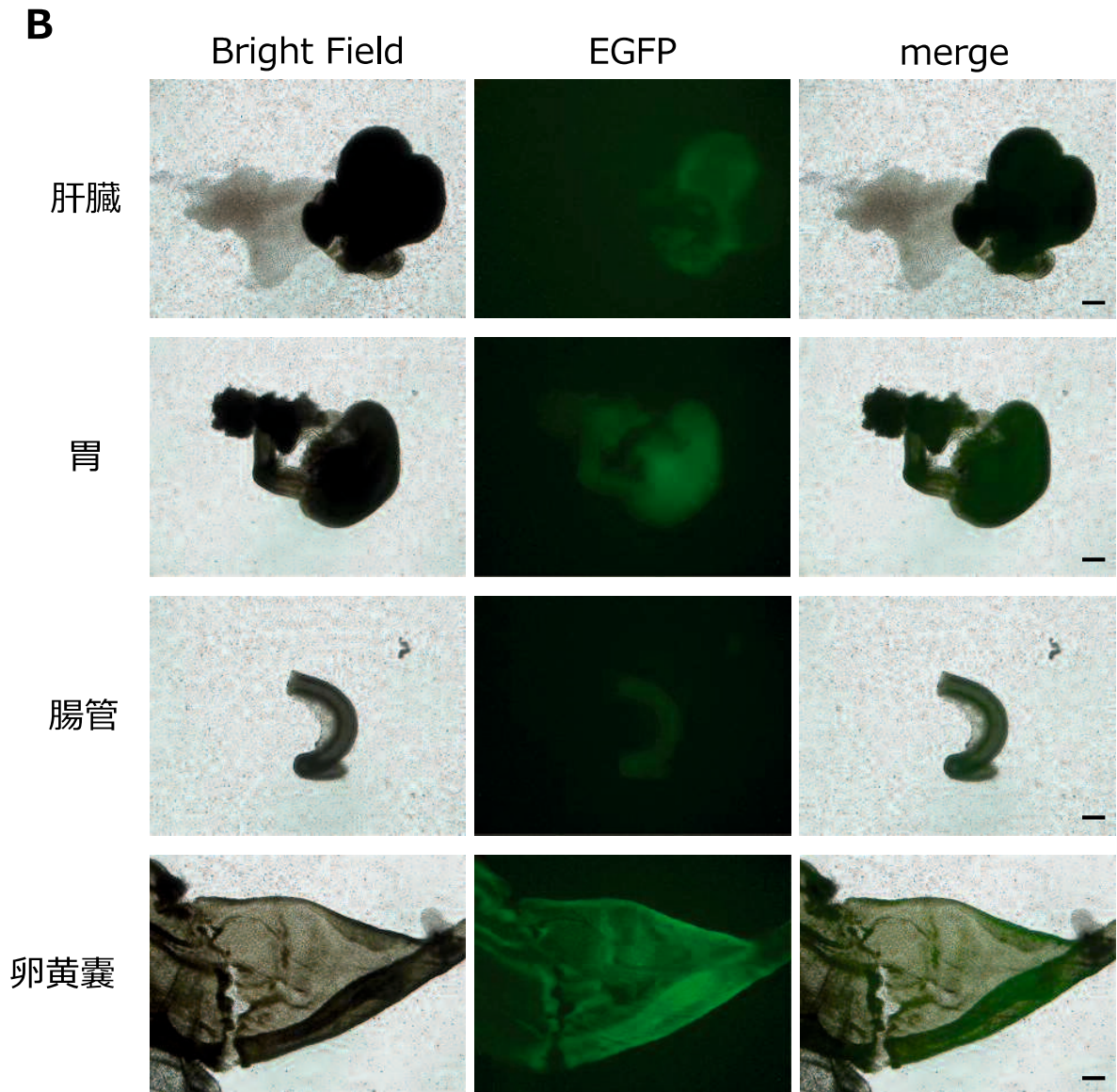


図4-10 12.5日齢におけるキメラ胎子

(A) EGFPを導入したTESCsを用いて作出した12.5日齢におけるキメラ胚を観察した。
 (B) 12.5日齢におけるキメラ胎子の臓器を分離し、個別に観察した。bar= 300 μ m

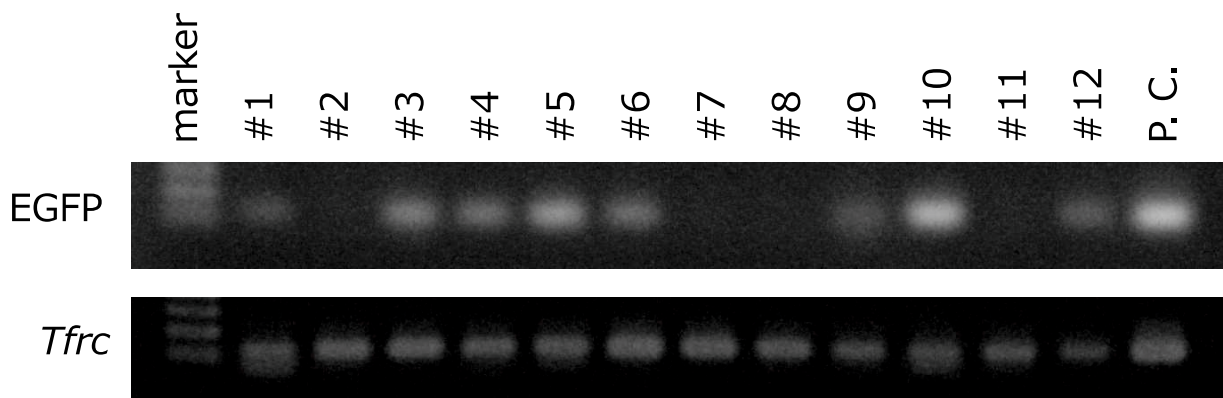


図4-11 キメリズムの判定

PCRにより胚組織から抽出したゲノムDNAを用いたキメリズムを判定した。
 P.C. : ポジティブコントロール

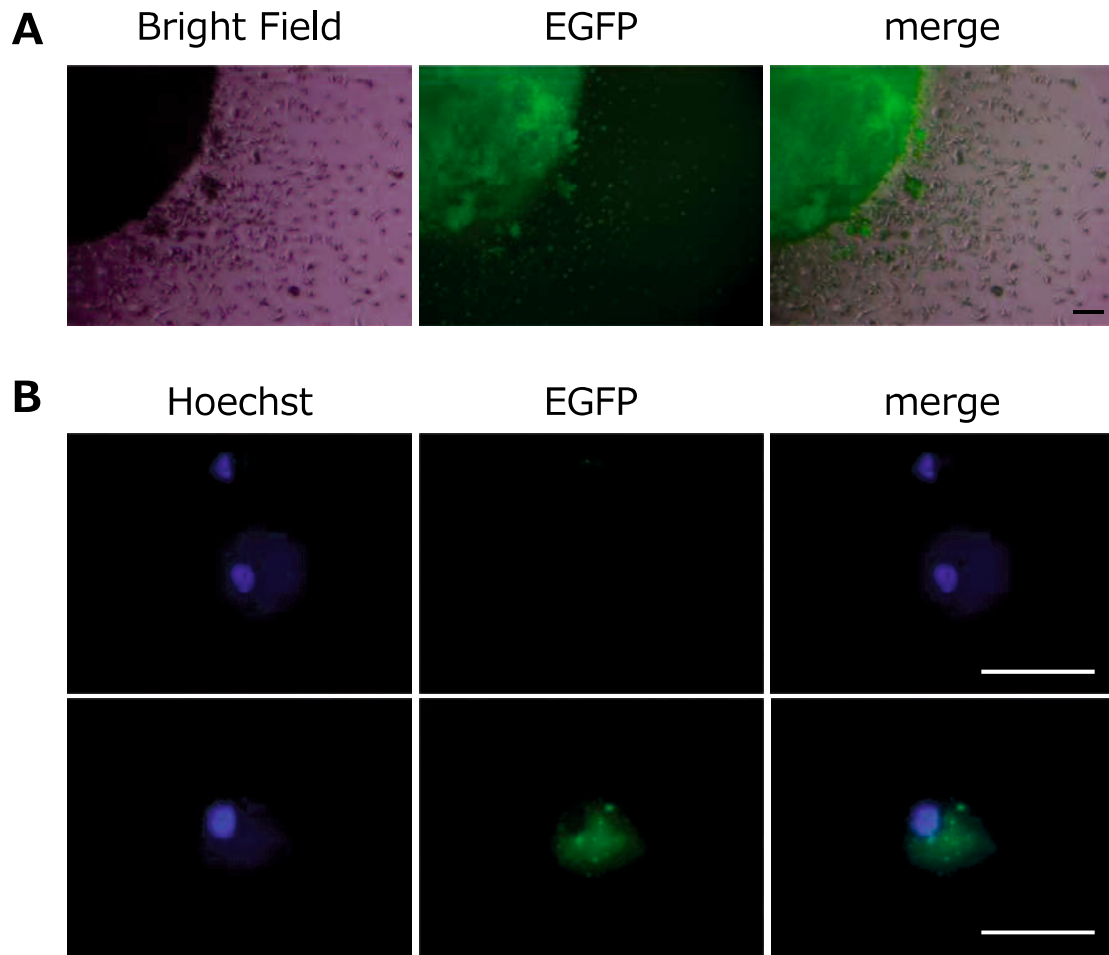


図4-12 培養したキメラ胎子組織片の観察

(A) 12.5日齢におけるキメラ胚組織片とその遊走細胞におけるEGFPの蛍光を観察した。bar=100 μm

(B) キメラ組織片の遊走細胞のサイトスピン標本における細胞を個別に観察した。bar= 50 μm

図4-13 キメラ胎子の蛍光免疫染色

- (A) 12.5日齢におけるキメラ胚組織切片の弱拡大で観察した。bar= 300 μ m
(B) 12.5日齢におけるキメラ胚組織切片における各組織の強拡大で観察した。それぞれ心臓、生殖腺、腸管、卵黄嚢を示す。bar= 50 μ m

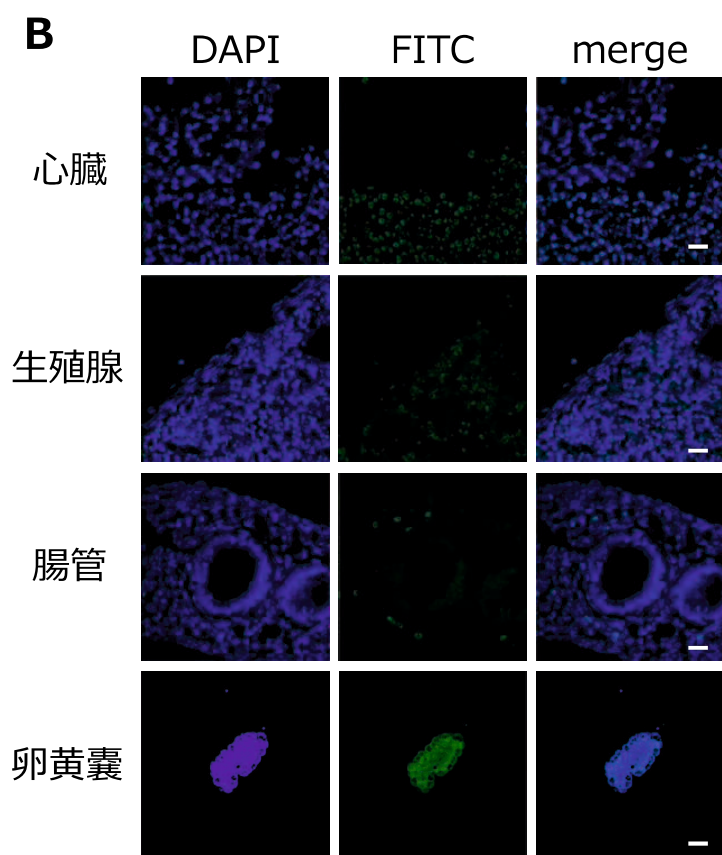
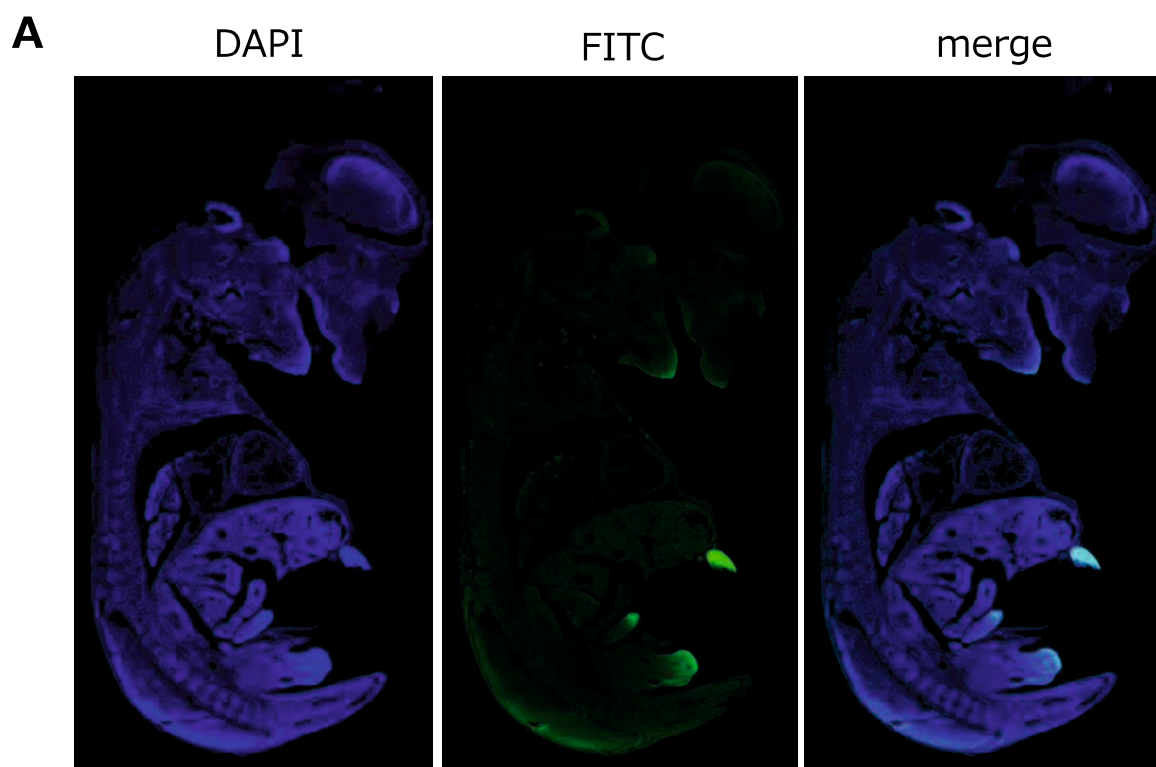


表4-1 RT-PCR条件

表5-2A 反応液組成

組成	容量 (μ L)
PrimeSTAR HS	5.0
10 μ M Primer F	0.2
10 μ M Primer R	0.2
cDNA	0.5
H ₂ O	4.1
total	10.0

表5-2B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	98 °C	30 秒	1
②	98 °C	10 秒	18
	72 °C	15 秒	
	(-1 °C/サイクル)		
	72 °C	30 秒	
③	98 °C	10 秒	17
	54 °C	15 秒	
	72 °C	30 秒	
④	72 °C	60 秒	1
⑤	15 °C	∞	1

表4-2 リアルタイムRT-PCR条件

表4-2A 反応液組成

組成	容量 (μ L)
Master Mix	5.0
10 μ M Primer F	0.2
10 μ M Primer R	0.2
cDNA	0.2
H ₂ O	4.4
total	10.0

表4-2B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	96 °C	15 分	1
	98 °C	30 秒	
②	60 °C	20 秒	45
	72 °C	20 秒	
③	95 °C	0 秒	1
	70 °C	15 秒	
	95 °C	0 秒	
④	40°C	30 秒	1
⑤	15 °C	∞	1

表4-3 PCR条件

表4-3A 反応液組成

組成	容量 (μ L)
50 mM MgCl ₂	0.475
10 μ M dNTP	0.5
10x buffer	1.0
10 μ M Primer F	0.5
10 μ M Primer R	0.5
Biotaq	0.1
Crezol Dye	2.5
H ₂ O	4.125
ゲノムDNA	0.2
total	10.0

表4-3B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	94 °C	3 分	1
	94 °C	30 秒	
②	Tm- 2 °C	45 秒	40
	72 °C	40 秒	
③	72 °C	3 分	1
④	15 °C	∞	1

表4-4 使用したプライマー

遺伝子		プライマー配列 (5'→3')
<i>Gapdh</i>	F	GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R	CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG
<i>Nestin</i>	F	AGGCGCTGGAACAGAGATTGGAAG
	R	TCCAGGTGTCTGCAAGCGAGAGTT
<i>Sox1</i>	F	GCCAAGACAGCGTGCCTTTGATTT
	R	CAATCTGCATCCCGGTTCACACAG
<i>Brachyury</i>	F	CATCGGAACAGCTCTCCAACCTAT
	R	GGTACCATTGCTCACAGACCAGAG
<i>Mixl1</i>	F	CGAGTCCAGGATCCAGGTGTGGTT
	R	ATCCGGAACGTGGTTCACATCTGC
<i>Acvr1</i>	F	GAGAAGTCATGGTTCAGGGAGAC
	R	GCAGCTAACCGTATCCAGAGTAGT
<i>Sox17</i>	F	CAGCATATGCAGGACCACCCCAAC
	R	CAGTCCCTGGCAGTCCCGATAGTG
<i>Hand1</i>	F	CTGCGCCTGGCTACCAGTTACAT
	R	GTGCGCCCTTTAATCCTCTTCTCG
<i>Elf5</i>	F	CTGGGAATGGCTCCAATTCTGCTG
	R	ACCTTGCGAGCGAATGTTCTGGAG
<i>Tuj1</i>	F	GATGTATGAAGATGATGACGAGGA
	R	GCAACATAAATACAGAGGTGGCTA
<i>Tfr</i>	F	GGTATGGAGAAAGCCTGAAGAG
	R	ACCACTCGCTACTCTCACTAT
<i>EGFP</i>	F	CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC
	R	CGGCGAGCTGCACGCTGCGTCCTC

第5章

異種4倍体多能性幹細胞の樹立とその応用

緒言

前章までにおいて、ゲノムの倍数性の変動がマウス胚性幹細胞の多能性および分化能に与える影響について解析および検討を行い、4倍体化することによって増殖速度は低下するものの、細胞レベルでは胚性幹細胞として基本的な多能性および多分化能を維持していることを明らかにした。本章ではゲノムの倍数性の変動を応用した新規技術開発の可能性について検討した。

ハイブリドーマは脾臓細胞とミエローマ細胞を人為的に融合させ、作出した倍数性の変動した多倍体細胞である (Köhler *et al.*, 1975)。このハイブリドーマの樹立方法の確立により、モノクローナル抗体を用いた医学・生命科学の研究が飛躍的に展開した。また、人為的に融合細胞を作出した例として、表現型の異なる2種類の細胞を融合され、遺伝学的スクリーニングを行う方法がある。不死化細胞株と線維芽細胞を融合することにより不死化の表現型の優勢/劣勢を判別し (Sugawara *et al.*, 1990)、不死化に関連する遺伝子座の特定が行われた (Delivee *et al.*, 1991)。また腫瘍細胞においては、体細胞と融合させることにより悪性度が抑制されるという報告もある (Harris *et al.*, 1969)。さらに、マウス胚性幹細胞とマウス線維芽細胞を融合させた融合細胞を解析したところ、多能性を維持していたという報告もある (Matveeva *et*

al., 2015)。この Matveeva らの報告においては、マウス胚性幹細胞とマウス線維芽細胞の融合細胞は多能性を維持しており、マウス線維芽細胞のゲノムの一部あるいは完全な初期化が起こる。さらに、マウス半数体胚性幹細胞とラット半数体胚性幹細胞を融合させ、異種二倍体多能性幹細胞の樹立に成功した報告も存在する (Li et al., 2016)。この報告においては、ラット胚性幹細胞の多能性維持の不完全性をマウス胚性幹細胞が融合し、補完する現象をもとに、ラット胚性幹細胞の安定的な維持培養に必要な分子の同定が行われている。これらの報告のように、哺乳類細胞における融合細胞の概念は以前から存在し、また、融合後の表現型についてもさまざまな解析がなされている。

本章では、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。

材料と方法

1. 培地および試薬の作成

LB 培地

トリプトン (Sigma) 10 g、イーストエキストラクト (日本 BD) 5.0 g および塩化ナトリウム (Wako) 5.0 g を蒸留水に溶かし、全量を 1 L とし、オートクレーブにより滅菌し、LB 培地として室温で保存した。

1 L の LB 培地に 100 mg/mL アンピシリンナトリウム (Sigma) を 1.0 mL 加え、アンピシリン添加 LB 培地として 4 °C で保存し、3 ヶ月以内に使用した。

1 L の LB 培地にアガー (日本 BD) 15 g を加え、攪拌し、オートクレーブにより滅菌した。攪拌しながら冷却し、100 mg/mL アンピシリンナトリウムを 1.0 mL 加え、シャーレへ分注し、固まるまで室温で静置し、アンピシリン添加 LB プレートとして 4 °C で保存し、3 ヶ月以内に使用した。

SOC 培地

トリプトン 20 g、イーストエキストラクト 5.0 g、塩化ナトリウム 0.5 g、塩化カリウム (Wako) 0.186 g を蒸留水に溶かし、水酸化ナトリウムを加えて pH を 7.0 に調

整し、オートクレーブにより滅菌した。滅菌後、1 M 硫酸マグネシウム 10 mL および 1 M 塩化マグネシウム 10 mL を加えて、-20 °C で保存した。

PBS 溶液

第 1 章材料と方法に記載した方法に従った。

PET (PBS-EDTA-Trypsin) 溶液

第 1 章材料と方法に記載した方法に従った。

DMEM 培養液

第 1 章材料と方法に記載した方法に従った。

ES 培養液

第 2 章材料と方法に記載した方法に従った。

0.2 % ゼラチン溶液

第 1 章材料と方法に記載した方法に従った。

電気融合用 e-hybri buffer 溶液

マンニトール(Sigma) 5.46 g を蒸留水に溶かし、1 M 塩化マグネシウムを 100 μ L および 1 M 塩化カルシウムを 100 μ L を加え、全量を 100 mL とした。0.2 μ m 径フィルター (Sartorius) を用いて濾過滅菌後、4 $^{\circ}$ C で保存した。

カルノア固定液

第 2 章材料と方法に記載した方法に従った。

3. レトロウイルスベクターの作成

大腸菌の形質転換とプラスミド抽出

プラスミドベクターの pCM-VSV-G および pMCs-puro は山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室および東京大学医科学研究所北村先生より分与されたものを用いた。

大腸菌 (DH5a) を氷上で融解し、プラスミド溶液を加え、氷上で 30 分間静置し、

42 °Cの温水中で 90 秒間ヒートショックし、直ちに 1 分間氷上に静置した。1.0 mL の SOC 培地に移し、37 °Cで振盪しながら 1 時間培養した。その後、アンピシリン添加 LB プレートに播種し、37 °Cで一晩培養した。形成されたコロニーを滅菌済爪楊枝で拾い、アンピシリン添加 LB 培地でさらに一晩培養した。その後培養液から 700 μ L とり、グリセロール 300 μ L と混和し、ストックとして-80 °Cで保存した。

プラスミドの抽出は、FastGene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス）を用いて付属プロトコルに従って行なった。抽出したプラスミドは NanoDrop2000（Thermofisher Scientific）により濃度および精製度を測定し、-20 °Cで保存した。

ウイルス液の作成

レトロウイルスのパッケージング細胞の Plat-GP 細胞は山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室より分与していただいたものを用いた。Plat-GP 細胞を 5.0 μ g/mL ブラストサイジン S 塩酸塩（Wako）添加 DMEM 培養液で培養した。培養した Plat-GP 細胞を 4.0×10^5 個となるように調整し 10 cm Dish（日本 BD）へ播種し一晩培養した。2.0 mg/mL ポリエチレンイミン 40 μ L と Opti-MEM（Gibco）960 μ L を、pCM-VSV-G 1.0 g および pMCs-puro 15.0 g と Opti-MEM 960 μ L をそれぞれ混合し、5 分静置

し、続いて両液を混合して、20 分静置した。その後、Plat-GP 細胞へ添加し、トランスフェクションした。4 時間後に培養液を除き、DMEM 培養液を加え、その 2 日後に培養上清を回収した。回収した培養上清は、0.45 μm 径フィルター (Sartorius) を通し、ウイルス液として -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

3. 各種細胞の樹立と培養

初代培養動物細胞の樹立と培養

動物の組織片を PBS 溶液中で洗浄し、クリーンベンチ内でトリミングを行い、再度 PBS 溶液中で洗浄した。その後、トリミングおよび洗浄済みの組織片をゼラチンコーティングした 24 ウェルプレート (Trueline) 上に静置し、DMEM 培養液中で培養した。組織片から遊走してくる細胞を確認し、適宜継代し、培養した。コンフルエントまで増殖した細胞は Culture Sure Freezing Medium (Wako) に懸濁し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

動物の組織片は山口大学共同獣医学部獣医解剖学研究室および生体システム科学研究室から分与していただいた。

樹立した細胞株を 10 cm Dish で培養し、DMEM 培養液 5.0 mL と前述の方法で作

成したウイルス液 1.0 mL を加え、ポリブレン (Hexadimethrine Bromide ; Sigma) を最終濃度 5.0 µg/mL となるように添加し、2 日間培養した。培養後、PBS 溶液で洗浄し、2.5 µg/mL ピューロマイシン (ナカライテスク) 添加 DMEM 培養液で 1 週間選択培養した。適宜継代し、ピューロマイシン耐性細胞株は Culture Sure Freezing Medium に懸濁し、-80 °C で保存した。

ギムザ染色による染色体標本の作成

初代培養動物細胞を培養し、コルヒチンを最終濃度 0.05 µg/ml となるように DMEM 培養液に添加した。5 - 8 時間静置し、PET 溶液を使って剥離し、1,000 rpm で 5 分間遠心し上清を捨て、1.0 % クエン酸ナトリウム水溶液に懸濁し、37 °C で 30 分間低張処理を行った。その後、カルノア固定液を加えて固定し、冷 50 %エタノール(-20 °C) に浸漬したスライドガラス上に展開し、風乾した。

風乾したスライドにギムザ染色を行い、得られた標本を観察した。

胚性幹細胞の培養

第 2 章材料と方法に記載した方法に従った。

融合細胞の作出と培養

培養した EGFP 発現胚性幹細胞と前述の方法で作成したピューロマイシン耐性細胞株を PET 溶液を用いて剥離し、1,000 rpm で5分間遠心し、上清を捨てた。それぞれ e-hybr buffer 溶液 500 μ L に懸濁し、ピューロマイシン耐性細胞株と EGFP 発現胚性幹細胞の懸濁液を 5 : 1 の割合で混合した。電気融合チャンバー (EG450-30BG ; バイオリサーチセンター) へ移し、電気融合装置 (LF301 ; ベックス) を用いて、50 V の交流電圧を 20 秒間通電してパールチェーンが形成されたことを確認し、400 V の直流電圧を 30 μ 秒間 0.5 μ 秒の間隔で 3 回通電した。通電後直ちに ES 培養液と混合し、ゼラチンコーティングした 35 mm Dish (Sumilon) へ播種し、培養した。培養後、2.5 μ g/mL ピューロマイシン添加 ES 培養液で 1 週間選択培養を行った。培養液は 2 日ごとに交換した。選択培養後、細胞の形態をオールインワン蛍光顕微鏡 Biozero (Keyence) で観察した。

4. 導入遺伝子の確認遺伝子発現解析

ゲノム DNA の抽出と PCR

ゲノム DNA の抽出は、Nucleospin TissueXS (Takara) を用いて付属プロトコルに従って行なった。抽出したゲノム DNA は、NanoDrop2000 により濃度を測定し、-20 °C または 4 °C で保存した。

iCycler (Biorad) および BIOTAQ (Bioline) を用いて表 5-1A および表 5-1B に記載した条件で PCR を行なった。プライマー配列は表 5-3A に示した。PCR 産物は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色を行い、観察した。

total RNA の抽出

第 1 章材料と方法に記載した方法に従った。

RT-PCR

抽出した total RNA を鋳型として、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて付属プロトコルに従って逆転写反応を行なった。得られた cDNA は -20 °C で保存した。

iCycler および PrimeSTAR HS (Takara) を用いて表 5-2A および表 5-2B に記載した条件で RT-PCR を行なった。プライマー配列は表 5-3B に示した。PCR 産物は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色を行い、観察した。

結果

1. 家畜および野生動物由来の線維芽細胞の培養と核型解析

まず、家畜および野生動物の皮下組織を培養し、組織片より遊走した線維芽細胞の培養を行った。ギムザ染色によりそれぞれの線維芽細胞の染色体標本を作成し、観察したところ、ウサギにおいて $2n = 46$ 本、ウシにおいて $2n = 60$ 本、シマウマにおいて $2n = 44$ 本の染色体セットが観察された（図 5-1A, B）。

さらにレトロウイルスベクターによりピューロマイシン耐性遺伝子の導入し、ピューロマイシン耐性細胞株の樹立を試みたところ、ウサギ、ウシ、シマウマの線維芽細胞から抽出したゲノム DNA においてピューロマイシン耐性遺伝子が検出された（図 5-2）。これらの細胞をピューロマイシン添加 DMEM 培養液中で培養し、選択培養を行ったのちに細胞融合の実験を行った。

2. マウス ESCs との融合細胞の作出と遺伝子発現解析

家畜および野生動物由来の線維芽細胞の体細胞の初期化を誘導するために、e-hybrid buffer 溶液中で電気刺激することにより EGFP 発現マウス ESCs とピューロマイシン

耐性家畜および野生動物由来線維芽細胞を融合し、選択培養により融合細胞株を樹立することを試みた (図 5-3)。

その結果、e-hybr buffer 溶液中において細胞同士が 1 列に整列した状態のパールチェーン形成が観察された (図 5-4A)。さらにピューロマイシンによる選択培養と EGFP の蛍光を指標として選択培養を行ったところ、ピューロマイシン耐性かつ EGFP を発現するドーム状のコロニーの形成が観察された (図 5-4B)。

これらの細胞において家畜および野生動物由来の線維芽細胞の体細胞が初期化されているかどうか調べるために、融合細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。本研究においてはデータベース上に公開されている配列が存在するウサギ線維芽細胞をその融合細胞について解析を行った。多能性マーカー遺伝子である *Oct3/4* について、その発現解析を行ったところ、融合細胞においてマウス ESCs と同様にマウス *Oct3/4* の発現が確認された。さらに、ウサギ *Oct3/4* について発現を解析したところ、融合細胞においてウサギ *Oct3/4* の発現も確認することができた (図 5-5)。

考察

本章では、細胞融合による多倍体化技術を応用してさまざまな動物種において体細胞の初期化が起こるか調べることを着目し、哺乳類細胞の多倍体化を引き起こすかどうかに着目し、哺乳類細胞の多倍体化に対する可塑性について検討を行った。マウス胚性幹細胞と家畜または野生動物の細胞の異種融合細胞の作出を行ったところ、naïve 型の胚性幹細胞様の細胞コロニーが出現し、ドナーのウサギの多能性マーカー遺伝子の発現も観察された。

細胞の融合後においては選択培養を行う必要があるが、本章では、蛍光標識と薬剤選択培養を組み合わせた方法を用いることとした。具体的には、EGFP 発現マウス (Okabe *et al.*, 1997) より樹立したマウス 2 倍体 ESCs (EGFP-ESCs) とピューロマイシン耐性遺伝子導入の線維芽細胞を用いて融合細胞を作出することとした。一般的な融合細胞であるハイブリドーマにおいては *Hprt* 遺伝子の欠損した細胞株を用いることで選択培養を行うことが知られている (Köhler *et al.*, 1975)。しかしながら本章においては、初代培養細胞である家畜および野生動物由来の線維芽細胞で均質な遺伝子欠損株を作出するのは困難であると考えた。また、細胞の追跡には蛍光タンパクなど標識遺伝子を導入する方法が知られている (Abe *et al.*, 2011) が、本章では、融合細胞の追跡

にあたり EGFP で標識した ESCs を用いるため蛍光タンパクによる二重標識をする必要がある。しかしながらセルソーターなどでの分取では、検出器への他方の蛍光波長の漏れこみが起こることが知られている (Kohsaka *et al.*, 2003)。これらの課題を克服するために選択培養として、マウス ESCs は EGFP を発現させた蛍光標識とし、一方家畜および野生動物由来の線維芽細胞はピューロマイシン耐性による薬剤選択を組み合わせた方法が最適であると考えた。

ピューロマイシン耐性遺伝子の導入は安定的に細胞株を維持するためにレトロウイルスベクターを用いた実験系 (Kitamura *et al.*, 1995) を用いて作出した。レトロウイルスベクターによりトランスダクションを行った細胞株から抽出したゲノム DNA の PCR を行なった結果、ピューロマイシン耐性遺伝子が検出され、ピューロマイシン耐性細胞株の作出に成功したと判断した。

動物細胞においては、細胞融合を行うことによってドナーの細胞の表現型をホスト細胞の表現型へ近づけることができることが知られ (Sugawara *et al.*, 1990)、例えば、現在では体細胞核のリプログラミングの手法として用いられている (Matveeva *et al.*, 2015)。また、細胞全体を融合するのではなく、プラスミドベクターなどにより必要な遺伝子のみを導入することで、ホストの細胞の表現型を大幅に変更すること

も可能である (Takahashi and Yanamana, 2006 ; Takanashi *et al.*, 2007 ; Sekiya and Suzuki, 2011)。体細胞の初期化機構については不明な点も多いが、解糖系の活性化や酸化的リン酸化を抑制することによってリプログラミング効率が上昇する

(Sone *et al.*, 2017) ことから、体細胞の初期化と細胞の維持に不可欠な代謝などが結びついている可能性が示唆されている。また、マウス細胞の初期化に必要な因子を哺乳類以外のニワトリやゼブラフィッシュなどの培養細胞に導入することで、部分的にニワトリやゼブラフィッシュの細胞の初期化が起こったとの報告がある (Rosselló *et al.*, 2013)。また、マウスおよびヒト以外のイヌやウシ、ウマなどの動物種における誘導多能性幹細胞 (iPS細胞) 樹立の報告もあるが (Baird *et al.*, 2015 ; Kawaguchi *et al.*, 2015 ; Nishimura *et al.*, 2017 ; Nagy *et al.*, 2011)、多能性維持が不安定であり、また、性状もマウスやヒトの多能性幹細胞と異なる (Peterson *et al.*, 2017)。これらのことからマウスやヒトのiPS細胞と対して他の動物種においては細胞の初期化の手法がまだ確立されていないことが示唆される。

また、多能性幹細胞はマウスにおける胚盤胞期胚の内部細胞塊およびヒトにおける着床後胚のエピブラストから樹立され、それぞれの発現遺伝子もそれらの由来する組織に相当しているとされている (Nichols *et al.*, 2009)。しかしながら、動物種ごとに胚盤

胞の形態には多様性が存在し、また胚盤胞期胚までの発生日数も異なる(谷口ら、2008)。

しかしながらマウスやヒト以外における多能性幹細胞の樹立の観点から、胚盤胞期胚の内部細胞塊や着床後胚のエピブラストといった胚発生と相同なステージについては検討されていない。そこで本章においては、naïve 型であるマウス多能性幹細胞を指標として、哺乳類細胞の融合細胞の作出および解析を行った。

本研究において作出したマウス ESCs とウサギ、ウシおよびシマウマの線維芽細胞の融合細胞において、マウス ESCs のコロニーと類似したドーム状のコロニーが観察された。この細胞はピューロマイシン存在下で淘汰されずに生存し、かつ EGFP の発現が観察されたため、マウス ESCs と家畜または野生動物の線維芽細胞の 2 種もの細胞株の融合細胞であると判断した。作出した融合細胞の遺伝子発現解析を行うにあたり、データベース上に公開されている遺伝情報の配列を参考にしたが、シマウマの配列は公開されていないため、本研究においては詳細な解析は困難であると判断した。また、今回の実験で用いたウシの線維芽細胞は山口県固有の無角和種という品種であり、データベース上に公開された配列と異なることが予想されたため、本章ではウサギ線維芽細胞を用いた融合細胞のみの遺伝子発現解析を行った。その結果、マウス ESCs とウサギ線維芽細胞の融合細胞においてマウス *Gapdh* およびウサギ *Gapdh* の発現が検出され、さら

に *Oct3/4* 遺伝子に関してはマウスとウサギ由来両方の *Oct3/4* の発現も確認された。すなわち、融合後のウサギ体細胞核からウサギの多能性マーカー遺伝子のウサギ *Oct3/4* が発現したことから、マウス胚性幹細胞の影響を受けることによりウサギ体細胞核の初期化が起こっている可能性が示された。今後、より多くの多能性マーカー遺伝子や初期分化マーカー遺伝子の発現を含めた発現遺伝子の網羅的な解析を行うことによってウサギの多能性の獲得やそれを維持するメカニズムが解明できることが期待される。

今後、さまざまな動物種においてデータベースへの配列の公開が進み、融合細胞の網羅的な解析が可能となれば、多倍体化した融合細胞の解析結果を応用し、細胞融合の過程を経ることなくさまざまな動物種における多能性幹細胞の樹立の基盤となることが予想される。また、ヒトにおける iPS 細胞などの多能性幹細胞は primed 型のみ樹立されてこなかったが、GSK3 β 阻害剤と MEL1/2 阻害剤に加えて、FGF2 を添加して培養することで naïve 型の多能性幹細胞を誘導した報告がなされた (Ware *et al.*, 2013)。このことから、マウスやヒト以外の動物種において naïve 型の多能性幹細胞をより安定的に維持する未知の因子が存在する可能性が示唆された。さらに近年、マウス多能性幹細胞を用いて生殖細胞の作出に成功した報告がなされ (Hayashi *et al.*, 2011 ;

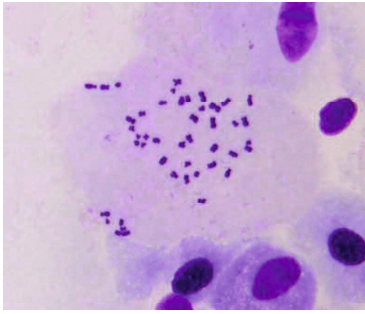
Hayashi *et al.*, 2012 ; Hikabe *et al.*, 2016)、iPS 細胞をはじめとする多能性幹細胞を用いて希少動物などの遺伝資源を確保する取り組みが知られている (Ben-Num *et al.*, 2011 ; Honda *et al.*, 2017)。これまで iPS 細胞の樹立が行われていない動物種において、異種の哺乳類の融合細胞を用いて多能性を維持するメカニズムが解明できれば、さまざまな動物種で iPS 細胞の樹立が可能となり、絶滅に瀕した動物種をはじめとした貴重な遺伝資源を維持できると可能性が広がると考える。

図5-1 ギムザ染色による染色体標本の解析

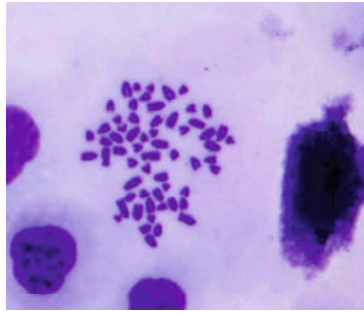
- (A) 樹立したウサギおよびウシ、シマウマの染色体標本のギムザ染色像を示す。
- (B) ギムザ染色した染色体標本のカウント結果を示す。

A

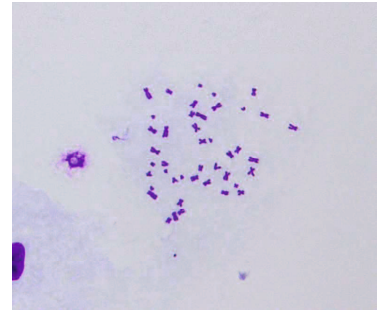
ウサギ



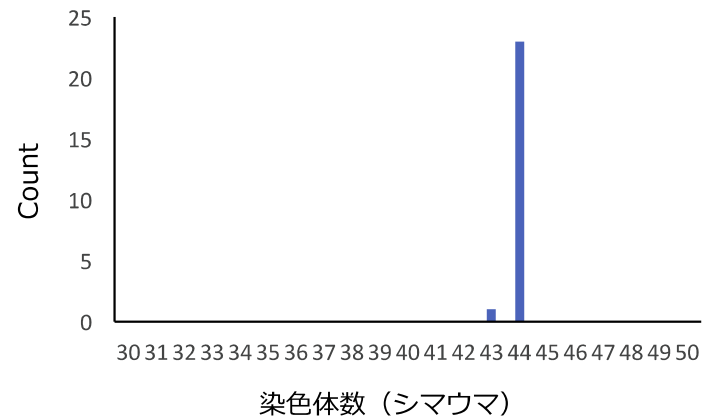
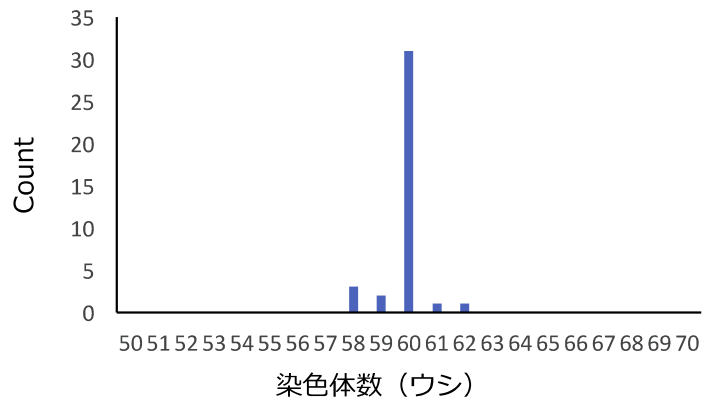
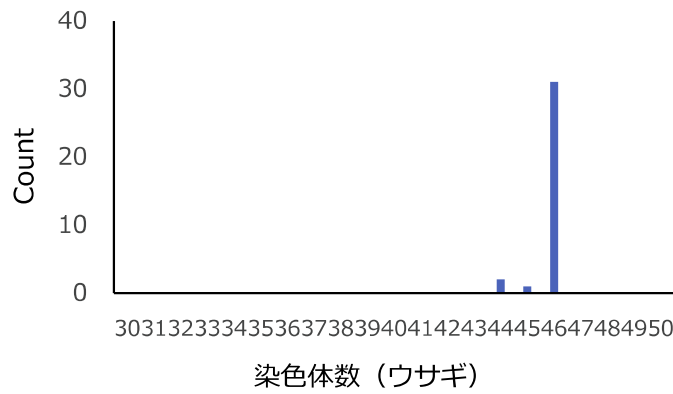
ウシ



シマウマ



B



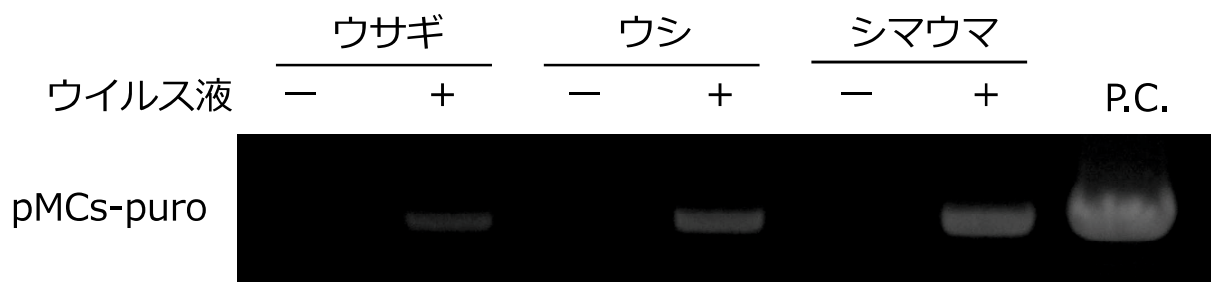


図5-2 ピューロマイシン耐性細胞株の樹立

ウイルス液を感染させた細胞から抽出したゲノムDNAを用いて、pMCs-puro遺伝子のジェノタイピングを行った。ポジティブコントロール (P.C.) としてpMCs-puroを用いた。

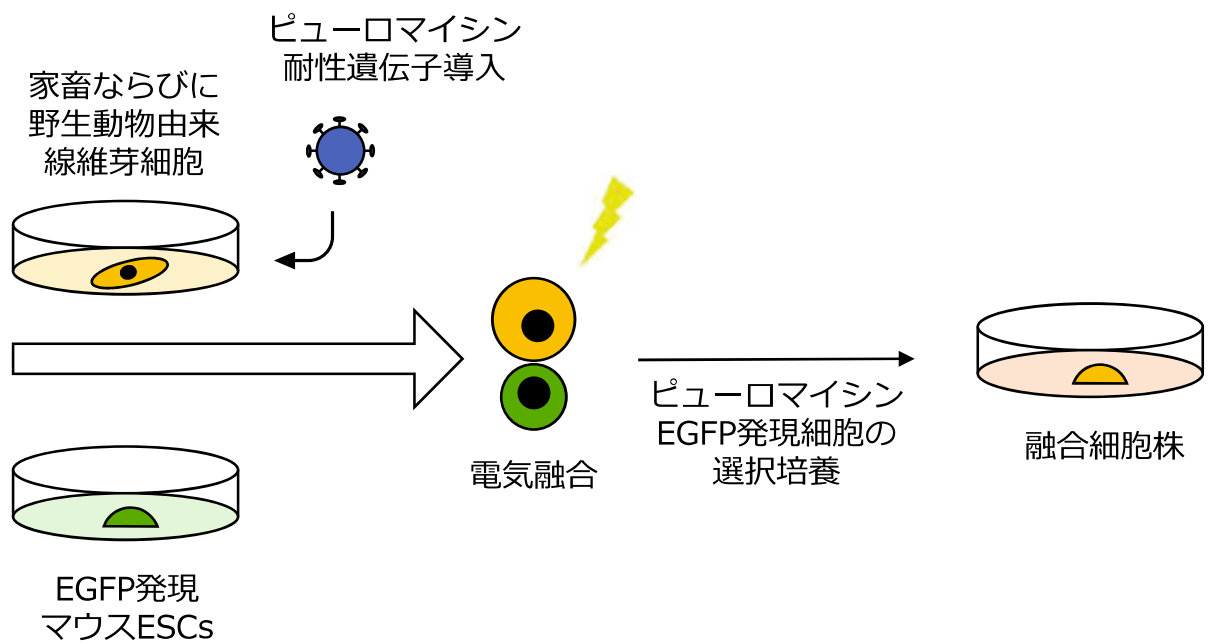


図5-3 融合細胞の作出方法の概略図

融合細胞の作出方法を示す。動物組織片由来の線維芽細胞にピューロマイシン耐性遺伝子を導入し、EGFP発現ESCsと電気融合した。さらに、ピューロマイシンおよびEGFP発現細胞の選択培養により融合細胞の分取した。

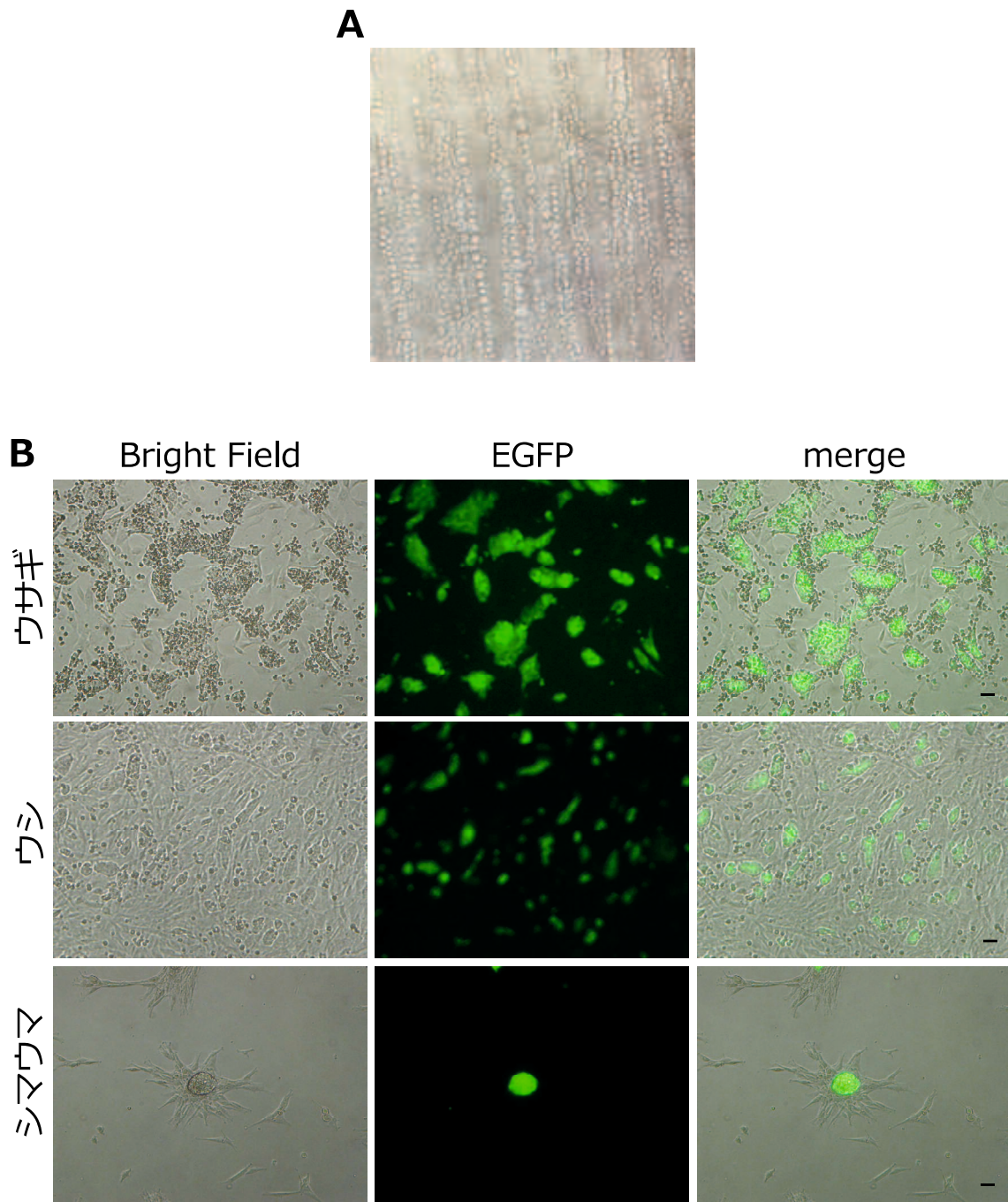


図5-4 融合細胞の樹立と培養

(A) 交流電流により線維芽細胞およびEGFP発現ESCのパールチェーン形成が形成された。

x40倍

(B) ピューロマイシンによる選択培養後、形成されたコロニーの細胞形態を観察した。それぞれウサギ、ウシ、シマウマとの融合細胞を示す。bar= 50 μ m

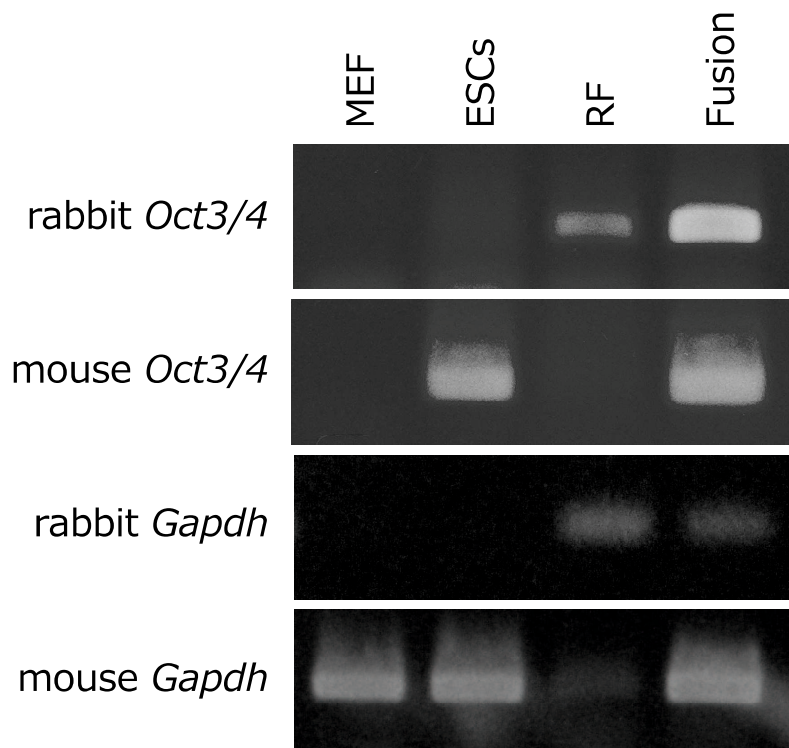


図5-5 RT-PCRによる遺伝子発現解析

RT-PCRによりマウスおよびウサギの*Oct3/4*、*Gapdh*遺伝子の発現を解析した。
 RF: ウサギ線維芽細胞。Fusion : ウサギ線維芽細胞とマウスES細胞の融合細胞

表5-1 PCR条件

表5-1A 反応液組成

組成	容量 (μ L)
50 mM MgCl ₂	0.475
10 μ M dNTP	0.5
10x buffer	1.0
10 μ M Primer F	0.5
10 μ M Primer R	0.5
Biotaq	0.1
Crezol Dye	2.5
H ₂ O	4.125
ゲノムDNA	0.2
total	10.0

表5-2B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	94 °C	3 分	1
②	94 °C	30 秒	35
	52 °C	45 秒	
③	72 °C	20 秒	1
	72 °C	1 分	
④	15 °C	∞	1

表5-2 RT-PCR条件

表5-2A 反応液組成

組成	容量 (μL)
PrimeSTAR HS	5.0
10 μM Primer F	0.2
10 μM Primer R	0.2
cDNA	0.5
H ₂ O	4.1
total	10.0

表5-2B PCR条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
①	98 °C	30 秒	1
②	98 °C	10 秒	18
	72 °C	15 秒	
	(-1 °C/サイクル)		
	72 °C	30 秒	
③	98 °C	10 秒	17
	54 °C	15 秒	
	72 °C	30 秒	
④	72 °C	60 秒	1
⑤	15 °C	∞	1

表5-3 使用したプライマー

表5-3A PCRに使用したプライマー

遺伝子		プライマー配列 (5'→ 3')
<i>pMCs</i>	F	CTAGACTGCCGGATCTAG
	R	CCTAACTGACACACATTCC

表5-3B RT-PCRに使用したプライマー

遺伝子		プライマー配列 (5'→ 3')
<i>rOct3/4</i>	F	TGCTACCCTGTACTCGCCAATG
	R	AACTTCACCTTCCCACCAACCAG
<i>mOct3/4</i>	F	GCATACGAGTTCTGCGGAGGGATG
	R	GGACTCCTCGGGAGTTGGTTCCAC
<i>rGapdh</i>	F	GAGAGCATCAGAGGAGGACGAG
	R	GAAGAGGGGCAGATTCTCAGC
<i>mGapdh</i>	F	GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R	CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG

総合考察

脊椎動物は多倍体化をうまく利用しながら進化したとされている（2R 仮説：Ohno, 1971）。多倍体化することによりゲノム量を増大させ、新たな機能の遺伝子を獲得したとされている（Panopoulou and Poustka, 2005）。現在この2R 仮説はゲノム解析の研究により支持されている。

しかしながら現存する哺乳類においては、多倍体胚は胚性致死となるため生存できず、多倍体個体は存在しない（Eakin *et al.*, 2005）。この一方、腫瘍組織においては多くの多倍体細胞が存在し、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の破綻に関与している（Zack *et al.*, 2013）。これらのことから哺乳類における多倍体細胞は、個体発生や組織構築などにおいて2倍体細胞とは異なる挙動を示すことが予想される。本論文においては、哺乳類における多倍体細胞の解析法の構築ならびにその特性の解析、さらには多倍体細胞を用いた応用の可能性を探ることを目的とした。

第1章では、マウス4倍体胚、8倍体胚および16倍体胚を作出し、2倍体胚と詳細な比較を行った。多倍体胚を作出する研究において、これまでの報告では8倍体胚までの作出に留まっており、16倍体胚を作出した研究は本研究が世界初であり、これまでに作出された哺乳類の中でも最大のゲノム量を有する多倍体胚である。1細胞あたり通

常のゲノム量の8倍量を有するにもかかわらず、全ての多倍体胚は卵割腔を有する胚盤胞期胚へ発生し、栄養膜細胞マーカーが発現していた一方、16倍体胚においては内部細胞塊が観察されなかった。しかしながら16倍体胚全体の細胞数を増加させるために集合16倍体胚を作出したところ、内部細胞塊の形成の復元が確認された。

マウスの胚盤胞形成においては、桑実胚期胚の細胞極性が重要であるという仮説(Inside-Outside 仮説)があり、多くの研究によりこの仮説は支持されている。1個の16倍体胚において内部細胞塊が形成されず、集合16倍体胚において内部細胞塊が形成されたのは複数胚の集合によってこの細胞極性を生じるに十分な胚を構成する細胞数が確保できたためであると考察できる。また、初期胚を構成する個々の細胞におけるゲノム量の変動に対し、マウス初期胚の形態形成は高い柔軟性を有しているものの、内部細胞塊を有する胚盤胞期胚の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。

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するために、マウス多倍体胚性幹細胞の樹立を試み、マウス4倍体胚性幹細胞(TEStCs: Tetraploid Embryonic Stem Cells)の樹立に成功した。この4倍体胚性幹細胞の解析にあたっては、コントロールとして2倍体胚性幹細胞を用いた。第2章では、樹立した4倍体胚性幹細胞の幹細胞とし

での性状について詳細に解析した。その結果、4 倍体胚性幹細胞はアルカリフォスファターゼ陽性の naïve 型のコロニー形態であり、かつ多能性マーカー遺伝子およびタンパクの発現が観察され、多能性マーカー遺伝子のプロモーター領域が低メチル化状態であった。4 倍体胚性幹細胞においては細胞増殖速度やゲノムのインプリンティング遺伝子のメチル化レベルにおいて違いはあるもの、2 倍体胚性幹細胞と同様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。

本研究と同様の方法で 4 倍体胚性幹細胞を作出した報告があるが (Horii *et al.*, 2015 ; Wen *et al.*, 2017)、どちらの報告においても本研究と同様に、倍数性の変動にかかわらず、多能性を維持していた。また、倍数性の変動による増殖速度の低下に関しても示されているが、その根本的な原因についてはまだ解明されていない。本研究における 2 倍体胚性幹細胞と 4 倍体胚性幹細胞においては各細胞周期の割合にも有意な差は見られず、また、過去の報告 (McGill *et al.*, 1992) や第 4 章の結果からも、倍数性の増大による細胞増殖速度の低下は胚性幹細胞のみに起こる現象ではないことから、ゲノム量の増大により細胞周期全体が一様に延長された可能性が考えられる。また、インプリンティング遺伝子において有意差が認められたが、近年の報告では胚性幹細胞を維持するために培養液に添加するサイトカインや小分子によって一部の DNA のメチル化

が消失することが報告されているなど (Yagi *et al.*, 2017)、DNA のメチル化と多能性維持に関してまだ不明なことが多い。本研究におけるインプリンティング遺伝子の発現の違いが倍数性の変動の影響によるものか、あるいは細胞株の樹立から解析までの細胞分裂の回数の違いによるものなのかについては不明であった。より詳細な解析を行うために、細胞分裂の回数を定量できるバイオマーカーの開発とそれを元にしたエピゲノムの解析が必要となると考える。

第3章では、1 個の 4 倍体胚から樹立した 4 倍体胚性幹細胞の均質性に着目し、倍数性の変動が細胞のサイズと 1 細胞あたりの遺伝子発現量に与える影響について解析を行った。その結果、マウス 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、また同時に 1 細胞あたりにおける遺伝子発現量も上昇していた。これらのデータについて数理的に解析を行ったところ、4 倍体胚性幹細胞の体積の増大した細胞内における mRNA 濃度は 2 倍体胚性幹細胞の細胞内の mRNA 濃度と同程度であることが明らかになった。これらの結果から哺乳類細胞においては、1 細胞あたりのゲノム量変動にもかかわらず、細胞内の RNA をはじめとする生体分子の濃度を一定に保つメカニズムの存在が示唆された。

これらのデータは細胞の大きさに関する遺伝学的スクリーニングにより同定された

Largen 遺伝子の解析によっても類似した結果が報告されている (Yamamoto *et al.*, 2014)。この遺伝子はゲノムの倍数性の変動には関与しないものの、細胞内における mRNA 翻訳を活性化させ、さらに 1 細胞あたりのサイズを増大させる機能を有する。細胞内における転写・翻訳の活性化により細胞のサイズが増大するのか、あるいは細胞のサイズの増大により転写・翻訳が活性化するのは未だ明らかになっていないものの、細胞内の恒常性を保つという点において、本研究における 4 倍体胚性幹細胞の細胞内の生体分子の濃度を一定に保つ機構において、Yamamoto らの報告と同様のメカニズムが機能していることが示唆される。1 細胞あたりのゲノム量が 2 倍体と 4 倍体では 2 倍の差があるにもかかわらず、細胞のサイズや 1 細胞あたりの遺伝子発現量は厳密に 2 倍と異なる原因は不明であり、透過型電子顕微鏡などを用いた細胞小器官や細胞内の超微細構造の解析をすることによって、細胞のサイズや遺伝子発現量を制御する機構について明らかになると考える。

第 4 章では、多能性を有するマウス 4 倍体胚性幹細胞を用いて、*in vitro* および *in vivo* において分化誘導を行った。その結果、*in vitro* において、ゲノム量が変動した 4 倍体胚性幹細胞からも複雑な分化過程をたどる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、*in vivo* において、4 倍体胚性幹細胞は分化した細胞で構

成された組織を含むテラトーマを形成し、さらに生体内においてはキメラ胎子の組織構築に寄与できることが明らかとなった。

これまでの研究から4倍体胚性幹細胞は胚様体テラトーマなどをはじめとする細胞の分化誘導は行われてきたが、分化誘導後の倍数性が維持されていることや、特定の細胞系譜への分化誘導を行った報告は本研究が初めてである。マウス4倍体胚性幹細胞は、培養液中のサイトカインや小分子に対して2倍体胚性幹細胞と同様に感受性を有し、さまざまな細胞系譜へ分化でき、また分化誘導後においても、分化誘導前と同様に4倍体細胞の細胞増殖能は2倍体細胞と比べて低いことが明らかとなった。

さらに生体内において胚発生へ寄与できるか調べるために、キメラ胚の作出を試みた。2倍体胚と4倍体胚性幹細胞のキメラ胚において、4倍体胚性幹細胞は胚盤胞期胚の内層細胞塊に寄与し、さらに胎子においてもホストの2倍体細胞に混在して組織を構築する能力を有していた。キメラ胚形成においては、ホストの胚とドナーの多能性幹細胞の動物種が必ずしも同種である必要はないこと (Isotani *et al.*, 2016 ; Kobayashi *et al.*, 2010 ; Masaki *et al.*, 2015)、また、胚性幹細胞の発現する接着因子が重要であることが知られていることから (Ohtsuka *et al.*, 2012)、異なる倍数性間のキメラ形成においても柔軟にキメリズムを受容することができることが予想された。キメラ形成能につ

いては一般的に定性的な解析がされており、ホストの胚とドナーの多能性幹細胞のそれぞれの細胞数や倍数性に着目した定量的な解析が今後必要であると考ええる。

以上第4章までの解析から、倍数性の変動した4倍体胚性幹細胞は2倍体胚性幹細胞とほぼ同等の多分化能を有することが明らかとなった。続いて第5章においては、動物種の異なる胚性幹細胞と体細胞の細胞融合により多倍体化を誘導することによって、融合した細胞の体細胞の初期化について解析し、哺乳類細胞の多倍体化における可塑性について検討した。その結果、マウス胚性幹細胞とウサギ、ウシおよびシマウマ由来の線維芽細胞のそれぞれの融合細胞において、naïve型の細胞コロニーの出現が観察された。また、ウサギとの融合細胞においてはウサギの多能性マーカー遺伝子の出現が確認できた。

ウサギをはじめ、家畜や野生動物の多能性幹細胞の作出方法ならびにその維持機構についてはあまり研究が進んでいないため、融合細胞において発現する遺伝子について網羅的な解析を行うことにより、ウサギに限らずそれぞれの動物種特有の多能性の獲得や維持に関する因子の同定が可能となり、さまざまな動物種における胚性幹細胞ならびに誘導多能性幹細胞（iPS細胞）の樹立の基盤となると考える。さらに、マウス多能性幹細胞のように *in vitro* で生殖細胞の分化誘導が可能な高品質な胚性幹細胞や iPS 細胞

の樹立が行うことができれば、絶滅に瀕した動物種や遺伝的に貴重な家畜などを *in vitro* において比較的容易にかつ低コストで維持できることが期待できる。

以上、本論文においては哺乳類における多倍体細胞の解析を行うために、まず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。さらにこの高い可塑性を応用することによって、さまざまな動物種における多能性細胞の構築とその維持機構の解明の可能性を示すことができた。著者はアフリカゾウ、キリンおよびサイが好きなので、これら絶滅に瀕した動物種の iPS 細胞株化などを含めた種の保存に微力でも役立てばそれに勝る喜びはない。

参考文献

- Abe T, Kiyonari H, Shioi G, Inoue K, Nakao K, Aizawa S, Fujimori T.** Establishment of conditional reporter mouse line at ROSA26 locus for live cell imaging. *Genesis*. 2011; 49: 579- 590
- Amano T, Jeffries E, Amano M, Ko AK, Yu H, Ko MSH.** Correction of Down syndrome and Edwards Dydrome aneuploidies in human cell cultures. *DNA Res*. 2015; 22 (5): 331- 342
- Baird AEG, Barsby T, Guest DJ.** Deriation of canine induced pluripotent stem cells. *Reprod Dom Anim*. 2015; 50: 669- 676
- Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang YC, Charte SJ, Laurent LC, Ryder OA, Loring JF.** Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature Methods*. 2011; 8 (10): 829- 833
- Berg H.** Biological implication of electric field effects. Part V. Fusion of blastomeres and blastocysts pf mouse embryos. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1987; 223- 228
- Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg Gunn P, Sun B,Lopes SMC, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund Richter L, Pedersen PA, Vallier L.** Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007; 448: 191- 196
- Burgress S.** Genomics: A matched set of frog sequences. *Nature*. 2017; 538: 320- 321
- Cambuli F, Murray A, Dean W, Dudzinska D, Kryeger F, Andrews S, Senner**

- CE, Cook SJ, Hemberger M.** Epigenetic memory of the first cell fate decision prevents complete ES cell reprogramming into trophoblast. *Nature Comm.* 2014; 5: 5538
- Cleveland BM, Weber GM.** Polyploidy effects on genes regulating growth mechanisms during fasting and refeeding in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Cell.* 2014; 382: 139- 149
- Davaadelger B, Shen H, Maki CG.** Novel roles for p53 in the genesis and targeting of tetraploid cancer cells. *PLoS ONE* 2014; 9: e110844
- Devilee P, van Vliet M, Bardoel A, Kievits T, Pearson PL.** Frequent somatic imbalance of marker alleles for chromosome 1 in human primary breast carcinoma. *Cancer Res.* 1991; 51 (3): 1020- 1025
- Dietrich JE, Hiragi T.** Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development.* 2007; 134: 4219- 4231
- Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Newell AEH, Lenzi ML, Olson S, Finegold MJ, Grompe M.** The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature.* 2010; 467: 707- 710
- Dyban A, Baranov V.** Cytogenetics of mammalian embryonic development. *New York : Oxford University Press.* 1987
- Eakin GS, Behringer RR.** Tetraploid development in the mouse. *Dev Dyn.* 2003; 228 (4): 751- 766
- Eakin GS, Hadjantonakis AK, Papaioannou VE, Behringer RR.** Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 2005; 228: 150- 159

- Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, Malley RO, Demers S, Vanhaelen Q, Shukalyuk AI, Schmauss G, Schramek D, Schnuetgen F, Melchner H, Ecker JP, Stanford WL, Zuber J, Stark A, Penninger JM.** Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell stem cell*. 2011; 9: 563- 574
- Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154– 156
- Finger DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J.** Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*. 2002; 16 (12): 1472- 1487
- Fujikawa-Yamamoto K, Luo X, Miyagoshi M, Yamagishi H.** DNA stable pentaploid H1 (ES) cells obtained from an octaploid cell induced from tetraploid cells polyploidized using demecolcine. *J Cell Physiol*. 2010; 223 (2): 369- 375
- Fujikawa-Yamamoto K, Miyagoshi M, Yamagishi H.** Dodecaploid H1 embryonic stem cells abolished pluripotency in L15F10 medium both with and without leukemia inhibitory factor. *Hum Cell*. 2013; 26 (3): 97- 104
- Fujikawa-Yamamoto K, Miyagoshi M, Yamagishi H.** Establishment of a tetraploid cell line from mouse H-1 (ES) cells highly polyploidized with demecolcine. *Cell prolifer*. 2007; 40 (3): 327- 337
- Gallardo MH, Bickham JW, Honeycutt RL, Ojeda RA, Köhler N.** Discovery of tetraploidy in mammal. *Nature*. 1999; 401 (6751): 341
- Graham C.** Virus assisted fusion of embryonic cells. *Acta Endocrinol Suppl*. 1971; 153: 154- 167

Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüß M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data.

Biotechniques 2006; 40: 173–177

Gundimeda SD, Ahmed F, Mundada MC, Rajappa SJ, Murthy SS. A near tetraploid clone in acute myeloid leukemia with CD56 expression. *J Cancer Res Ther.* 2014; 10: 187–190

Haraguchi S, Matsubara Y, Hosoe M. Chick embryos can form teratomas from microinjected mouse embryonic stem cells. *Develop Growth Differ.* 2016; 58: 194–204

Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature.* 1969; 223: 363–368

Harrison SE, Sozen B, Christodoulou N, Kyprianou C, Zernicka-Goetz M. Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science.* 2017; 356 (6334): eaal1810

Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primoedial germ cell-like cells in mice. *Science.* 2012; 10 (1126): 1-5

Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell.* 2011; 146: 519–532

Heier J, Takle KA, Hasley AO, Pelegri F. Ploidy manipulation and induction of alternate cleavage patterns through inhibition of centrosome duplication in the early zebrafish embryo. *Dev Dyn.* 2015; 244: 1300–1312

Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N,

- Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K.** Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*. 2016; 539: 299- 303
- Hirabayashi M, Tamura C, Sanbo M, Goto T, Kato-Itoh M, Kobayashi T, Nakauchi H, Hochi S.** Ability of tetraploid rat blastocysts to support fetal development after complementation with embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*. 2012; 79: 402- 412
- Hirate Y, Hirahara S, Inoue K, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H.** Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Current Biology*. 2013; 23: 1181- 1194
- Hirota T, Ohta H, Powell BE, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Saitou M, Turner JMA.** Fertile offspring from sterile sex chromosome trisomic mice. *Science*. 2017; 357 (6354): 932- 935
- Honda A, Choijookhuu N, Izu H, Kawano Y, Inokuchi M, Honsho K, Lee AR, Nabekura H, Ohta H, Tukiyaama T, Ohinata Y, Kuroiwa A, Hishikawa Y, Saitou M, Jogahara T, Koshimoto C.** Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered *Tokudaia osimensis*. *Sci Adv*. 2017; 3: e1602179
- Horii T, Yamamoto M, Morita S, Kimura M, Nagao Y, Hatada I.** p53 suppresses tetraploid development in mice. *Sci Rep*. 2015; 5: 8907
- Imai H, Fujii W, Kusakabe KT, Kiso Y, Kano K.** Effect of whole genome duplication on cell size and gene expression in mouse embryonic stem cells. *J Reprod Dev*. 2016; 62 (6): 571- 576

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*. 2015; 10: e0130585

Isotani A, Yamagata K, Okabe M, Ikawa M. Generation of Hprt-disrupted rat through mouse ← rat ES chimeras. *Sci Rep*. 2016; 6: 24215

James RM, Kaufman MH, Webb S, West JD. Electrofusion of mouse embryos results in uniform tetraploidy and not tetraploid/ diploid mosaicism. *Genet Res*. 1992; 60 (3): 185- 194

Jang HS, Hong YJ, Choi HW, Song H, Byun SJ, Uhm SJ, Seo HG, Do JT. Changes in parthenogenetic imprinting patterns during reprogramming by cell fusion. *PLoS ONE*. 2016; 11 (5): e0156491

Kaufman MH. Histological identification of primordial germ cells and differentiation of the gonads in homozygous tetraploid mouse embryos. *J Anat*. 1991; 179: 169- 181

Kaufman MH. Postcranial morphological features of homozygous tetraploid mouse embryos. *J Anat*. 1992; 180 (3): 521- 534

Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph*. 1983; 7: 249- 261

Kaufman MH, Webb S. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development*. 1990; 110 (4): 1121- 1132

Kawaguchi J, Kano K, Naito K. Expression profiling of tetraploid mouse

embryos in developmental stages using a cDNA microarray analysis. *J Reprod Dev.* 2009; 55 (6): 670- 675

Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, Imai H. Generation of naïve bovine induced pluripotent stem cells using PiggyBac transposition of Doxycyclin-inducible transcription factors. *PLoS ONE.* 2015; 10 (8): e 0135403

Kitamura T, Onishi M, Kinoshita S, Shibuya A, Miyajima A, Nolan GP. Efficient screening of retraviral cDNA expression libraries. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92: 9146- 9150

Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knissly AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell.* 2010; 142: 787-799

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256: 495- 497

Kohsaka T, Ogawa E, Koyama Y, Futamata Y, Tanaka S, Kuriki H, Kasahara T. Fluorochromes and antibodies in flow cytometry. *Cytometry Research.* 2003; 13 (1): 19- 24

Koizumi N, Fukuta K. Effect of insulin on in vitro development of tetraploid mouse embryos. *Exp. Anim.* 1996; 45 (2): 670- 675

Kondoh H, Takemoto T. Axial stem cells driving both posterior neural and mesodermal tissues during gastrulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22 (4): 374- 380

Korotkevich E, Niwayama R, Courtois A, Friese S, Berger N, Buchholz F,

- Hiiragi T.** The apical domain is required and sufficient for the first lineage segregation in the mouse embryo. *Dev cell.* 2017; 40: 235- 247
- Krivokharchenko A, Galat V, Ganten D, Bader M.** In vitro formation of tetraploid rat blastocysts after fusion of two-cell embryos. *Mol Reprod Dev.* 2002; 61 (4): 460- 465.
- Kruglova AA, Kizilova EA, Zhelezova AI, Gridina MM, Golubitsa AN, Serov OL.** Embryonic stem cell/ fibroblast hybrid cells with near tetraploid karyotype provide high yield of chimeras. *Cell Tissue Res.* 2008; 334 (3): 371- 380
- Kubiak JZ, Tarkowski AK.** Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res.* 1985; 157: 561–566.
- Kurosawa H.** Methods for induction embryoid body formation: In vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2007; 103 (5): 389- 398
- Leeb M, Wutz A.** Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 2011; 479: 131- 135
- Lei L, Guan N, Zu YN, Zhang QH, Shen JL, Jin LH.** Developmental pattern of hexaploid mouse embryos produced by blastomere fusion of diploid and tetraploid embryos at the 2-cell stage. *Zygote.* 2009; 17: 125- 130
- Li X, Cui XL, Wang JQ, Wang YK, Li YF, Wang LY, Wan HF, Li TD, Feng GH, Shuai L, Li ZK, Gu Q, Hao J, Wang L, Zhao XY, Liu ZH, Wang XJ, Li W, Zhou Q.** Generation and application of mouse-rat allodiploid embryonic stem cells. *Cell.* 2016; 164: 279- 292
- Lin CJ, Amano T, Zhang J, Chen YE, Tain XC.** Acceptance of embryonic stem

cells by a wide developmental range of mouse tetraploid embryos. *Biol Reprod.* 2010; 83: 177- 184

Lin M, Thorne MH, Martin ICA, Sheldon BL, Jones RC. Electron microscopy of the seminiferous epithelium in the triploid (ZZZ and ZZW) fowl, *Gallus domesticus*. *J Anat.* 1995; 186: 563- 576

Lin P, Lan X, Chen F, Yang Y, Jin Y, Wang A. Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis of the mouse uterus in the peri-implantation period. *PLoS ONE.* 2013; 8: e62462

Liu L, Czerwiec E, Keefe DL. Effect of ploidy and parent genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. *Gene Expr Patterns.* 2004; 4: 433- 441

López-Sánchez N, Frade JM. Genetic evidence for p75^{NTR}-dependent tetraploidy in cortical projection neurons from adult mice. *J Neurosci* 2013; 33: 7488– 7500

Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol* 2007; 7- 14

Manzanares M, Rodriguez TA. Development: Hippo signaling turns the embryo inside out. *Current Biology.* 2013; 23 (13): 559- 561

Marks H, Kalkan T, Menafra R, Denissov S, Jones K, Hofemeister H, Nichols J, Kranz A, Stewart AF, Smith A, Stunneberg HG. The transcriptional and epigenomic foundations of ground state. *Cell.* 2012; 149: 590- 604

- Martin GR.** Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*. 1980; 209 (4458): 768- 776
- Matveeva NM, Kizilova EA, Serov OL.** Generation of mouse chimeras with high contribution of tetraploid embryonic stem cells and embryonic stem cell-fibroblast hybrid cells. *Methods Mol Biol*. 2015; 1313: 61- 71
- Mcgill JR, Lallry PJ, Leach RJ, Johnson TJ, Von Hoff DD.** Chromosomal influence on hybrid cell proliferation. *Cell Prolif*. 1992; 25: 345- 355
- McFeely R.** Anueploidy, polyploidy, and structural rearrangement of chromosomes in mammals other than human. *Springer-Verlag*. 1969; 434- 444
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Matuyama M, Maeda M, Yamanaka S.** The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003; 113: 631- 642
- Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S.** Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotech*. 2009; 27 (8): 743- 746
- Masaki H, Kato-Itoh M, Umino A, Sato H, Hamanaka S, Kobayashi T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakauchi H.** Interspecific in vitro assay for chimera-forming ability of human pluripotent stem cells. *Development*. 2015; 142: 3222- 3230
- Modinski JA.** The feta of inner cell and trophoctoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. *Nature*, 1981; 292 (5821): 342-343

Morillo SM, Abanto EP, Román MJ, Frade JM. Nerve growth factor-induced cell cycle reentry in newborn neurons is triggered by p38^{MAPK}-dependent E2F4 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 2722– 2737

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passaged embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 8424- 8428

Nagy K, Sung HK, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Micheal LP, Smith LC, Nagy A. Induction pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev and Rep.* 2011; 7: 693- 702

Nelakanti RV, Kooreman NG, We JC. Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Cuur Protoc Stem Cell Biol.* 2016; 32 (4A. 8): 1- 17

Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 487– 492

Niemenko A. Induction of triploidy in mouse by cytochalasin B. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1975; 34 (2): 279- 289

Ninomiya N, Michiue T, Asashima M, Kurisaki A. BMP signaling regulates the differentiation of mouse embryonic stem cells into lung epithelial cell lineages. *In vitro Cell Dev Biol.* 2013; 49: 230- 237

Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Wijesekera DPH, Sanno K, Tanaka E, Sugiura K, Kawate N, Tamada H, Imai H. Feeder-independent canine induced pluripotent stem cells maintained under serum-free conditions. *Mol Reprod Dev.* 2017; 84: 329- 339

- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG.** Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000; 24: 372- 376
- Ohinata Y, Tsukiyama T.** Establishment of trophoblast stem cells under defined culture conditions in mice. *PLoS One.* 2014; 9 (9): e107308
- Ohta H, Sakaide Y, Yamagata K, Wakayama T.** Increasing the cell number of host tetraploid embryos can improve the production of mice derived from embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 2008; 79: 486- 492
- Ohtsuka S, Nishikawa-Torikai S, Niwa H.** E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS ONE.* 2012; 7 (9): e45220
- Ohno S.** Evolution by gene duplication. Berlin: *Springer- Verlag.* 1970
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y.** “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997; 407: 313- 319
- Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H.** Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/ progenitor cells. *Stem cell.* 2008; 26: 3086- 3098
- Ozler S, Ersoy AO, Oztas E, Topcu V, Celen S, Danisman N.** The unprecedented recurrent diploid/tetraploid mosaicism of trisomy-18 (mixoploidy; $4n+18/2n+18$): clinical report. *Am J Med Genet Part A.* 2015; 167: 1650- 1653
- Panopoulou G, Poustka AJ,** Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications – the adventure of hypothesis. *Trends Genet.* 2005;

21: 559- 567

Park MR, Hwang KC, Bui HT, Cho SG, Park C, Song H, Oh JW, Kim JH.

Altered gene expression profiles in mouse tetraploid blastocysts. *J Reprod Dev.* 2012; 58 (3): 344- 352

Park MR, Lee AR, Bui HT, Park C, Park KK, Cho SG, Song H, Kim JH, Nguyen

VT, Kim JH. Chromosome remodeling and differentiation of tetraploid embryos during preimplantation development. *Dev Dyn.* 2011; 240 (7): 1660-1669

Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL. Isolation of

embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev. Boil.* 1990; 141 (2): 344- 352

Peterson YZ, Kafarnik C, Guest DJ. Characteriaztion of companion animal

pluripotent stem cells. *Cytometry Part A.* 2017; 00A: 00- 00

Piferrer F, Beaumont A, Falfulere JC, Flajshans M, Haffray P, Colombo L.

Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture.* 2009; 293: 125- 156

Rungsiwiwut R. Numchaisrika P, Ahnonkitpanit V, Virutamasen P,

Pruksananonda K. Triploid human embryonic stem cells derived from tripronuclear zygotes displayed pluripotency and trophoblast differentiation ability similar to the diploid human embryonic stem cells. *J Reprod Dev.* 2016. 62 (2): 167- 176

Rossant J, Moens CB, Nagy A. Genome manipulation in embryonic stem cells.

Phil Trans R Soc Lond B. 1993; 339 (1288): 207- 215

Rosselló RA, Chen CC, Dai R, Howard JT, Hochgeschwender U, Jarvis ED.

Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species. *elife*. 2013; 2: e00036

Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like

cells by defined factors. *Nature*. 2011; 475: 390- 395

Selmecki AM, Maruvka Y, Richmond PA, Guillet M, Shores N, Sorenson

AL, De S, Kishony R, Michor F, Dowell R, Pellman D. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature*. 2015; 519: 349- 369

Smits K, Goossens K, Van Soom A, Govaere J, Hoogewijs M,

Vanhaesebrouck E, Galli C, Colleoni S, Vandesompele J, Peelman L.

Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine *in vivo* and fresh and frozen-thawed *in vitro* blastocysts. *BMC Res Notes* 2009; 2: 246

Sone M, Morone N, Nakamura T, Tanaka A, Okita K, Woltjen K, Nakagawa

M, Heuser JE, Yamada Y, Yamanaka S, Yamamoto T. Hybrid cellular metabolism coordinated by *Zic3* and *Esrrb* synergistically enhances induction of naive pluripotency. *Cell Metabolism*. 2017; 25: 1103-1117

Sugawara O, Oshimura M, Koi M, Annab LA, Barrett JC. Induction of cellular

senescence in immortalized cells by human chromosome1. *Science*. 1990; 247 (4943): 707- 710

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse

embryonic and adult fibroblast culture by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663- 676

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K,

Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human

fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861- 872

Takahashi S, Kobayashi S, Hiratani I. Epigenetic differences between naïve and primed pluripotent stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 13

Takahashi S, Lee J, Kohda T, Matsuzawa A, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *Development*. 2014; 141: 3842- 3847

Takemoto T, Uchikawa M, Yoshida M, Bell DM, Lovell-Badge R, Papaioannou VE, Kondoh H. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature*. 2011; 470 (7334): 394- 398

Tanaka H, Goto H, Inoko A, Makihara H, Enomoto A, Horimoto K, Matsuyama M, Kurita K, Izawa I, Inagaki M. Cytokinetic failure-induced tetraploidy develops into aneuploidy, triggering skin aging in phosphovimentin-deficient mice. *J Biol Chem* 2015; 290: 12984– 12998

Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 1998; 282: 2072- 2075

Tang C, Weissman IL, Drukker M. The safety of embryonic stem cell therapy relies teratoma removal. *Oncotarget*. 2012; 3 (1): 7-8

Tarkowski AK, Witkowska A, Opas J. Development of cytochalasin B induced tetraploid and diploid/ tetraploid mosaic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1977; 41: 47- 64.

Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007; 448: 196-199

- Toyooka Y, Oka S, Fijimori T.** Early preimplantation cells expressing Cdx2 exhibit plasticity of specification to TE and ICM lineages through positional changes. *Dev Biol.* 2016; 411: 50-60
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW.** Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003; 422: 901– 904
- Von Hoff DD, Forseth B, Clare CN, Hansen KL, VanDevanter D.** Doubling minutes arise from circular extrachromosomal DNA intermediates which integrate into chromosomal sites in human HL-60 leukemia cells. *J Clin Invest.* 1990; 85 (6): 1887- 1895
- Wang ZQ, Kiefer F, Urbanek P, Wagner EF.** Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev.* 1997; 62: 137- 145
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya Y, Takahashi JB, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y.** A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnol.* 2007; 25 (6): 681- 686
- Ware CB, Melson AM, Meham B, Hesson J, Zhou W, Jonlin EC, Jimenez-Caliani AJ, Deng X, Cavanaugh C, Cook S, Tesar PJ, Okada J, Margaretha L, Sperber H, Choi M, Blau CA, Treuting PM, Hqwkins RD, Cirulli V, Ruohala-Baker H.** Derivation of naïve human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2014; 111 (12): 4484- 4489
- Weidgang CE, Suefferlein T, Kleger A, Mueller M.** Pluripotency factors on their lineage move. *Stem Cell International.* 2015; 6838253.
- Wen B, Li R, Cheng K, Li E, Zhang S, Xiang J, Wang Y, Han J.** Tetraploid embryonic stem cells can contribute to the development of chimeric fetuses

and chimeric extraembryonic tissues. *Sci Rep.* 2017; 7: 3030

Wen D, Saiz N, Rosenwaks Z, Hadjantonakis AK, Rafii S. Completely ES cell-derived mice produced by tetraploid complementation using inner cell mass (ICM) deficient blastocysts. *PLoS ONE.* 2014; 9 (4): e94730

Wu BJ, Zhao LX, Zhu CC, Chen YL, Wei MY, Bao SQ, Sun SC, Li XH. Altered apoptosis/ autophagy and epigenetic modifications cause the impaired postimplantation octaploid embryonic development in mice. *Cell Cycle.* 2017; 16 (1): 82- 90

Yagi M, Kishigami S, Tanaka A, Semi K, Mizutani E, Wakayama S, Wakayama T, Yamamoto T, Yamada Y. Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. *Nature.* 2017; 548: 224- 227

Yamamoto K, Gandin V, Sasaki M, McCracken S, Li W, Silvester JL, Elia AJ, Wang F, Wakutani Y, Alexandrova R, Oo YD, Mullen PJ, Inoue S, Itsumi M, Lapin V, Haight J, Wakeham A, Shahinian A, Ikura M, Topisirovic I, Sonenberg N, Mak TW. Largin: a molecular regulator of mammalian cell size control. *Mol Cell.* 2014; 53: 904- 915

Yamazaki W, Amano T, Bai H, Takahashi M, Kawahara M. The influence of polyploidy and genome composition on genomic imprinting in mice. *J Biol Chem.* 2015; 291 (40): 20924- 20931

Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. A novel regulator of cardiomyogenesis in pluripotent embryonic cells. *Biochem J.* 2011; 437: 345- 355

Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic

stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotech.* 2003; 21: 183- 186

Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morena L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 2008; 453 (7194): 519- 523

Yu F, Zhong H, Liu G, Liu S, Zhang Z, Zhou Y, Tao M, Liu Y. Characterization of vasa in the gonads of different ploidy fish. *Gene.* 2015; 574: 337-344

Zack TI, Schumacher SE, Carter SL, Cherniack AD, Saksena G, Tabak B, Lawrence MS, Zhsng CZ, Wala J, Mermel CH, Sougnez C, Gabriel SB, Hernandez B, Shen H, Laird PW, Getz G, Meyerson M, Beroukhim R. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet.* 2013; 45: 1134– 1140

Zhang K, Li L, Huang C, Shen C, Tan F, Xia C, Liu P, Rossant J, Jing N. Distinct functions of BMP4 during different stages of mouse ES cell neural commitment. *Development* 2010; 137: 2095–2105

Zhou Y, Wang M, Hiang M, Peng L, Wan C, Liu J, Liu W, Zhao R, Zhao X, Hu W, Liu S, Xia Y. Autotetraploid cell line induced by SP600125 from crucian carp and its developmental potentiality. *Sci Rep.* 2016; 6: 21814

谷口和之、木曾康郎、佐藤英明（監修）、McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT.（著） 獣医発生学 学窓社 2008

中辻憲夫（監修）、末盛博文（編集）、松本佳久、池谷 真、戸田口淳也（著） 実験医学別冊 ES・iPS 細胞実験スタンダード 羊土社 2104

丹羽仁史 幹細胞の多能性を規定する分子機構 融合領域レビュー 2012; 1: e008

謝辞

本論文を作成するにあたり、学部学生時代より自由な発想の元での実験、懇切丁寧な研究のご指導ならびに本論文のご校閲を賜りました獣医解剖学研究室加納聖先生に心より感謝申し上げます。また、本研究に対して、多大なるご指導ならびにご助言をいただきました獣医解剖学研究室木曾康郎先生ならびに日下部健先生に深く感謝いたします。さらに実験材料の提供および一部の解析をいただいた東京大学応用遺伝学研究室の藤井渉先生、宮崎大学機能生化学研究室の西野光一郎先生、脇谷晶一先生、高澤健先生に感謝いたします。

また、研究室データゼミで活発な議論をし、自由な発想に基づいたさまざまなアイデアを賜りました小杉七草さんをはじめ、支えてくれた研究室の方に感謝いたします。さらに学部学生時より大学生活の多くの場面で登場し、研究生活を味わい深いものにしてくれた米満研三さんをはじめ、関わってくれた友人に感謝いたします。

最後にこれまでさまざまな方面で応援していただいた両親に心より感謝し謝辞とさせていただきます。