

哺乳類における多倍体化培養細胞

今井，啓之
九州大学大学院医学研究院実験動物学分野

<https://doi.org/10.15017/2544167>

出版情報：九州大学低温センターだより．13，pp.2-5，2019-03．九州大学低温センター
バージョン：
権利関係：



哺乳類における多倍体化培養細胞

今井啓之

九州大学 医学研究院 実験動物学分野

はじめに

医学や農学などの生物学分野において、細胞試料の保存は実験の再現性・バイオリソースの保存において重要である。凍結保存は-80℃の冷凍庫や液体窒素が用いられる。一般的な保存方法として、培養液に 10%となるように DMSO (Dimethyl Sulfoxide) を添加した保存液を用いて、凍結チューブ内で保存する。氷晶形成を抑えて細胞膜を保護することにより凍結-解凍による細胞死を抑制することができるとされる。DMSO が幹細胞の分化に影響を与えることも報告されているため、DMSO を用いない凍結保存液も開発されている[1,2]。また、マウスなど動物の初期胚の保存においては、冷蔵庫での短期間の保存が可能であるが[3]、多くは液体窒素を用いたガラス化法凍結法が用いられている。この初期胚保存方法は臨床医療や畜産分野においても広く用いられている。以上のように生物学的試料の保存には-80℃の冷凍庫や液体窒素、特に長期間にわたる保存にあたっては液体窒素が不可欠となっている。

これらの背景を踏まえた上で本稿では、筆者のこれまでの研究内容について紹介する。

1. 多倍体化胚の特性について

哺乳類の胚発生は、半数体の精子および卵が受精することにより 2 倍体受精卵となることが必須である。稀に割球の融合や不分離が起こることにより、染色体セットが倍加した多倍体胚が出現することがあり、その割合は約 0.5%程度である[4]。マウスにおいて、これら多倍体胚は胚盤胞期まで in vitro で培養することができるが[5]、発現遺伝子の異常などが認められ[6]、着床後には様々な組織の形成異常がみられる[7]。倍数性変動が哺乳類の初期胚発生に与える影響についてより詳細に解析するため、様々な多倍体胚を作出し、その解析を行った。

マウスは B6D2F1 系統を用い、得られた胚は流動パラフィンを重ねた M16 培養液ドロップ中、37℃、5%CO₂ のインキュベーター内で培養した。胚の多倍体化誘導は電気融合法により行った。

マウス胚を用いて多段階にわたる多倍体化誘導を行ったところ、2 倍体胚から 4 倍体、8 倍体、16 倍体胚の作出に成功した。これら作出したすべての多倍体胚は、卵割

腔を有する胚盤胞へ発生した。その一方で、倍数性の増大に従って、胚全体を構成する細胞数は減少し、特に16倍体胚では2～3個と極めて少ない細胞数で1つの胚が構成されており、将来胎子組織へ発生する内部細胞塊を欠いた（図1）。RT-PCRによる遺伝子発現解析でも同様に、16倍体胚におけるOCT3/4を含む内部細胞塊マーカー遺伝子mRNAの発現が検出されなかった。

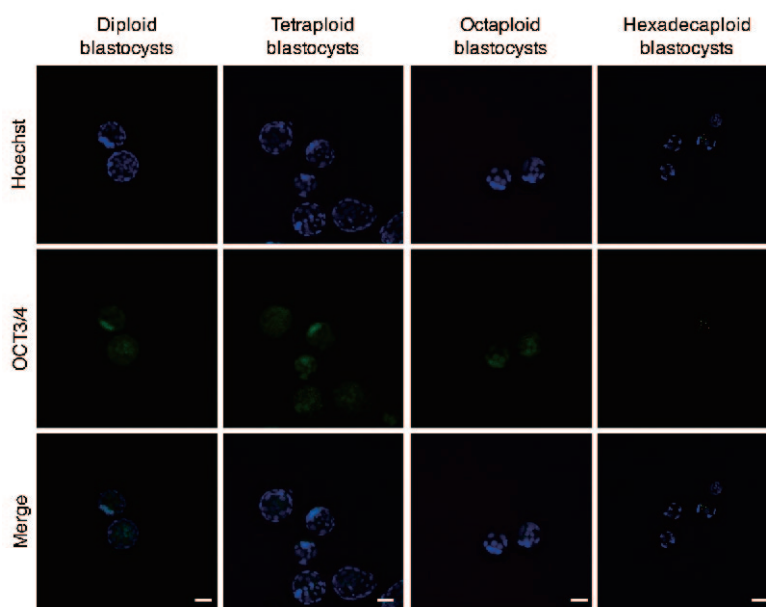


図1 多倍体胚の免疫染色像(Hoechst：核、OCT3/4：内部細胞塊)

16倍体胚はOCT3/4陽性の内部細胞塊を欠く。4倍体、8倍体胚においては内部細胞塊（緑）が形成されている。がBar: 50μm

参考文献 14) Imai *et al.* より

これまでの研究から、内部細胞塊の形成には、胚盤胞期の前段階である桑実胚期の胚を構成する細胞の内側/外側の細胞極性、特に Hippo シグナル経路が重要であることがわかっている[8, 9]。本研究において16倍体胚に内部細胞塊が形成されなかった原因についても、桑実胚期16倍体胚では内側極性の細胞が欠如したためであることが考えられた。

2. 16倍体胚における内部細胞塊形成

単独の16倍体胚では将来胎子組織へ発生する内部細胞塊が形成されなかったことを受け、レスキュー実験を行なった。前述の初期胚発生における Hippo シグナルの関与を踏まえ、16倍体胚に内/外の極性を付与するために、細胞数の補完を試みた。

多倍体胚の作出は前述の方法に即して行った。胚を構成する細胞数の補完は、4個の16倍体胚を桑実胚期において互いに接着させて培養し、1個の集合胚とすることにより行なった。

作出した集合16倍体胚は胚盤胞期胚へ発生し、免疫染色および RT-PCR の結果が

ら、mRNA およびタンパクレベルで内部細胞塊マーカーの発現が観察された（図2）。16倍体化に伴い消失する内部細胞塊は、胚全体の細胞数を確保することにより回復できることが明らかとなった。マウス4倍体胚における内部細胞塊数は2倍体胚と比較して少ない、または欠如するという報告があり

[10, 11]、本研究結果は多倍体胚における内部細胞塊の減少または欠如を回復する方法となりうる。また、本研究で用いた超多倍体胚で

ある16倍体胚においても正常胚様の形態を示す一方で、胚の多倍体化によりオートファジーやエピゲノムの異常が起こることから[12, 13]、着床後の発生異常の根本原因の解決にはさらに詳細な解析が必要と考える。

以上、我々の研究結果から、哺乳類初期胚は多倍体化に対して高度に可塑性を有していることが示唆され、論文として報告した[14]。この研究は、染色体異常胚の基礎研究となりうるほか、特に畜産分野などにおいて多倍体化技術の応用により優良形質家畜の増産などへ応用が期待できる。

参考文献

1. Katkov II, Kim MS, Bajpai R, Altman YS, Mercola M, Loring JF, Tersikh AV, Snyder EY, Levine F. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology*. 2006; 53(2): 194-205
2. Chetty S, Pagliuca FW, Honore C, Kweudjeu A, Rezania A, Melton DA. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nature Methods*. 2013; 10(6): 553-558
3. Hourcade JD, Perez-Crespo M, Serrano A, Gutierrez-Adam A, Pintado B. In vitro and in vivo development of mice morulae after in non-frozen conditions. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2012; 10: 62
4. Dyban A, Baranov V. Cytogenetics of mammalian embryonic development. *New*

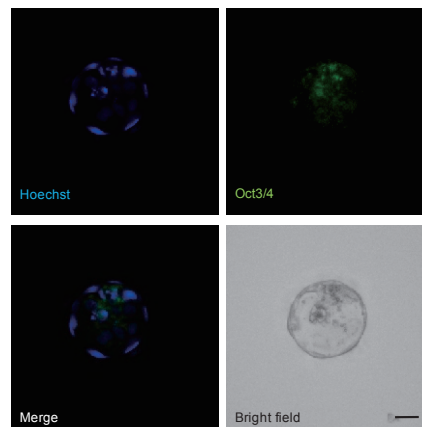


図2 集合16倍体胚における内部細胞塊形成

4個の胚を接着させて集合16倍体胚とすることで、Oct3/4陽性（緑）の内部細胞塊が形成された。Bar: 50μm

参考文献 14) Imai *et al.* より

York: Oxford University Press. 1987

5. Koizumi N, Fukuta N. Effect of insulin on in vitro development of tetraploid mouse embryos. *Exp. Anim.* 1996; 45(2): 670-675
6. 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
7. Kaufman MH. Postcranial morphological features of homozygous tetraploid mouse embryos. *J. Anat.* 1992; 180(3): 521-534
8. 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 angiomin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 2013; 23(13): 1181-1194
9. Manzanares M, Rodriguez TA. Development: Hippo signaling turns the embryo inside out. *Curr. Biol.* 2013; 23(13): 559-561
10. Liu L, Czerwicz E, Keefer DL. Effect of ploidy and parent genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. *Gene Expr. Patterns.* 2004; 4(4): 433-441
11. 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
12. 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(2): 125-130
13. Wu BJ, Zhao LX, Zhu CC, Chan 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
14. Imai H, Fujii W, Kusakabe KT, Kiso Y, Kano K. Aggregation recovers developmental plasticity in mouse polyploid embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* In press (bioRxiv: 263533)