

単為発生胚・雄性発生胚由来胚性幹細胞からの 機能的な細胞の分化誘導と解析

小野寺 勇太¹、寺村 岳士²、竹原 俊幸¹、村上 秀樹¹、
小澤 まどか¹、武内 大輝¹、安齋 政幸³、加藤 博己³、
三谷 匡³、松本 和也¹、佐伯 和弘¹、入谷 明¹、
佐川 典正²、細井 美彦¹

要 約

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell ; ES 細胞) は自己複製能と様々な細胞へと分化することの出来る分化多能性を有している細胞である。近年、この ES 細胞を用いた再生修復医療の可能性が注目されている。しかし、受精卵から ES 細胞を作出するため、移植後に免疫拒絶反応を示すことが示唆されており、ES 細胞を用いた再生修復医療の 1 つの課題となっている。そこで、片親性の雌性単為発生胚と雄性発生胚から ES 細胞を樹立し、片親性 ES 細胞の分化多能性を観察した。

緒 論

ES 細胞は自己複製能と様々な細胞へと分化することの出来る分化多能性を有している細胞である [1-7]。哺乳動物の胚は、たとえそれが片親性のゲノムを有するものであっても着床し、短い期間であれば発生することが知られている。しかし着床後はゲノム・インプリンティングの関与により胚は最後まで発生する事が出来ない。ゲノム・インプリンティングは単親性の発生を防ぐためにゲノムに仕込まれたエピジェネティックな修飾であり、精子に由来するゲノムには父性的な修飾が、卵子に由来するゲノムには母性的な修飾が施されている [8]。インプリンティング遺伝子は由来する性によって対照的な修飾がなされており、片親のゲノムすなわち卵子のみに由来するゲノムを持つ雌性単為発生胚 (Pg) と 2 つの精子に由来するゲノムを有する雄性単為発生胚 (Ag) に分類され、それぞれ卵子、精子から引き継いだ片方のみのパターンを有している。このパターンは ES 細胞においても引き継がれることが報告されている。すなわち、PgES 細胞は両アレルとも母性由来のインプリンティングパターンを持ったゲノムを有しており [9]、AgES 細胞は父性由来のインプリンティングパターンのゲノムを有している。

例えば、PgES 細胞では Igf2 や H19 等の父性由来のインプリンティング遺伝子はメチル化によって不活性型を示すが、Igf2r や p57KIP2 のような母性由来のインプリンティング遺伝子は活性型である [10, 11]。この特徴的なエピジェネティックな修飾によって PgES 細胞、AgES 細胞は未分化状態では特徴的な形質を示すことはないが、分化後にキメラマウス、テラトーマ、あるいは胚様体内で一定の偏った分化をすることが知られている。PgES 細胞は神経系などの外胚葉に分化し易く、内胚葉細胞への分化は殆ど観察されていない [12, 13]。

一方、AgES 細胞は筋組織や骨格筋等の中胚葉に分化し易いが、神経等の外胚葉や内胚葉細胞への分化はあまり認められない [14]。両方のケース共にキメラマウスにおける寄与率は低く、テトラプロイドレスキュー法を用いて完全に ES 細胞由来の産仔を得ることを試みた場合、初期に胎生致死となる。そのため、

PgES 細胞、AgES 細胞が共に全ての細胞系譜に寄与しているのか、あるいは、成体の中で特定の機能を持った細胞に分化出来るのかは確認されていない。片親性由来の胚から ES 細胞の分化の多様性と系譜の偏りの確認、従来分化しにくいと考えられている系譜への誘導は、ゲノム・インプリンティングの組織発生への関わりを理解する上で有用な情報をもたらすと考えられる。

今回我々は、Pg・Ag 胚という無性的に発生した胚から ES 細胞を樹立し、分化誘導を行うことで、ドーパミン産生細胞、拍動心筋細胞、アルブミン産生細胞等の機能的な細胞を誘導した。これらの細胞を各系譜にそれぞれの分化誘導系で誘導した場合でも、従来 *in vivo* の実験で報告されていたような分化の偏りが確認された。

材料と方法

B6D2F1 マウス Pg 胚の作出と PgES 細胞の樹立および培養

B6D2F1 マウスの未受精卵をストロンチウムとサイトカラシン B を用いて 6 時間活性化を行なった。その後、胚盤胞期胚まで発生した胚を 0.5% Pronase 添加 PBS (-) で処理し、透明帯の除去を行なった。次に、10% FBS-DMEM で 3 倍に希釈した抗マウス抗血清、10% FBS-DMEM で 5 倍に希釈したモルモット補体で順次処理し、栄養外胚葉層を免疫学的に除去することで ICM を回収した。回収した ICM は、ES 細胞培養培地 (LIF+) でマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) を播種した 4 穴ディッシュ上で培養した。

培養から 5-6 日目に未分化な細胞のコロニーを確認した後に、顕微鏡下でキャピラリーを用いて機械的にコロニーを 3-4 等分にする操作を 2-3 日行なってコロニー数を増やした。コロニー数が充分増えたところに、細胞解離液を加え、単一になった細胞のみを新たな MEF 上に播種した。2-3 日後に多くの未分化細胞のコロニーが認められれば、継代コロニーの増殖力および未分化性が安定するまでは同様の操作を行い、樹立を行なった [15]。以降、同様の ES 細胞培養培地で継代培養を行なった。

また、AgES 細胞においては、当研究室で、除核した卵子に 2 本の精子を受精させて樹立された株を使用し、ES 細胞においては B6D2F1 マウスの受精卵から同様の手法を用いて ES 細胞の樹立・継代培養を行なった。

神経細胞への分化誘導

胚様体形成を誘導するために、Pg/AgES 細胞をコンフルエントな状態になるまで培養し、細胞解離液によって回収して、10% FBS-DMEM 培養液中でそれぞれ浮遊培養を行なった。3-4 日間浮遊培養して胚様体形成を誘導後、ゼラチンコート処理したディッシュ上で 7 日間接着培養し、細胞解離液によって回収して、bFGF 10 ng/ml、EGF 20ng/ml を添加した ES 細胞培養用培地 (LIF-) で浮遊培養を行ない、neurosphere を誘導した。3-4 日間浮遊培養した neurosphere をゼラチンコート処理したディッシュ上で接着培養し、神経細胞へと分化誘導した。培養液は、bFGF 10 ng/ml、EGF 10ng/ml を添加した ES 細胞培養用培地 (LIF-) を使用した。

拍動心筋細胞への分化誘導

同様の方法により胚様体形成を誘導した。3 日間浮遊培養した胚様体を、分化誘導用培地でさらに 4 日間浮遊培養を行なった。その後、ゼラチンコート処理したディッシュ上で同様の培地を使用して拍動心筋細胞へと分化誘導した。分化誘導用培地は 20% FBS-IMDM に H₂O₂、DMSO を添加したものを使用した。

アルブミン産生細胞への分化誘導

同様の方法により胚様体形成を誘導した。3-4 日間浮遊培養した胚様体を、ゼラチンコート処理したディッシュ上で 21 日間接着培養を行なった。分化誘導用培地は 20% FBS-IMDM に bFGF 10ng/ml、aFGF 10ng/ml、EGF 10ng/ml を添加したものを使用した。

アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色

樹立された Pg/AgES 細胞および ES 細胞を 99%エタノール (-20℃ /5 分)、70%エタノール (-20℃ /5 分)の条件で固定した。染色は AS-BI アルカリフォスファターゼ染色キット [SIGMA] を用いて行なった。

テラトーマの作製

3-4 日間浮遊培養した胚様体を SCID マウスの腎臓皮膜下へと移植した。術後 2 週間後、移植した腎臓を回収し、Tissue-Tek O.C.T Compound および Tissue-Tek Cryomold を使用して凍結 (-80℃) し、凍結ブロックを作製した。

ヘマトキシリン・エオジン染色

凍結ブロックより凍結切片を作製し、10%中性ホルマリンを使用して固定を行なった。その後、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。

RT-PCR

分化誘導後、14日目、7日目、21日目のものを回収し、定法に従って抽出、逆転写および PCR を行なった。

Primer の塩基配列 (* 京都大学 多田 高先生より分与)

	Forward	Reverse
*NF-M	GCCGAGCAGACCAAGGAGGCCATT	CTGGATGGTGCCTGGTAGCTGCT
TH	GACTGCTGCCACGAGCTGCTGGG	TCTTGGTAGGGCTGCACGG
* α -fetoprotein	TCGTATTCCAACAGGAGG	CACTCTTCCTTCTGGAGATG
*G3pdh	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC	CATGTAGGCCATGAGGTCCAC

神経細胞：NF-M、TH

未成熟肝細胞： α -fetoprotein

アルブミン産生細胞：Albumin

免疫組織化学的染色

PgES 細胞ならびに AgES 細胞、それぞれの ES 細胞を神経細胞、拍動心筋細胞、アルブミン産生細胞へ分化誘導後、14 日目、7 日目、21 日目のものを 10%中性ホルマリンで固定し、定法に従って免疫組織化学的染色を行なった。

未分化細胞：抗 Oct3/4 抗体、抗 SSEA-1 抗体

神経細胞特異的微小管：抗 β -tubulin class III (TUJ) 抗体、抗 Nestin 抗体

心筋細胞：抗 Troponin-T (TNT) 抗体、抗 Desmin 抗体

アルブミン産生細胞：抗 Albumin (ALB) 抗体、抗 Pdx-1 抗体

ウェスタンブロッティングならびにウェスタンブロッティングを用いた定量解析

神経細胞、拍動心筋細胞、アルブミン産生細胞へ分化誘導後、14日目、7日目、21日目のものを SDS に溶解し、定法に従ってウェット式によるウェスタンブロッティングを行なった。

アルブミン産生細胞：抗 Albumin (ALB) 抗体

心筋細胞：抗 Troponin-T (TNT) 抗体

神経細胞特異的微小管：抗 β -tubulin class III (TUJ) 抗体

ドーパミン産生細胞：抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体

結 果

今回得られたマウス Pg/AgES 細胞を免疫組織化学的手法によって評価した結果、Pg/AgES 細胞は受精卵から樹立された ES 細胞と同様に未分化細胞マーカーである ALP 活性、OCT3/4、SSEA-1 を発現していることが示された (図 1-a)。また、キメラマウスの作製 (図 1-b) やテラトーマ形成 (図 1-c) からも分化多能性が示された。

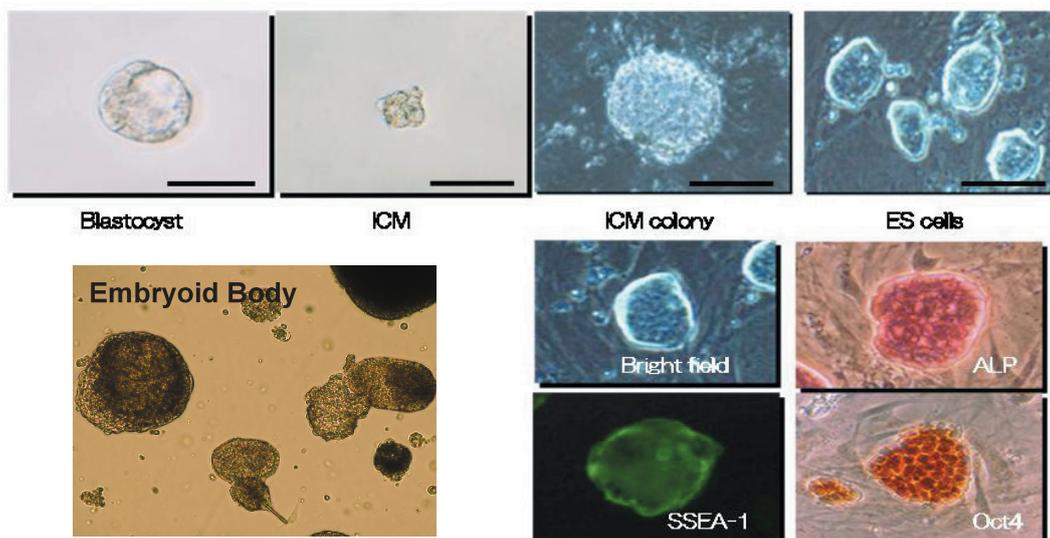


図 1-a. PgES 細胞、AgES 細胞の未分化細胞マーカーの発現解析と分化多能性の検討

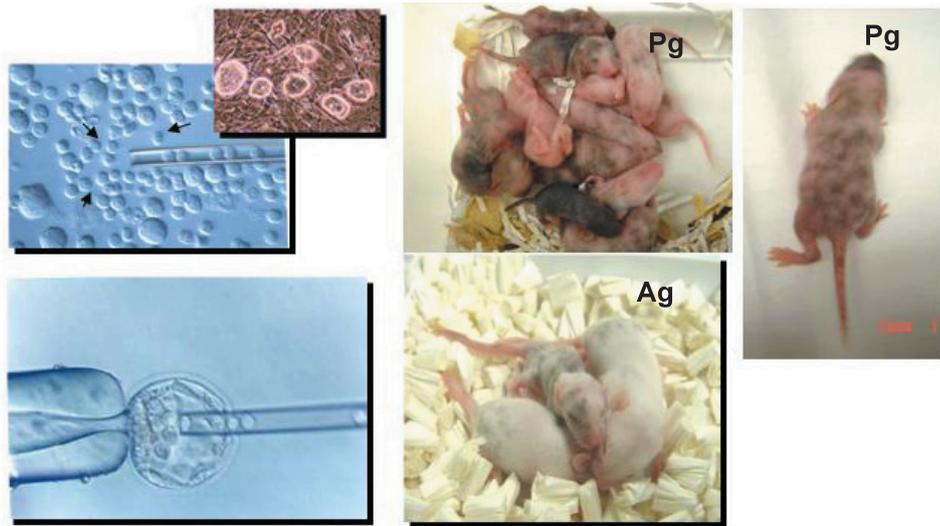


図 1-b. PgES 細胞、AgES 細胞から得られたキメラマウス

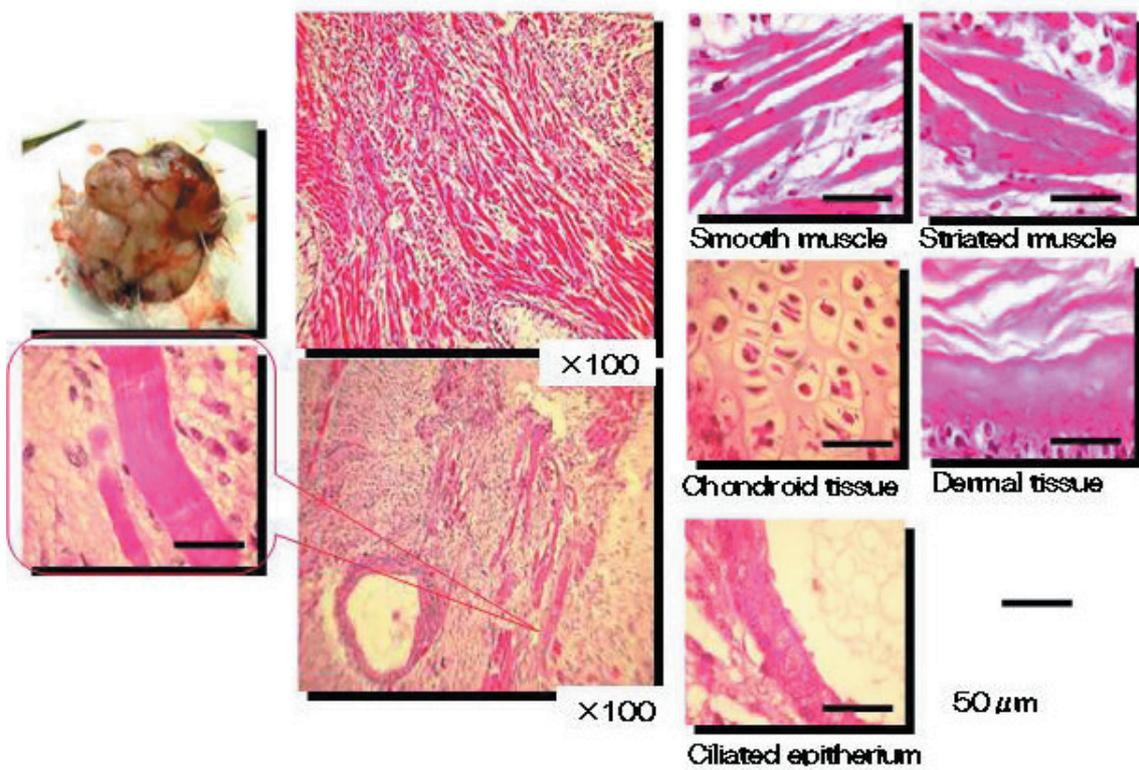


図 1-c. ES 細胞を SCID マウスに移植する事によって得られたテラトーマ

RT-PCR によって各分化誘導後の細胞を評価した結果、 α -fetoprotein、Neurofilament-M (NF-M)、Tyrosinhydroxylase (TH) の遺伝子発現が認められた (図 2)。それぞれの細胞に向けた分化誘導によって、各遺伝子発現が上昇していることが分かる。ネガティブコントロール (N.C) にはマウス繊維芽細胞を用い、ポジティブコントロール (P.C) にはマウスの脳、心臓、肝臓の各臓器を用いた。

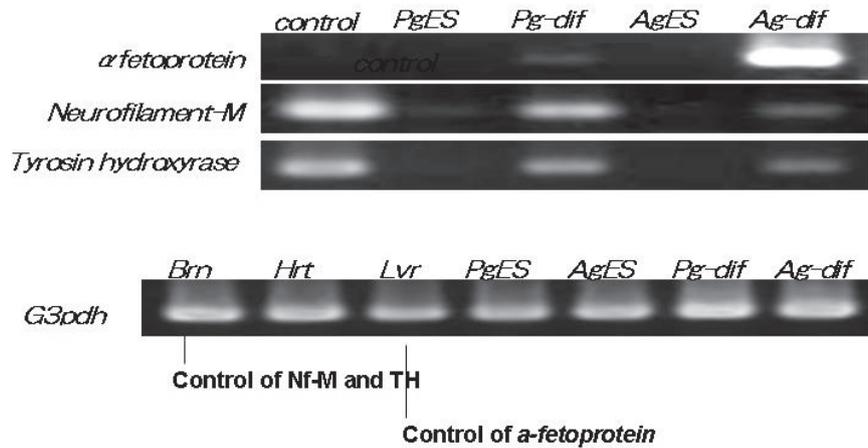


図 2. RT-PCR による mRNA の発現解析

さらに、分化誘導後の細胞をウェスタンブロッティング (図 3) および免疫組織化学的染色 (図 4) によって評価した結果、ALB、TNT、TUJ、TH の局在およびタンパク質の発現が認められた。ウェスタンブロッティングのネガティブコントロール (N.C) にはマウス繊維芽細胞を用い、ポジティブコントロール (P.C) にはマウスの脳、心臓、肝臓の各臓器を用いた。

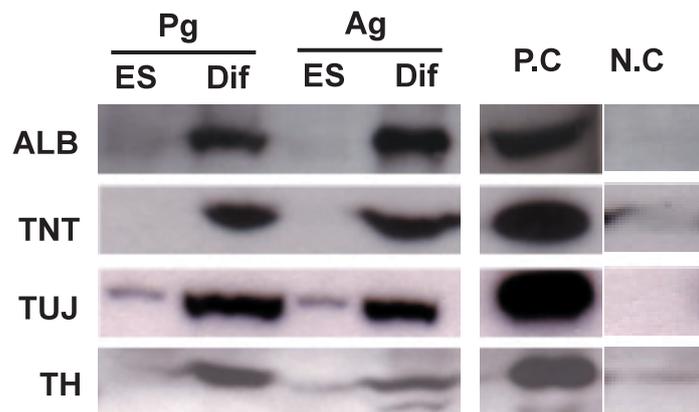


図 3. ウェスタンブロッティングによるタンパク質発現の確認

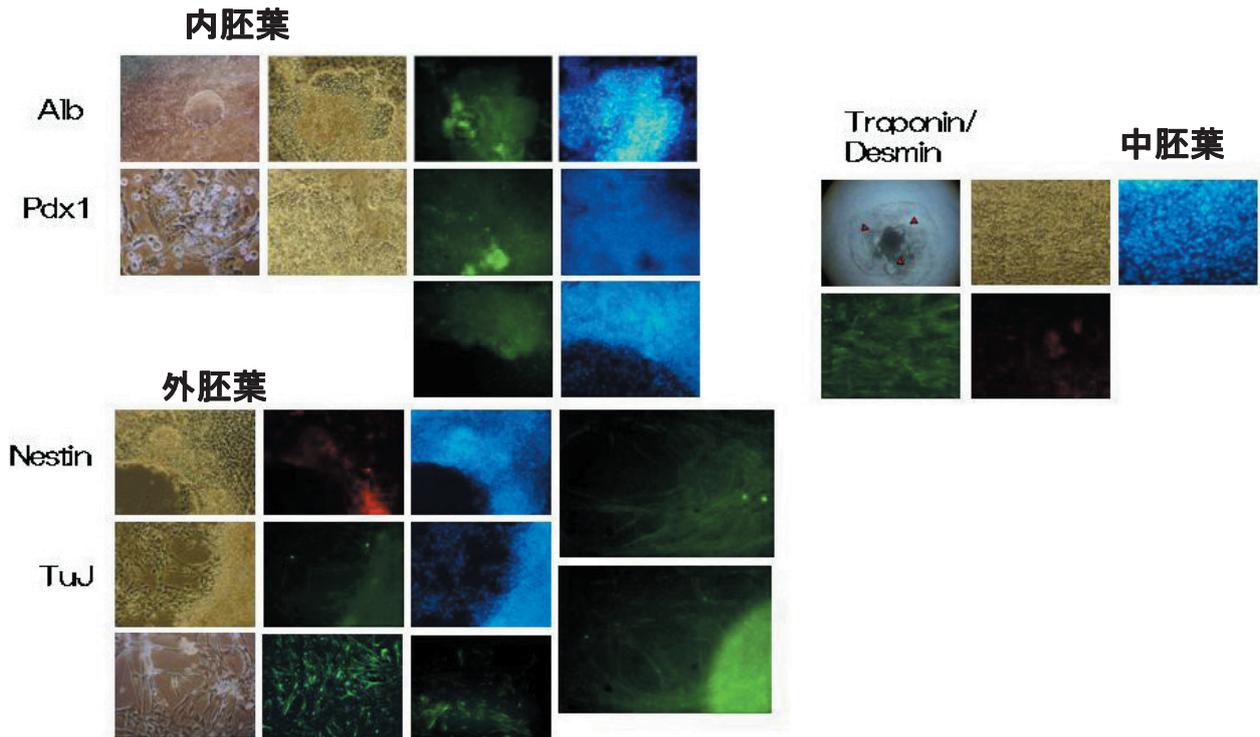


図 4. 免疫組織化学的染色によるタンパク質発現の確認

考 察

本研究では、無性的に発生した胚から樹立された ES 細胞が三胚葉すべての系譜の機能細胞に分化する能力を持っているかどうかを検討し、これによりエピジェネティックな修飾が直接的に系譜決定を制限しているのかどうか、さらに、片親性 ES 細胞が機能再生を目的とした移植の材料になりうるような分化能力を備えているのかについて明らかにすることを目指した。

我々の用いた分化誘導系では、全ての細胞系譜に分化した。マウス PgES 細胞は外胚葉、特に神経系の細胞に分化し易いことが知られている。テラトーマの形成あるいは胚様体を形成させると、内胚葉の発達が極めて悪く、神経系に偏った分化能力を有していると報告されている。単為発生胚に関しては特定の遺伝子を操作するだけで個体として発生するという事実 [15] もあり、雌性単為発生胚では生物体として必要な基本要素を備えているとも考えられる。また、キメラマウスへの寄与率も比較的高く [16]、今回 *in vitro* でも多様な分化能力が示されたことは、予想された結果であるといえる。

一方で雄性単為発生胚は着床後、形態形成が終わる前に墮胎することから、個体構成という意味において全ての細胞系譜の分化能力を有しているかどうかは不明であった。Ag 胚から樹立した ES 細胞は、キメラマウスにおいて、骨格系、骨格筋への寄与が極めて高く、全体として低い寄与であっても骨格形成に異常をもたらすことから、偏った分化をしていることが推測されていた。また、テラトーマを作成させると、主に骨格筋などの中胚葉への寄与が著しく高く、神経や内胚葉への寄与が低いことが観察されていた。

今回我々が用いた *in vitro* の系では、どちらの ES 細胞であっても、神経系細胞、アルブミン産生細胞、心筋様細胞へ分化した。

神経細胞への分化誘導において、PgES 細胞と AgES 細胞の間で誘導に要する期間、誘導効率に差は見られなかった。どちらも約 3 日で内胚葉の膜を有する胚葉体を形成し、これをペトリッドィッシュに播種す

ると、内胚葉の細胞、繊維芽細胞様細胞、尿膜細胞を進展した。2日後に再度非接着培養系に戻すと、約6日間でNeurosphere様構造を形成した。Neurosphereは酵素により容易に継代することが出来た。接着環境に戻し、EGF、bFGFといった神経系への誘導が効果的であるという報告のある成長因子を加えると、ほぼ全てのsphereが軸索を伸長した〔17〕。このことから、AgES細胞も、PgES細胞と同等の神経系分化能を備えていることが分かった。

今回我々は、胚様体を接着させ、 H_2O_2 とDMSOを添加することで心筋細胞を誘導した。心筋細胞の発生にはROSシグナルが重要な働きをしていると考えられており、 H_2O_2 の添加は細胞内ROSシグナルの上昇と、効率の上昇に効果的であるとする報告がある〔18, 19, 20〕。拍動は、早い場合では胚様体接着から2日目に生じた。拍動心筋細胞の形成率について、PgES細胞-AgES細胞間で差が認められた。AgES細胞は*in vivo*で中胚葉系へ分化しやすいことが報告されているが、*in vitro*においても拍動心筋細胞への分化が高率となることが認められた。

アルブミン産生細胞の誘導に関しては、どちらの細胞を利用しても発現が認められた。アルブミン産生細胞等、内胚葉系の細胞の誘導にはaFGFとbFGF、EGFの添加が有効であるという報告がある〔21, 22, 23〕。本研究では、システィックな形態を有した胚様体から誘導を行うことで、効率的にアルブミン産生細胞を誘導する事が可能であった。この方法では、直接に分化誘導を行うというよりも、システィックな胚様体の中で自発的に出現した前駆細胞が、培地に添加したaFGFやbFGF、EGFによって選択的に増殖した結果であると考えられる。内胚葉系細胞への分化は、特にPgES細胞で制限されているという報告があるが、意図的な誘導系ではそのような傾向は認められず、出現に要する期間やコロニーの大きさにも違いは認められなかった。

アルブミン産生細胞などの内胚葉機能細胞への分化には、周りの支持細胞とそれによって作り出されるnicheが必須であるとされている。我々の研究は、インプリンティング修飾とそれによる発現制御が、直接的に細胞系譜の決定や分化の決定付けに関わっている訳ではなく、分化に伴う細胞増殖の制御や、成長因子を受容するレセプターの発現、nicheを構成する細胞の増殖速度等に関わっている可能性を示している。細胞系譜の決定および機能細胞の分化に関わる副次的な要素としては、雌性単為発生、雄性発生それぞれの特徴的なキャラクターに起因する可能性がある。Androgenoteに由来する細胞は、Parthenoteに由来する細胞に比べて老化が起こりにくく、細胞増殖速度が早いという報告がある。神経細胞は分化の際に細胞増殖を停止する必要があり、細胞増殖速度が止まり易いPgES細胞が神経系に分化するという傾向が認められたのかもしれない。また、心筋細胞等の中胚葉の細胞にはIgf2による刺激が非常に効果的であるという報告がある。Igf2は重要なインプリンティング遺伝子であり、雄性ゲノムから発現する。つまり、自発的分化によりIgf2を分泌し、それをパラクラインで伝達出来るAgES細胞のほうが、心筋細胞に分化し易いと考えられる。

*in vitro*で神経細胞は、成長因子の添加に応じて分化が進行したことから、成長因子のレセプター群やそれに続く分化カスケードは通常のES細胞と共通で感受性も殆ど等しく、分化後のインプリンティング遺伝子の発現により制限されていないことが推測される。*In vivo*で分化が偏ることの要因の一つには、成長因子の受容状態が*in vitro*と違い、強制的に分化が起こるにはおそらく十分ではないこと、さらに、インプリンティングによって発現量が大きく変わる分子の影響も原因だと考えられ、IGF2などのような分子の影響が、成長因子の濃度が*in vivo*では*in vitro*よりも大きくなり、分化系譜の制限や特定の系譜の増殖に繋がっていることも推測される。

今回の結果で重要な事は、卵子あるいは精子の提供者と同一の遺伝情報を持つES細胞が得られ、それが全ての細胞系譜に由来し、機能的な細胞に分化誘導することが出来るという事である。PgES細胞は提供者に対しては免疫拒絶反応を誘起しないという報告〔24〕もあり、細胞移植の点で理想的な素材となり

うることが考えられる。ヒトでは現在未だクローン ES 細胞の樹立が達成していないため、ES 細胞を再生修復医療の素材として用いることが出来ない [25]。また、特定の因子を導入して様々な細胞から得られる iPS 細胞がヒト細胞においても報告された [26] が、今回の片親性 ES 細胞は遺伝子導入などの外来因子による操作・導入を行わないため、選択肢の一つとなる可能性がある。

今回我々は、PgES 細胞、AgES 細胞も三胚葉由来の機能的な細胞に分化しうることを示した。これは、哺乳類の発生において重要であると考えられているエピジェネティックな修飾が、細胞の系譜決定に直接的に影響しているというよりも、副次的な要素で決定されるという事を示唆する。また、無性的に発生した胚からも分化誘導に応じて機能的な細胞が得られるということから、AgES、PgES 細胞が、再生修復医療の素材となりうるということが明らかとなった。

参考文献

1. Evans, M. J. and Kaufman, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156
2. Suzuki, H., Kamada, N., Ueda, O., Jishage, K., Kurihara, Y., Kurihara, H., Terauchi, Y., Azuma, S., Kadowaki, T., Kodama, T., Yazaki, Y. and Toyoda, Y. 1997. Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and in vitro differentiation ability. *Exp. Anim.* 46, 17-23
3. Wobus, A. M. 2001. Potential of embryonic stem cells. *Molecular Aspects of Medicine* 22: 149-164
4. Nakatsuji, N. 2001. Primate and mouse embryonic stem cells for biomedical research. Elsevier Science.
5. Solter, D. and Knowles, B. B. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *PNAS*, 75: 5565-5569
6. Ovit, C. E. and Scholer, H. R. 1998. The molecular biology of oct-4 in early mouse embryo. *Molecular Human Reproduction*, 4: 1021-1031
7. Cottanach, B. M. and Beechey, C. V. 1990. Abnormal and X-chromosome imprinting. *Development Supplement* 63-72
8. Robertson, E. J., Evans, M. J. and Kaufman, M. H. 1983. X-chromosome instability in pluripotential stem cell lines derived from parthenogenetic embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 74, 297-309
9. DeChiera, T. M., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64; 849-860
10. Bartlomei, M. S., Zemel, S. and Tilghman, S. M. 1991. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351, 153-155
11. Park, J., Yoshida, I Tada, T., Takagi, N., Takahashi, Y, and Kanagawa, H. 1998. Differentiative potential of a mouse parthenogenetic embryonic stem cell line revealed by embryoid body formation in vitro. *Jpn. J. Vet. Res.* 46: 19-28
12. Allen, N. D, Barton, S. C, Hillton, K, Norris, M. L and Surani, M. A. 1994. A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. *Development*, 120: 1473-1482
13. Mann, J. R., Gadi, I., Harbison, M. L., Abbondanzo, S. J., and Stewart, C. L. 1990. Androgenetic mouse embryonic stem cell lines are pluripotent and cause skeletal defects in chimeras: Implications for genetic imprinting. *Cell*, 62: 251-260

14. Yoshimizu, T., Obata, Y., Carrol, J. and Kono, T. 1998. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium. *J. Mamm. Ova Res.* 15: 146-152
15. Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS, Ogawa H. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. 2004, *Nature.* 22;428 (6985) : 860-4.
16. Jagerbauer, E., Fraser, A., Herbst, E, W., Kothary, R. and Fundele, R. 1992. Parthenogenetic stem cells in postnatal mouse chimeras. *Development,* 116: 95-102
17. Lee, S, H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J, M. and McKay, R, D. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature biotechnology,* 18: 675-679
18. Klug, M, G., Soonpaa, M, H, Koh, G, Y. and Field L, J. 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.* 98: 216-224
19. Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. and Kameler, R. 1985 The in vitro development of blastocysts-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium.
20. Agapios, S., Bernd K. F., Eugen K., Maria W., Heinrich S., Jurgen H. 2003. *Cardiovascular research,* 58: 278-291
21. Levenberg, S., Golub, J, s., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. and Langer, R. 2002. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *PNAS,* 99: 4361-4369
22. Chinzei, R., Tanaka, Y., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., Teramoto, K., Arii, S., Takase, K., Sato, C., Terada, N, and Teraoka, H. 2002. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology,* 36: 22-29
23. Choi, D., Oh, H., Chang, U., Koo, S, K., Jiang, J, X., Hwang, S., Lee, J, D., Teoh, G, C., Lee, J, S. and Oh, B. 2002. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplantation,* 11: 359-368
24. Kim K, Lerou P, Yabuuchi A, Lengerke C, Ng K, West J, Kirby A, Daly MJ, Daley GQ. 2007. Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. *Science*315
25. Thomson, J, A., Itskovits-Eldor, J., Shapiro, S, S., Waknitz, M, A. Swiergiel, J, J., Marshall, V, S. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*282
26. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131.

英文要旨**Induction of three germ layer cells from parthenogenetic or androgenetic embryo origin embryonic stem cells in vitro**

Yu-ta Onodera¹, Takeshi Teramura², Toshiyuki Takehara¹, Hideki Murakami¹, Madoka Ozawa¹, Hiroki Takeuchi¹, Masayuki Anzai³, Hiromi Kato³, Tasuku Mitani³, Kazuya Matumoto¹, Kazuhiro Saeki¹, Akira Iritani¹, Norimasa Sagawa², Yoshihiko Hosoi¹

Abstract

Embryos of some kind of mammals can precede early development even if it possesses only mono-sexual genome. And embryonic stem cells (ESCs) could also be established from the asexual embryos. ESCs only have female genome is called parthenogenetic ESC (PgESCs), and the ESCs only have male genome is androgenetic ESC (AgESCs). Some researchers confirmed both ESCs can contribute chimera mice and it can differentiate some tissues. However, these ESCs cannot form total mouse bodies and delivered as a live born when it was injected in tetraploid embryos.

In the present study, we demonstrated multi-differentiation potency of these ESCs in vitro using some defined induction methods. After differentiation induction using some chemicals and growth factors, both AgESCs and PgESCs differentiated dopamine-producing cells, beating cardiomyocytes, albumin-producing cells and insulin-producing cells. These results show that even ESCs originated from asexual embryos possess differentiation potency to some kind of functional cells derived from three different embryonic layers. Furthermore, it may suggest that the asexual-ESCs can be another material for regenerative medicine since these cells were established from embryos never developed as individuals.

1. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Graduate School of Medicine, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan

3. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama 642-0017, Japan