

(研究 題 目) マウス胚性幹細胞の個体発生に関する研究 (Studies on the developmental ability of embryonic stem cells in the mouse)

(研 究 者)

角田幸雄(教授) Yukio Tsunoda(Professor)

加藤容子(学振特別研究員) Yoko Kato(JSPS Fellow)

近畿大学農学部畜産学教室 (College of Agriculture, Kinki University)

徳永智之(研究員) Tomoyuki Tokunaga(Research Scientist)

農林水産省畜産試験場 (National Institute of Animal Industry)

Summary The present study was undertaken to examine the possibility that ES cells develop directly into young. Some blastocysts, whose ICM was replaced by ES cells, developed into fetuses. But, it could not be concluded they purely originated from ES cells. The enucleated eggs that received ES cell developed to blastocysts but they did not develop into young.

研究目的

胚性幹細胞 (ES細胞) は、胚盤胞から分離される細胞で、内細胞塊由来の細胞が培養条件に適応して分化が休止した状態で増殖を続けるようになったものと考えられている。ES細胞は正常な核型を維持し、多能性を有する細胞である。すなわち、胚盤胞へ注入したりあるいは8細胞期胚と集合したのち受胎雌へ移植するとキメラ個体が得られ、またその生殖系列にとりこまれる場合が多い。このことから、ES細胞に外来遺伝子を導入し、培養条件下で遺伝子が導入された細胞を選別したのち、これらの細胞を用いてトランスジェニックキメラマウスが作出されている。ついで、このキメラを他の系統のマウスと交配させて F_1 を得、雌雄の F_1 同士を交配すると25%の確率で導入遺伝子をホモに持つトランスジェニックマウスが作出される。さらに、相同遺伝子組み換え法を用いることによって、目的とする遺伝子を破壊し、遺伝子の発現や機能を調べたりあるいは多様な疾患モデルマウスが作出されている。キメラを介したトランスジェニックマウス作出法は、従来の前核へのマイクロインジェクション法に比べてきわめて有用ではあるが、生殖系列キメラの作出率が高いES細胞の樹立が容易ではなく、また F_2 個体を得て初めて外来遺伝子をホモに持つ個体を得られるなどの欠点がある。

本研究は、キメラを介さずにES細胞由来の個体を作成することを目的に、① 4倍体胚との集合、② 胚盤胞内細胞塊とES細胞との置換、③ 未受精卵への核移植、などの技術を

用いて実施した。

研究経過および研究成果

① 4倍体胚との集合

方法：アルビノであるCD-1系マウスより採取した2細胞期胚を、0.5MHz、15V/mmの交流を15秒間流したのち、100V/mmの直流電流を100 μ sec 通電して割球を融合させた。ついで、4細胞期へ発育させ、定法に従って透明帯の1部をカット後、3～30個のES細胞を囲卵腔へ注入し、1～2日間培養した。ついで、胚盤胞期へ発育した胚を偽妊娠雌の子宮へ移植して産子への発生能を検討した。なお、用いたES細胞は、有色マウス由来の雄株であるF1/1細胞である。

結果：予備実験として、電氣的融合法により作成した4倍体胚の培養試験を実施した。まず、作出した胚の染色体を検査したところ、いずれの胚も染色体数は80本前後であり、4倍体であることが確認された。4倍体胚作出に用いた2細胞期胚のうち72%の胚で割球が融合し、76%が胚盤胞へ発育した。この発生率は、2倍体胚の発生率と大差がみられなかった。また、これらの胚を受胎雌へ移植して妊娠11.5日目に開腹検査したところ、79%の胚で着床が観察された。

ES細胞を集合した胚の発生率は、注入した細胞数によって相違した。すなわち、3～5個および10個集合した胚の発生率は91～97%と高かったが、20～30個集合した胚の発生率は63%と有意に低かった。しかしながら、これらの集合胚を33匹の受胎雌へ移植しても、産子は全く得られなかった。

② 胚盤胞内細胞塊とES細胞との置換

まず45度に研磨したインジェクションピペットへ10～15個のES細胞を吸引し、増大胚盤胞へ注入した。萎縮した腔が回復するまで2～3時間培養後、胚の切断の要領で内細胞塊部分を切断除去した。胚が回復後、偽妊娠3.5日目の受胎雌の子宮へ移植した。予備的に、別の系統のマウスから採取した内細胞塊細胞を用いて、同様の方法で内細胞塊の置換を行った。その結果、93個の置換胚盤胞を12匹の受胎雌へ移植したところ、3匹が妊娠し6匹の産子が得られた。しかしながら、そのうち2匹は切断したはずのマウス由来の毛色を示す個体であり、ここで用いた技術は不完全であることが判明した。同様に、121個のES細胞との置換胚を10匹のマウスに移植したところ、15～16日目程度に発育している2匹の死亡胎子が得られた。なお、このマウスの眼色はいずれも有色であったが、キメラになっている可能性もありES細胞由来の胎子であると断定はできなかった。

③ 未受精卵への核移植

F₁(C57BL/6XCBA) マウスより、排卵後種々の時間に採取し、染色体を除去した未受精卵をレシピエント卵細胞質として用いた。I 区: hCG 注射後13時間目に採取し、直後に染色体を除去 II区: 同18時間目 III 区: 同25時間目 IV区: hCG 注射後21~22時間目に染色体を除去し、25時間目で使用 V 区: 同28時間目で使用 VI区: 同31時間目で使用 VII 区: 同41時間目で使用 の7 区である。

ES細胞を1 個インジェクションピペット内へ吸引し、まずPIA の入った液へ移して細胞を出し入れし、ついでHVJ(2600単位) をピペット内へ吸引した。レシピエント卵細胞質の透明帯の切り口からES細胞の入ったピペットをさし入れ、細胞質に押しつけるようにしてES細胞を排出した。注入後30分以内に、7% エタノールを含むM2液へ入れて7 分間室温に静置して活性化させた。ついで、操作卵は融合ならびに活性化を促進するために100 または140Vの直流電流を30、50、あるいは100 μ sec 通電した。融合卵は、5 ~6 時間培養後、核形成の有無を確認し、さらに4 ~5 日間培養して発生過程を検討した。また、胚盤胞期へ発育した核移植卵の一部は偽妊娠1 日目の受胚雌の卵管へ移植して、妊娠12.5および18.5日目に胎子の有無を検査した。

その結果、100V/mm、30 μ sec の電気パルスを与えた場合に最も核形成率が高いことが判明した。核形成率ならびに発生率は、処置区によって大きく相違した。すなわち、核形成率はI 区で5 % と低く、II~V 区では29~40% であった。VI~VII では、37~62% の核移植卵がフラグメントし、核形成の有無は検査できなかった。胚盤胞への発生率は、II~V 区で12~18% であった。核検査時に1 核+1 極体を示す卵の胚盤胞への発生率は、1 核のみのものに比べて高かった。しかしながら、胚盤胞へ発育した核移植卵56個を受胚雌へ移植したが、ES細胞由来の産子は得られなかった。

本研究期間中にES細胞由来の産子を得るには至らなかったが、置換法ならびに核移植法をさらに改善すれば、個体を得られる可能性が大きいと判断された。

4.3 発表論文リスト

- (1) Y. Kato, T. Ooguro & Y. Tsunoda Effect of the reduction of mouse 2-cell embryos on blastocle formation timing and developmental ability in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 41 · 1483-1488, 1994.
- (2) Y. Kato & Y. Tsunoda Effect of the culture density of mouse zygotes on the development in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 41 · 1315-1322, 1994.
- (3) 加藤容子・弓場俊輔・田中龟代次・徳永智之・角田幸雄 胚性幹細胞を用いたトランスジェニックマウスの作出；A群色素性乾皮症原因遺伝子をモデルとして。 *日畜会報*, 64 · 1115-1120, 1993.
- (4) Y. Tsunoda & Y. Kato Nuclear transplantation of embryonic stem cells in mice. *J. Reprod. Fert.*, 98 · 537-540, 1993.
- (5) Y. Kato & Y. Tsunoda Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.*, 36 · 276-278, 1993.
- (6) 加藤容子・角田幸雄 ノコダゾールがマウス 2 細胞期胚の体外発生能に及ぼす影響。 *日本不妊会誌*, 38 · 599-603, 1993.