

|           |                                     |
|-----------|-------------------------------------|
| 氏 名       | ほり い たく ろう<br>堀 居 拓 郎               |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                           |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 1349 号                        |
| 学位授与の日付   | 平 成 15 年 1 月 23 日                   |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当             |
| 研究科・専攻    | 農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻           |
| 学位論文題目    | 近交系マウスからの胚性幹細胞株の樹立と個体形質改変への応用に関する研究 |

|        |                    |               |             |
|--------|--------------------|---------------|-------------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教 授 今 井 裕 | 教 授 佐 々 木 義 之 | 教 授 廣 岡 博 之 |
|--------|--------------------|---------------|-------------|

### 論 文 内 容 の 要 旨

一つの生物体の中で二種以上の細胞が混在するキメラは、植物においては接ぎ木という形で個体の形質改変に利用されてきた。一方、動物においても、胚由来の多能性幹細胞（ES 細胞）を発生途上の胚に導入することによってキメラ個体を作出することができ、ジーンターゲットなどの遺伝子機能解析に不可欠な技術となっている。しかし、キメラ個体の表現型を解析しようとするとき、導入された ES 細胞が個体形質にどのように影響を及ぼすのかについてはほとんど知られていない。そこで本研究では、種々の近交系マウスから ES 細胞株を樹立するとともに、同種系統間あるいは亜種系統間の組合せで作製したキメラマウスの表現形質の変化について検討した。

まず、マウス初期胚および胎子始原生殖細胞から多能性幹細胞株である ES 細胞および EG（Embryonic Germ）細胞株を樹立し、そのキメラ形成能について検討した。幹細胞株の樹立には、従来までの血清を含む培地と血清代替物質を含む無血清培地を用い、株化に及ぼす影響について検討した。その結果、ES 細胞、EG 細胞のいずれにおいても、血清代替物質を用いることで従来よりも効率良く細胞株を樹立することができた。一方、培地への血清の添加は、胚由来幹細胞の増殖を刺激するものの、細胞分化も同時に誘導した。樹立した ES 細胞および EG 細胞を胚盤胞期胚に注入しキメラマウスの作製を試みたところ、いずれの細胞株からも得られた産子の半数以上がキメラ個体であった。以上のことから、初期胚および胎子始原生殖細胞からの効率的な幹細胞株の樹立と継代手法を確立するとともに、これらの細胞株の多分化能をキメラ個体によって証明することができた。ES 細胞については、特にこれまで樹立の報告がほとんどなかった近交系マウス、病態モデルマウス、遺伝子組換えマウスからの樹立を行った。その結果、雑種第一代（F1）マウスからの樹立効率には劣るものの、近交系マウスにおいても高い樹立効率が得られた。また、近交系マウスと同様、形質改変マウスや疾患モデルマウスからも ES 細胞の樹立が可能となった。

ついで、ES 細胞の胚盤胞期胚への導入によりキメラマウスを作製し、キメラマウスの形質がどのように変化するのか比較検討を行った。実験用マウスの近交系基準系統である BALB/c（BALB）マウスと C57BL/6（B6）マウスを比較すると、持久力の指標となる最大酸素摂取量や走行時間には差がなく、BALB と B6 間で作製したキメラマウスにおいても変化は見られなかった。しかし、BALB マウスと B6 マウスでは、遊泳時において尾部を始めとする身体の使用方の違いにより限界水泳時間が異なり、その差はキメラマウスの形質にも見られた。一方、B6 マウスとは代謝能力が大きく異なる野生マウス由来種 MSM/Ms（MSM）マウスの胚盤胞期胚に B6 マウスの ES 細胞を注入してキメラ個体を作製し形質を比較したところ、体重や自発運動量、最大酸素摂取量など様々な身体特性において、ES 細胞の寄与により大きく変化することが明らかとなった。また、MSM マウスはヒトに対して恐怖心を抱きやすい系統であるが、恐怖心を抱きにくい B6 マウスの ES 細胞が寄与することにより、ヒトをあまり怖がらなくなった。このことは身体特性のみならず心理特性も変化したことを示唆するものと考えられた。

本研究により、ES 細胞や EG 細胞を効率よく樹立・維持する培養系が確立された。また、ES 細胞の導入により作製さ

れたキメラ個体は身体特性のみならず心理特性についても導入された ES 細胞の影響を強く受けることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

哺乳動物の胚に由来する胚性幹細胞（ES 細胞）は、発生途上の胚に導入することで生殖細胞を含む様々な組織の形成に寄与する多能性未分化細胞であり、ジーンターゲットイングなどの遺伝子機能解析に不可欠なツールとなっている。しかし、導入した ES 細胞がキメラ個体の表現型にどのような影響を及ぼすのかについてはこれまでにほとんど知られていない。そこで本研究では、種々の近交系マウスから ES 細胞株を樹立するとともに、同種系統間あるいは亜種系統間の組合せで作出したキメラマウスについて、ES 細胞の寄与による個体形質の変化について検討した。得られた成果は、以下のように要約される。

1. 種々の近交系マウス、病態モデルマウス、ノックアウトマウスから効率的に ES 細胞株を作出する無血清培養系を確立した。従来の ES 細胞の培養系で用いられていた血清を含む培養液は、幹細胞の増殖を刺激するものの細胞の分化も同時に誘導するが、血清代替物質を含む無血清培地を用いることにより未分化幹細胞株の樹立が可能となった。また、同様の手法を用いることにより、胎子始原生殖細胞からの未分化幹細胞（EG 細胞）の株化も可能となった。
2. 株化された ES 細胞と EG 細胞を用いてキメラマウスを作出したところ、得られた産子の半数以上でキメラマウスが得られ、これらの幹細胞が高い多能性分化能を持つことが明らかとなった。しかし、EG 細胞由来のキメラマウスのほとんどは出生直後に死亡し、EG 細胞の個体形成能には限界があると考えられた。
3. 二種類の近交系マウスである BALB/c (BALB) と C57BL/6 (B6) から樹立した ES 細胞を用いて、同種系統間でキメラマウスを作製し、その表現型をオリジナル系統の表現型と比較した。両系統は本来、基礎体力（代謝能力）の指標となる最大酸素摂取量には差がなく、ES 細胞をリシプロカルに導入したキメラマウスにおいても、最大酸素摂取量、トレッドミルを用いた走行特性などの形質に差は見られなかった。しかし、オリジナル系統において差の見られる限界水泳時間は両者で異なり、運動特性と密接に関係する骨格筋の使い方、運動を制御する神経系組織における ES 細胞の寄与率により表現型が影響を受けることが示唆された。
4. 同種系統マウスとは代謝能力において大きな差がある亜種系統由来のキメラマウスについて検討した。B6 マウスに由来する ES 細胞を野生マウス由来の MSM/Ms (MSM) 胚に導入して作出したキメラマウスの表現型をオリジナルマウスとの間で比較した結果、体重、自発運動量、最大酸素摂取量など様々な表現型が ES 細胞のキメラマウスへの寄与によって変化することが明らかとなった。MSM マウスは遺伝的にヒトに対する警戒心が強いが、ヒトに馴化しやすい B6 マウス由来の ES 細胞が導入されることによって、キメラマウスはヒトに馴化する形質に変化した。

以上のように本論文は、これまで困難とされていた近交系マウスをはじめとする様々なマウス系統から ES 細胞を効率的に樹立する手法を確立している。さらに、これらの ES 細胞を同種あるいは亜種系統のマウス胚に導入してキメラマウスを作出したところ、ES 細胞に由来するマウス系統の形質の影響を受け、代謝能、運動特性のみならず心理特性などがオリジナル系統とは異なった表現型をもつようになることを明らかにした。これらの成果は、キメラ動物を用いた基礎的・実用的研究に新たな視点を与えるものであり、発生学、運動生理学、生殖生物学、実験動物学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。