

胚性幹細胞の利用に関する研究とその展望

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	徳永, 智之
巻/号	14巻10号
掲載ページ	p. 8-12
発行年月	1991年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



胚性幹細胞の利用に関する研究とその展望

徳永 智之

動物個体へ外来遺伝子を導入する手段として胚性幹細胞（ES細胞）を利用する方法が注目されている。ES細胞は哺乳動物の胚盤胞の内部細胞塊が培養条件に適応して、個体を再び生産できるだけの能力を維持しながら無限に増殖するようになったものと考えられており、培養系でこの細胞に誘起した遺伝子変異をキメラ動物を経由して個体に導入することができる。すでにマウスではES細胞を利用した遺伝子標的法によって特定の遺伝子を破壊した変異個体の作製が行われており、個体レベルでの遺伝子機能の解析に多用されている。

1個のES細胞は、卵子1個に相当すると考えると、家畜においてもES細胞がその育種・改良に果たす役割は大きい。現在、家畜胚からES細胞を樹立する試みが行なわれているが、それらの細胞を用いてキメラ個体を作製したという報告はなされていない。

はじめに

胚盤胞の内部細胞塊（Inner cell mass, 以下ICM）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が胚性幹細胞（embryonic stem cell, 以下ES細胞）である（Evans *et al.*, 1981; Martin, 1981）。ES細胞は正常核型を維持しており、マウスの皮下あるいは腎被膜下に移植すると種々の組織に分化した固形腫瘍を形成することや、分化誘導条件下で培養することによって胞状の胚様体を形成することから、本来の分化能力（pluripotency, 多能性）を持つことが明らかに

されている。また、ES細胞は胚盤胞に注入するとその発生に参加してキメラを形成するとともに、その生殖系列にも取り込まれて生殖細胞に分化してES細胞由来の遺伝子を持った精子や卵子が形成される（Bradley *et al.*, 1984）。このように、ES細胞は *in vitro* の状態からキメラを経由して個体を生産することができるため、*in vivo* で遺伝子の発現や機能を追及したり、疾患モデル動物を作製することが容易になる。

1. ES細胞株の樹立と培養

ES細胞の樹立は通常3.5日齢の胚盤胞から培養を開始するが、着床遅延を誘起したマウスに由来の胚盤胞や単離したICMを培養したり、桑実胚を分散して培養する方法などがある。また、ES細胞の培養に不可欠とされるフィーダ

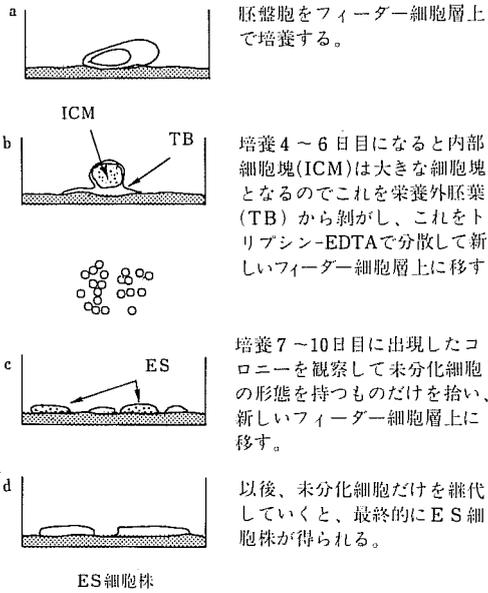


図1 ES細胞株の樹立の過程

一細胞層として、胎児線維芽細胞の初代培養細胞を用いる場合と株化されたSTO細胞を用いる場合がある。このように、ES細胞の樹立法には詳細な点で違いはあるが、基本的には図1に示すように胚盤胞を線維芽細胞のフィーダー細胞層上で培養し、頻りに継代して未分化細胞を分離するものである。樹立の過程での分化した細胞塊と未分化の細胞塊は、その形態的特徴にのみ依存して区別されているので、樹立したES細胞株を種々の発生工学的研究に応用する場合には、その多能性と核型の正常性を確認しておかなければならない。

ES細胞の樹立には種々の要因が影響を及ぼすが、その一つとしてマウスの系統があげられる。はじめ、ES細胞はマウスの系統にかかわらず樹立が可能であると考えられていたが、現在ではES細胞が得やすい系統と得にくい系統があると考えられている。とくに奇形腫(Teratoma)の自然発症率の高い129系マウスが多用されているが、実際に生殖細胞に分化して、一般に利用されている細胞株はE14(Hooper *et al.*,1987), D3(Gossler *et al.*,1986), CCE(Kuehn *et al.*,1987)およびAB(McMahon

et al.,1990)など限られたものに過ぎず、他系統由来のES細胞で高率に生殖細胞に分化するものは報告されていない。最近、サイトカインの一種のLeukemia inhibitory factor(LIF)を添加した培地を用いることで、ES細胞の分化が抑制されることが報告され(Williams *et al.*,1988; Smith *et al.*,1988), ES細胞の培養そのものは容易になってきている。それでも、依然として生殖細胞に分化できる細胞株の樹立は簡単にはいかない。

2. ES細胞キメラの作製

ES細胞を応用するためには、それが生殖細胞に分化して、その遺伝形質を子孫に伝えられる生殖系列キメラが得られなければならない。しかし、ES細胞のキメラ形成能は細胞株ごとに違っており、キメラが得られたとしても生殖系列キメラであるとは限らない。このため、個々のES細胞株の持つ分化能力が最大限に発揮されるようなキメラの作製法を検討することも重要である。一般にES細胞キメラは、ES細胞を胚盤胞の胚盤腔内に注入して作製されており、集合法を利用した例はみられなかった。最近、ES細胞を8細胞期胚と集合したり、桑実胚に注入する方法を用いてES細胞の寄与率の高いキメラマウスを作製した報告がなされている(Nagy *et al.*,1990; Lallemand *et al.*,1990)。著者らも独自に樹立した129系マウスに由来しないES細胞(F1/1, 写真1)を用いて検討した結果、CD-1系マウス由来の8細胞期

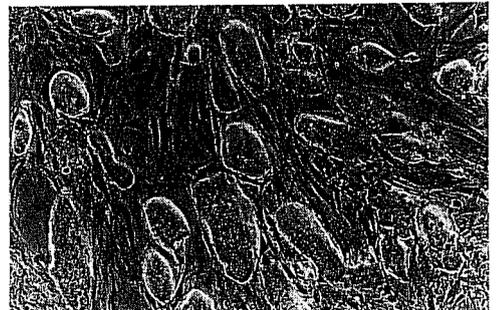


写真1 F1/1細胞のコロニー

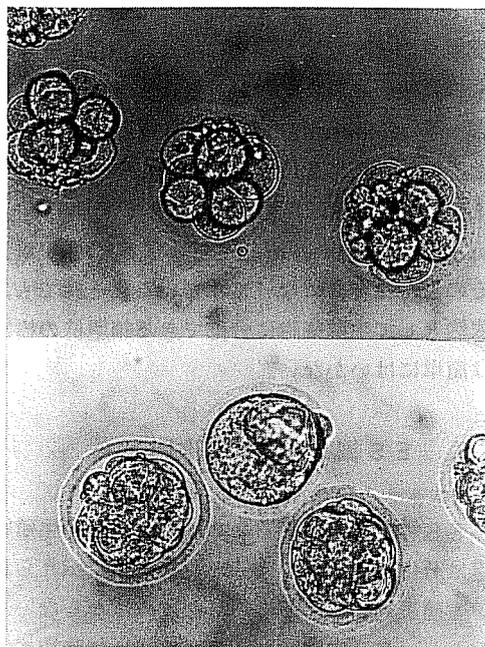


写真2 F1/1細胞を注入した8細胞期胚(上段)と1晩培養して桑葉胚から胚盤胞に発育したキメラ胚

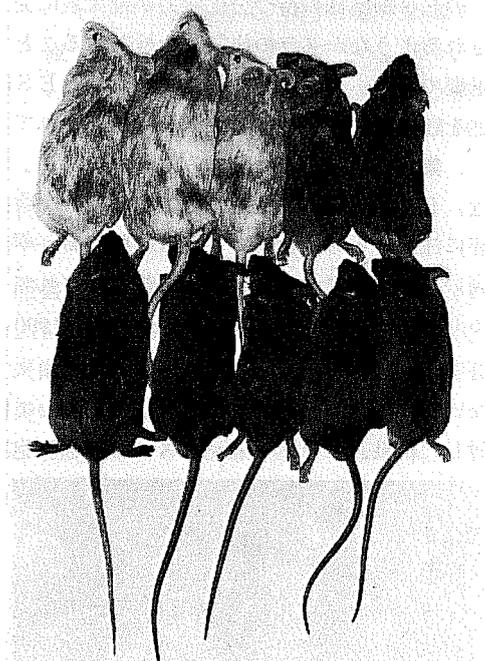


写真3 写真2のキメラ胚を受卵雌に移植して得られたキメラマウス

胚を宿主として、その卵胞腔内に細胞を注入することによって高率に生殖系列キメラが形成さ

表1 F1/1細胞の生殖系列キメラ形成率

宿主胚	産子数/ 移植胚数 (%)	キメラの 割合(%)	生殖系列キ メラ/妊孕 性雄(%)
胚盤胞	49/96(51)	10(20)	0/3(0)
8細胞期胚	49/112(44)	39(80)	24/27(89)

れることを明らかにしている(写真2, 3および表1)。最近の研究では、ES細胞が生殖系列に寄与するためには、ES細胞と宿主胚の遺伝子型の適性が重要であると考えられており、129系マウスに由来するES細胞株を胚盤胞に注入してキメラマウスを作製する場合にはC57BL/6系マウスに由来する胚盤胞が宿主胚として最適であるといわれている(Schwartzberg *et al.*,1989; Thomas *et al.*,1990)。著者らの実験でもF1/1細胞をCD-1系マウス由来の胚盤胞に注入した場合のキメラ形成率は低く、その原因はCD-1系の遺伝子型が宿主として不適であるためと考えられた。しかし、そのような不適性は、8細胞期胚を宿主としてキメラマウスを作製することによって改善され、ES細胞が高率に生殖系列に寄与する要因として、遺伝子型の適性だけでなく宿主胚の発育ステージも重要であると示唆された。

より効率的に生殖系列キメラを作製する試みとして、生殖細胞の分化に異常を示すW遺伝子ミュータント系マウス由来胚盤胞を利用する方法が報告されているが(Evans *et al.*,1985)、著者らもES細胞利用技術の開発を目的に種々の試みを行っている。

Tsunoda *et al.* (1987) は本来個体に発生できない単為発生胚と8細胞期受精胚の割球1個を集合させると、受精胚由来の遺伝形質のみを示す1卵性多胎子が得られることを報告している。著者らは、これをES細胞のキメラ作製に応用できないかと考え、単為発生胚を宿主としたES細胞キメラの作製を試みたが、結果的に産子をまったく得ることができなかった。この原因は、単為発生胚では雄ゲノムの不在によ

って胚胎外膜組織の発育が不全であるためと推定される。また、先の報告では受精卵の割球と単為発生卵を集合した場合には受精卵の割球に由来する細胞の一部が胚胎外膜組織に寄与して、胚の発育を支持するために産子が得られると考えられているのに対して、ES細胞はそれらの組織に機能的に寄与する能力を持たないと考えられる。最近、受精卵を倍化して得た4倍体胚をホストとした場合、ES細胞キメラが得られることが報告されており(Nagy *et al.*,1990)、著者らも追試に成功している。4倍体卵は単為発生卵と違い雄親と雌親に由来する両方のゲノムを持っており着床後の発生能は非常に高いことが知られている。これらのことから、着床後のES細胞キメラ胚の発育は宿主の受精胚に由来する胚胎外組織に依存すると推察される。他にES細胞キメラ形成率を改善する手段として、ホスト胚の割球数を減少させて集合胚を構成するES細胞の比率を上げるなどを試みている。しかし、このような操作は手間がかかるだけでなく、かえって産子生産率を低下させる場合が多い。

3. ES細胞を応用した トランスジェニックマウスの作製

ES細胞は *in vitro* で外来遺伝子を導入した後、あらかじめ目的の遺伝子が導入された細胞を選択することができる。そして、この細胞を用いてキメラ動物を作製し、首尾よくES細胞がその生殖系列に寄与すれば、子の代には外来遺伝子をヘテロに持つ雌雄の個体を得られ、それらの兄妹交配によって次の代には系統化されたトランスジェニック動物が得られる。ES細胞を利用したトランスジェニック動物作製の可能性は、はじめ挿入突然変異によってヒポキサンチンホスフォリボシルトランスフェラーゼ(HPR T) 遺伝子を不活化し、レッシュ・ナイハン病のモデルマウスが作製されたことによって証明された(Kuehn *et al.*,1987;Hooper

et al.,1987)。一方、あらかじめ変異を起こした遺伝子を細胞に導入することによって、これに対応する内在遺伝子を相同遺伝子組換え(homologous recombination)によって不活化する遺伝子標的(gene targeting)法がさかんに応用されている。この方法に受精卵を応用できれば、標的遺伝子を不活化した個体を得られるはずであるが、実際には相同遺伝子組換えの起こる頻度は低く、受精卵の数量的な制約があるためにその可能性は極めて低い。その点ES細胞を利用すれば、1千万個単位の細胞の中から選択培養によって変異遺伝子を持ったクローンを分離することができ、それらES細胞に由来するキメラ動物の子孫が得られる。これまでに、この方法で β_2 ミクログロブリン(Zijlstra *et al.*,1990)、IGF I I (DeChiara *et al.*,1990)、あるいはc-a b l (Schwartberg *et al.*,1989)、i n t - 1 (Thomas *et al.*,1990; McM -ahon *et al.*,1990) や s r c (Sorissno *et al.*,1991) などの癌遺伝子などの他にHox 1.1 (Zimmer *et al.*,1989)、E n - 2 (Joyner *et al.*,1989) などのホメオテック遺伝子について、遺伝子欠損マウスが作製されている。

4. 畜産分野におけるES細胞

ES細胞は、一度樹立されれば無限に増殖し、培養系で遺伝子の改変も自在であり、さらにキメラを介してその遺伝情報を持った生殖細胞を再生することができるため家畜の育種・改良や家畜による有用物質の生産などへの応用が期待される。1個のES細胞は卵子1個に相当すると考えれば、ES細胞を利用したトランスジェニック家畜の生産は極めて大きな意義を持つことが理解できる。また、ES細胞は卵子とは異なり凍結保存も非常に簡便に行えるので遺伝資源の保存の観点からも有用と思われる。ES細胞はそのような応用面だけでなく、それ自体非常に興味深い研究対象であり、とくに全能性を有するか否かは興味深い問題であり、今後、核

移植などの技術によって解明されなければならない。その結果如何ではES細胞を核の供給源としてクローン動物の作出に応用できるかもしれない。すでにマウスではES細胞株を樹立すること自体はさほど難しいものではなく、これに対して家畜では、これまでヒツジ、ウシおよびブタなどでES細胞株の樹立が試みられているが(Hndyside and Hooper,1987; Piedrahita *et al.*,1988; Ware and First,1988; Schellander *et al.*,1989; Evans *et al.*,1990; Notarianni *et al.*,1990; Piedrahita *et al.*,1990a; Piedrahita *et al.*,1990b), キメラ家畜の作製に成功したという報告はまだなされていない。著者らもマウスで得られたノウハウを生かして、家畜のES細胞の樹立を試みており、再現性良く未分化細胞コロニーが得られることがわかった。これをいかに安定に培養維持するかが今後の問題となっている。これらのコロニーの出現する過程はマウスの場合とかならずしも一致していないことから、マウスES細胞の培養系がそのまま家畜に応用できるとは限らず、それぞれの動物種に適応した培養系の開発が重要と思われる。

おわりに

マウスにおいてはトランスジェニック技術はすでに特殊なものではなく、マイクロインジェクション法によって安定して生産することができるため、単にトランスジェニックマウスを作出するだけならばES細胞はそれ程重要ではない。これに対してトランスジェニック家畜の研究は、多くの研究者の努力にもかかわらず、今のところ期待されたほどの成果はあがっていない。先に述べた理由から、家畜のES細胞株はこの様な現状を打破するための有望な手段であることは明らかである。生殖細胞に分化し得る家畜のES細胞を樹立することが急務である。

(日本全薬工業株式会社中央研究所)

引用文献

- 1) Bradley, A. *et al.* (1986) *Nature*, 309 : 255~256
- 2) DeChiara, T.M. *et al.* (1990) *Nature*, 345 : 78~80
- 3) Doetschman, T.C. *et al.* (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.*, 87 : 27~45
- 4) Evans, M. *et al.* (1985) In *Genetic manipulation of the early mammalian embryo* (ed. Costantini, F. and Jaenisch, R.), Cold Spring Harbor Laboratory : 93~102
- 5) Evans, M.J. *et al.* (1990) *Theriogenology*, 33 : 125~128
- 6) Gossler, A. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83 : 9065~9069
- 7) Handyside, A. and Hooper, M.L. (1987) *Rox's Arch. Devel. Biol.*, 196 : 185~190
- 8) Hooper, M. *et al.* (1987) *Nature*, 326 : 282~295
- 9) Kuehn, M.R. *et al.* (1989) *Nature*, 326 : 285~288
- 10) Lallemand, Y. and Brulet, P. (1990) *Development*, 110 : 1241~1248
- 11) Martin, G.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78 : 7634~7638
- 12) McMahon, A.P. and Brabley, A. (1990) *Cell*, 62 : 1073~1085
- 13) Nagy, A. *et al.* (1990) *Development*, 110 : 815~821
- 14) Notarianni, E. *et al.* (1990) *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 41 : 51~56
- 15) Piedrahita, J.A. *et al.* (1988) *Theriogenology*, 29 : 286
- 16) Piedrahita, J.A. *et al.* (1990) *Theriogenology*, 34 : 865~877
- 17) Piedrahita, J.A. *et al.* (1990) *Theriogenology*, 34 : 879~901
- 18) Schellander, K. *et al.* (1989) *Theriogenology*, 31 : 254
- 19) Schwartzberg, P.L. *et al.* (1989) *Science*, 246 : 799~803
- 20) Smith, A.G. *et al.* (1988) *Nature*, 336 : 688~690
- 21) Soriano, P. *et al.* (1991) *Cell*, 64 : 693~702
- 22) Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1990) *Nature*, 346 : 847~850
- 23) Ware, C.B. and First, N.L. (1988) *Biol. Reprod.*, 38, suppl. : 129
- 24) Williams, R.L. *et al.* (1988) *Nature*, 336 : 684~687
- 25) Zijlstra, M. *et al.* (1989) *Nature*, 342 : 435~438
- 26) Zimmer, A. and Gruss, P. (1989) *Nature*, 338 : 150~153