

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640056

研究課題名(和文)異種間キメラによる新たな幹細胞の多分化能評価システムと実験モデルの創成

研究課題名(英文)Evaluation of stem cell multipotency by interspecific chimera production

研究代表者

原口 清輝 (Haraguchi, Seiki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所家畜育種繁殖研究領域・主任研究員

研究者番号：10324576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが樹立したブタES様細胞とマウスES細胞を用いて、ニワトリ胚およびマウス胚を宿主とした異種間キメラ胚の作製を行った。ブタES様細胞はそれぞれの胚組織とのキメラは形成されず、胚体外組織に分布していた。一方、マウスES細胞とニワトリ胚による異種間キメラ作製では、ニワトリ胚組織の頭部、頸部、心臓にマウスES細胞が多く存在することが分かり、引続きキメラ解析を行っている。さらに興味深いことに、胚体外組織(卵黄嚢)に分布したマウスES細胞は効率よくテラトーマを形成することが明らかとなり、少なくともマウス由来の幹細胞では多分化能を評価することが可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：We asked if the evaluation system for multipotency of stem cells by using interspecific chimera; porcine ES cells (pESCs)-mouse embryos and pESCs (or mESCs)-chick embryos were possible. pESCs-mouse embryos: pESCs were confirmed in the clump derived from inner cell mass after 3 days outgrowth culture (in vitro). However, the pESCs were not observed recovered embryos, although small number of the marker positive cells existed in the extra-embryonic region (in vivo). pESCs (mESCs)-chick embryos (ex ovo): Although pESCs were distributed within the extra-embryonic region, none of pESCs derived cells were observed in the embryonic region. On the other hand, mESCs contributed to the embryo body, especially head, neck and heart. Moreover, mESCs distributed to the yolk sac efficiently developed teratoma, suggesting that the ex ovo system would be available for the evaluation of multipotency of stem cells in mice.

研究分野：発生工学

キーワード：異種間キメラ テラトーマ ニワトリ ブタ マウス ES細胞

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞を含む種々の幹細胞の多分化能を *in vivo* で評価する方法として、免疫不全マウスを用いたテラトーマ形成試験がある。マウス体内に接種された細胞が、外・中・内胚葉の三胚葉へ分化すれば、その細胞は多分化能を有すると判断される。これまでに、マウス、ヒト、サル、ラット、ウサギなどから樹立された ES (様) 細胞はテラトーマを形成することが知られている。一方ブタでは、5-6 日齢胚 (E5-6 胚) 由来の ES 様細胞ではテラトーマ形成は確認されていない。E5-7 胚の内部細胞塊 (ICM) を別の胚盤胞へインジェクションした集合胚からはキメラ個体が得られており、この時期の ICM が多分化能を有していることは明らかである。申請者らは、E5-6 胚のブタ ICM から自己増殖能を有する ES 様細胞株を樹立した。この細胞株を免疫不全マウスへ移植すると、生着後に細胞の増殖は認められるものの、やはり典型的なテラトーマは確認できていない。ブタのみならず、樹立された家畜胚由来 ES 様細胞を用いてキメラ個体を作製する場合は多大な労力を要し、また作製が可能な施設は極めて限られる。したがって、その前段階として多分化能を評価する実験系が必要である。果たして、テラトーマを形成しない家畜 ES 様細胞は多分化能を持たないと言えるだろうか。ブタ、ウシなど家畜由来 ES 様細胞には特有の性質が存在するかもしれない、そうであれば最適な環境を整えることで三胚葉系列への分化が誘導される可能性がある。これを示すことが出来れば、幹細胞の新たな多分化能評価システムの開発のみならず、異種間キメラ個体作出による新たな実験モデルの開発に繋がるという着想により本課題を提案するに至った。

2. 研究の目的

ブタは家畜であるのみならず、移植・再生医療の研究分野では欠くことの出来ない実験動物に位置づけられている。本研究は、申請者らが樹立したブタ ES 様細胞を用い、マウス胚およびニワトリ胚を宿主に集合胚を作製した後、異種間キメラの作製を行う。これにより、異種間キメラを利用した幹細胞の多分化能評価システムの開発と、新たな実験モデルの創成を目指す。

3. 研究の方法

(1) 恒常的マーカー発現細胞株の樹立：EF1 α -EGFP もしくは EF1 α -LacZ に neo 耐性遺伝子 (loxP で挟まれているため必要に応じて除去可能) を繋いだベクターを作製し、ブタ ES 様細胞 (pESCs) およびマウス ES 細胞 (mESCs) に導入した後、G418 薬剤選択によって発現安定株を樹立する。樹立された発現安定株は、それぞれ pESC-EGFP, pESC-LacZ、および mESC-EGFP, mESC-LacZ と表記する。

(2) ブタ-マウスキメラ胚作製 (*in vitro*) :

pESC-EGFP をマウス 8 細胞期および胚盤胞期胚へインジェクションして集合胚を作製した後培養し、キメラ形成能を評価する。

(3) ブタ-マウスキメラ作製 (*in vivo*) :

(2) で作製した集合胚を仮腹マウスへ移植後に再び回収し、キメラ形成能を評価する。

(4) ブタ-ニワトリキメラ胚作製 (*ex ovo*) :

放卵直後の胚盤葉に、pESC-EGFP, pESC-LacZ を移植した後培養する。初めに、インジェクション細胞数による発生率、キメラ率についての条件検討を行う。孵化直前までの適当な発生段階で解剖し、キメラ形成能を評価するとともに、移植細胞の分布、増殖・分化、形態変化等を肉眼所見および組織切片により調べる。

(5) マウス-ニワトリキメラ胚作製 (*ex ovo*) :

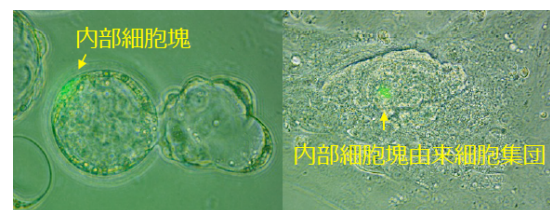
放卵直後の胚盤葉に、mESC-EGFP, mESC-LacZ を移植した後培養する。初めに、インジェクション細胞数による発生率、キメラ率についての条件検討を行う。孵化直前までの適当な発生段階で解剖し、キメラ形成能を評価するとともに、移植細胞の分布、増殖・分化、形態変化等を肉眼所見および組織切片により調べる。

4. 研究成果

(1) 恒常的マーカー発現細胞株の樹立：恒常的に EGFP もしくは LacZ を発現する pESC-EGFP, pESC-LacZ および mESC-EGFP, mESC-LacZ 安定株を得た。

(2) ブタ-マウスキメラ胚作製 (*in vitro*) :

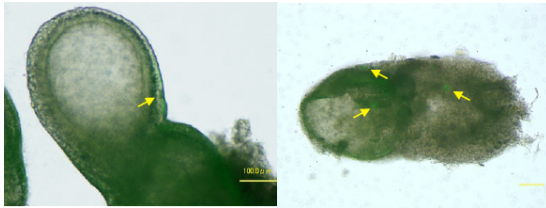
pESC-EGFP (1-20 細胞) とマウス 8 細胞期胚で集合胚を作製した後培養すると、マウス胚盤胞内部細胞塊に pESC-EGFP 由来の蛍光が確認された。さらにこれを 3 日間 out-growth 培養を行った結果、内部細胞塊由来細胞集団にも蛍光が確認された為、ブタ ES 様細胞がマウス胚組織に寄与できる可能性が示唆された。



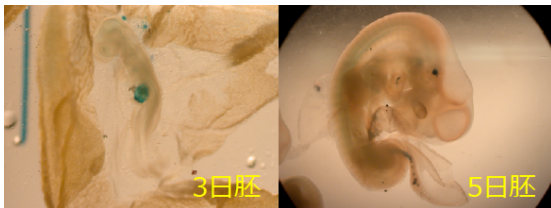
(3) ブタ-マウスキメラ作製 (*in vivo*) :

pESC-EGFP をマウス胚盤胞期胚にインジェクション (1-20 細胞) し、胚移植を行った。発生後期では死滅、発生遅延が頻発するため 7 日相当胚でのキメラ解析を行った。7 日胚の生存率は 28%、そのうち蛍光発現率は 25%

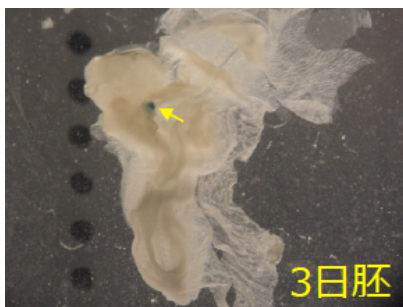
であった。しかし、胚組織に pESC-EGFP は確認されず、胚体外組織に数個の pESC-EGFP が確認されたのみであった。これらの結果より、ブタ-マウス異種間キメラ胚による多分化能評価は困難と判断された。



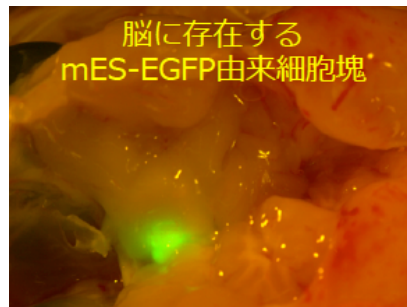
(4) ブタ-ニワトリキメラ胚作製 (ex ovo) : まずは条件検討のため、mESC-LacZ を放卵直後の胚盤葉にインジェクションし、3-5 日後に胚を回収して LacZ 染色を行った。その結果、インジェクションされる細胞数は多いほどキメラ率が高く ($3 \times 10^4 > 1 \times 10^4$)、注入量は少ないほど胚発生率が高いことが分かった ($0.5 \mu\text{l} > 1.0 \mu\text{l}$)。



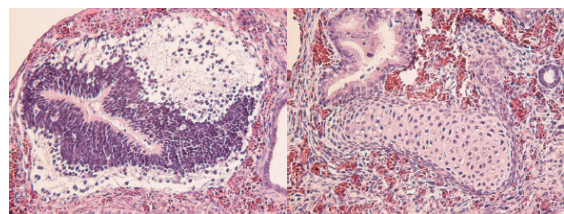
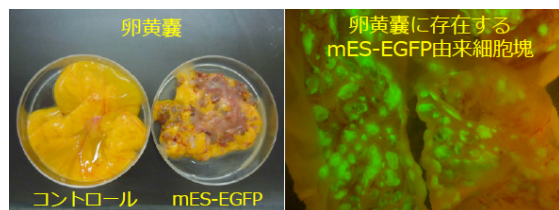
条件検討では、pESC-LacZ を用いた場合でも同様の結果を示した。そこで、pESC-LacZ もしくは pESC-EGFP を放卵直後のニワトリ胚盤葉にインジェクションし (4×10^3 - 1.5×10^4 細胞 ($0.5 \mu\text{l}$))、解析を行った。3 日胚の生存率は 44.8%、胚組織における pESC 由来細胞キメラ率は 30.8%であったが、pESC 由来細胞数が少なかったためさらに培養期間を延長した。5 日胚以降では、胚発生に伴って内在性のガラクトシダーゼ活性によるバックグランドが出現するため、pES-EGFP を用いて実験を行った。その結果、ニワトリ胚組織に分布するブタ ES 様細胞集団を確認することは出来たものの、マウス ES 細胞の場合と比べて胚の生存率およびキメラ率 (pES 由来細胞数) が低く、免疫組織染色によるキメラ解析は一旦保留にすることとした。



(5) マウス-ニワトリキメラ胚作製 (ex ovo) : 異種間キメラがうまく形成されない一因として、マウス胚およびニワトリ胚の発生に対してブタ ES 様細胞の増殖速度が遅いことが予想された。すなわち、増殖速度の早いマウス ES 細胞を用いれば、その多分化能を評価できる可能性がある。そこで、mESC-EGFP とニワトリ胚における異種間キメラ作製についてさらに詳細な検討を行うことにした。 7.5×10^3 細胞を同様にインジェクションしたとき、3 日胚と 8 日胚の生存率はそれぞれ 100%と 36%、胚組織における蛍光発現率はそれぞれ 68%と 30%であった。インジェクション後の胚を孵化直前まで培養して解剖した結果、mESC-EGFP 由来細胞塊は特に頭部 (脳)、頸部に存在した。このキメラ組織については、現在免疫組織解析を進めている。

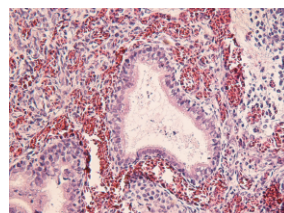


さらに興味深いことに、胚体外組織 (卵黄嚢) に分布したマウス ES 細胞は増殖・分化しており、組織解析の結果 3 胚葉性テラトーマであることが明らかとなった。



外胚葉 (神経)

中胚葉 (軟骨)



内胚葉 (消化管)

以上、ニワトリ胚を宿主に用いた異種間キメラ作製において、マウス ES 細胞はテラトーマ形成による多分化能評価が可能であることが明らかとなった。ES 細胞以外のマウス由来幹細胞においても、その増殖速度がニワトリ胚発生と揃えば多分化能評価は可能と推測される。家畜などマウス以外の幹細胞については今後さらに検討の余地があると思われる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

①松原悠子、細江実佐、原口清輝、ニワトリ胚を用いたマウス ES 細胞の多能性評価、日本畜産学会第 119 回大会、2015 年 3 月 28 日-3 月 30 日、宇都宮大学峰キャンパス (宇都宮市)

②原口清輝、松原悠子、細江実佐、異種間キメラによる幹細胞の多能性評価、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 28 日-5 月 30 日、京都テルサ (京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 清輝 (HARAGUCHI Seiki)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・主任研究員
研究者番号：10324576

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者

松原 悠子 (MATSUBARA Yuko)
独立行政法人 農業生物資源研究所・動物科学研究領域・上級研究員
研究者番号：90391573