

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02367

研究課題名(和文) 胚盤胞補完法を用いた異種生殖細胞の発生学的解析

研究課題名(英文) Developmental analysis of xenogenic germ cells using blastocyst complementation

研究代表者

平林 真澄 (HIRABAYASHI, Masumi)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授

研究者番号：20353435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ES/iPS細胞が始原生殖細胞から精子または卵子にどのような経過をたどって分化・発生していくかの解析にPrdm14遺伝子欠損ラットを利用した。その胚盤胞を同種(ラット)あるいは異種(マウス)のES/iPS細胞で補完したところ、産仔の精巣および卵巣にES/iPS細胞由来生殖細胞の存在が確認できた。同種の場合は自然交配により、異種の場合は顕微授精によって生殖細胞の正常性を評価したところ、いずれの場合でもES/iPS細胞に由来する正常産仔の作製に成功した。さらに、遺伝子改変を加えた同種ES/iPS細胞を用いて胚盤胞補完することで、迅速かつ効率的な遺伝子改変ラットの作製システムを構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光遺伝子の発現を指標にして始原生殖細胞の動向を追跡できるPrdm14遺伝子欠損ラットを用い、生殖細胞の出現時期とその後の発生過程を明らかにした。本ラットに胚盤胞補完法を適用することでES/iPS細胞由来の生殖細胞を再生できるので、様々な動物種において効率的に遺伝子改変動物を作製できるようになる。効率的な家畜動物の繁殖・生産、絶滅危惧種の保存などへの応用にも繋がっている成果である。

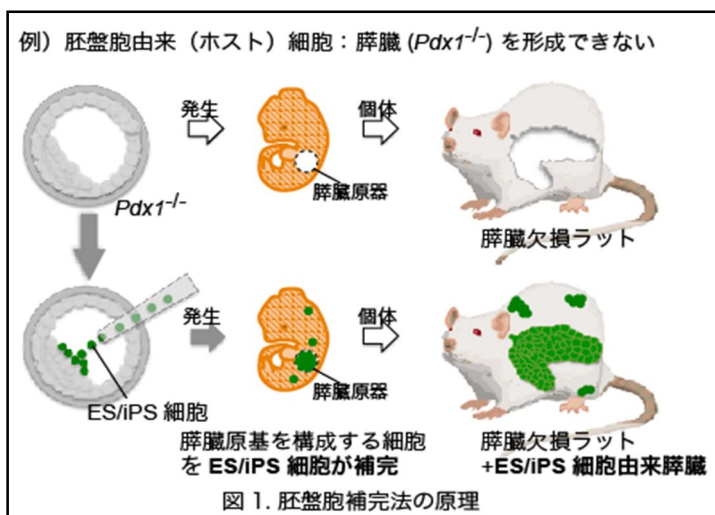
研究成果の概要(英文)：Prdm14 gene-deficient rats have been developed to analyze how ES/iPS cells differentiate and develop from primordial germ cells to gametes (sperm cells or oocytes). When blastocysts from these rats were complemented with allogeneic (rat) or xenogeneic (mouse) ES/iPS cells, the presence of ES/iPS cell-derived germ cells was confirmed in the testis or ovary of the resultant chimeric offspring rats. Functional normality of these germ cells was confirmed by the ES/iPS cell-derived offspring production through natural mating (rat-rat allogeneic experimental series) or round spermatid injection (rat-mouse xenogeneic experimental series). Furthermore, the blastocyst complementation was successfully applied with genetically modified allogeneic ES/iPS cells, which could contribute to establish a rapid and efficient system for gene-modified rat production.

研究分野：実験動物学、発生工学、生殖工学

キーワード：始原生殖細胞 精子 卵子 Prdm14遺伝子 生殖細胞欠損 異種キメラ 胚盤胞補完法 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト誘導性多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作製成功以降、少し過熱気味の臓器再生医療分野において、我々は「胚盤胞補完法」という胚性幹細胞 (ES 細胞)/iPS 細胞由来の目的臓器を作る方法に着目した。この方法では、特定臓器形成に不可欠な遺伝子をノックアウト (KO) することにより発生個体内に目的臓器の“空き”を作り出せるようにしておけば、胚盤胞の時点で ES 細胞/iPS 細胞を顕微注入して作ったキメラ胚盤胞から発生した個体の“空き”は注入細胞由来臓器で補完されている、という原理である (図 1)。例えば、*Pdx1* 遺伝子を KO したラット胚盤胞 (ホスト) にラットあるいはマウスの ES 細胞/iPS 細胞 (ドナー) を注入してキメラ個体を作出すれば、ドナー由来の膵臓を再生できる。ヒトにも応用可能なこの技術の有効性は、げっ歯類における異種



モデルにおいて実証した (Kobayashi ら、Cell 2010; Yamaguchi ら、Nature 2017)。さらに CRISPR/Cas9 法を用いて *Foxn1* 遺伝子および *Sall1* 遺伝子を欠失させ、胸腺・T 細胞欠損ラットや腎臓欠損ラットを作製することに成功し、胚盤胞補完法の適用により胸腺や腎臓の再生することも実証した (Hirabayashi ら、Transgenic Res 2019; Goto ら、Nat Commun 2019)。このように、本研究課題の遂行上必要となる胚盤胞補完のげっ歯類モデル (同種・異種) は正常に機能している。

2. 研究の目的

ES 細胞から分化誘導したエピブラスト様細胞に *Prdm1*、*Prdm14*、*Tfp2c* といった遺伝子を強制発現させると、高効率に機能的な始原生殖細胞 (PGC) へと誘導できる (Nakaki ら、Nature 2013; Magnúsdóttir ら、Nat Cell Biol 2013)。これらの遺伝子のうち PGC の形成に深く関わる *Prdm14* 遺伝子は胎児期の生殖細胞だけで発現し、マウスでは同遺伝子の欠損は精子・卵子がまったく形成されない不妊個体の作出につながる (Saito ら、Development 2012) が、ラットにおける知見はない。そこで本研究課題では、*Prdm14* 遺伝子を欠失させた PGC 欠損 KO ラットならびに *Prdm14* 遺伝子を蛍光遺伝子と置換したノックイン (KI) ラットを作製し、生殖細胞の出現時期とその後の発生過程を明らかにする。次に上記 KO ラットから回収した胚盤胞を同種 (ラット) あるいは異種 (マウス) の ES/iPS 細胞で補完し、作製された ES/iPS 細胞由来の生殖細胞の機能的正常性 (個体発生) を証明する。そして最後に、標的遺伝子にあらかじめ改変を加えておいた ES/iPS 細胞を用いてキメラ個体を作製することにより、自然交配だけで効率よく遺伝子改変ラットが作製可能な、時間・労力・費用の大幅削減につながるシステムを開発する。

3. 研究の方法

Prdm14/KO ラットの作製と解析

Prdm14 遺伝子の開始コドンから第 4 エクソンまでを CRISPR システムによって欠失させた *Prdm14*/KO ラット、ならびに同領域をターゲティングベクターによって H2B Venus で置換した ES 細胞を用い、胚盤胞注入によるキメラと G1 作製を経て作出した *Prdm14*-H2BVenus/KI ラットを準備した。そして *Prdm14* 遺伝子ヘテロ KO (*Prdm14*^{mut/+}) ラットのライン内交配によってホモ KO (*Prdm14*^{mut/mut}) 個体を作成し、それらの生殖隆起・性腺を目視あるいは免疫組織染色によって観察した。また、*Prdm14*-H2BVenus ヘテロ (*Prdm14*^{HV/+}) 雄ラットを WT 雌ラットと交配後に様々なステージの胚を回収し、PGC 挙動を解析した。さらに H2BVenus 陽性細胞をセルソーターにより分取し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

Prdm14^{mut/mut} 胚盤胞の同種・異種 ES/iPS 細胞による補完

Prdm14^{mut/+} ラットと *Prdm14*^{HV/+} ラットの交配によって得られた 4.5 日目胚盤胞 (*Prdm14*^{mut/HV} 胚盤胞を 1/4 の確率で含む) を回収し、RT2 ラット由来の XX 型 ES 細胞・XY 型 ES 細胞を顕微注入した後に移植して同種キメララットを作製した (キメラの末梢血から遺伝子型を判定)。また、GFP マウス由来の XY 型および XX 型 iPS 細胞、または *Blimp1*^{Tg(BAC-mEGFP)/+}/CAG-nmScarlet 由来の XX 型および XY 型 ES 細胞を *Prdm14*^{mut/mut} ラット胚盤胞に注入することにより、異種キメララットを作製した。そして *Prdm14*^{mut/HV} キメラ精巣・卵巣の組織切片を作製し、形態的正常性は

HE 染色で調べ、生殖細胞が ES/iPS 細胞由来であることの確認は蛍光観察により行った。キメラ個体内で作出された配偶子の機能的正常性は、自然交配 (同種キメラの場合) あるいは BDF1 マウス未受精卵子への円型精子細胞注入 (異種キメラの場合) による産仔獲得に基づいて評価した。

Prdm14^{mut/mut} ラット胚盤胞の Pax2/8dKO ラット ES/iPS 細胞による補完

RT2 ラット XX 型 ES 細胞と XY 型 ES 細胞のそれぞれに、腎臓欠損となる Pax2 遺伝子および Pax8 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 発現プラスミドを導入し、Pax2/8 両遺伝子欠損 (Pax2/8dKO) となった ES 細胞株を樹立した。これらを Prdm14^{mut/HV} 胚盤胞に顕微注入することでキメララットを作製し、Prdm14^{mut/HV} 雄キメラからは精巣上部尾部精子を、Prdm14^{mut/HV} 雌キメラからは MII 期卵を回収し、遺伝子型解析を行った。また、Prdm14^{mut/HV} 雌雄キメラの性成熟を待って WT ラットと自然交配し、回収した胚盤胞ならびに分娩産仔についても遺伝子型解析を行った。

4. 研究成果

Prdm14/KO ラットの作製と解析

Prdm14^{mut/mut} ラットにおける胎生 15.5 日齢の生殖隆起、出生 1 日齢、4 週齢、8 週齢の性腺を観察した (図 2)。生後 1 日齢では卵巣・精巣ともに正常に見えたが、4 週齢以上では卵巣消失や精巣萎縮、さらには生殖細胞の欠如が認められた。免疫組織染色によると胎生 15.5 日齢の生殖隆起には生殖細胞を示す Vasa 陽性の細胞は認められなかった。4 週齢以上の萎縮精巣にもライディッヒ細胞・セルトリ細胞といった体細胞は観察されたが、Vasa 陽性細胞はまったく認められなかった。

次に、Prdm14^{HV/+} ラットの着床前胚 (2 細胞期~胚盤胞) ならびに胎仔 (胎生 7.5~15.5 日齢) における H2B Venus の蛍光に基づき PGC の挙動を追跡した (図 3)。すべての着床前胚で Venus シグナルが認められ、胚盤胞では栄養膜外胚葉よりも内部細胞塊で強いシグナルが観察された。原腸陥入前胚 (胎生 7.5~8.0 日齢) でシグナルは検出されなかったが、原腸陥入した胎生 8.5 日齢では胚体外外胚葉に隣接する後部エピプラストにおいて Venus 陽性クラスターがわずかに認められ、胎生 9.5 日齢では Venus 陽性細胞が増加した。また、Venus 発現パターンは *Tfap2c* 発現パターンと密接に関連していた。*Tfap2c* を発現する Venus 陽性 PGC は胎生 10.5~11.5 日齢で後腸に沿って移動し、胎生 12.5 日齢付近で性腺領域に到達した。胎生 15.5 日齢のラット性腺では *Tfap2c* と *Ddx4* を発現する PGC の割合が拡大し、雌雄間で明らかな形態的差異を示すようになった。8,966 遺伝子に及ぶ PGC のトランスクリプトーム解析からは、発生ステージ (胎生 7.5~15.5 日齢) に応じた遺伝子発現の変化を明らかにすることができた。以上、Prdm14/KO^{mut/mut} ラットは生殖細胞のみを欠損するという表現型を示した。同遺伝子の蛍光マーカー KI は PGC の追跡を可能にし、ラットにおける生殖細胞の出現時期やその後の発生過程が明らかになった。

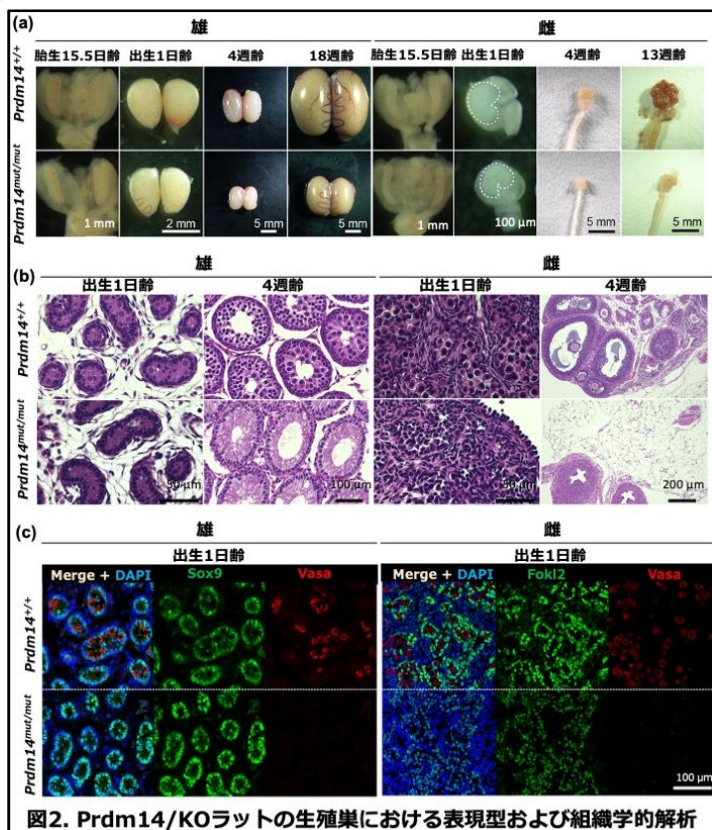


図2. Prdm14/KOラットの生殖巣における表現型および組織学的解析

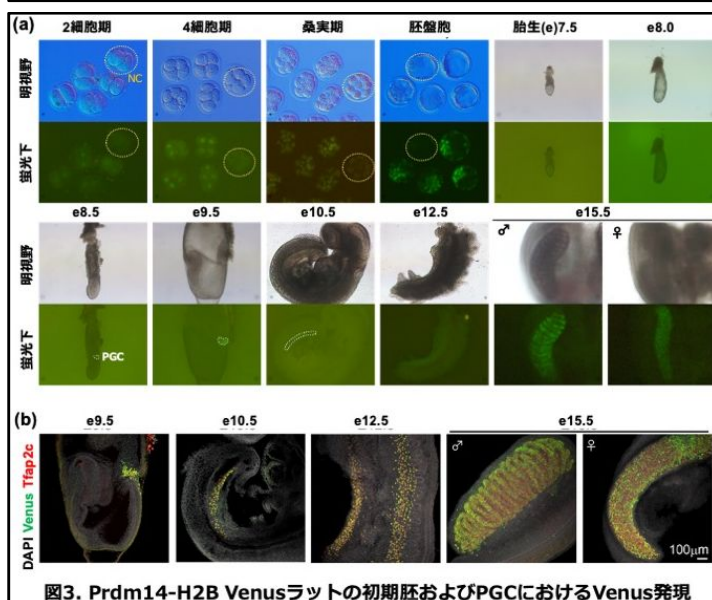


図3. Prdm14-H2B Venusラットの初期胚およびPGCにおけるVenus発現

Prdm14^{mut/mut} 胚盤胞の同種・異種 ES/iPS 細胞による補完

同種胚盤胞補完実験では、Prdm14^{mut/+} ラットと Prdm14^{HV/+} ラットの交配により得られた Venus 陽性胚盤胞に RT2 ラット由来の ES 細胞 (tdTomato 陽性) を顕微注入し、キメラを作製した (図 4)。作製したキメラの遺伝子型が Prdm14^{HV/+} だった場合、精巢・卵巣の tdTomato 蛍光はキメラ状で、WT ラットとの交配により得られた G1 世代の約 10% が tdTomato 陽性だった。一方、作製したキメラの遺伝子型が Prdm14^{mut/HV} だった場合の精巢・卵巣は完全な tdTomato 陽性を呈し、G1 世代は 100%、tdTomato 陽性の産仔だった。

次に、異種胚盤胞補完実験では EGFP 陽性のマウス iPS 細胞を用い、異種キメラ胎仔あるいは異種キメラ産仔を作製した (図 5)。移植 6 日後のキメラエピプラストおよび移植 12 日後のキメラ生殖巣を回収して始原生殖細胞形成予定領域を観察したところ、EGFP 陽性シグナルを呈する細胞が認められた。異種キメラ産仔の遺伝子型解析の結果で Prdm14^{mut/HV} だった場合、その精巢には EGFP 陽性のマウス iPS 細胞に由来する生殖細胞が確認できた。さらに、そこから調製した EGFP 陽性の円形精子細胞をマウス未受精卵子に顕微注入したところ、EGFP 陽性産仔への正常発育が確認できた。以上、Prdm14 欠損ラット精巢内に同種のラットのみならず異種のマウスの生殖細胞を作り出すことに成功し、それらが機能的に正常であることも実証した。

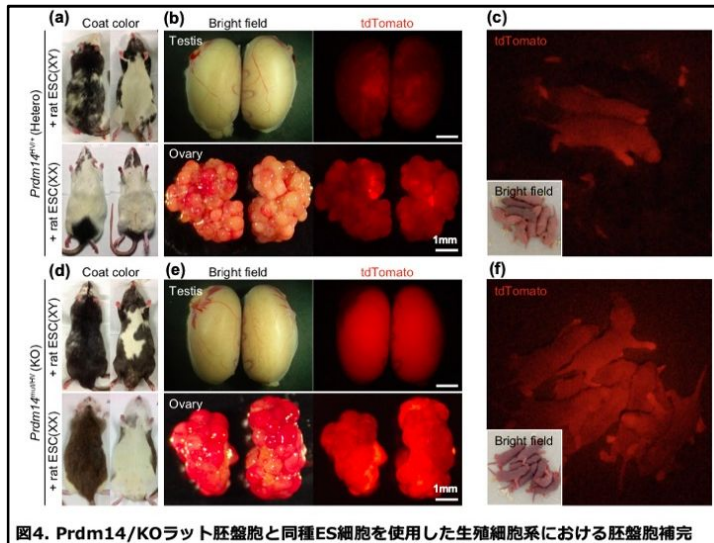


図4. Prdm14/KOラット胚盤胞と同種ES細胞を使用した生殖細胞系における胚盤胞補完

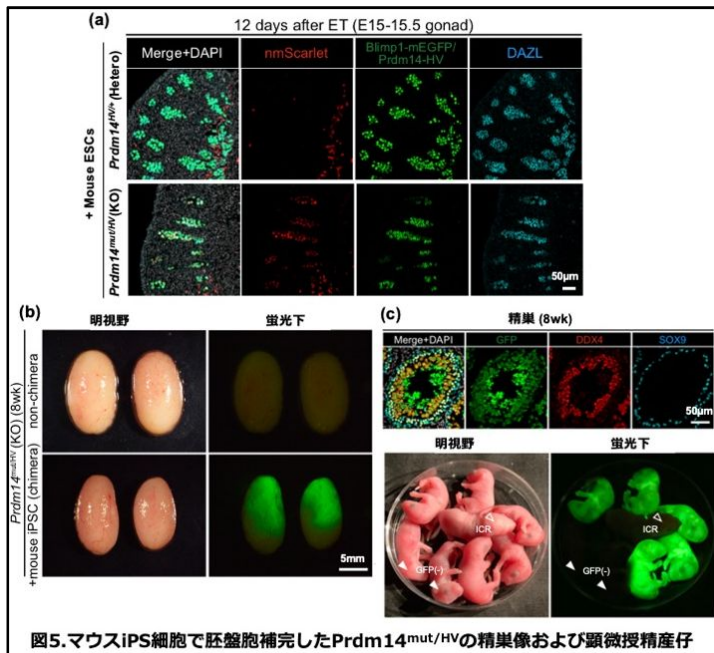


図5. マウスiPS細胞で胚盤胞補完したPrdm14^{mut/HV}の精巢像および顕微鏡産仔

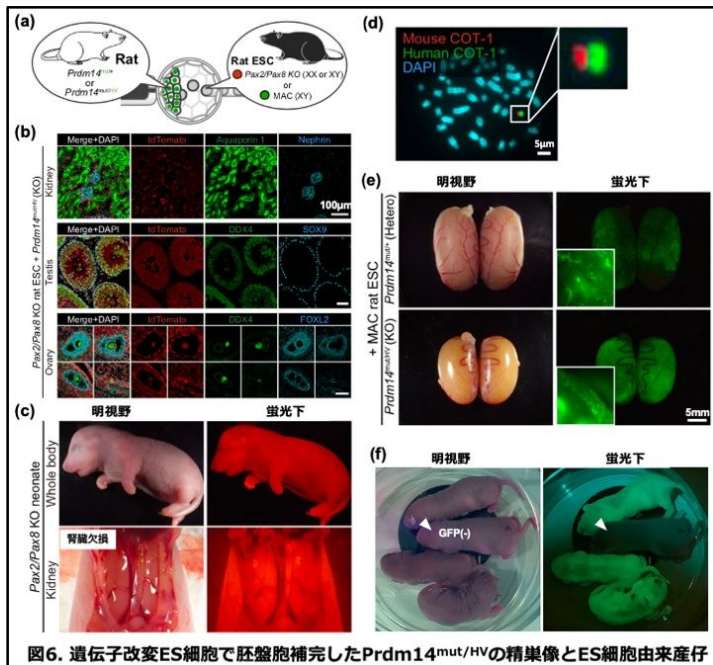


図6. 遺伝子改変ES細胞で胚盤胞補完したPrdm14^{mut/HV}の精巢像とES細胞由来産仔

Prdm14^{mut/mut} ラット胚盤胞の Pax2/8dKO ラット ES/iPS 細胞による補完

CRISPR/Cas9 によって導入した Pax2/8 遺伝子のダブル欠損ホモ変異 (Pax2/8-dKO) を持つラット ES 細胞 (tdTomato 陽性) を、Prdm14^{mut/+} ラットと Prdm14^{HV/+} ラットの交配により得られた Venus 陽性胚盤胞に顕微注入した (図 6)。胚盤胞補完によって Pax2/8-dKO 由来の配偶子をもつようになったキメラの生殖巣 (精巢・卵巣) および腎臓には一様に tdTomato 陽性の細胞が観察された。Pax2/8-dKO 由来の配偶子をもつ雌雄キメラの交配によって作出した産仔は、左右両側の腎臓のみならず尿管まで完全に欠損していた。一方、過去に人工染色体 MAC (EGFP 陽性) 導入ラット ES 細胞を用いて作製した雄キメララットから、G1

世代で 1 例の ES 細胞由来個体も作出できていなかった。この ES 細胞を *Prdm14* 欠損ラット精巣内で生殖細胞に分化させる胚盤胞補完実験も機能することが確認され、キメラ精巣から調製した EGFP 陽性円形精子細胞を顕微授精することで MAC 導入ラット産仔の獲得も可能になった。以上、*Prdm14*^{mut/HV} 胚盤胞を遺伝子改変 ES 細胞で補完するという、「迅速かつ効率的な遺伝子改変ラット作製システム」を確立できた。

の研究成果は *Development* 誌 (2000) に、
の研究成果は *Nat Commun* 誌 (2021) に、
それぞれ掲載済みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirabayashi Masumi, Goto Teppei, Hochi Shinichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Pluripotent stem cell-derived organogenesis in the rat model system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transgenic Research	6. 最初と最後の頁 287-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11248-019-00161-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Toshihiro, Kobayashi Hisato, Goto Teppei, Takashima Tomoya, Oikawa Mami, Ikeda Hiroki, Terada Reiko, Yoshida Fumika, Sanbo Makoto, Nakauchi Hiromitsu, Kurimoto Kazuki, Hirabayashi Masumi	4. 巻 147
2. 論文標題 Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 e183798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.183798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuki Yasuhiro, Kobayashi Kaoru, Hirabayashi Masumi et al.	4. 巻 116
2. 論文標題 Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomal rats for improved prediction of human drug metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 3072 ~ 3081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1808255116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Goto Teppei, Hara Hiromasa, Sanbo Makoto, Masaki Hideki, Sato Hideyuki, Yamaguchi Tomoyuki, Hochi Shinichi, Kobayashi Toshihiro, Nakauchi Hiromitsu, Hirabayashi Masumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in Sall1-targeted anephric rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 451 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08394-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Hiroki, Nakanishi Anna, Toyama Satoshi, Yamanoue Mai, Yamada Kana, Ukai Akane, Hashita Tadahiro, Iwao Takahiro, Miyamoto Tomomi, Tagawa Yoh-ichi, Hirabayashi Masumi, Miyoshi Ichiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 26
2. 論文標題 Contribution of rat embryonic stem cells to xenogeneic chimeras in blastocyst or 8-cell embryo injection and aggregation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Xenotransplantation	6. 最初と最後の頁 e12468 ~ e12468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/xen.12468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Tomoyuki, Sato Hideyuki, Kobayashi Toshihiro, Kato-itoh Megumi, Goto Teppei, Hara Hiromasa, Mizuno Naoki, Yanagida Ayaka, Umino Ayumi, Hamanaka Sanae, Suchy Fabian, Masaki Hideki, Ota Yasunori, Hirabayashi Masumi, Nakauchi Hiromitsu	4. 巻 8
2. 論文標題 An interspecies barrier to tetraploid complementation and chimera formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15289 ~ 15289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33690-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Toshihiro, Goto Teppei, Oikawa Mami, Sanbo Makoto, Yoshida Fumika, Terada Reiko, Niizeki Naoko, Kajitani Naoyo, Kazuki Kanako, Kazuki Yasuhiro, Hochi Shinichi, Nakauchi Hiromitsu, Surani M. Azim, Hirabayashi Masumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Blastocyst complementation using Prdm14-deficient rats enables efficient germline transmission and generation of functional mouse spermatids in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21557-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagae Mayuko, Uenoyama Yoshihisa, Okamoto Saki, Tsuchida Hitomi, Ikegami Kana, Goto Teppei, Majarune Sutisa, Nakamura Sho, Sanbo Makoto, Hirabayashi Masumi, Kobayashi Kenta, Inoue Naoko, Tsukamura Hiroko	4. 巻 118
2. 論文標題 Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2009156118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2009156118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平林 真澄, 後藤 哲平, 三宝 誠, 保地 眞一, 中内 啓光, 小林 俊寛
2. 発表標題 Prdm14遺伝子をノックアウトしたラット性腺の免疫組織学的解析
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 俊寛, 小林 久人, 後藤 哲平, 及川 眞実, 三宝 誠, 中内 啓光, 栗本 一基, 平林 真澄
2. 発表標題 Prdm14 遺伝子座に H2BVeunus をノックインしたラットにおける始原生殖細胞発生の解析
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林 真澄, 後藤 哲平, 三宝 誠, 保地 眞一, 中内 啓光, 小林 俊寛
2. 発表標題 Prdm14遺伝子ノックアウトによる生殖細胞欠損ラットの作製とその応用
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林 真澄
2. 発表標題 ラット発生工学技術の軌跡
3. 学会等名 日本実験動物協会関東支部第20回REG部会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤 哲平, 余郷 享子, 保地 眞一, 平林 真澄.
2. 発表標題 前核注入時のCas9 nucleaseデリバリー様式がラット胚盤胞の変異モザイク発生頻度に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 俊寛
2. 発表標題 ヒト初期発生、とくに生殖細胞への運命決定機構の解明に向けた複合的アプローチ
3. 学会等名 第21回日本異種移植研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱仲 早苗, 後藤 哲平, 平林 真澄, 山口 智之, 中内 啓光.
2. 発表標題 異種間キメラ動物における自己寛容破綻のメカニズムの解明
3. 学会等名 第21回日本異種移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長江麻佑子, 及川真実, 水野直彬, 岩月研祐, 三宝 誠, 中内啓光, 平林真澄, 小林俊寛
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスベクター法を介した効率的なTfap2c-T2A-tdTomatoノックインラット作製とその発現解析
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩月研祐, 山中貴寛, 根岸 淳, 手島淳輝, 玉田 靖, 平林真澄, 保地真一
2. 発表標題 シルクフィブロインディスクをデバイスとしてSSV法によってガラス化保存したラット臍島の腎被膜下移植
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hirabayashi Masumi, Takizawa Akiko, Hochi Shinichi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, New York.	5. 総ページ数 16
3. 書名 Embryonic stem cells and gene manipulation in rat. (Eds. Hayman G., Smith J., Dwinell M., Shimoyama M.) Rat Genomics. Methods in Molecular Biology.	

1. 著者名 Hirabayashi M, Hochi S	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, Totowa.	5. 総ページ数 14
3. 書名 Organ generation from knocked-out rat blastocysts complemented with pluripotent stem cells (Eds. Liu C and Du Y) "Microinjection: Methods and Protocols"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生理学研究所ホームページ https://www.nips.ac.jp/ 行動・代謝分子解析センター 遺伝子改変動物作製室(平林研究室)ホームページ http://www.nips.ac.jp/mamtg/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小林 俊寛 (KOBAYASHI Toshihiro) (20587414)	生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・助教 (63905)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関