

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300147

研究課題名（和文） 胚性幹細胞を用いたノックアウトラットの作製と臓器再生

研究課題名（英文） Knock-out rat production and organ regeneration using embryonic stem cells

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

研究成果の概要（和文）：本研究ではラット ES 細胞と発生工学技術を駆使し、臓器欠損や免疫不全などの疾患モデルラットの作製とその利用を目指した。エレクトロポレーション法によって外来性蛍光タンパク質遺伝子を導入した ES 細胞からの Tg ラットの作出、ならびに Rosa26 遺伝子座の相同組換えを誘起した ES 細胞からのノックインラットの獲得には成功した。また、Pdx1 遺伝子欠損ラットを作出することはできたが、予想した膵臓欠損という表現型を示す個体を得るには至らなかった。しかし、幹細胞補完法により膵臓欠損マウス中にラット幹細胞由来の膵臓を作製させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：The ultimate objective of the present study is to produce gene-modified rats useful for regenerative medical research using pluripotent embryonic stem cells (ESCs) and advanced reproductive technologies (ART). Rats expressing the kusabira-orange gene, as well as rats expressing the tdTomato gene knock-in at Rosa26 locus, were successfully produced in preliminary trials. Rats lacking Pdx1 gene were also produced by a similar ART protocol with ESCs (Pdx1-deficient mice have no pancreas), but these rats did not show any phenotypic loss of the pancreas. However, functional rat pancreas was successfully regenerated in adult mice by injecting rat wild-type pluripotent stem cells (PSCs) into Pdx1/KO mouse blastocysts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：胚性幹細胞、キメララット、ランダムインテグレーション、ジーンターゲットティング、臓器欠損、4倍体補完、ノックインラット

## 1. 研究開始当初の背景

ラットはマウスよりも大きく外科的な手術操作が容易であり、脳地図の解析も進み、ゲノム情報がほぼ解読された小型実験動物

として広く普及している。特に精神・神経系においては重要な基礎データがラットにおいて蓄積されており、遺伝子改変マウスを用いた解析では限界がある。また、神経の高次

機能を解析できるような動物は一般に子供が少なく卵子の数も少ないことから、従来の卵子や初期胚に依存した生殖工学をこれらの高次機能動物に適用することは困難である。そのため新しいアプローチによる遺伝子 KO 動物作製技術の確立が重要な課題となってきた。マウスでは ES 細胞を利用することや、体細胞クローン作製技術を適用することで特定遺伝子機能を破壊した KO マウスも作製されている。しかし、ラットでは ES 細胞株の樹立は極めて困難であり、また、体細胞クローンラットの作出例も報告された (Zhou et al., 2003) が、その再現性は未だに確認されていない。

ごく最近、GSK3 阻害剤、MEK 活性化阻害剤および FGF 受容体阻害剤の 3 種類のインヒビターセットを添加した培養液を用いることによりラット ES 細胞株が樹立できると報告された (Buehr et al., Cell 135; 2008)。

そこで我々は、これらの阻害剤を添加した培養液でラットの ES 細胞を樹立できるか否かを追試した。CAG/venus トランスジェニック (Tg) ラット由来の胚盤胞 9 個から 2 ラインのアルカリフォスファターゼ陽性 ES 細胞株を樹立することに成功した。これら ES 細胞における *In vivo* での多分化能を調べた結果、肝・消化管 (内胚葉)、骨・軟骨・筋肉 (中胚葉)、神経組織・上皮 (外胚葉) を含むテマトーマの形成が確認できた。また、Crlj:WI と DA/S1c の F1 由来の胎胚腔内に継代 6-8 代目の ES 細胞 10 個を顕微注入し、偽妊娠雌の子宮角に移植することによりキメラの作製を試みたところ、すべての E15.5 胎仔で *venus* 遺伝子の発現が確認でき、出産産仔におけるキメラ率も極めて高かった。さらに、これら両ラインのキメラ個体から生殖系列寄与も確認ができた。以上のことから、本研究課題を遂行するための最低限の基盤が整った。

## 2. 研究の目的

精神・神経系などの高度な機能の解析にはマウスでは限界があり、ラットが重要な役割を果たしてきた。またヒトに近い薬剤反応を期待できることから、薬理学・毒性学の疾患モデルとして重要である。しかしながら、ラットは ES 細胞が樹立されてから日が浅く、その再現性の検証ですら報告されていない。インヒビターを添加した培養液によるラット ES 細胞樹立の条件は必ずしも最適な条件とは言えず、Buehr らの論文にも細胞の接着性や分化しやすい性質など問題点が指摘されている。また、ラット系統における ES 細胞と宿主卵子の組み合わせも生殖系列寄与へ影響することも指摘されている。本研究期間中にラットの遺伝子ターゲッティン

グ法の開発および疾患モデル動物の作製のみならず、ラット ES 細胞の培養条件やラット系統の最適組み合わせも精査する。申請者は、最終ゴールを KO ラット作製技術の開発と捕らえ、終始目的を達成するための研究活動に身を投じてきた。世界初の KO ラットを作製することが我々の使命だと考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 近交系 Brown-Norway (BN) ラット胚盤胞に由来する胚性幹 (ES) 細胞株の樹立と外来遺伝子導入個体の作製。

FGF、MEK/ERK、TGF- $\beta$  等の分化誘導シグナル伝達系の阻害剤と、ES 細胞の増殖に必須の  $\beta$  カテニンのシグナルを抑制する GSK3 の特異的阻害剤を培養液に添加することにより、ラットの ES 細胞株が樹立できると報告された (Cell 135; 2008)。我々も同方法を適用して、高率でキメラ個体作製に貢献し、かつ生殖系列へ寄与する ES 細胞を CAG/venus-Tg ラット由来の胚盤胞から樹立することに成功した (Mol Reprod Dev 77; 2010)。本実験では、新たに樹立した近交系 BN ラット由来の ES 細胞株を用い、蛍光蛋白 Kusabira-Orange 遺伝子 (CAG/huKO-neo) 導入がキメラ個体作製に及ぼす影響について調べた。BN/Crlj ラット由来の E4.5 胚盤胞から、FGF レセプター阻害剤、MEK 活性化阻害剤、およびラット LIF を含む N2B27 培地中で樹立した 1 ラインの ES 細胞株 (Sry 陽性) を用いた。1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の ES 細胞と 25  $\mu$ g の CAG/huKO-neo 遺伝子をキュベット (500  $\mu$ l) に入れ、800 V、10  $\mu$ F、抵抗 $\infty$  のパルス条件でエレクトロポレーションし、60-mm ディッシュに播種した。2 日後に G418 (200  $\mu$ g/ml) を添加し、7 日後の生存コロニーから Kusabira-Orange 発現陽性コロニーを回収した (図 1)。

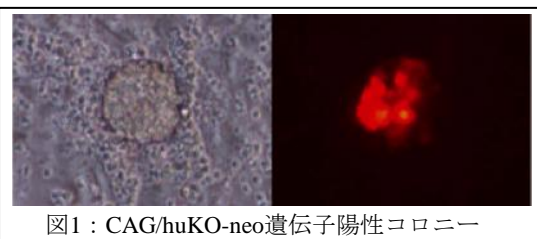


図1：CAG/huKO-neo遺伝子陽性コロニー

これらの ES 細胞 10 個を Wistar/ST または Wistar-Hannover 由来の E4.5 胎胚腔内に顕微注入し、胚移植によって誕生させた産仔におけるキメラ個体の割合を求めるとともに、F1 産仔における CAG/huKO-neo 遺伝子の発現を調べた。

(2) ラット Rosa26 遺伝子座の同定と全身性に tdTomato 遺伝子を発現するノックインラットの作製

近年のラットにおける生殖系列へ寄与可能な多能性幹細胞の樹立・維持法の確立は、

それら細胞への遺伝子導入を介してのトランスジェニックラットおよびノックアウトラットの作製を可能にした。これによりマウスと同様にラットでも逆遺伝学的な個体レベルでの遺伝子機能解析が可能になり、大型で扱いやすく生理学的にもよりヒトに近いモデルとして今後益々利用されるようになることが予想される。マウスやヒトにおいて目的の遺伝子を安定かつ全身性に均一に発現させる手段の一つとして取られているのが Rosa26 遺伝子座へのノックインである。Rosa26 遺伝子座はマウス ES 細胞へのジントラップ法により同定された遺伝子座で、上記のような特徴から、レポーター遺伝子や細胞死を引き起こす毒素遺伝子をコンディショナルに発現できるカセットを挿入したマウスを作製し、組織特異的な Cre recombinase 発現マウスとの交配させることで、遺伝子発現細胞の追跡および消失を可能にし、現代の遺伝子機能解析に欠かせないツールとして用いられてきた。そこで我々はマウス、ヒトに次ぐ種として、ラットにおいて Rosa26 遺伝子座の同定を試み、同遺伝子座への tdTomato 遺伝子ノックインラットを作製した。

#### (3) 4 倍体胚補完による ES/iPS 細胞のみに由来するラット産仔作製の試み

マウスでは ES 細胞あるいは iPS 細胞と 4 倍体胚から再構築したキメラ胚を移植することで ES/iPS 細胞のみに由来する産仔を作製できる (Nagy et al., Development 1990; Zhao et al., Nature 2009)。本実験では生殖系列への寄与が確認されたラットの ES 細胞株および iPS 細胞株を用い、4 倍体胚補完によりラット産仔を作製することを試みた。ドナー細胞には、CAG/Venus-Tg ラット由来 ES 細胞株の rESWiv3i-1 および rESWiv3i-5 (Hirabayashi et al., Mol Reprod Dev 2010)、ならびに Cr1j:WI ラット線維芽細胞由来の EGFP 導入 iPS 細胞株 riPS#3 (Kobayashi et al., Cell 2010) を継代数 7~22 のときに用いた。ホストの 4 倍体胚は Cr1j:WI ♀由来の 2 細胞期胚の割球を 0.5%マンニトール液中で電気融合させることにより調製した。融合胚を 4 日間体内培養して胚盤胞へと発生させ、10 個の ES 細胞あるいは iPS 細胞を胞胚腔内に顕微注射した。これらのキメラ胚を偽妊娠 3.5 日目のレシピエント子宮に移植し、7~11 日後 (E10.5~14.5) に胎仔発生率を調べた。

#### (4) ラット ES 細胞株の生殖系列への寄与条件に関する後方視的解析

ラットでは体細胞核移植や 4 倍体胚補完によって個体を作製する技術が未確立なことから、現時点では ES 細胞の遺伝形質だけを備えた個体を得るにはキメラを作製して野

生型ラットと交配するというコンベンショナルな方法を採用するしかない。本実験では、様々な系統から異なる培地によって樹立したラット ES 細胞株を用い、キメラ経由で G1 世代への形質伝達を調べた。そしてその成否に基づき、ラット ES 細胞株の生殖系列寄与に関わる条件を後方視的に解析した。G1 世代への伝達は、3i 培地 (SU5402、PD0325901、CHIR99021) で樹立した 4 系統 7 ライン、2i 培地 (PD1843521、CHIR99021) で樹立した 3 系統 4 ライン、2i + Forskolin 培地で樹立した 3 系統 5 ラインの ES 細胞株で調べた。ここで言う系統には、(1) WI ならびに WI をバックグラウンドに CAG/venus 外来遺伝子をホモあるいはヘテロに持つ Tg ラット、(2) BN、(3) DA ならびに WI×DA の F3 以上の世代から有色個体を選抜した BLK、(4) 近交系アルビノの F344、が含まれる (全 7 系統)。各ラインの ES 細胞株から胚盤胞注入によって複数のキメラ個体を作製し、それらの産仔を 100 匹以上調べても ES 細胞特性が現れなかった場合にそのラインを陰性と判定した。

#### 4. 研究成果

(1) 近交系 BN ラット胚盤胞に由来する ES 細胞株の樹立と外来遺伝子導入個体の作製。

CAG/huKO-neo 陽性である BN ラット由来 ES 細胞の胞胚腔注入を経て 35% (75/213) の産仔が生まれ、うち 75% (56/75) が毛色キメラだった (表 1、図 2-a)。

表 1. CAG/huKO-neo 導入 ES 細胞由来のキメララット作製

ESライン	胚盤胞系統	注入数	産仔数	キメラ数 [キメラ/注入]
BN2i-4/huKO	Wistar/ST	116	31 (27%) <sup>a</sup>	22 (71%) [22%] <sup>a</sup>
	Wistar-Hannover	97	44 (45%) <sup>b</sup>	34 (79%) [35%] <sup>b</sup>
BN2i-4 (非導入)	Wistar/ST	24	9 (38%)	8 (89%) [33%]

a,b: 異符号間に有意差あり (χ<sup>2</sup>検定: P<0.01)

産仔率、キメラ産仔率とも、遺伝子非導入の陰性対照 ES 細胞での結果 (それぞれ 38%と 89%) と有意な差は認められなかった。雄キメララット 12 個体と野生型雌ラットとの交配により計 441 匹の F1 産仔を作出し、

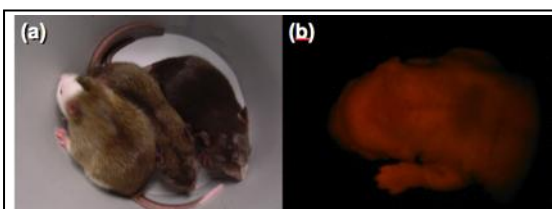


図2: CAG/huKO-neoキメララット (a)と生殖寄与したクサビラオレンジ陽性産仔 (b)

うち 1 キメラ個体に由来する 50 匹の F1 産仔において 12 匹の CAG/huKO-neo 遺伝子の発現を確認した (図 2-b)。



このように、ラット ES 細胞に外来遺伝子 CAG/huK0-neo を導入してもキメラ個体の作製効率には影響しなかった。また、本実験結果は「ES 細胞を介した初めてのトランスジェニックラット誕生 (F1 世代)」という成果も含んでいる。

(2) ラット Rosa26 遺伝子座の同定と全身性に tdTomato 遺伝子を発現するノックイン (KI) ラットの作製

マウス Rosa26 遺伝子座配列との相同性検索により、ラットにも同様の遺伝子座が存在することが明らかとなった。その機能の保存性を確認するために、ラットの Rosa26 遺伝子座に tdTomato と薬剤耐性遺伝子を組み込んだターゲティングベクターを作成し、ラットの ES /iPS 細胞に導入したところ、薬剤耐性コロニーのうち約 30 % と高頻度で相同組換え体が得られ(表 2)、それらは均一に tdTomato を発現していた。

細胞名	系統	細胞種	導入細胞数 (x10e6)	薬剤耐性コロニー数	ピッキングコロニー数	ノックイン株数 (%)
BLK2i-1	DA x Wistar	ES	5x	3	2	1 (50)
			5x	2	2	2 (100)
			2.5x	18	12	6 (50)
DA3i-1	DA	ES	5x	48	24	9 (38)
BN2i-4	BN	ES	5x	8	8	2 (25)
			5x	13	9	2 (23)
T1-3	Wistar	iPS	4x	9	8	3 (38)
DAT3-1	DA	iPS	5x	6	6	1 (17)
Total				107	71	26 (37)

さらに、得られた tdTomato ノックイン ES 細胞をラット胚盤胞に注入し、キメララットの作製、ならびに生殖系列への寄与を介した KI ラットを作製した (図 3)。それらを解析

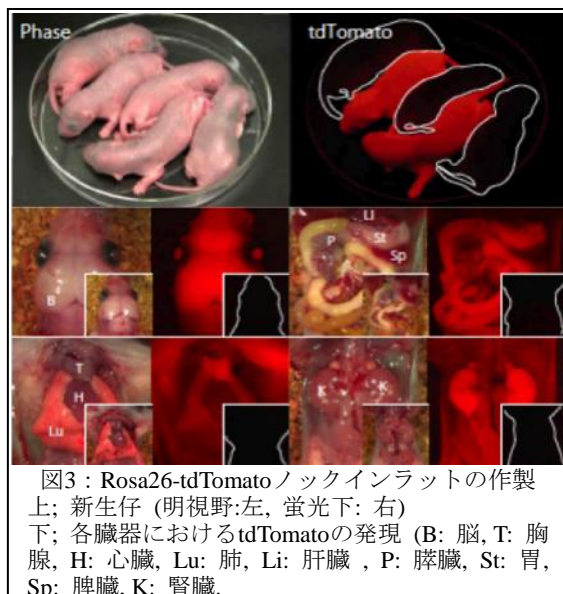


図3: Rosa26-tdTomato ノックインラットの作製上; 新生仔 (明視野:左, 蛍光下: 右) 下; 各臓器におけるtdTomatoの発現 (B: 脳, T: 胸腺, H: 心臓, Lu: 肺, Li: 肝臓, P: 膵臓, St: 胃, Sp: 脾臓, K: 腎臓。

したところ、血液や各臓器において全身性に

安定して tdTomato の発現が認められた。以上、マウスやヒトと同様にラットでも Rosa26 遺伝子座が目的遺伝子を安定して全身性に発現させるために適切な遺伝子座であることが明らかとなった。

また、本研究で得られた新たなツールはラットを用いた様々な研究に有用であると思われる。

(3) 4 倍体胚補完による ES/iPS 細胞のみに由来するラット産仔作製の試み

rESWiv3i-1 ラインでは、E10. 5 で 9% (2/22) が生存胎仔、9% (2/22) が退行途上胎仔として回収できたが、E13. 5 で回収されたのは退行途上胎仔のみ (21%, 5/24) で、E14. 5 では胎仔の存在も認められなかった (0%, 0/78; 図 4)。rESWiv3i-5 ラインの胎仔発生率は E11. 5、E12. 5、E13. 5、E14. 5 でそれぞれ、15% (10/66)、24% (5/21)、9% (2/22)、9% (4/44)

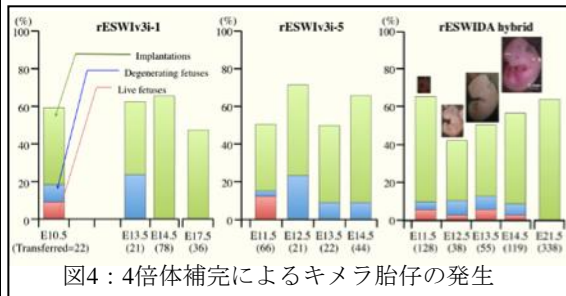


図4: 4倍体補完によるキメラ胎仔の発生

であった。E11. 5 で回収できた生存胎仔のうち 3 例で心拍が確認できたが、E12. 5 で回収された胎仔のうち形態的に正常なサイズだった 3 例には心拍が認められなかった。E13. 5 および E14. 5 で回収された胎仔はすべて退行途上であった。また、riPS#3 ラインにおける E11. 5 と E14. 5 の胎仔発生率はそれぞれ、24% (17/72: うち生存胎仔 12 例) と 8% (11/135: すべて退行途上胎仔) だった。すべての生存/退行途上胎仔について venus あるいは EGFP の発現が確認できた。このように、ラット ES/iPS 細胞を 4 倍体胚で補完しようとしても E12. 5 以降の産仔発生例は得ることはできなかった。4 倍体胚補完によるマウス産仔の作製効率には ES 細胞の継代数や樹立元のマウス系統などが影響することが知られており、この点を考慮に入れてラットにおけるストラテジーを再検討すべきかもしれない。

(4) ラット ES 細胞株の生殖系列への寄与条件に関する後方視的解析

全 16 ライン中 11 のラット ES 細胞株で生殖系列への寄与が確認できた (69%)。樹立培地別に見ると、3i 培地、2i 培地、2i + Forskolin 培地でそれぞれ、4/7 (57%)、2/5 (40%)、5/5 (100%) となった (表 3)。

3 種類の培地全てで樹立を試みた CAG/venus-Tg (ホモ) ラット由来ラインでは、

2i + Forskolin 培地で樹立したラインでのみ G1 世代への伝達が起こったが、この少例数のデータを元に Forskolin の効果を強調し過ぎるべきではない。  
 有色のグループ (2)/(3) とアルビノのグル

表3: ラットES細胞ラインのプロファイル

ID#	ESライン	ラット系統	毛色	性別	増地	生殖寄与キメラ / 総キメラ	生殖寄与産仔 / 総G1産仔
1	W1v/2l-13	Venus Tg-homo	アルビノ	XY	2i	0/3 (0%)	0/76 (0%)
2	W1v/2l-17	Venus Tg-homo	アルビノ	XY	2i	0/6 (0%)	0/168 (0%)
3	BN2i-6	BNSa/N Slc	ブラウン	XX	2i	0/12 (0%)	0/157 (0%)
4	BN2i-4	BNSa/N Slc	ブラウン	XY	2i	1/17 (6%)	12/577 (2%)
5	BLK2i-1	BLK	ブラック	XY	2i	11/12 (92%)	105/333 (32%)
6	W1v/3i-1	Venus Tg-hetero	アルビノ	XX	3i	3/5 (60%)	17/111 (15%)
7	W1v/3i-5	Venus Tg-hetero	アルビノ	XX	3i	3/5 (60%)	3/70 (4%)
8	W1v/3i-10	Venus Tg-hetero	アルビノ	XY	3i	0/4 (0%)	0/136 (0%)
9	W1v/3i-4	Venus Tg-homo	アルビノ	XY	3i	0/4 (0%)	0/96 (0%)
10	BN3i-3	BNSa/N Slc	ブラウン	XY	3i	0/9 (0%)	0/321 (0%)
11	BN3i-5	BNSa/N Slc	ブラウン	XY	3i	1/7 (14%)	2/151 (1%)
12	DA3i-1	DA/Slc	アグーチ	XY	3i	1/2 (50%)	10/64 (16%)
13	W1v/2iF-12	Venus Tg-homo	アルビノ	XY	2iF	1/1 (100%)	2/32 (6%)
14	W1v/2iF-20	Venus Tg-homo	アルビノ	XY	2iF	1/5 (20%)	1/73 (1%)
15	W12iF-11	Crij-WI	アルビノ	XY	2iF	2/2 (100%)	9/64 (14%)
16	W12iF-13	Crij-WI	アルビノ	XY	2iF	1/1 (100%)	1/46 (2%)
17	F344 2iF-37	F344/N Slc	アルビノ	XY	2iF	1/1 (100%)	3/14 (21%)

ープ (1)/(4) 間の比較では、寄与率はそれぞれ 4/6 (67%)、7/11 (64%) となった (図 5)。

ES 細胞株の Genotype も伝達への影響条件ではなさそうである (XX: 67%, 2/3, XY: 64%, 9/14)。また、BLK 由来 ES 細胞株からのキメラ度 (アルビノに占める黒毛色の割合: 60~90%) と伝達度 (G1 産仔あたりの陽性個体の割合: 0~65%) には相関は認められなかった。

以上、ES 細胞樹立に用いた 3 種類全ての培地から生殖寄与能を有する ES ラインを得た。2i+フォルスコリン培地で樹立したすべての ES 細胞ラインは生殖寄与能を有したが、

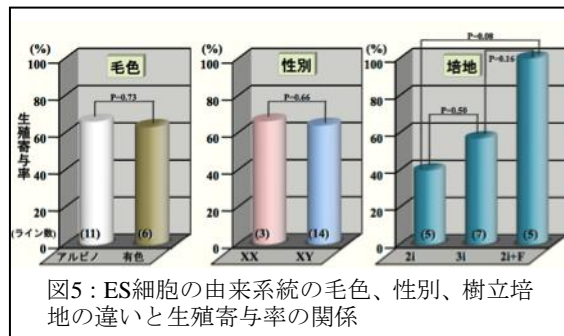


図5: ES細胞の由来系統の毛色、性別、樹立培地の違いと生殖寄与率の関係

フォルスコリン添加の有効性についてはさらなる検討が必要である。ラット系統の毛色および ES 細胞の性別は、生殖寄与能への影響条件ではなかった。アルビノ由来 ES 細胞ラインにおいては毛色寄与率に基づいて生殖寄与能は予測するのは困難だった。

上記成果の他、本研究課題の遂行中にこれら ES 細胞を使って、相同遺伝子組換え法により作製した変異導入 ES 細胞から免疫不全 (IL2 $\gamma$  遺伝子) およびメタスチンニューロン欠損 (Kiss1 遺伝子) などのノックアウト (KO) ラットの獲得にも成功した (未発表)。幹細胞に相同遺伝子組換えを施して KO/KI ラ

ットを作製できる環境が整い、国内外の研究者へ内在遺伝子改変したラット個体の作製技術を提供することが可能となった。

さらに、ラット幹細胞の胚盤胞補完術により膀胱欠損マウス中にラット幹細胞由来の膀胱を再生することに成功したことから、胚盤胞補完法による異種の胚発生過程を利用した臓器再生研究の最初のステップとなることが期待される

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hirabayashi M, 他 6 名. A retrospective analysis of germline competence in rat embryonic stem cell Lines. Transgenic Res. 22: 411-416. (2013). 査読有 doi: 10.1007/s11248-012-9638-7.
- ② Kobayashi T, 他 6 名 6 番目. Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato. Stem Cell Dev. 21: 2981-2986. (2012). 査読有 doi: 10.1089/scd.2012.0065.
- ③ Hirabayashi M, 他 7 名. Ability of tetraploid rat blastocysts to support fetal development after complementation with embryonic stem cells. Mol. Reprod. Dev. 79: 402-412. (2012). 査読有 doi: 10.1002/mrd.22043.
- ④ Hamanaka S, 他 11 名, 11 番目. Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. PLoS ONE 6: e22008. (2011). 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0022008.
- ⑤ Kanatsu-Shinohara M, 他 9 名, 9 番目. Homologous recombination in rat germline stem cells. Biol. Reprod. 85: 208-217. (2011). 査読有 doi: 10.1095/biolreprod.111.090837.
- ⑥ Kobayashi T, 他 11 名, 11 番目. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. Cell 142: 787-799. (2010). 査読有 doi: 10.1016/j.cell.2010.07.039.
- ⑦ Hirabayashi M, 他 5 名. Rat transgenesis via embryonic stem cells electroporated with Kusabira-orange gene. Mol. Reprod. Dev. 77: 474. (2010). 査読有 doi: 10.1002/mrd.21181.

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① 加藤 めぐみ, 他. マウスおよびラットの多能性幹細胞を用いた異種間 4 倍体補完法による個体の作製. 第 35 回日本分子生物学; Late-breaking Abstracts, 2012. 12. 13. 福岡県福岡市.
- ② 葉山 智工, 他. 免疫不全マウスを用いた異種異所発生によるラット始原生殖細胞からの生殖腺様組織誘導. 第 35 回日本分子生物学学会, 2012. 12. 13. 福岡県福岡市.
- ③ 田村 千尋, 他. ラット ES 細胞におけるインプリント遺伝子の DNA メチル化解析. 第 105 回日本繁殖生物学学会, 2012. 9. 7. 茨城県つくば市.
- ④ Kobayashi T, 他. Generation of ROSA26-Tomato knock-in rats via gene targeting of pluripotent stem cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012. 6. 14. Yokohama, Japan.
- ⑤ 平林 真澄, 他. ラット ES 細胞株の生殖系列への寄与条件に関する後方視的解析. 第 59 回日本実験動物学会, 2012. 5. 26. 大分県別府市.
- ⑥ 小林 俊寛, 他. ラット Rosa26 遺伝子座の同定と全身性に tdTomato 遺伝子を発現するノックインラットの作製. 第 59 回日本実験動物学会, 2012. 5. 26. 大分県別府市.
- ⑦ 平林 真澄, 他. 4 倍体胚盤胞期胚に注入したラット ES 細胞の産仔発生能について. 第 104 回日本繁殖生物学学会, 2011. 9. 13. 岩手県盛岡市.
- ⑧ Kobayashi T, 他. Generation of Rat Embryo in Mouse by Tetraploid Complementation Using Pluripotent Stem Cells. The 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2011. 6.17. Toronto, Canada.
- ⑨ Hamanaka S, 他. Generation of germline competent rat induced pluripotent stem cells. The 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2011. 6.17. Toronto, Canada.
- ⑩ 田村 千尋, 他. 4 倍体胚補完による ES/iPS 細胞のみに由来するラット産仔作製の試み. 第 58 回日本実験動物学会, 2011. 5. 25. 東京都江戸川区.
- ⑪ 濱仲早苗, 他. Germline transmission 可能なラット iPS 細胞の樹立. 第 33 回日本分子生物学学会, 2010. 12. 10. 兵庫県神戸市.
- ⑫ 加藤 めぐみ, 他. 近交系 Brown-Norway ラット胚盤胞に由来する ES 細胞株の樹立と外来遺伝子導入個体の作製. 第 103 回日本繁殖生物学学会, 2010. 9. 3. 青森県

十和田市.

- ⑬ 三宝 誠, 他. ラット胚性幹細胞への外来遺伝子導入がキメラ個体の作製効率に及ぼす影響. 第 57 回日本実験動物学会, 2010. 5. 12. 京都府京都市.

〔図書〕(計 1 件)

- ① Hirabayashi M, Hochi S. Rat embryonic stem cells: establishment and their use for transgeniesis (Ed. Atwood CA) "Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications" InTech, Rijeka. 397-410. (2011).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 幹細胞を用いた異種間胚胞キメラ動物作製法 (Method for producing heterologous embryonic chimeric animal using a stem cell)

発明者: 中内啓光、小林俊寛、山口智之、濱仲早苗、平林真澄、加藤めぐみ、

権利者: 国立大学法人東京大学、大学共同利用機関法人自然科学研究機構

種類: 特許

番号: USAN13/146, 977

出願年月日: 2011 年 7 月 29 日

国内外の別: 国外(米国)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 抑制性ニューロン特異的にレポーター遺伝子を発現する非ヒト哺乳動物

発明者: 柳川右千代、川口泰雄、平林真澄

権利者: 国立大学法人群馬大学、大学共同利用機関法人自然科学研究機構

種類: 特許

番号: 4872072

取得年月日: 平成 23 年 12 月 2 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/mamtg/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者