

氏名	徳 永 智 之		
学位(専攻分野の名称)	博士(農学)		
学位授与番号	博 乙 第 2338 号		
学位授与の日付	平成 3 年 9 月 30 日		
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第 4 条第 2 項該当)		
学位論文題目	マウス胚性幹細胞の培養とその応用に関する発生工学的研究		
論文審査委員	教授 丹羽皓二	教授 猪 貴義	教授 佐藤勝紀
	教授 内田仙二	教授 山本 格	

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本研究では新しいマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 株の樹立を試み, 得られた細胞株を用いてその培養条件および効率的なキメラマウスの作製法について検討した。まず, 4 種類の異なる系統のマウス由来の胚盤胞または単離した内部細胞塊から 11 の ES 細胞株を得た。このうち, CBA 系の雄と交配した C57BL/6 の雌から得た胚盤胞に由来する ES 細胞株 (F1/1) に高い増殖性が見られた。この F1/1 細胞は雄型正常 2 倍体の核型を有しており, 多能性を有することが明らかにされたが, その増殖性はフィーダー細胞依存性であり, 多能性の維持には頻繁な継代が必要である。F1/1 細胞を囲卵腔内に注入した 8 細胞期胚を培養後に移植した結果, F1/1 細胞の寄与率がきわめて高いキメラマウスが高率に作出され, その生殖系列にも F1/1 細胞が高率に組み込まれることが明らかとなった。さらに, F1/1 細胞に導入した外来遺伝子 (neo 遺伝子) がキメラを経由して, その子孫に伝えられることも確認された。これらの結果から, 本研究で樹立された F1/1 細胞はトランスジェニック動物の作製に有効であり, その応用性の高いことが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

胚性幹細胞 (ES 細胞) は初期胚から分離される多能性細胞であるが, 長期間の継代培養あるいは選択培養の過程で染色体が変化してその性質が失われる場合が多い。そこで, 本論文では新しいマウス ES 細胞株の樹立を目的とし, その培養条件とキメラ形成能を検討するとともに, 実際にその ES 細胞を用いたトランスジェニックマウスの作成を試み, 次のような結果を明らかにしている。

1. 新しく樹立した11の ES 細胞株のうち、129系雌マウスから得た単離 ICM 由来の TT-12 および胚盤胞由来の TT-B4, さらに F1 雌から得た胚盤胞由来の F1/1 の 3 株について染色体を分析した結果、これらの ES 細胞はいずれも正常な核型を有していた。また、これらの細胞株はいずれも体外において多能性を維持することができた。
2. 最も増殖性の高かった F1/1 細胞の増殖はフィーダー細胞依存性であり、その多能性維持には頻繁な継代培養が必須であった。また、LIF 添加培地において、F1/1 細胞はフィーダー細胞に依存することなく未分化の形態と正常核型を維持することができるが、その増殖と多能性の維持は困難であった。
3. F1/1 細胞を CD-1 系マウス (白色被毛) の 8-細胞期胚囲卵腔内に注入し、一定期間培養後に受卵雌に移植した結果、F1/1 細胞の寄与率が非常に高いキメラマウスを高率に得ることができた。また、ほとんどのキメラマウスが F1/1 細胞に由来する生殖細胞 (精子) を有していた。
4. F1/1 細胞に neo 遺伝子を導入し、得られた 4 株のネオマイシン耐性株を用いてキメラマウスを作製した結果、いずれの株もキメラ形成能を維持していること、さらに交配試験によりネオマイシン耐性 F1/1 細胞が生殖系列に寄与していることが証明された。また、このキメラマウスと交配した CD-1 雌から得た F1 マウスとその兄弟交配によって得られた F2 世代マウスのゲノム DNA を分析した結果、neo 遺伝子の挿入されていることが確認された。

以上のように、本論文は ES 細胞の機能維持のための諸条件を明らかにするとともに、ES 細胞が初期発生機構の解明および形質転換動物の作成に利用され得ることを明解に示したものであり、本審査会は本論文が博士 (農学) の学位に値するものと判定した。