

学 位 論 文 題 名

Developmental potential of mouse
parthenogenetic embryonic stem cells

（マウス単為発生胚幹細胞の発生能）

学位論文内容の要旨

雌性ゲノムしか持たない単為発生胚は、雌性および雄性の両ゲノムを有する受精卵とは異なる遺伝子発現パターンを示す。この単為発生胚と受精卵を凝集して作成したキメラ胚では、単為発生胚由来の細胞が特定の組織から選択的に除去される。同じ単為発生の細胞である単為発生胚幹(ES)細胞を受精卵と凝集させて作成したキメラ胚でも、同じような現象が見られるといわれてきた。しかし、最近、単為発生胚の細胞と単為発生胚由来のES細胞のキメラ胚内での分化能に差異のあることが示唆された。また、単為発生胚の細胞と単為発生胚由来のES細胞を異所移植した場合に形成される腫瘍（奇形腫）内での分化能にも違いのあることも示唆されているが、一致した見解には至っていない。ES細胞を用いてキメラ胚あるいはキメラ組織を作成した場合、他の細胞との識別が可能なマーカーを持つES細胞は、キメラ組織の中での分布を容易に追跡できる。そこで、本研究では、はじめに大腸菌由来 β -galactosidase を発現させる遺伝子をマーカーとして持つ単為発生胚由来ES細胞株を樹立し、そのES細胞株の分化能について受精卵由来のES細胞と比較検討した。

第1章では、単為発生胚由来ES細胞株であるTMA-48Pに β -galactosidase を発現させるためLac Z遺伝子を導入した。その結果、五つのLac Z遺伝子発現細胞株が得られた。RバンドおよびQバンド法を用いての五つのLac Z遺伝子発現細胞株の核型分析を行った結果、いずれも第8染色体がトリソミーであった。さらに、単為発生胚由来ES細胞株（TMA-48PとLac Z遺伝子発現ES細胞株のひとつである

T48PZ4) と受精卵由来ES細胞株 (NR2) の体外での胚様体の形成能と腎臓皮膜下での奇形腫の形成能について比較検討した。その結果、TMA-48PおよびT48PZ4から形成された胚様体の成長と胚葉体内胚葉層の発達は、受精卵由来細胞株に比較して低下することが分かった。また、単為発生胚由来ES細胞株から発生した奇形腫は、受精卵由来ES細胞株から形成された奇形腫に比べて、骨組織や筋繊維など中胚葉由来の組織への分化が制限される傾向が示された。さらに、TMA-48PとT48PZ4の胚様体および奇形腫の形成能には差異のなかったことから、Lac Z発現ES細胞株 (T48PZ4) における第8染色体のトリソミーは、培養下での単為発生の性質に影響のないことが示された。

第2章では、単為発生胚由来ES細胞の培養下での分化能を検討するため、単為発生胚由来ES細胞と受精卵由来ES細胞を凝集させてキメラ胚様体を作成し、キメラ胚様体における単為発生胚由来ES細胞の分布と寄与率を調べた。キメラ胚様体の形態学的および組織学的検索により、単為発生由来ES細胞株 (TMA-48P) は受精卵由来ES細胞株 (NR2) と比較して、特に内胚葉形成期およびその後の発育ステージにおいて極めて低い分化のパターンをとることが示された。また、Lac Z発現単為発生胚由来ES細胞株のT48PZ4と受精卵由来ES細胞株であるTMA-24によって作製されたキメラ胚様体においては、T48PZ4は内胚葉系に特異的に分布し単為発生胚由来ES細胞は胚外胚葉での寄与率が低下していた。単為発生胚由来ES細胞がキメラ胚様体から選択的に除去された本実験の所見は、単為発生胚と正常胚を凝集して作製したキメラ胚から単為発生胚由来細胞が選択的に除去される所見に類似する。したがって、単為発生由来ES細胞は単為発生細胞特有の性質を維持していることが示唆された。

第3章では、単為発生胚由来ES細胞および受精卵由来ES細胞を細胞浮遊液 (未分化の状態) にして皮下に注入あるいは、両者のES細胞から発生した胚葉体 (分化した状態) を腎臓皮膜下に移植して奇形腫形成能を比較検討した。組織学的検索の結果、皮下に未分化な状態で注入された場合と胚様体に分化した状態で腎臓皮膜下に移植された場合では、単為発生ES細胞の奇形腫形成能は異なっていた。すなわち、未分化な状態のES細胞から形成された奇形腫では、単為発生胚由来で

も受精卵由来の奇形種と同じように内胚葉、中胚葉および外胚葉に由来する様々な組織で構成されていた。いっぽう、単為発生胚由来ES細胞から発生した胚様体の移植によって形成された奇形腫は、主に神経系組織や角化上皮などの外胚葉由来の組織と腺上皮や絨毛上皮など内胚葉由来の組織により構成され、中胚葉由来の組織はほとんど認められなかった。このことから、胚様体へ分化した状態の単為発生胚由来ES細胞は中胚葉由来の組織への分化能の低いことが明らかとなった。

以上、本研究で作出したマーカー遺伝子(Lac Z)発現単為発生胚由来ES細胞(T48PZ4)の分化能は、元の単為発生胚由来ES細胞の分化能と比べて差異はなく、単為発生の有力な研究材料となることが分かった。また、このT48PZ4は、胚様体を形成する過程で内胚葉へ特異的に分化するとともに、形成された胚様体内での数が減少し、単為発生細胞の特徴を維持していることが示唆された。さらに、単為発生胚由来ES細胞を異所移植した場合に形成される腫瘍（奇形腫）内での分化能は、移植時点での分化程度の違いによって異なることが分かった。このことから、従来報告されていた奇形腫における単為発生胚の細胞と単為発生胚由来ES細胞の分化能の相違は、細胞を異所移植する時点での両者の分化程度の差異に起因するものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司

副 査 教 授 高 木 信 夫 (地球環境科学研究科)

副 査 教 授 渡 邊 智 正

副 査 助 教 授 高 橋 芳 幸

学 位 論 文 題 名

Developmental potential of mouse parthenogenetic embryonic stem cells

(マウス単為発生胚幹細胞の発生能)

単為発生の研究、とくに単為発生胚細胞のキメラ個体内での分化能を明らかにするためには、マーカー遺伝子を有する細胞は有力な研究材料となる。また、研究材料としては、胚細胞よりも胚幹細胞 (ES細胞) の方が実用性は高い。

そこで、申請者は既存の単為発生ES細胞株の細胞に遺伝子を導入し、 β -ガラクトシダーゼを遺伝子マーカーとして持つ単為発生ES細胞株を樹立するとともに、その分化能を調べた。新たに樹立した単為発生ES細胞株の細胞は第8染色体のトリソミーであったが、その体外培養における分化能は遺伝子導入前の元のES細胞と差異の無いことを示した。ついで、樹立した遺伝子導入単為発生ES細胞と受精卵由来ES細胞を凝集させてキメラ胚様体を作成し、両者の分化能の違いを調べた。その結果、単為発生ES細胞は受精卵由来ES細胞に比べて内胚葉形成期以降の発育において極めて低い分化パターンを示すことを明らかにした。さらに、樹立単為発生ES細胞の皮下移植および単為発生ES細胞から発生した胚様体の腎臓皮膜下移植を行い、単為発生ES細胞の奇形腫形成能を検討した。その結果、未分化状態の単為発生ES細胞の皮下移植によって形成された奇形腫では、受精卵由来ES細胞によって形成された奇形腫と同じように内胚葉、中胚葉および外胚葉に由来する種々の組織が観察された。いっぽう、分化の進んだ状態にある単為発生ES細胞の胚様体から発生した奇形腫は、主に外胚葉および内胚葉由来組織により構成され、中胚葉由来組織への分化能の低いことを明らかにした。

以上のように、申請者は単為発生特有の発生・分化能を有するマーカー遺伝子導入単為発生ES細胞株を樹立し、単為発生胚の代わりに単為発生の研究に活用できることを示した。さらに、奇形腫における単為発生ES細胞の分化能は、奇形腫形成開始時点でのES細胞の分化程度の違いによって異なることを明らかにした。よって、審査員一同は申請者が博士 (獣医学) の学位を受ける資格を有するものと認めた。