〔総説〕

家畜におけるES細胞の利用技術

今 井 裕

農林水産省畜産試験場

農林研究団地、私書箱5号、つくば市、305

Establishment of ES Cell Lines and Their Possible Application
for Genetic Modification of Domestic Animal

Hiroshi Imai

National Institute of Animal Industry,

Tsukuba Norindanchi, P.O. Box 5 Ibaragi, 305

(Received November 30, 1993)

1. はじめに

動物生体内には、未分化な性質を有しながら増殖する神経幹細胞、造血系幹細胞、間葉系幹細胞、生殖系幹細胞等の細胞群がある。これらはある条件下でより高次の機能をもつ数種類の細胞に分化する能力をもつことから、細胞分化のメカニズムの解明、あるいは細胞から組織へと構築されてゆくメカニズムの解明に有用となる。なかでも卵巣あるいは精巣等の生殖巣に自然発生的に生ずる腫瘍（奇形腫）は、多くの異なった組織に分化しうる未分化幹細胞群として古来より注目を集めてきた。すなわち、細胞から組織構築を越えて、個体構築へと発展する可能性をこれらの細胞は有している。

一方、遺伝子工学技術の進展にともなって多くの遺伝子が単離され、培養細胞に目的遺伝子を導入することによって機能解析が行なわれてきた。しかし、培養細胞はある特殊な細胞の機能を維持しているものの、複雑な生体組織内での遺伝子機能解析に不十分である。そこで、すべての組織に分化しうる全能性を有する受精卵に目的遺伝子を導入し、個体レベルでの遺伝子機能解析が行なわれるようになった。しかし、この手法では導入した遺伝子が染色体内にランダムに組み込まれるために、遺伝

子発現の組織・時期特異性は十分に制御できず、必ずしも本来の機能を反映しているとは言い難い。

最近になって、受精後間もない初期胚から未分化な性質を持つ幹細胞株が樹立されES (Embryonic Stem) 細胞と名づけられた。この細胞は、受精卵のように単独で個体を構築する全能性を有しないが、初期胚との共存下ですべての組織への構築に関与しうる。ここで得られた個体は、2種類の異なった細胞に由来する遺伝形質をもつキメラ個体となるが、キメラ個体間の交配によってES細胞の遺伝形質のみを反映する個体を得ることができる。さらに、ES細胞は培養細胞と同様に体外で遺伝子操作によって、目的とする染色体領域への遺伝子導入が可能となった。現在では、標的遺伝子導入法として、様々な遺伝子機能解析研究に多用されている。

ここでは、個体再構築能を有する多能性幹細胞であるES細胞に注目し、樹立に至る歴史、樹立方法、ES細胞の性質及び応用技術領域（特に畜産領域）でのES細胞の活用技術について概説する。最近のマウスES細胞を用いた遺伝子機能解析については、紙面の関係上ここでは割愛させていただく。詳細は総説を参照されたい (Capecchi, 1989; RosantとJoyner, 1989; 山村, 1993)。

2. E S細胞株作出の歴史

E S細胞について論じる場合、E C (Embryonic Carcinoma Cell) を無視することは出来ない。マウスでは従来、精巣や卵巣に腫瘍を高発する系統が知られていた。129/Sv (精巣性奇形腫) あるいはL TやL X B J (卵巣性奇形腫) がこれに当たる。これらの系統では、実験的に初期胚を精巣や腎臓に移植することによって奇形腫を形成させることが可能で、この腫瘍から多能性分化能をもつ細胞株として得られたものがE C細胞である (KleinsmithとPierce, 1964)。E C細胞の多分化能を顕著に示したのは、マウス胚内にE C細胞を導入した場合で、正常胚細胞と同様に個体のあらゆる組織に分化し、E C細胞と胚細胞に由来する2種類の細胞が共存するキメラ個体が得られたことによる (Brinster, 1974)。しかし、この細胞は本来ガン化した細胞から分離されているために、種々の組織において腫瘍が発生するとともに、次世代にE C細胞の形質を伝達する生殖細胞に分化しえないことが明らかとなった。

そこで、E C細胞と同様初期胚を出発点として、体外で培養・維持することによって1981年に株化された細胞がE S細胞である (Evans と Kaufman, 1981; Martin, 1981)。

現在株化されているE S細胞株としては、A B (Mc Mahonら, 1990)、D 3 (Doetschmanら, 1985)、E 1 4 (Hooperら, 1987)、C C E (Kuehnら, 1987) があり、これらはE C細胞と同様129/Sv系マウスから作出されている。これ以外の系統からの株化の報告は少ないが、C57BL系 (LedermannとBurki, 1991) 及びF 1 (C57BLXCBA)(TT-12; TokunagaとTsunoda, 1989) マウスからも作出されている。特殊な例としては、半数体 (Kaufmanら1983)、突然変異マウス由来 (Mugnusonら, 1982; Martinら, 1987) 胚からのE S細胞株の作出も報告されている。

E S細胞の株化によってE C細胞と同様にこの細胞のキメラ形成能が検討され、E S細胞がすべての組織に分化すると同時に生殖細胞へも分化し、その形質が次世代に伝達する能力のあることが示された (Bradleyら, 1984)。このような性質は、E C細胞には見られなかったものであり、両細胞とも未分化細胞でありながら決定的な差はこの個体再構築能にあるといえる。

3. E S細胞の作出とその評価

1) E S細胞の作出

ここでは、まずマウスE S細胞株の作出方法について

図1 E S細胞株作出過程の概略

概説するが、その詳細については、優れた解説書があるので参照されたい (Robertson, 1987; 徳永, 1991)。

E S細胞株樹立の過程を端的に述べるとすれば、初期胚を胎子由来の線維芽細胞を支持細胞 (Feeder Cell) とする細胞上で、完全に体外条件下で継代培養するというに尽きる (図1)。しかし、現在多くの研究者に利用されているにも係わらず。細胞株は以外と少なく、しかも、キメラ形成能や生殖細胞に効率良く分化しうるE S細胞株は極めて限られる。この意味で、手法としては確立されているとはいえない。個々の研究者の経験や、用いている培養条件によって細胞株の性質は微妙に差がでてくる。

著者らの研究室では、自然交配後3.5日令の子宮から回収した胚盤胞期胚を培養に用いている。支持細胞としては、自然交配後14-16日令の胎子由来の細胞を用いている。つまり、胎子全体を細切りした後、0.25%トリプシン溶液で細片組織から細胞を分散させる。この細胞浮遊液を、10cmのプラスチックシャーレがコンフルエントになるまで、10%ウシ胎子血清を添加したダルベコ変法イーグル培地 (D-MEM) 中で増殖させ、一旦凍結保存する。初期胚が準備できる数日前に、保存しておいた細胞を融解し、必要量の細胞を増殖させた後、マイトマイシンC (10 μ g/ml) を含む培養液で2-3時間処理し、支持細胞の増殖を停止させる。これらの細胞は、トリプシン処理によって、ディッシュから回収し、4穴マルチディッシュに3 $\times 10^5$ cell/mlとなるように導

入して支持細胞とする。

初期胚の培養は、回収した胚盤胞期胚を4穴マルチディッシュの支持細胞上に1個ずつ導入して行なう。培養液としては、基本液をD-MEMとし、これに20%ウシ胎子血清、0.1mM 2-メルカプトエタノール、核酸混合液(アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、チミジン)及び非必須アミノ酸を加えた通称ES培地(Robertson, 1987)と呼ばれるものを用いる。現在では、サイトカインの一種であるLIF(Leukemia Inhibitory Factor)が胚細胞の分化を抑制することが知られ(Williamsら, 1988; Smithら, 1988)、培養液中に添加することが一般的となっている。

37℃のCO₂インキュベーター内で培養すると、胚は翌日には支持細胞に接着し、trophectodermの進展とともにICM領域の細胞が区別できるようになる。培養開始後、4-6日後には、ICM領域の細胞はさらに大きくなり細胞塊(コロニー)を形成する。このコロニーをタイミング良く新しい支持細胞上に継代することが重要であり、タイミングを失うとコロニーは分化してしまう。継代は、0.1%トリプシン 0.1% EDTA溶液によって行なう。数回の継代を続けると、安定して増殖を続ける細胞群が得られる(写真1)。増殖速度が早いために、培養液は毎日交換する。樹立されたES細胞の形態は、支持細胞として用いている線維芽細胞と明瞭に区別がつく(写真1)。細胞間の境界がはっきりせず、細胞質に比べて核が占める割合が大きいことがES細胞の形態的特徴である。マウスの系統によっても異なるが、樹立効率はおおよそ10%程度である。

作出されたES細胞を評価する方法はいくつかある。

始原生殖細胞 (PGC :

Primordial Germ Cell) のマーカーであるアルカリフォスファターゼ活性は、ES細胞でも陽性に検出される。また、染色体数は正常二倍体に維持されている。このことは、後に述べるキメラ形成能とも関連し、一般的に正常染色体数を有した細胞の比率が低下すると、キメラ形成能は低下する。さらに、ES細胞を体外で支持細胞のない条件下で培養したり、マウス皮下に注入することによって種々の組織へ分化する多分化能を検討すること出来る。しかし、前述したように、ES細胞の価値が単なる多分化能ではなく、個体再構築能

写真1 マウスES細胞株(×196)

であることを考えると、キメラ動物を作出し、それらの生殖細胞形成にES細胞が関与しているかについて検討することが必須となる。

株化されたES細胞からキメラを作出してみると、そのキメラ形成能、さらに生殖細胞への寄与度は細胞株ごとに異なってくる。キメラ動物の作出法として現在最も良く用いられている方法は注入法(Brinster, 1974)である。通常、ES細胞の毛色形質とは異なる系統の胚盤胞期胚の腔内にES細胞を導入する。この結果、ES細胞のキメラ個体組織内での寄与率は毛色によって容易に判定できる。キメラ動物の作出効率は、用いるES細胞株とそれを導入する胚の系統によって左右される。129系統由来ES細胞はC57BL/6系のマウスの胚に導入する場合に、効率良く生殖細胞キメラが得られる(Schwartzbergら, 1989)。我々は、F1マウス由来のES細胞(TokunagaとTsunoda, 1993)を用いているが、この場合はICR系マウス胚に導入するのが良い。

表1 種々の遺伝子の分化・未分化細胞における発現制御

Gene	Preimplantation embryo	ES/EC cell	Differentiated ES/EC cell	PGC	Other tissue
E-ALPase	+	—		—	
TN-ALPase	±	±		+	+
K-FGF		—	+		
IGF-II			+		
Lamin		—	+		
Lamin B		+			
c-myb		±	+		
Oct-3		+	—	—	—
PDGF-A		+	±		
PDGF-B		±			
TGF-β ₁		+	±		
TGF-β ₂	+	—	+		
TGF-β ₃		—	+		

+ 発現; — 発現抑制; ± 低発現

いずれにしても、生殖細胞キメラの作出効率を上げることは極めて重要である。TokunagaとTsunoda (1993)は、通常注入に用いる胚盤胞期胚よりやや速い発生ステージにある8細胞期胚にES細胞を注入することにより、非常に高い生殖細胞キメラ個体を得ることに成功している。注入された胚が胚盤胞期に発生したとき、ICM領域へのES細胞の寄与度が高まり、結果的に生殖細胞キメラ作出効率が高まったと考えられる。

最近、新しいキメラ作出法が報告された (Woodら, 1993)。この方法は、トリプシン処理により分離したES細胞上に桑実胚を置き、一定時間共培養して胚にES細胞を接着させると同時に胚内に取り込ませる簡単な手法で、これらの胚からキメラ動物を得ることが出来る。この方法の利点は、注入法で用いるマイクロマニピュレーター等の高価で、操作に熟練を要する機械を必要としないことである。著者らも、キメラ形成効率を両手法で比較したところ、違いを認めなかった。しかし、胚に接着するES細胞数が増えるとその後の胚発生が低下する傾向が見られる。いずれにしても、ES細胞を用いてキメラ動物を作出する際には、ICM領域にどの程度ES細胞が存在するかが重要であり、もし、ICM領域すべてがES細胞から構成されれば、そこから生じる個体は生殖細胞も含めてES細胞の形質をもった動物の得られることが期待できる。

これまでに株化されたES細胞のほとんどは雄の核型を有する。結果的に、キメラ個体は生殖細胞への寄与率が高まるにつれて性比は雄に強く傾く傾向がある。雌の核型をもつES細胞のキメラ動物を作出した例は見当たらないが、この場合、ES細胞の維持の過程で一方のX染色体が消失しやすいといわれている。最近我々は、チロシンキナーゼ遺伝子のgene targetingを行なう過程で、元来雄の核型をもつES細胞でありながら雌キメラ個体を高率に生じるES細胞を分離した (Tokunagaら, 1994)。この細胞は性決定遺伝子を含むY染色体を欠いた39本の染色体構成を有していることが明らかとなった。従って、ES細胞を介したキメラ個体の作出は39本の染色体構成のES細胞でも可能であり、雌型のES細胞からキメラ個体が得られない原因は染色体消失以外の、X染色体の不活性化あるいはゲノムインプリンティング等の原因があるのかもしれない。

ES細胞株としてはキメラ形成能は低くても、それを構成する個々の細胞は極めて高率に生殖細胞キメラを生じることが示されている (Nagyら, 1993)。生殖細胞キメラを効率良く作出できることがES細胞の価値と考えれば、このような細胞をうるための樹立・継代条件が重要となる。

2) ES細胞の特性

EC細胞やES細胞等の未分化細胞をレチノイン酸やcAMP類似体によって分化誘導し、それに伴う細胞の生化学的な性質の変化や特異的遺伝子の発現についてはこれまで多くの報告がある。しかし、未分化状態が維持されている細胞そのものの性質、つまりES細胞とはそもそもどのような細胞であるのかについては全く分かっていない。ES細胞であることを示すマーカーが存在すればES細胞株を作出するうえでも、またそれがES細胞のキメラ形成能や生殖細胞への寄与度と関連してい

図2 PGCの増殖に関する因子

ば極めて有用となる。表1には、未分化細胞の分化前後における各種遺伝子の発現変化についてまとめて記している。未分化状態で発現が抑制されているいくつかの遺伝子 (胚性アルカリフェスファターゼ、K-FGF, Lamin A/C, TGF- β) が存在する。しかし、これらの特徴は、EC細胞も共有しており、ES細胞とEC細胞を区別するマーカーとはならない。

ES細胞が、初期胚からどのような過程を経てその未分化能や増殖能を獲得するのかは不明である。最近、PGCからES様細胞の株化に成功している (Matsuiら, 1992)。これまでのところ、これらの細胞がキメラ個体内の生殖細胞に寄与するかどうかの確実な証拠はないが、PGCから無限増殖系に入った細胞群がES細胞と同様の性質をもつとすれば、この細胞の増殖性を検討することによってES細胞の樹立やその特性解明に何らかの糸口が見いだせる可能性がある。

PGCは胚発生の初期から体細胞の細胞系譜から独立して存在する。これらの細胞は結果的に将来配偶子に分化する点で特殊である。PGCの増殖には、ある種の増殖因子が必要なことが推測されていた。マウスにおいて、S1 (Steel)とW (White Spotting) と呼ばれる2種

類のmutant系は、いずれもPGCや造血系幹細胞の増殖が著しく抑制される表現形を示す。このmutantはそれぞれS1とWの遺伝子部位に異常を有しているが、W geneはtyrosin kinase familyの細胞表面 receptorであるc-kit をコードし、S1 geneはこのreceptorに対するligandであるSCF (Stem Cell Factor) をコードしていた。両者のmutationが同様の現象を誘導することから、これらの遺伝子は幹細胞の増殖に重要な作用を果たしていると考えられた (Godlinら, 1991)。図2に、体外培養条件下でのPGCの予想される増殖メカニズムについて簡単に図示した。PGCは、元来 c-kit を発現している。従って、体外でPGCが増殖しない原因は支持細胞がc-kit に対するligandであるSCFを発現していない可能性がある。そこで、PGCの体外培養に及ぼすSCFの効果について検討した。この結果、SCFはPGCの生存性には有効に作用するが、増殖を支持するためには別の要因が必要とすることが示された (Godlinら, 1991; Dolci ら, 1991)。このことは、可溶性のSCFしか発現していないSteel mutationでは、PGCの増殖が抑制され本質的に不妊となることと一致する。そこで、Matsuiら(1991)は、膜結合型のSteel factor geneを欠いた支持細胞に膜結合型SCF geneを発現させるとともにLIFの存在下でPGCを培養したところ、PGCの増殖が認められたことから、PGCの増殖に対する膜結合型SCFとLIFの協調作用を示した。しかし、この場合でも、生体内におけるPGCの増殖には及ばないためにそれ以外の因子の必要性が指摘されてきた。さらにMatsuiら(1992)は、oligodendrocyteにおける幹細胞の増殖にbFGF (basic Fibroblast Growth Factor) が有効であることから、膜結合型SCFの発現、LIF及びbFGFの共存下でPGCを培養したところ、20代以上にわたりPGCの体外培養が可能であり、これらの細胞はES細胞に匹敵する未分化・多能性を有していることを明らかにした。

生体内では、いったん増殖したPGCは生殖細胞へと分化する前に増殖を停止する。しかし、膜接合型steel factor、LIF、bFGFの存在下でPGCが増殖を維持し続けることは、奇形腫の発症との関連で興味深い。さらに、この奇形腫は元来EC細胞の分離にも用いられたことから、ES細胞樹立の際にも同様な増殖因子の存在を必要とする可能性を示唆している。

3. 家畜におけるES細胞の作出

マウスES細胞が遺伝子機能解析に極めて重要な武器として汎用されるに至っているが、家畜では残念ながらこの種の未分化細胞の株化には成功していない。表2に示すように、多くの家畜で胚細胞に由来する株化細胞は樹立されている。しかし、これらの細胞がES細胞であるという根拠は乏しい。マウスと同様に、ES細胞であることの基準となる細胞の形態、核型、体外・体内での分化能、のいずれにおいてもES細胞の特徴を示しているが、ES細胞特異的のマーカが存在しない現在、ES細胞からのキメラ動物、生殖細胞キメラ動物の作出によって、この細胞の多分化能を証明する必要がある。

ES細胞株の作出がマウス以外の動物種で困難な理由は明らかでない。考えられる原因として、1) 胚細胞培養系が十分整備されていない。2) 胚細胞の生存性や増殖を維持するのに適当な支持細胞がない。3) ES様細胞が株化されたとしてもキメラ動物を作出することが技術的に困難である等が考えられる。著者らは、家畜に比べて実験材料が容易に手に入り、キメラ作出技術も確立されているウサギを用いてES細胞の作出を試みている (Imaiら, unpublished data)。

交配後5日目の雌子宮から胚盤胞期胚を回収し、mitomycin C処理したマウス胎子由来線維芽細胞を支持細胞とするES培養液中で培養する。培養開始後3日目にはマウスES細胞と同様の形態を有したコロニーが出現してくる。これらのコロニーをほぼ1週間毎に新しい支持細胞上に継代することによって5継代までコロニーを維持することが出来る (写真2)。交配後6日目に回収した拡張胚盤胞期胚から出現したコロニーは容易に分化するので、5日目から6日目までの間に細胞分化の分岐点の存在が想像できる。コロニーは未分化細胞マーカーの一種であるアルカリフォスファターゼや4C9 (Yoshinagaら, 1991) に陽性の反応を示すが、この反

写真2 ウサギES細胞 (×520)

応性は培養開始後6日目から急速に低下して行く。従って、形態的にはES細胞のコロニーの形態を有していても、未分化細胞の性質は徐々に失われていることが想像される。これらの未分化性、多分化能がいつ消失するかについて、実際にキメラ動物を作出して検討したところ、ICMの細胞からはキメラ動物が出来るのに対して、6日間培養した細胞からはキメラ動物は全く得られなかった。このことから、少なくともウサギでは、継代可能な細胞であっても、その多分化能は培養初期からすでに失われていると考えられる。

家畜のES細胞株作出においても、キメラ動物の作出条件について検討するとともに、ES細胞特異的なマーカーの検索が重要であり、これによって樹立された株化細胞の検定や細胞株作出に適した培養条件の検討が可能となると考えられる。

4. ES細胞の利用技術

ES細胞が体外で培養細胞と同様に操作できる利点は計り知れない。このことは、事実上細胞に対してあらゆる変異導入を行なえることを意味する。このような利点を生かしたES細胞の利用法として標的遺伝子組換え法(Gene Targeting)と遺伝子タギング法(Gene tagging)(Gosslerら, 1989; FriedrichとSoriano, 1991)がこれまで報告されている。両者とも最終的には遺伝子機能解析を目的としたものであるが、前者が細胞内で起こる導入遺伝子に対する相同組換え現象を利用した遺伝子変異導入に対して、後者は未知遺伝子の単離と機能解析を目的としている。これらの技術は単に遺伝子の機能解析という基礎科学領域のみならず、ヒト疾患に関与する遺伝子を標的とした原因遺伝子の機能解析や疾患モデル動物作出による治療法の開発に今後重要な役割を果たして行くであろう。

家畜におけるES細胞の利用は応用技術と密接に関わってくる。現在、家畜におけるトランスジェニック動物は、ほとんどマイクロインジェクション法によって行なわれている。しかし、その遺伝子導入効率は低く、これに代わる遺伝子導入法として遺伝子導入ES細胞から効率良くキメラ個体が得られればその利点は大きい。第2に、マウスで行なわれている標的遺伝子組換え法の家畜ES細胞への応用が考えられる。ヒト遺伝子疾患モデル動物としてのマウスの有用性は明らかであるが、十分とはいえない。例えば、神経活動等の高次生理機能は、構造的・機能的にマウスをモデルとして解明できない部分があると想定される。そこで、よりヒトに近いブタあるいはミニブタが有効であり、ES細胞を用いた原因遺伝子の標

表2 家畜におけるES細胞株作出の試み

Species	Culture condition	Feeder cell	Cell line	Chimera	Criteria	Reference
Porcine	D-MEM + 10%CS + 10%FCS	STO	Yes	-	Morphology	Piedrahita et al (1988)
	D-MEM + 10%FSC + 10%PS	Porcine	Yes	-	Morphology	Strojek et al (1990)
	D-MEM + 20%FCS + LIF	uterine fibro. STO	Yes	-	Morphology	Lee et al (1992)
	D-MEM + 10%CS + 5%FCS	STO	Yes	?	Morphology	Notarianni et al (1990)
Bovine	TCM-199 + 10%NBBS	Mouse embryonic fibroblast	Yes	-	Morphology	Saito et al (1992)
	MEM- α + 10%FCS + LIF				Karyotype Invitro differ. Nuclear Trans.	
Sheep	TCM-199 + 20%FCS	Bovine liver fibroblast	Yes	-	Morphology Invitro differ.	Meinecke-Tillmann & Tillmann (1992)
Goat	TCM-199 + 20%FCS	Bovine liver fibroblast	Yes	-	Morphology Invitro differ.	Meinecke-Tillmann & Tillmann (1992)
Mink	MEM- α + 20%FCS	Mink embryonic fibroblast	Yes	No	Morphology Karyotype In vivo & in vitro differ.	Sukoyan et al (1992)

的遺伝子組換えによる変異導入が可能になると考えられる。標的遺伝子組換えは、動物ゲノムのすべてを対象としうるので、家畜の生産物の改変も可能となる。乳汁中のアレルゲンとなる蛋白質の除去や、遺伝子発現調節領域への染色体部位特異的な外来遺伝子導入も可能となる。

ES細胞を介してトランスジェニック動物を作出する際の欠点は、ES細胞から直接個体を再構築出来ない点である。変異・外来遺伝子を導入されたES細胞は、キメラ動物の生殖細胞を介してのみ次世代にその形質を伝達しう。目的とするトランスジェニック動物を得るためには、このキメラ動物から最低2世代の交配と検定を必要とする。そこで、未分化な胚細胞から個体再構築が可能な核移植技術のES細胞への応用が考えられる。

家畜では、1986年に Willadsen がこの技術を確立し、ヒツジで核移植由来の産子を得ることに成功している。核移植技術の本質は、レシピエント卵子となる未受精卵子から核を除去し、ドナー核となる発生初期胚の割球を karyoplast の状態で電氣的にレシピエント細胞に導入することである。ウシでは、すでに単一の受精卵から複数の遺伝的に同一の形質を有する個体が作出され (Willadsen, 1989)、優良家畜の大量増殖技術として期待されている。

核移植に用いられているドナー核は、胚発生初期のものであり一般的に未分化の状態にあると考えられる。ドナー核に用いることの出来る胚発生時期は動物種によって異なる。マウスでは、2細胞期がこれに相当し、胚盤胞期のICMあるいはES細胞核を用いた核移植は成功していない。一方、ウシでは少なくとも64細胞期胚のドナー核から産子が得られ (Willadsenら, 1991)、ヒツジでもICM細胞の核移植は可能である (Smith & Wilmut, 1989)。さらに、最近ウシで長期間培養したICMに由来する細胞をドナー核として用い、産子が得られたと報告されており (SimsとFirst, 1993)、少なくともこの動物種ではES細胞をドナー核として用いることが出来る可能性がでてきた。もしこれが事実とすれば、遺伝子を導入したウシES細胞から遺伝子導入動物を核移植によって直接作出することが出来るわけで、応用技術として画期的なものとなる。

5. おわりに

多能性未分化細胞の研究は1950年代から開始されているので、すでに40年余の研究の歴史をもつ。その研究の中心となって活躍した実験動物がマウスであって、初期胚の体外培養、体外受精、胚操作、核移植といった諸技

術がこの研究と付随して産み出されてきた。いわば、この研究が発端となって、研究の過程で必要な諸技術が開発され、現在の発生工学と呼ばれる研究領域にまで発展してきたといっても過言ではない。この研究の一つの到達点が、1981年に樹立されたES細胞であり、すでに紹介したようにその個体再構築能を有する幹細胞としての能力を個体レベルでの遺伝子機能解析研究に如何なく発揮している。一方、家畜における初期胚の研究は1970年代から開始され所定の成果を収めてきたが、個々の技術の成熟度はマウスのそれに比べるべくもなく低い。恐らく、家畜におけるこのような状況は、ES細胞株の樹立の成否に少なからず影響する。近い将来、家畜における発生工学技術が確立されるとともに、ES細胞株が樹立されることを期待したい。この細胞株は、畜産領域を含めた応用技術研究にマウスES細胞株以上の潜在価値をもっている。

ここで紹介した研究は、徳永智之 (農林水産省畜産試験場)、高橋清也 (農林水産省畜産試験場)、村上博 (日本ハム中央研究所)、内田昌樹 (岡山大学) 諸氏との共同研究によってなされたもので、ここに深謝する。また、研究の一部は農林水産省特別研究費、科学技術庁振興調整費の援助を受けて行なわれた。

文 献

- Bradley, A., M. Evans, M. H. Kaufman & E. Robertson, 1984. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309: 255-256.
- Brinster, R. L., 1974. The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.*, 140: 1049-1056.
- Capecchi, M. R., 1989. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.*, 5: 70-76.
- Dolci, S., D. E. Williams, M. K. Ernst, J. L. Resnick, C. I. Brannan, L. F. Lock, S. D. Lyman, H. S. Boswell & P. J. Donovan, 1991. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*, 352: 809-811.
- Evans, M. J. & M. H. Kaufman, 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.

- Friedrich, G. & P. Soriano, 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.*, 5: 1513-1523.
- Gardner, R. L., 1968. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature*, 220: 596-597.
- Godlin, I., R. Deed, J. Cooke, K. Zsebo, M. Dexter & C. C. Wylie, 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 352: 807-809.
- Gossler, A., A. Joyner, J. Rossant & W. C. Skarnes, 1989. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science*, 244: 463-465.
- Hooper, M., K. Hardy, A. Handyside, S. Hunter & M. Monk, 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germ line colonization by cultured cells. *Nature*, 326: 282-295.
- Kaufman, M. H., E. J. Robertson, A. H. Handyside & M. J. Evans, 1983. Establishment of pluripotent cell lines from haploid mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 73: 249-261.
- Kleinsmith, L. J. & G. B. Pierce, 1964. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.*, 24: 1544-1551.
- Kuehn, M. R., A. Bradley, E. J. Robertson & M. J. Evans, 1987. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 326: 285-288.
- Lee, K. H., K. M. Ebert & V. E. Papaioannou, 1992. The derivation, maintenance, and differentiation of pluripotent cell lines from 7-8 day old porcine blastocysts. Abstract of 12th International Congress on Animal Reproduction (Hague), Vol. 2: 706-708.
- Ledermann, B. & K. Burki, 1991. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp. Cell Res.*, 197: 254-258.
- Martin, G. R., L. M. Silver, L. M. Fox & A. L. Joyner, 1987. Establishment of embryonic stem cell lines from preimplantation mouse embryos homozygous for lethal mutations in the t-complex. *Dev. Biol.*, 121: 20-28.
- Matsui, Y., D. Toksoz, S. Nishikawa, S.-I. Nishikawa, D. Williams, K. Zsebo & B. L. M. Hogan, 1991. Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, 353: 750-752.
- Matsui, Y., K. Zsebo & B. L. M. Hogan, 1992. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70: 841-847.
- McMahon, A. P. & A. Bradley, 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62: 1073-1085.
- Meinecke-Tillmann, S. & B. Meinecke, 1992. Establishment in culture of embryonic cell lines from small embryonic cell lines from small domestic ruminants. Abstract of 12th International Congress on Animal Reproduction (Hague), Vol 2: 718-720.
- Mugnuson, T., C. J. Epstein, L. M. Silver & G. R. Martin, 1982. Pluripotent embryonic stem cell lines can be derived from tw5/tw5 blastocysts. *Nature*, 298: 750-753.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly & J. C. Roder, 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 8424-8428.
- Nortarianni, E., S. Lauric, R. M. Moor & M. J. Evans, 1990. Maintenance and differentiation in culture of pluripotent embryonic cell lines from pig blastocysts. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 40: 51-56.
- Piedrahita, J. A., G. B. Anderson & R. H. BonDurant, 1990. Influence of feeder layer type efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology*, 34: 865-877.
- Robertson, E. J. 1987. Embryo-derived stem cell lines. in *Teratocarcinomas and embryonic stem cells—A practical approach*. (Robertson, E. J. ed.), 71-112. IRL Press, Oxford.

- Rossant, J. & A. L. Joyner, 1989. Towards a molecular-genetic analysis of mammalian development. *Trends Genet.*, 5: 277-283.
- Saito, S., N. Strelchenko & H. Niemann, 1992. Bovine embryonic stem cell-like cell lines cultured over several passages. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 201: 134-141.
- Schwartzberg, P. L., S. P. Goff & E. J. Robertson, 1989. Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science*, 246: 799-802.
- Sims, M. M. & N. L. First, 1993. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Theriogenology*, 39: 313.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl & D. Rogers, 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336: 688-690.
- Smith, L. C. & I. Wilmut, 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40: 1027-1035.
- Strojek, R. M., M. A. Reed, J. L. Hoover & T. E. Wagner, 1990. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Theriogenology*, 33: 901-913.
- Sukoyan, M. A., Golubitsa, A. I. Zhelezova, A. G. Shilov, S. Y. Vatolin, L. P. Maximovsky, L. E. Andreeva, S. D. Pack, S. I. Bayborodin, A. Y. Kerkis, H. I. Kizilova & O. L. Serov, 1992. Isolation and cultivation of blastocyst-derived stem cell lines from American mink (*Mustela vison*). *Mol. Reprod. Dev.*, 33: 418-431.
- 徳永智之, 1991. 胚性幹細胞の樹立とその応用. 畜産の研究, 45: 125-134.
- 徳永智之・角田幸雄, 1989. マウス胚性幹細胞株の樹立について. 家畜繁殖学会誌, 35: 173-178.
- Tokunaga, T. & Y. Tsunoda, 1993. Efficacious production of viable germ-line chimeras between embryonic stem (ES) cells and 8-cell stage embryos. *Dev. Growth Differ.*, 34: 561-566.
- Tokunaga, T., M. Uchida, S. Nada, T. Yagi, S. Aizawa, S. Takahashi & H. Imai, 1994. Y-chromosome deficiency occurred in a murine embryonic stem cell line during the course of gene targeting. *Theriogenology*, 41:319.
- Willadsen, S. M., 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 302: 63-65.
- Willadsen, S. M., 1989. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome*, 31: 956-962.
- Willadsen, S. M., R. E. Janzen, R. J. McAlister, B. F. Shea, G. Hamilton & D. McDermid, 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 35: 161-170.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola & N. M. Gough, 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336: 684-687.
- Wood, S. A., W. S. Pascoe, C. Schmidt, R. Kemler, M. J. Evans & N. D. Allen, 1993. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 4582-4585.
- 山村研一, 1993. 遺伝子ターゲティングによるヒト疾患モデルマウスの作成. 最新医学, 48: 1483-1490.
- Yoshinaga, K., H. Muramatsu & T. Muramatsu, 1991. Immunohistochemical localization of the carbohydrate antigen 4C9 in the mouse embryo: a reliable marker of mouse primordial germ cells. *Differentiation*, 48: 75-82.