

近交系マウスES細胞樹立の試み

清水川 理恵 (筑波大学 生物学類 4年) 指導教官:八神 健一、杉山 文博 (筑波大学 基礎医学系)

<目的と背景>

マウス胚性幹細胞 (ES細胞) は、胚盤胞内部細胞塊 (ICM) を白血球抑制因子 (LIF) 添加培地で培養することで樹立可能な培養細胞である。ES細胞は、さまざまな細胞を作り出す能力、すなわち、多分化能を持っており、今日では遺伝子改変マウス作製の道具として、分子生物学の分野で広く普及している。

従来、胚性奇形腫を形成しやすい129系統と呼ばれるマウス系統を中心として、ES細胞の樹立が行われてきた。しかし、これらのES細胞を用いて得られたノックアウトマウスは、C57BL/6Jの遺伝的背景で表現形質を評価する傾向があり、129系統の遺伝的背景を排除するためC57BL/6Jへ10世代ほど戻し交配をかける必要が生じ、時間の損失が非常に大きい問題となる。また、再生医療へ基礎研究のため様々な系統のマウスよりのES細胞樹立が要求されてきている。

今回、私は汎用されている近交系マウスの一つである、C57BL/6Jを用いて生殖系移行が可能なES細胞の樹立を試みた。

<方法>

C57BL/6Jの胚盤胞由来のICMを、マイトマイシンCで処理したBALB/c由来の胚性繊維芽細胞 (フィーダー細胞) 上にて培養した。培地には、ダルベッコ変法イーグル培地 (GIBCO) に、LIFのほか、15% Knockout SR (KOSR) (GIBCO)、2-メルカプトエタノール (SIGMA)、非必須アミノ酸 (GIBCO) を添加したものをを用いた。

培養後、4日たったICMは、ガラスピペットを用いて単離し0.25%トリプシンで処理した後にフィーダー細胞上に播種し継代を行った。コロニー形成ごとにこの作業を行い、4回目の継代で得られた細胞をES様細胞とした。

ES様細胞が果たしてES細胞特有の性質を示すのか、以下の実験を行い検討した。

(1) 増殖活性を評価するため、アルカリフォスファターゼ活性の検出を行った。

(2) ES細胞マーカー遺伝子の発現の有無をRT-PCR法を用いて検定した。

(3) マイクロインジェクション法によりキメラ形成能を解析した。

<結果・考察>

25個の胚盤胞から3ラインのES様細胞が樹立された。内1ラインは微生物の汚染が生じたため維持を断念した。残り2ラインは7代目以降にてES細胞の分子生物学的な特質を検査した。結果、2ラインともアルカリフォスファターゼ活性は陽性、ES細胞のマーカー遺伝子であるOct3/4、Osteopontin、CD9、PECAM、Utf1、Sox2、の発現も確認された。

次に、多分化能を *in vivo* で検定するためマイクロインジェクション法によりICRマウス8細胞胚もしくは胚盤胞とES細胞とによるキメラ胚を作製後、偽妊娠マウスに移植しキメラマウスの発生を検討した。結果、両ラインともキメラマウスが発生し、ES細胞の多分化能が確認された。さらにC57BL/6J由来の高キメリズム個体も得られ、ES細胞の生殖系移行が期待された。

8細胞胚に移植したES細胞の発育

ライン	移植胚数	キメラマウス
A	109	7 (3)*
B	106	6 (4)

*高キメリズム個体

胚盤胞に移植したES細胞の発育

ライン	移植胚数	キメラマウス
A	141	8 (1)*
B	132	27 (3)

*高キメリズム個体

今後、キメラマウスの交配実験によってES細胞の生殖系移行を確認する予定である。