

氏 名 川 瀬 栄八郎

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大乙第26号

学位授与の日付 平成8年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 マウス生殖系列細胞の増殖と分化に関する研究

論文審査委員 主 査 教 授 桂 勲
教 授 今村 孝
助 教 授 城石 俊彦
助 教 授 藤澤 敏孝
教 授 帯刀 益夫（東北大学）

論文内容の要旨

哺乳類の初期胚においては細胞分化などについての調整能が高いことが知られており、ある程度発生が進んでも未分化幹細胞が存在している。胚幹細胞(ES細胞株)は胚盤胞の内部細胞塊を培養して樹立された幹細胞株であり、内部細胞塊の細胞に性質が類似し、生殖細胞を含めいろいろな細胞に分化することができる多分化能を持っている。しかし、いままでES細胞株として報告されたものは129/Svという特定の系統由来のものがほとんどであり、様々なマウス系統や他の哺乳類でもES細胞株が存在するか否かは不明であった。

申請者はマウスC57BL/6系統の胚盤胞から内部細胞塊を単離し、マウス胎仔繊維芽細胞株のSTO細胞をサブクロニングして得られたSL10細胞をフィーダー細胞とし、培地中に高濃度のLIF (leukemia inhibitory factor)を加えることでC57BL/6系統から効率よくES細胞株の樹立が可能になった。得られたES細胞株は、正常な核型を示しており、キメラ形成能があった。またその中には生殖系列に寄与したES細胞株も存在した。次にこの方法を用いてBALB/c、BXSb/MpJ-Yaa、MRL/Mp-lpr/lpr系統からのES細胞株の樹立を試みた。その結果いずれの系統からもキメラ形成能をもつES細胞株の樹立ができたが、樹立の効率やキメラ寄与率は比較的強く生殖系列への寄与も見られなかった。このことは多くのマウス系統からもES細胞株の樹立が可能ではあるが、遺伝学的系統によって大きな違いが存在することを示唆している。

一方、ES細胞が由来した内部細胞塊は、生体内では原始外胚葉を経て始原生殖細胞を作り出す。マウスでは始原生殖細胞は受精後7日令胚の尿膜周辺の胚体外中胚葉中に小さな細胞集団として現れ、後腸、腸間膜、背大動脈周辺を移動し、11.5日令胚までに生殖隆起に達する。その後始原生殖細胞は増殖停止、減数分裂、性分化へと進んでいく。ES細胞と始原生殖細胞はともに生殖系列細胞に属するがES細胞が体細胞分化を含めた多分化能あるいは全能性を示すのに対し、始原生殖細胞は生殖細胞への分化に制限されている。したがってES細胞あるいは内部細胞塊から始原生殖細胞への分化は体細胞分化と生殖細胞分化の分岐点という発生学的に重要な位置を占める。そこで申請者は始原生殖細胞を生体内に近い状態で培養することにより増殖分化制御因子の解析を行うこと、さらにはその性質を保持したままでの継代維持を可能にすることを旨とした研究を行った。

いままでに始原生殖細胞の増殖因子または生存因子として報告されたSCF (stem cell factor)、LIF、bFGF (basic fibroblast growth factor)、cAMPや細胞内のcAMPを上昇させるforskolinなどを用いても生体内での増殖パターンを培養下で再現することは出来なかった。したがって始原生殖細胞に対して未知の増殖因子・生存因子の存在が示唆された。そこで申請者は様々な因子を検討した結果、始原生殖細胞の新たな増殖因子としてTNF- α (tumor necrosis factor- α)を見つけた。TNF- α は今までに報告された増殖因子・生存因子とは異なり、早期の始原生殖細胞にのみ効果があった。マウス胚を用いたRT-PCRとwhole-mount in situ hybridizationでの解析よりTNF- α 、また培養下でTNF- α と同様な効果を示すことが多いLT (lymphotoxin)、さらにはTNFのレセプターであるTNFR1とTNFR2の全てが始原生殖細胞に対してTNFが効果のある時期の胚で発現していることがわかり、培養下だけでなく実際に生体内でも増殖因子として働いている可能性がある。その一方でBRL-CM (Buffalo rat liver 細胞で作成したコンディションド培地)中

にSCFやLIF以外に未知の増殖因子の存在を示唆する知見を得た。さらにBRL-CM、forskolinと膜結合型SCFを組み合わせることで始原生殖細胞の増殖速度を生体内近くまで再現することができた。またこれらの細胞は細胞の形態、培地要求性、フィダー細胞の要求性、c-kitやOct-3タンパク質の発現からES細胞に類似したEG細胞に分化転換しておらず、始原生殖細胞の性質をある程度保持していることが推測された。

このようにマウス胚発生で重要な増殖分化制御を受けている生殖系列細胞のうち、未分化幹細胞(ES細胞)と始原生殖細胞についてその細胞増殖制御に関わる因子を体外培養系を用いた研究により解析することが可能になり、新たな知見を得ることができた。

論文の審査結果の要旨

川瀬栄八郎君は、マウス初期胚の発生学上の性質を、(1) 種々の系統のマウスからES(胚幹)細胞株を樹立し、その性質を調べること、(2) マウスの始原生殖細胞の培養に必要な因子を探索し、その効果を研究することの2点から検討した。

ES細胞はマウスの発生研究に重要な役割を果たしているが、現在使われているES細胞の大部分は129/Svという系統のマウスに由来するものであり、ES細胞の種々の性質がどの程度この系統の特殊性によるか、他の様々なマウス系統からES細胞株が樹立できるかどうかは不明だった。川瀬君は、ES細胞樹立の条件を検討した後に、広く様々な実験に用いられるC57BL/6とBALB/c、自己免疫疾患をもつBXSB/MpJ-YaaとMRL/lpr/lprの各マウスから、ES細胞株を樹立することができた。細胞株の大部分は雄(XY)で正常の核型を示したので、それらよりキメラマウスを作成したところ、多くの場合キメラはできるが、C57BL/6以外では寄与率が低く、かつ生殖系列まで寄与したものが得られなかった。以上の結果から、ES細胞を作れるという性質はマウス系統によらず共通だが、樹立の効率やキメラの寄与率などに遺伝的な違いが存在することがわかった。

マウスの始原生殖細胞の培養における増殖因子または生存因子としてSCF(stem cell factor)、LIF(leukemia inhibitory factor)、bFGF(basic fibroblast growth factor)、forskolinなどが知られているが、これらを使ってもまだ生体内の増殖パターンを培養下で再現することはできない。そこで川瀬君は、新たな増殖因子・生存因子を探索した結果、TNF- α (tumor necrosis factor- α)が始原生殖細胞の新たな増殖因子であることを発見した。TNF- α は、今までに報告された増殖因子とは異なり、早期の始原生殖細胞にのみ効果があった。また、この時期のマウス胚がTNFのレセプターであるTNFR1とTNFR2を持つことから、TNFが生体内でも増殖因子として働く可能性が示された。川瀬君はさらにBuffalo rat liver細胞のコンディションド培地(BRL-CM)中に未知の増殖因子の存在を示唆する結果を得た。BRL-CM、forskolin、膜結合型SCFを組み合わせると始原生殖細胞の増殖速度を生体内近くまで高められるので、今後の研究に期待が持てる。

以上の研究は、非常に労力を要する実験を基盤として、マウスの初期発生における細胞の性質の解明に一定の寄与をしたものであり、審査委員は全員一致で博士論文として十分なものと結論した。なお、これらの結果は既に3報の論文として国際誌に発表されている。

公開発表およびそれに続く非公開審査委員会での質疑応答から、川瀬君は専門分野の知識とその理解に関して、博士の学位を得るのに十分なものをもつと審査委員会は結論した。英語の実力に関しては、投稿論文の別刷を読んだ結果、十分な能力があると判断した。