

氏名	やまもと さとし 山本 智
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 691号
学位授与年月日	平成 27年 2月 23日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第3項該当
学位論文名	胚性幹細胞を利用した病態モデル動物の作製に関する研究
論文審査委員	(委員長) 教授 花園 豊 (委員) 教授 松浦 徹 講師 寺谷 工

論文内容の要旨

1 研究目的

ヒトの持つ多種多様な生命機能およびその異常により生じる種々の疾患の要因を明らかにするためにモデル系を構築することは必要不可欠である。モデル系を構築するにあたって標的遺伝子改変マウス/ラットが広く用いられているが、その作製には多大な時間と労力を要する。そこで本研究では ES 細胞を介した遺伝子改変マウスに着目し、迅速かつ効率的な作製手法を開発することを目的とした。

2 研究方法

2つのアプローチを検討した。1つ目としてY染色体上に緑色蛍光タンパク質をコードする GFP 遺伝子を有するトランスジェニックマウス (Y-GFP マウス) を作製した。本マウスより ES 細胞を樹立した。39, XO の核型を有する ES 細胞は蛍光を示さないため、フローサイトメトリーを用いた効率的な分離を試みた。2つ目として複数の導入変異遺伝子と複雑な遺伝背景を有するアルツハイマー病モデルマウスである 3xTg-AD マウスから ES 細胞を樹立した。ES 細胞の生殖系列移行能を確認するために、キメラマウスを作製した。この ES 細胞を用いて新たに標的遺伝子改変操作を行い、四倍体胚補完法によって Rage ノックアウトマウスの作製を試みた。

3 研究成果

1つ目のアプローチとして作製した Y-GFP マウスでは雄のみ蛍光が確認でき、少なくとも E2.5 で非侵襲的に雌雄判定が可能であった。本マウスより樹立した ES 細胞において蛍光を示さないコロニーが認められ、核型解析の結果 39, XO であった。フローサイトメトリーを用いて蛍光の有無により細胞を分けたところ、蛍光を有さない細胞群では Y 染色体の存在が確認されず、XO の核型を有する ES 細胞の迅速な選択が可能であった。また、Y 染色体が 5 回の継代後に 2.9% の頻度で脱落することを確認した。2つ目のアプローチとして 3xTg-AD マウスより ES 細胞を樹立して、二倍体胚もしくは四倍体胚の胚盤胞へ導入したところ、安定的な生殖系列移行能を有するキメラマウスを作出することができた。標的遺伝子改変技術による相同組換え ES 細胞を取得し、四倍体胚補完法の適用によって効率的な Rage ノックアウトマウスの作製に成功した。

4 考察

Y-GFP マウス由来 ES 細胞を応用することによって同一の ES 細胞より雄性株 (40, XY) と雌性株 (39, XO) を効率的に取得できることを示した。これらよりキメラ個体を作製すればホモ変異マウスの作製過程を 1 世代 (3 ヶ月) 短縮することが可能である。また、3xTg-AD マウスのように複数変異かつ複雑な遺伝背景を有する系統より ES 細胞を樹立して標的遺伝子を改変することにより、従来法 (別系統の自然交配による変異導入) よりも効率的に新たな変異を導入可能であることを示した。本方法は多因子遺伝性疾患のモデル動物への応用または複雑なタンパク質の相互作用理解に応用することができる。

5 結論

我々が樹立した Y-GFP Tg マウスは雄を非侵襲的に選別可能とした初めての報告であり、このマウスおよび派生した ES 細胞はジーンターゲット技術においてより効率的な動物作製に応用可能なツールになりえる。また、3xTg-AD マウスより樹立した ES 細胞を用いた標的遺伝子改変手法は、他の多くの遺伝子あるいは複雑な遺伝背景を持つマウス系統に応用可能である。今後、本研究で開発した技術および近年飛躍的な進歩をみせている遺伝子改変技術を応用することによって新たな病態モデルを作製し、様々な角度からヒトの疾患を理解していくことが可能である。

論文審査の結果の要旨

論文表題：胚性幹細胞を利用した病態モデル動物の作製に関する研究

本論文は、胚性幹細胞(ES 細胞)を利用した遺伝子改変マウスの作出に関する論文で、大きく二つのパートに分かれる。

前半は、Y 染色体に GFP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(Y-GFP Tg マウス)の作出と、本マウス由来の ES 細胞の作製を扱う。Y-GFP Tg マウスは、発生・胎仔の段階から蛍光を指標にすることでオス個体を非侵襲的に選別可能とした、世界でも初めての報告であり、ユニークである。ちなみに、X 染色体に GFP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの報告は既にあるが、雌雄の判別には使えない。

後半は、既存の遺伝子改変マウスに付加的遺伝子変異を導入するための効率的な方法(四倍体補完法等)を示した。既存の遺伝子改変マウスに付加的遺伝子変異を導入することは、多重遺伝子改変マウスを作出する上で必須であり、論文表題にある通り、病態モデル動物の作製に役立つであろう。

前半の研究成果は、Transgenic Research 誌に平成 26 年 10 月に発表され(第 23 巻 757-765 頁)、山本氏の学位申請にあたっての主要論文になっている。後半の研究成果は、同じく Transgenic Research 誌に平成 25 年 6 月に発表されている(第 22 巻 537-547 頁)。

以上より、申請者の論文は、博士 (医学) の学位に十分な quality を有していると考えられ、審査委員全員一致で合格とした。

試問の結果の要旨

論文表題：胚性幹細胞を利用した病態モデル動物の作製に関する研究

申請者は、学位論文のとおりにより発表を行った。発表は大変に分かりやすく、所定の時間内に要領よく行えた。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査員からは、実験の方法、データの解釈、考察内容から用語の使い方に至るまで、多くの質問が出されたが、いずれの質問に対しても的確に返答し、全体として有意義な質疑応答が行われた。審査員から出されたメジャーなコメントは以下のものであった。

- ・ Y 染色体に GFP 遺伝子を挿入したトランスジェニック・マウス(Y-GFP Tg マウス)は、その道のプロがねらって作ろうとしても出来るものではない。今回の Y-GFP Tg マウスは偶然に得られたものだから、申請者は幸運だったと言える。よい仕事をするには運も必要なのかもしれない。

- ・ Y-GFP Tg マウスから ES 細胞を作製して継代すると、Y 染色体が少し(約 3%)抜け落ちることを可視化したのは興味深い。

- ・ 論文の前半部分(Y-GFP Tg マウス作製)と後半部分(四倍体補完法による多重遺伝子改変マウス作製)の関連が希薄である。しかし、ES 細胞を利用する遺伝子改変マウスの作製という点では一貫しているので現状でよし、とした。

- ・ CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術の登場によって、遺伝子改変マウスの作製に大きな変革が起こっている今、本論文の内容はやや古めかしく感じられるかもしれない。この点に関しては、ゲノム編集技術が進展しても、ES 細胞を利用する発生工学技術の重要性が減じることはないと思われるので、その旨を考察に加筆することとした。

申請者の発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断し、試問に合格とした。