

ES 細胞や始原生殖細胞等は遺伝資源の保全としての対象と
なりえるか?

ES Cells and PGCs belonging to Germ-Line Cells may play an
important part in the conservation of species

橋本光一郎

Koichiro Hashimoto

明治乳業・研究企画部・動物センター

〒250-0862 神奈川県小田原市成田540

Meiji Dairies Corporation, Research Planning Department,
Laboratory Animal Center
540, Naruda, Odawara, Kanagawa 250-0862, Japan

Germ-line cells including totipotent (pluripotent) indifferent cell lines of ES, EG and EC cells may play an important part in the conservation of genetic materials. In liquid N₂, they are able to preserve their characteristics and important abilities as cells. We will not establish ES cell lines with the aim of the conservation. If once their cell lines are established, they will be more precious cells for the conservation. Some of germ cells, e.g. avian PGCs and mammalian spermatogonia etc., seem to be worthwhile objects for the conservation now, because they can produce offspring by using the technique of PGC chimera production or injection of spermatogonia into seminiferous tubules. Similarly, the other cell types also have the possibility of obtaining the offspring derived from them although some specific techniques are requisite for it. Here we discuss the possibility that we will obtain the offspring derived from manipulated PGCs,

gametogonia and gametocytes by the ovarian transplantation of reconstituted fetal ovaries or the transplantation of reconstituted seminiferous tubules among tubules of host testis.

Key Words : ES 細胞、PGC、生殖系列細胞、遺伝資源、保全

はじめに

遺伝資源として保全の対象となる「細胞」は?と問われた時、まずは精子や排卵卵子が挙げられるでしょう。精子の凍結保存の成功が、その後の畜産を大きく変えたことは明瞭な事実です。この精子や卵子は、生殖(細胞)系列の細胞ですが、他の論文に任せるとしてここでは扱いません。このように生殖系列の細胞が、遺伝資源の保全の対象となるということは、個体を作出できるあるいは作出に関わることができるという点にあります。

近年、体細胞クローン作出の成功¹⁾は、(ドナー核となる体細胞がいかなる種類の細胞であるのかを確定する必要がありますが)個体を作出できる点で(ある種の)体細胞が保全の対象となりうるものであることを意味しています。このことは、本編で扱う生殖細胞へ分化することのできる未分化細胞や生殖細胞、それ以外の(ある種の?)体細胞も対象となる、すなわち体を構成しているほとんど全ての細胞は遺伝資源であることを示しています。もちろん、体細胞クローンの場合に限らず、遺伝資源とするには多数の個体からの細胞を保全しなければいけないことは明らかなことです。

体を構成しているあらゆる細胞は保全の対象となりうるわけですが、実際には(トランスジェニック(Tg)動物や希少動物などの特殊な場合を除けば)、容易に、安全に、そして多数の、正常な、個体を(短期間に)作出できる方法が存在することが必要であると思われます。実際に行われている精子や初期胚の凍結保存を考えればよいでしょう。そこで、本編では個体作出の方法が開発されている未分化細胞や生殖系列細胞を取り上げ、これら細胞の持つ特徴から今後保全の対象と成り得るかを議論したいと思います。

第1章 遺伝資源の保全対象としての培養細胞である ES 細胞や EG 細胞

胚盤胞期胚の内部細胞塊(ICM)(この細胞群から将来の胚体が形成される)から *in vitro* 培養下で樹立された細胞株である、「万能細胞」として近年呼ばれている ES 細胞(embryonic stem cell)、また生殖系列の細胞である始原生殖細胞(PGC)を *in vitro* 培養下で増殖させる中から樹立された EG 細胞(embryonic germ cell)等は多分化能を持つ未分化細胞株です。通常は生殖系列への分化能を持つ株をそのように

呼びますが、ヒトではこのような分化能を確認することは倫理上出来ないの
で、多分化能を持つことが証明された
場合だけでもこの様に呼びます。これ
らの細胞株の樹立は、まずマウスで試
みられ、そして樹立されました (ES
細胞は 1981 年に^{2), 3)}、EG 細胞は 1992
年に初めて報告されました⁴⁾)。その
後かなりの年月を経て、多くの種でこ
のような細胞の樹立が報告されていま
すが、実際にはマウスの、それも限ら
れた系統(129)から樹立された株によ
る実験が大半を占めていて、この状況
は現在でも続いています。このように、
これらの細胞株の樹立はきわめて労
力の大きい困難を伴うという点では、
容易に遺伝資源の保全の対象とは成
りにくいものです。しかし、いったん
樹立されたものはきわめて利用価値
の高い細胞株であることも事実です。

ES 細胞や EG 細胞は培養細胞株で
すので、細胞培養条件を慎重に守るこ
とにより、理論的にはほぼ無限に増殖
させることが出来ます。しかし、未分
化状態を維持する(特に生殖系列分化
能を維持することが最も難しいと考
えられている)ことに細心の注意をは
らう作業を伴うため、継代を重ねるご
とに生殖系列分化能を失ってゆく機
会が増えることが予想されます。した
がって、通常は継代数の小さい株を使
用することになりますが、ここで凍結
保存の技術を必要とすることになり
ます。現在一般に使用されている方法
は、ES 細胞を扱う人にとってのバイ
ブルである“Teratocarcinomas and

embryonic stem cells: A practical
approach”⁵⁾の第 4 章 6.2 に書かれてい
る方法、すなわち培養細胞株の通常の
凍結保存法である「細胞培養用培地
(20% 牛胎児血清 (FCS)) に DMSO
を 10%になるように加えた凍結用培地
を使った緩慢凍結」です。研究者によ
り様々な方法が適用されているかも
しれませんが、文献への記載を調べる
限りでは非常に少なく、実際には凍結
保存法に関する研究改良はそれほど
行われていないと推測されます。なぜ
ならば、生殖系列分化能の保持を確認
する作業には大変な労力と時間を要
することもあって、成功が確認されて
いる方法を使い生殖系列分化能を維
持した状態の細胞を凍結融解後でも
確実に我々は得ることができる(不都
合を感じない)からです。

なお、凍結保存液に関し、上記以外
の方法が報告されていますので参照
してください。ただし、DMSO を 10%
にて使用する点は変わりなく、FCS の
濃度を変えているものです^{6), 7)}。

ES 細胞や EG 細胞を個体にする方
法としては、キメラを介する方法とク
ローン作出の方法があります。ES 細胞
のよるクローン作出は、マウス体細胞
クローン作出法に則って最近成功が
報告されました⁸⁾。また、従来からあ
るキメラを介する方法とは以下のよ
うなものです⁷⁾⁹⁾。まず宿主としては、
通常、胚盤胞期胚を使用します。この
胚盤胞の ICM 近傍へ ES 細胞や EG 細
胞を移植して宿主 ICM へ取り込ませ
たキメラ胚を作出し、これを代理母の

子宮へ戻し出産させます。このキメラ胚由来の子供の持つ生殖細胞の中に移植した ES 細胞や EG 細胞が分化して生殖細胞となっていたならば、移植した ES 細胞や EG 細胞の性質を半分持つ子孫が手にはいることとなります。これらの子供同士をかけあわせると 1/4 の確率で移植した ES 細胞や EG 細胞の性質を持つ子供が得られるわけです。

ES 細胞や EG 細胞が持つ極めて重要な性質として、高い増殖率と相同遺伝子組み換え率があります。増殖率が高い培養細胞株ですので、外来遺伝子導入により組み換え体の選別は容易ですし、相同遺伝子組み換えにより KO (Knock Out) や KI (Knock In) 細胞を繊維芽細胞などの体細胞よりもはるかに高い頻度で得ることが可能です。この方法により多数の KO マウスや KI マウスが作出され¹⁰⁾、遺伝子の機能の解析だけでなく、ヒトの遺伝子疾患モデル動物として治療法の研究や新薬の開発に使われつつあります。また、全能性に近い多分化能を保持していることから、現在では in vitro あるいは in vivo での任意の細胞種への分化誘導法が盛んに研究されていて¹¹⁾、再生医学分野での中心的役割を負わされていることから、重要な遺伝資源とみなされるでしょう。

このように ES 細胞や EG 細胞株は、その樹立がかなり煩雑で慎重なプロセスを必要としています。けれども、in vitro 培養下で維持されている（凍結保存が可能な）培養細胞株であり、且

つ生殖細胞へ分化する能力を保持していますのでその性質を持つ個体を復元することができるという点で、貴重な遺伝資源であり、生殖系列細胞の保存の一形態であるわけです。

同様の性質を持つ細胞が実はまだあります。ES 細胞や EG 細胞はこの細胞の研究を基礎にして生まれてきたものです。それは、*teratocarcinoma* の *stem cell* である EC 細胞 (*embryonal carcinoma cell*) です。この細胞を使った膨大な研究があります¹²⁾ が、その中で、「保存」という観点からみると、きわめて興味深い研究が報告されています。Brinster¹³⁾そしてその後 Mintz & Illmensee¹⁴⁾により報告された一連の研究がそれです。ここで初めて胚盤胞への細胞注入技術が確立しましたが、それ以上に癌細胞由来である EC 細胞が脱癌化する事、さらには多分化能、生殖系列分化能を持つことが証明された研究です。この中で、使用した EC 細胞が腹水型胚様体 (*embryoid body*) でしたので、胚様体として継代移植により維持されます。実験ではおよそ 10 年間 200 世代を経た細胞が使用されました。つまり、胚様体という初期胚に類似した環境に EC 細胞がおかれた場合、10 年間も生殖系列分化能を維持できたということで、これは EC 細胞の in vivo での「保存」ということになります。ちなみに、in vitro ではこのような長期にわたる継代維持はほとんど不可能です。

第2章 遺伝資源の保全対象としての

生殖系列細胞である始原生殖細胞・生殖原細胞

始原生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) は、胚発生初期の一時期にしか存在しない細胞で、我々が (何らかの手段により) 将来生殖細胞へと分化することが決定された生殖系列細胞として最初に識別することができる細胞です。哺乳類胚ではアルカリ性ホスファターゼ活性の高い細胞として判別できる細胞として、まず胚体外に出現し、その後胚発生の進行に従って、胚形成というダイナミックな形態形成運動による受動的な位置移動と自らの持つ能動的な細胞移動により将来生殖巣が形成される領域へ向かって移動し、最終的に生殖巣原基へたどり着き定着し、増殖します。この生殖巣原基が、その形態的特徴により雌雄を判別できるまでの未分化生殖巣期の生殖細胞までを、通常 PGC と呼びます。未分化生殖巣の雌雄が判別できた時点で、結果的にこの生殖巣は卵巣あるいは精巣と呼ばれるようになります。そしてそこに定着増殖している生殖細胞に対しては、減数分裂にはいるまでを生殖原細胞 (卵原細胞・精原細胞)、減数分裂に入ったものを生殖母細胞 (卵母細胞・精母細胞) と呼ぶことになります^{15), 16)}。

これらの生殖系列の細胞は将来卵や精子へと分化していく細胞ですので、遺伝資源の保全の対象となり得るわけです。しかし、これが現実的な保全の対象となり得るためには、これら

の細胞を卵や精子へと分化させることが出来る方法がある、願わくば受精させて個体にすることが出来ることを保障するような、あるいはその可能性を示せるだけの一連の技術が存在することが最低限必要であると考えます。また、PGC は第 1 章で述べた EG 細胞株の樹立に使われますので、この意味でも重要な細胞といえます。

ここでは、我々が Tg 動物作出のための技術開発として行ってきた実験 (マウスを使った再構成卵巣の卵巣移植や再構成精細管の精巣移植とニワトリ PGC キメラ作出) を紹介しながら、保全の対象となり得る細胞群であることを示そうと思います。

(1) 胎仔卵巣から作出した再構成卵巣の成体卵巣部位への卵巣移植^{15), 16)}

卵巣を摘出した後、その部位に他個体の卵巣を移植するという卵巣移植は、かなり古くから行われています。マウス胎仔卵巣では、これを成体へ卵巣移植することにより移植卵巣由来の産仔を得ることができたという報告は、1940 年代に既になされています。

マウスでは胎齢 12.5 日頃に生殖巣の形態から性判別が可能となり、胎齢 13.5 日から卵原細胞は減数分裂に入り始め、15.5 日頃にはすべての生殖細胞は卵母細胞となります。これまでの胎仔卵巣移植の報告は、胎齢 13.5 日以降の胎仔卵巣を使ってなされていましたので、生殖細胞としては卵原細胞と卵母細胞が混在しているため、卵

原細胞由来で産仔が得られるかについては不明でした。そこで、生殖細胞としては卵原細胞のみである胎齢 12.5 日の胎仔卵巣を使い卵巣移植しましたところ、産仔を得ることができました。PGC を遺伝子導入の対象細胞とすることを目指していました我々は、この実験結果から単離した卵原細胞由来の産仔作出を可能とする方法を考案しました。それが、再構成卵巣の作出とその卵巣移植という方法です。この詳細については、マニュアルも公表しておりますので、そちらを参照してください^{15), 16)}。

この方法が、マウス胎齢 12.5 日以前の生殖細胞である PGC へも適用が可能であるかについては、現在のところ試みられておりません。しかし、マウス PGC の増殖条件を検討していた過程で、増殖した細胞が EG 細胞へ脱分化しているのか、あるいは PGC の性質を保持しているのかを検討するため、増殖した PGC 様細胞を胎仔卵巣の体細胞と混ぜて再構成卵巣を作出し、成体卵巣部位に移植する実験を行いました。移植して週間後、primary follicle の形成を組織学的に確認しましたので、増殖した PGC 様細胞は PGC である可能性が高いという結果を得ました¹⁷⁾。この実験自体はかなりラフなものでし、目的が産仔を得ることではなかったため、この卵母細胞から産仔が得られるかについては不明ですが、可能性はあると思われます。なお、卵巣移植では、拒絶反応が起きることが報告されています。

(2) 胎仔・新生仔精巣から作出した再構成精細管・再凝集塊の成体精巣内への移植¹⁶⁾

精巣は、卵巣と比較すると遙かに複雑な形態をしていますので、上記(1)と同様の方法を胎仔・新生仔精巣をつかって再凝集塊を作成し、成体精巣を摘出後にその部位に移植しましたがうまくいきませんでした。そこで、生殖細胞欠損 W ミュータント成体精巣内(精細管間の間充織)に移植を行ったところ、精細管を形成し、その腔内に精子形成過程の精原細胞・精母細胞・精細胞・精子を確認することができました。

また、基底膜成分のマトリゲルでの包埋培養を行うと、細胞密度依存で精細管様構造物の形成が見られましたので、これをディスパーゼ処理により回収後、精巣内へ移植した場合でも、同様精子形成を認めることができました。しかし、新たに形成された精細管は、宿主精細管との結合は組織学的に認められませんでしたし、またペアリングさせましたが交配による産仔も得ることができませんでした。実験は拒絶反応が起きない系にておこなったので、allograft が可能であるかは確かめていません。

この方法で、精子にまで発生を進行させることができることが確認されていますので、この精子を回収し、卵細胞質内精子注入法(Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI)などの技術¹⁶⁾で

産仔の作出は可能であると思われます。しかし、精原細胞では、次に示す精細管内移植の技術を使う方法のほうが優れています。この方法では、交配による産仔作出が報告されています。

(3) 精原細胞の精細管内移植¹⁶⁾

Brinster ら¹⁸⁾により報告された技術で、マウス同種間での移植以外に、異種であるラットやヒトの精原細胞をマウス精細管内に移植することによりラットやヒトの精子を得ることができたことも報告されています。精巣が、immunologically privileged site であることは古くから知られていましたが、xenograft でも適用可能な場合があるということは、かなり広い応用が考えられるでしょう。Brinster 以降、技術的な改良が加えられ、特別な機材を使わなくとも移植は可能となっています¹⁶⁾。なお、宿主として使う精巣に関する注意を付け加えると、可能な限り宿主の生殖細胞を除いておく必要があるため、成体への busulfan 投与か、停留睾丸状態にして精原細胞以外の生殖細胞を死滅させるか、生殖細胞欠損 W ミュータント(なお、Sl ミュータントの方は使用できない)等を使用する必要があります。

(4) PGC キメラの作出(19)

哺乳類の場合、PGC は子宮内で発生中のある時期の胎仔の時期にしか

存在していません。マウス PGC を in vitro で培養することができることをすでに述べましたが、これを回収して子宮内で発生中の胎仔の PGC が存在している部位へ移植するという PGC キメラ作出も試みられています。今後、何らかの報告が出てくることが予想されますが、胎仔が子宮内で発生するという哺乳類の特徴が PGC キメラ作出の大きな障壁となっていることは確かなことです。

一方鳥類では、卵殻内で発生が進行するため、胚へのさまざまな手術が容易であることと同時に、PGC の移動に関しても、哺乳類と異なる点があり、これが PGC の単離と移植を容易にしています。PGC は哺乳類と同様に胚体外に出現しますが、その後血管系の形成に伴って血管内に取り込まれ、血流に乗って循環する時期が知られています。その後血管系から抜け出して、哺乳類と同様に、将来生殖巣となる領域(生殖巣隆起)へ向かって間充織中を細胞移動します。鳥類では、桑名らによって、血流中を循環している時期の PGC の単離法、PGC の血流中への移植法、宿主胚 PGC の除去法などは既に開発されていて、PGC キメラ成鳥から移植 PGC 由来の子孫も高率で作出されています。さらに、単離した PGC の凍結保存(10%DMSO を使用)についても、融解後の PGC から作出されたキメラの後代検定から凍結保存 PGC 由来の雛も得られています²⁰⁾。

絶滅危惧鳥類種や希少家禽系統の保全に向けて、精液の凍結保存とともに

に Perry の胚培養法を使うことにより、胚を殺すことなく胚血流中の PGC を採取して²¹⁾凍結保存することが現在行なわれています。

おわりに

ES 細胞や EG 細胞等の多分化能(全能性)を持つ未分化細胞株を遺伝資源として保全するために樹立するということはないと思います。通常は、Tg 動物の作出などを目的として樹立されると考えられます。しかし、一旦樹立できた株に関しては、その能力から見て遺伝資源の保全の対象として十分成り得るものです。他方、生殖系列の細胞は、生殖細胞としての分化の道

筋に入っている細胞ですので、最終的に精子や卵子となり、受精によって子孫となる新たな個体の発生に関わります。この意味では、遺伝資源の保全の対象となりえます。しかし、遺伝資源の保全を目的とした場合、必要となる経費が嵩張らないことも重要でしょうが、より簡単な方法で確実に保全できること、そして、より簡単な方法で確実に子孫を作ることができる方法を選択することになると思われます。本章で取り上げた細胞群は、現状では、希少動物、絶滅危惧種などに対して、可能と考えられるあらゆる手段で保全を図ろうとする場合に対象となるものであると思われます。

文献

1. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J. and Campbell K.H.S.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385, 810-813, 1997.
2. Evans M.J. and Kaufman M.H. : Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 154-156, 1981.
3. Martin G.R.: Isolation of a pluripotent cell line from early embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78, 7634-7636, 1981.
4. Matsui Y., Zsebo K. and Hogan B.L.M.: Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 70, 841-847, 1992.
5. Robertson E.J. : Embryo-derived stem cell lines. In: Robertson E.J.(ed), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp71-112, 1987.
6. Abbondanzo S.J., Gadi I. and Stewart, C.L.: Derivation of embryonic stem cell lines. In: Wassarman P.M. and DePamphilis M.L.(ed) , *Guide to techniques in mouse development*. *Methods in Enzymology*, Vol. 225, Academic Press, San Diego, pp803-823, 1993.

7. Roach M.L. and McNeish J.D.:Methods for the isolation and maintenance of murine embryonic stem cell. In: Turksen K (ed), Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, Vo. 85, pp1-16, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002.
8. Wakayama T., Rodriguez I., Perry A.C.F., Yanagimachi R. and Mombaerts P. :Mice cloned from embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 14984-14989, 1999.
9. Bradley A.:Production and analysis Of chimaeric mice. In:Robertson E.J. (ed), Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp113-151, 1987.
- 10.野口茂・平井久丸(編):ノックアウトマウス・データブック. Molecular Medicine 臨時増刊号、Vol. 34、564p、中山書店、東京、1997.
- 11.Turksen K (ed), Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 85, 499p., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002.
- 12.野口武彦・村松喬(編):マウスのテラトーマ:EC細胞による哺乳動物の実験発生学、理工学社、東京、1987.
- 13.Brinster R.L.:The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development. J. Exp. Med. 140, 1049-1056, 1974.
- 14.Mintz B. and Illmensee K.:Normal genetically mosaic mouse produced from malignant teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 3585-3589, 1975.
- 15.橋本光一郎・川瀬栄八郎・中辻憲夫:マウス始原生殖細胞および生殖原細胞の発生工学的操作へ向けて. 実験医学. 10、1558-1565, 1992.
- 16.中辻憲夫(編):幹細胞・クローン研究プロトコール、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座4, 254p、羊土社、東京、2001. (第1章-⑤~⑦. 第6章-②⑥. を参照).
- 17.Kawase E. and Hashimoto K.: Differentiation of migratory-stage cultured primordial germ cells into oocytes. 準備中
- 18.Brinster R.L. and Zimmerman J.W.:Spermatogenesis following male germ-cell transplantsation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.91, 11298-11302, 1994.
- 19.桑名貴:鳥類始原生殖細胞の胚間移植、実験医学、12、260-265、1994.
- 20.Naito M., Tajima A., Yasuda Y. and Kuwana T.:preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. J. Reprod. Fert. 102, 321-325, 1994.
- 21.Kawashima t., Sakai R., Kano K., Tamaki Y. and Hashimoto K.:Is the embryo culture system useful for collecting primordial germ cells from endangered avian embryos? Zoo Biology. 21, 287-294, 2002.