

ヒト染色体を保有するキメラマウス胎仔における発生異常

舟木 賢治*

Kenji FUNAKI

Developmental anomalies in the fetuses of a chimeric mouse containing a human chromosome

ABSTRACT

Chimeric mice containing a human chromosome were produced by introducing a human chromosome into mouse embryonic stem cells via microcell-mediated chromosome transfer.

In present study, the dead fetuses of the chimeric mice containing a human chromosome 2-derived fragment (hChr.2f) or a human chromosome 21 (hChr.21) were studied anatomically in order to examine the effects of introduction of a human chromosome to mouse. Polydactyly were observed in almost of the chimeric fetuses containing hChr.2f, but were not detected in the chimeric fetuses containing hChr.21. Aplasia of the sternum and delayed ossification or deletion of the cervical vertebrae centrum were universally observed in both the chimeric fetuses. Histological abnormalities in heart and liver were frequently detected in both the chimeric fetuses. Interestingly, the number of germ cells decreased remarkably in all of the chimeric fetuses containing hChr.21.

はじめに

分子生物学的、遺伝子工学的手法の飛躍的な進歩により、ヒトの全ゲノムが解析されたことはよく知られている。しかし、その一方で生物学的機能が全く、もしくは一部しか知られていないような遺伝子も数多く見つかってきており、これらが生体内や個体発生過程でどのような役割を果たしているかを解明するための研究が重要になっている。遺伝子を破壊または導入し、個体レベルでその表現型を解析することができるトランスジェニック技術は、これらの遺伝子の機能を解明するのにきわめて有用である⁽¹⁾⁽²⁾。

遺伝子導入には、遺伝子解析が最も進み、胚操作技術も確立されているマウスが最も多く用いられてきた。マウス個体への外来遺伝子導入法としては、大別して2つの方法が知られている⁽³⁾。1つは受精卵前核にDNAを注入する方法であり、もう1つは分化多能性を保持した胚幹細胞（ES細胞）にDNAを導入し、キメラマウスを

作製する方法である。後者の方法によって作製されたキメラマウスにおいては、ES細胞の貢献した細胞、組織においてのみ導入遺伝子が認められる。一方、ES細胞由来の生殖細胞を経て得られる子孫においては、全ての細胞、組織で導入遺伝子が保持される。これらの技術を利用して現在までに数多くのトランスジェニックマウスが作製されてきた。しかし、導入可能な遺伝子DNA断片、すなわちクローニングできるDNAの大きさに限界があるため、コード領域から離れて存在するすべての発現制御領域をカバーする導入遺伝子を構築することが困難であった。そのため、外来遺伝子を導入したマウス個体において本来の組織特異性、時期特異性を再現できないことが多く、それがこの技術の利用範囲を大きく制限していた。

この問題を克服する方法としては、微小核細胞融合法によりヒト染色体をES細胞に導入し、そのES細胞を宿主胚に移植することが考えられる。最近、この方法によってヒト2番染色体断片やダウン症に関係するヒト21番

*島根大学教育学部理科教育生物学研究室

染色体を移入したキメラマウスが作出され、それらのキメラ個体では移入した染色体上の遺伝子が発現していることが示された⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

本研究では、マウス個体に移入されたヒト染色体がマウスの発生におよぼす影響を明らかにするために、hChr.2f あるいは hChr.21 を保持するキメラマウスの出生前後（周産期）に死亡した胎仔について解剖学的、組織学的な検討を行った。

．材料および方法

鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室より提供されたキメラマウス胎仔について、まず外形観察を行った後、骨格標本と組織標本を作製し、異常の有無を調べた。

[実験動物]

鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室、キリンビール基礎技術研究所および北里大学との共同研究によって作製されたキメラマウスで、周産期に死亡した15個体のキメラ胎仔を用いた。そのうちの4個体は、(40,XY)の核型をもつマウスES細胞を用いてヒト2番染色体断片 (hChr.2f : Ig 遺伝子領域を含む) を導入したキメラ胎仔であり、他の11個体は、核型 (39,X0) のES細胞を用いてヒト21番染色体 (hChr.21) を導入したものであった。

[キメラマウスの細胞におけるヒト染色体の検出]

キメラ胎仔から採取・培養された尻尾繊維芽細胞を用い、空気乾燥法によって染色体標本を作製した。次に、プローブDNAとしてヒトCOT-1DNA (Gibco BRL, 1 mg/ml), pSTneo (0.5 mg/ml) を用いた蛍光in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH法)⁽⁶⁾ により染色体標本を処理し、蛍光顕微鏡 (オリンパスBX60) で観察した。蛍光シグナルは、ARUGUS画像解析ソフトを用い、ローダミン用フィルター、FITC用フィルター、およびDAPI用フィルターにて、それぞれの蛍光シグナルを検出し画像解析を行った。

[骨格標本を作製]

10%ホルマリンで固定し、95%アルコール中で保存された胎仔の外形観察を行った後、骨格標本を作製するために胎仔の皮膚、筋肉、内臓をできるだけ除去し、2%水酸化カリウム溶液中に10~15日間浸漬して軟部組織を透徹した。透徹した試料を0.01%アリザリンレッドS溶液 (1% KOHで希釈) で12時間染色した後、Mall液 (1% KOHで希釈した10%グリセリン) 中で軟部の過色がとれるまで約24時間放置した。この方法では、骨化した部分だけが赤く染まり、まだ骨化していない軟骨の部分は染色されない。完成した骨染色標本を50%グリセリ

ンに1日間浸したあと、80%のグリセリン中で観察し、100%のグリセリン中で保存した。

[組織標本の作製]

骨格標本作製時に剖出した皮膚、筋肉、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、肺、胃、小腸、大腸、膀胱、生殖腺について通常のパラフィン切片法により組織標本を作製し、ヘマトキシリン エオシン (HE) で二重染色した。

．結 果

実験に用いられたキメラマウス胎仔の全個体において、移入されたヒト染色体が保持されていた (図1)。キメラ胎仔の外部形態の観察では、以下に述べるような種々の異常がみられた。しかし、外部生殖器はすべて正常であり、hChr.2f 移入キメラ胎仔は全個体が雄、hChr.21 移入キメラ胎仔はすべて雌であった。このような両者における性の異なりは、キメラマウス作製に用いられたES細胞が互いに異なるためである。すなわち、hChr.2f の移入には雄由来のES細胞 (40,XY) が、hChr.21 の移入には雌由来のES細胞 (39,X0) が用いられた結果である。

キメラ胎仔において観察された外表異常、骨格異常および組織学的異常を表1に示す。

[外表異常]

図1にみられるように、hChr.2f を移入したキメラ胎仔は、全個体とも同じ発生段階にある正常個体に比べ身体が大きく、2個体に全身の浮腫がみられた (図2)。また、正常であれば閉じているはずの眼瞼が開いており、黒色の眼球が露出していた。hChr.2f 移入キメラ胎仔における最も注目すべき異常は、前肢における多指症であった。多指は3個体にみられたが、そのうちの2個体は両前肢に、1個体は左前肢にのみ認められた (図3)。hChr.21 移入キメラ胎仔では、発育にいくらかの個体差がみられた。外形異常としては、全個体で‘眼瞼の開き’がみられた以外には、明らかな異常は認められなかった。

[骨格異常]

胸骨の形成不全と頸椎椎体の骨化遅延あるいは欠損が、hChr.2f 移入キメラ胎仔とhChr.21 移入キメラ胎仔の両方でみとめられ、特に、前者は全個体に共通してみられた。正常な胸骨形成では、胸骨が6個に分離・縦列して形成されるが、キメラ個体ではそれらが部分的に癒合していた (図4)。しかし、癒合のパターンや程度には個体差がみとめられた。

頸椎の異常については、Chr.2f を移入したキメラ胎仔の全個体とhChr.21 を移入したキメラ胎仔の2個体

Table 1. キメラマウス胎仔の外表面、骨格および組織における異常

		hChr.2f 移入キメラ胎仔	hChr.21 移入キメラ胎仔
外 表		開いた眼瞼 (4/4) 全身浮腫 (2/4) 前肢の多指症 (3/4)	開いた眼瞼 (11/11)
骨 格		胸椎椎体の骨化遅延あるいは欠損 (4/4) 胸骨の形成不全 (4/4)	胸椎椎体の骨化遅延あるいは欠損 (2/11) 胸骨の形成不全 (11/11)
組 織	心 臓	心筋線維の蛇行 (3/4) 心筋線維間内出血 (1/4) 心筋線維の変性 (1/4)	心室形成不全 (4/11)
	肝 臓	肝細胞壊死 (2/4) 鬱血 (1/4)	肝細胞壊死 (6/11) 鬱血 (2/11)
	生 殖 腺		生殖細胞の著しい減少 (11/11)

() 内は、異常個体 / 調査個体総数を示す。

で、第1頸椎～第6頸椎の椎体が染色されていなかったことから、椎体の骨化が遅れているかあるいは欠損していることが示された(図4)。

[組織学的異常]

内臓の外見的所見から、キメラ胎仔では正常胎仔に比べ、全般に臓器の肥大あるいは過形成(体の大きさに対して内臓が大きい)の傾向がみられた。また、それらの中には組織学的な異常がみられるものがあった。

表1に示されるように、両方のキメラ胎仔で心臓と肝臓の組織学的異常がみられたが、両者に共通した異常は肝臓における細胞壊死と鬱血だけであった(図5)。心臓の異常については両者の間に共通性がなく、hChr.2f 移入キメラ胎仔では全個体に心筋線維の異常がみられ(図5)、一方、hChr.21 移入キメラ胎仔では4個体に心室形成不全がみられた。

最も興味深いのは、hChr.21 移入キメラ胎仔の全個体でみられた卵巣における生殖細胞の著しい減少であった(図6)。このような生殖細胞の減少は、hChr.2f 移入キメラ胎仔の精巣ではまったくみられなかった。

・ 考 察

本研究で用いられたhChr.2f 移入キメラマウスは、染色体数40の正常マウス細胞と、正常なマウス染色体にヒト2番染色体断片が加えられたES細胞からなる。一方、hChr.21 移入キメラ個体は、正常マウス細胞とX染色体モノソミーである39本のマウス染色体にヒト21番染色体が加わった染色体をもつES細胞からなっている。一般に、ヒトの染色体異常個体では、出生時体重は正常あるいは低体重である⁽⁷⁾。したがって、hChr.2f 移入キメラ胎仔の身体が正常個体よりも明らかに大きいという現象は、ヒト染色体移入による遺伝的不均衡に起因するものではなく、キメラマウスの作製法と関係があると考えられる。本研究で用いられたキメラマウスの作製では、8細胞期胚へES細胞を移植するためキメラ胚には正常の8細胞期胚よりも多くの細胞が存在することになる。正常胚とキメラ胚の細胞数の差は、細胞分裂が繰り返されるたびに大きくなるはずである。しかし、発生調整能をもつとされる哺乳類胚では、初期円筒期に胚の大きさが調整されて正常胚の大きさになるといわれている⁽⁸⁾。こ

のことから、特に、hChr.2f 移入キメラマウスでは、胚の発生調整能が低下あるいは欠損している可能性がある。キメラ胎仔に共通してみられた「眼瞼が開き、黒色の眼球が露出する」という現象についてもキメラマウス作製上の問題であると考えられる。本来、胚移植に用いられた8細胞期胚はアルビノ系マウスなので眼色は赤くなる。一方、ヒト染色体移入に用いられたES細胞はアルビノアグーチ系マウス由来なので眼に黒色素がある。したがって、キメラ胎仔の眼が黒くなったのは、ES細胞が眼の形成に関与したことを示している。但し、なぜキメラ胎仔で眼瞼が開くかについては不明である。明らかな外表奇形として唯一観察されたのは、hChr.2f 移入キメラ胎仔の3個体でみられた前肢の多指症であったが、この種の奇形と染色体異常との関係については今のところ報告されていない。しかし、多指症はhChr.21 移入キメラ胎仔ではまったくみられないことから、移入されたhChr.2fによる可能性が高い。hChr.2f 移入キメラ胎仔の1個体で多指症がみられなかったのは、前肢の細胞におけるhChr.2fの保持率やES細胞に由来する細胞の占有率が他の3個体よりも低いためと考えられる。

キメラ胎仔では、胸骨や頸椎の形成不全などの骨格異常が観察されたが、一部のヒト染色体トリソミー症候群でも多彩な骨格異常がみられることが報告されている⁽⁹⁾。染色体異常が骨格形成に影響している可能性はあるが、胸骨や頸椎の形成不全は両方のキメラ胎仔に共通してみられたので、移入されたヒト染色体上に存在する遺伝子の直接的な影響であるとは考え難い。おそらく、マウス胚へのヒト染色体移入によって生じた遺伝的不均衡によるものと考えられる。

心臓、肝臓、生殖腺において観察された細胞変性による種々の異常について、染色体異常との関連性が指摘されているのは生殖細胞の減少だけである。したがって、心臓や肝臓における組織学的異常は、ある種の病気に罹患したヒトや実験動物においてよくみられるような病態変化と捉えるほうが妥当である。ヒトの21番染色体トリソミー（ダウン症候群）でみられる心臓奇形のように、染色体異常症は臓器の奇形をとまなうことがある⁽¹⁰⁾。したがって、hChr.21 移入キメラ胎仔における心室形成不全は、移入されたヒト21番染色体上にある遺伝子の直接的な影響によるものである可能性が高い。

hChr.21 移入キメラ胎仔でみられた生殖細胞の著しい減少は、性染色体異常症においてかなり普遍的にみられるが、常染色体異常症では知られていない⁽¹¹⁾。前述のように、hChr.21 移入キメラ胎仔はXモノソミーのES細胞を用いて作製されたため、卵巣を形成している細胞が

Xモノソミーである可能性が高い。ヒトのX染色体モノソミーであるターナー症候群では、卵巣内の生殖細胞が著しく少なく、卵巣の発達が悪いため、二次性徴が起らないことがよく知られている。しかし、マウスのXモノソミー個体では、ほとんどが正常な卵巣発達を経て、生殖能を持つようになる。したがって、hChr.21 移入キメラ胎仔における卵巣の異常は、移入されたヒト21番染色体とマウスX染色体モノソミーの複合的な影響によるものと考えられる。

本研究では、脳などの神経系については検討しなかったが、今回、移入されたヒト染色体との関連性が示唆された異常については、発症機序を解明するための分子生物学的アプローチが必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、貴重なキメラマウスを御提供いただいた鳥取大学医学部細胞工学教室の押村光雄教授に深く感謝の意を表します。また、染色体のFISH解析に協力していただいた鳥取大学医学部細胞工学教室の香月康宏、研究の助手をしていただいた島根大学教育学部生物学研究室の加川美雪、伊藤美由紀の諸氏に深謝いたします。

参考文献

- 1) Edward, M. R. and Desmond, J. S. (1997): Optimizing the mouse to shift sequence for function. *Trends Genetics* 13: 423-426.
- 2) Kola, I. and Hertzog, P. J. (1997): Animal models in the study of the biological function of genes on human chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1713-1727.
- 3) 中辻憲夫 (1993): 発生工学のすすめ, 羊土社
- 4) Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, K., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M. and Ishida, I. (1997): Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimeric mice. *Nature Genetics* 16: 133-143.
- 5) Oshimura, M., Shinohara, T., Tomizuka, K., Miyabara, S., Takehara, S., Kazuki, Y., Funaki, K., Ohguma, A. and Ishida, I. (1999): Chimeric mice containing a human chromosome 21. *The American Society of Human Genetics 49th Annual Meeting.*
- 6) Nederlof, P. M., Filter, S., Wiegant, J., Raap, A. K.,

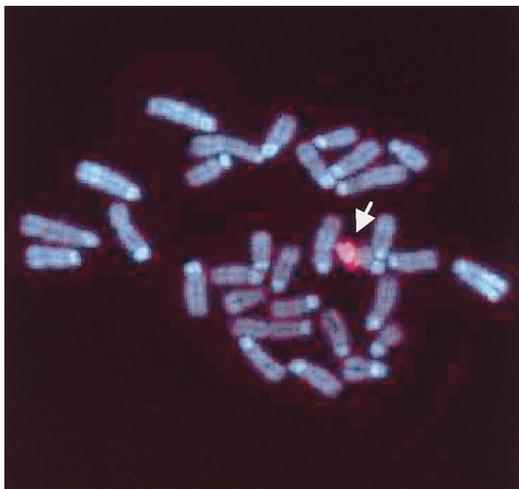


図1 hChr.21 移入キメラ胎仔の尻尾線維芽細胞におけるFISH解析
矢印はヒトCOT-1DNA (赤) をプローブとして検出されたヒト21番染色体を示す。



図2 周産期マウス胎仔の外形像
(右：正常胎仔、左：hChr.2f 移入キメラ胎仔)
キメラ胎仔は正常胎仔にくらべて体が大きく、全身に浮腫がみられる。また、眼瞼が開き、固定処理によって白く変色した眼球が露出している。



図3 hChr.2f 移入キメラ胎仔の右前肢における多指症
本来は5本であるはずの指が6本みられる。

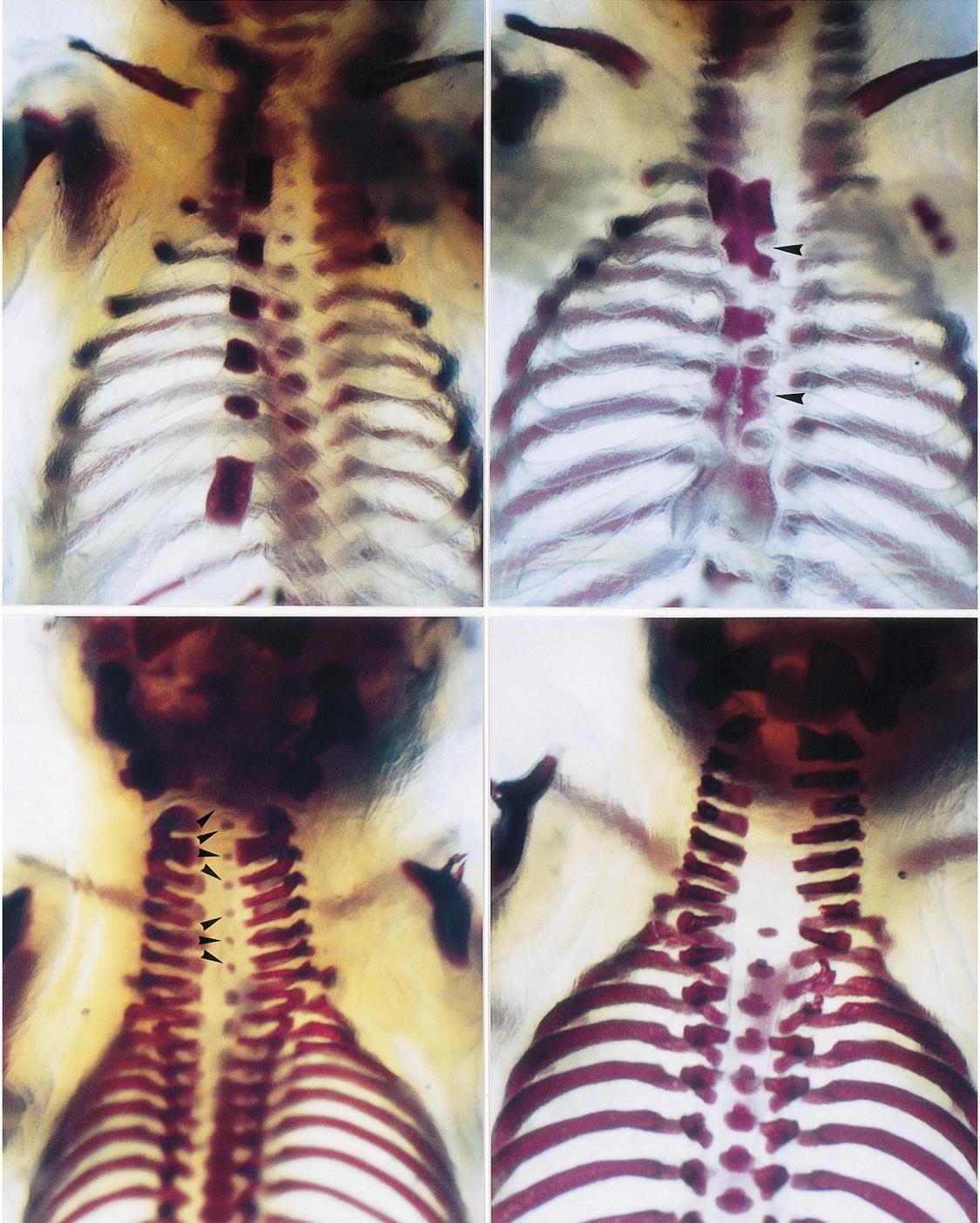


図4 骨染色法による骨格標本（左：正常胎仔、右：キメラ胎仔）
 上段：正常胎仔では胸骨が6つに分離・整列しているが、キメラ胎仔では部分的に癒合している（鋏）。
 下段：正常胎仔では7個の頸椎椎体が形成されているが（鋏）、キメラ胎仔ではみられない。

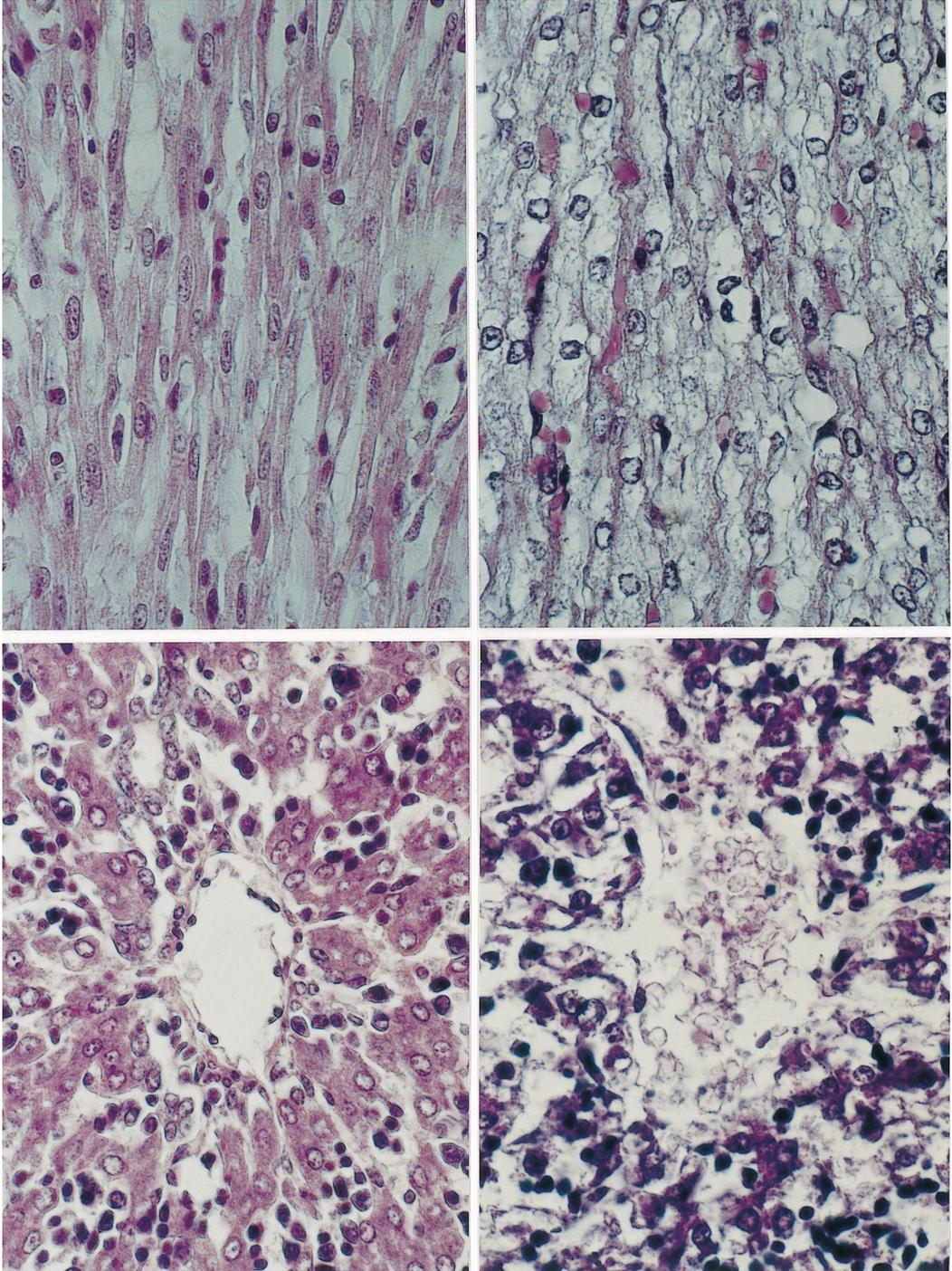


図5 マウスの組織像（左：正常胎仔、右：hChr.2f 移入キメラ胎仔）
上段：心臓。正常胎仔では心筋細胞の細胞質がエオシン（赤紫色）によく染まっているが、キメラ胎仔では心筋細胞が変性し、細胞質が抜けたように見える。
下段：肝臓。正常胎仔では、中心静脈を中心にして放射状に配列した肝細胞の細胞質がエオシン（赤紫色）によく染まっているが、キメラ胎仔では、ほとんどの肝細胞に細胞質の変性と核凝縮がみられる。

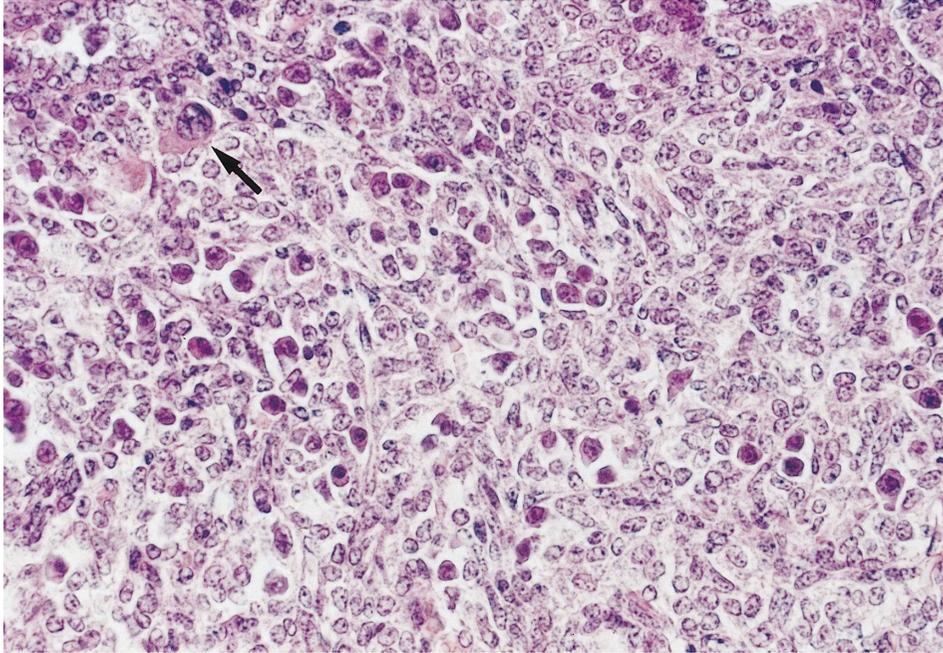


図6 hChr.21 移入キメラ胎仔の卵巢
生殖細胞（矢印）は、卵巢支質内に僅かしかみられない。

Tanke , H. J., Pioem, J. and Ploeg, M. (1990) :
Multiple fluorescent in situ hybridization. *Cytometry*
11 : 126-131.

7) 外村 晶 編 (1978) : 染色体異常, 朝倉書店

8) Daniel , J. C. Jr. (1971) : *Methods in Mammalian
Embryology*, W.H. Freeman and Com.

9) Smith, D. W. (1975) : The 18 trisomy and 13
trisomy syndromes, in *Endocrine and Genetic
Diseases of Childhood*, 2nd Ed. , 715-729, W. B.
Sanders.

10) Smith , G. F. and Penrose , L. S. (1977) : Down's
anomaly , J. & A. Churchill.

11) Barlow , P. (1973) : The influence of inactive
chromosomes on human development. Anomalous
sex chromosome complements and the phenotype.
Humangenetik 17 : 105-136.