

氏名(本籍)	みず 水	たに 谷	えい 英	じ 二
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 8 5 9 号			
学位授与年月日	平 成 1 8 年 3 月 2 4 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	マウスをモデルとする ES 細胞及び核移植による遺伝子 改変動物作出技術の開発に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤 英 明	
	(副 査)	教 授	西 森 克 彦	
		助教授	佐々田 比呂志	
		助教授	豊 水 正 昭	

論文内容要旨

1. 緒言

体外で生殖細胞を操作することにより産子を生産する発生工学技術は、実験動物での胚培養・体外受精技術に始まり、1980年代からはウシなどの産業動物での体外成熟培養・受精・胚培養 (IVMFC) に続き、ごく最近、1997年には体細胞をドナー核としたクローンヒツジを作出する核移植技術まで発展してきている。この間、胚性幹細胞 (ES 細胞) を利用したジーンターゲティング法が開発され、ES 細胞を培養下で遺伝子操作した後に受精卵へ注入しキメラマウスを作り、F1 キメラマウス同士の交配によりノックアウト動物の作出が可能となった。しかしながら、ES 細胞によりキメラ個体を作出する能力は異なり、また、F1 キメラマウスが作出された場合でも生殖細胞に ES 細胞由来の遺伝子が導入されず目的の遺伝子改変マウスが得られない場合も多い。一方、1997年に株化細胞の乳腺細胞をドナー核とした核移植技術により体細胞クローンヒツジが作出され、哺乳類においても体細胞からクローン個体が作出できることが証明され、現在までに10種類以上の動物種において体細胞クローン個体の作出が報告されている。核移植技術の大きな利点として、体細胞に遺伝子の相同組換えを行うことにより、マウス以外の動物で樹立が困難な ES 細胞を用いずに遺伝子改変動物を作出できる可能性があげられる。しかしながら、現在のところ核移植技術による体細胞クローン個体作出の成功率は数%と低いうえに、体細胞クローン個体における様々な異常も報告され、成功率の向上および正常個体作出系の開発が望まれている。

以上の背景下、本研究では実験動物として広く利用されているマウスを用い、発生工学を利用した産子獲得技術の基礎研究として、まず、第一に ES 細胞を用いた遺伝子改変動物の作出効率を上げるために、従来の体外受精や自然交配ではなく、顕微授精技術を用いることを発想した。顕微授精技術では、1個の精子を直接卵子へ注入することから、精子数が少ない場合や運動能力を持たない精子からでも産子を得ることが可能である。第二に、体細胞クローン個体作出の効率向上を目的に体性幹細胞を用いた体細胞クローン個体作出法の開発および体細胞由来 ES 細胞注入法によるクローン胚の発生能力の改良を検索した。

2. 顕微授精を併用した効率的な ES 細胞由来産子の作出

2.1. GFP を発現する ES 細胞由来精子分別による顕微授精

Green fluorescence protein (GFP) 遺伝子を導入した3種類の ES 細胞をマウスの胚盤胞期胚に注入後仮親子宮へ胚移植し、キメラマウスを作出した (Fig.1)。作出した6頭の雄キメラマウスを自然交配した結果、3頭の個体で ES 細胞由来の産子が得られ ES 細胞の生殖細胞系列への分化が確認された (Table 1)。次に、6頭の個体から精巢を取り出し、UV 照射下で解析したところ、すべてのキメラマウス精

巢の曲精細管内に GFP 蛍光を発現する領域が存在した。この領域は発現していない領域とで縞模様状のコロニーを形成していることが観察され、2種類の曲精細管を容易に分離することが可能であった(Fig. 2 および 3)。そこで、これらの精細管を別々に切り出し精巣内精子を採取し、それぞれの精子をマウスの成熟卵子へ顕微注入し、翌日 2 細胞期へ発生した胚を仮親子宮へ胚移植した。その結果、6 頭すべてのキメラマウス精巣から採取した GFP 蛍光を発現する曲精細管内の精子による顕微授精により、ES 細胞由来の産子を得ることができた(Table 2)。特に、6 頭中 2 頭の個体では自然交配により ES 細胞由来産子が得られなかったが(Table 1)、顕微授精により ES 細胞由来産子を効率的に作出することができた。一方、GFP 蛍光を発現しないものでは ES 細胞由来の産子が得られなかった。

以上の結果、GFP を導入し顕微授精技術を用いることで、ES 細胞由来の子孫が得られることが示された。このことにより、キメラ個体で ES 細胞の生殖細胞系への寄与率が低く自然交配では ES 細胞由来の産子が得られない場合でも、精巣内には ES 細胞に由来する生殖細胞が存在する可能性が初めて明らかにされ、顕微授精により確実に ES 細胞由来の産子を作成できる方法が開発された。

2.2. GFP を発現する ES 細胞由来円形精子細胞を用いた顕微授精

顕微授精法の応用技術として成熟精子になる前の円形精子細胞を用いた Round spermatid injection(ROSI)法がある。この方法により、遺伝的に希少価値が高いモデル動物であるものの精子形成不全や乏精子症の個体、あるいは精子形成過程が完成する前の未成熟個体からでも産子を得ることが可能である。そこで GFP 蛍光を発現する ES 細胞由来のキメラマウスを作成し、精子形成過程が完成していない 20 日齢の精巣から円形精子細胞を採取後顕微授精し、ES 細胞由来産子を作成する可能性を検索した。20 日齢のキメラマウス精巣を UV 照射下で観察したところ、成熟キメラマウス精巣と同様に曲精細管内に GFP 蛍光を発現する領域と発現しない領域が存在した。続いて、GFP 蛍光を発現している曲精細管領域を切り出し採取した細胞懸濁液を観察した結果、円形精子細胞が存在していたが成熟精子は認められなかった。そこで、円形精子細胞を用いて ROSI を行った結果、供試した 3 頭すべてで ES 細胞由来の産子が得られ、その率は 100% であった(Table 3)。

2.3. GFP 非導入 ES 細胞由来精子分別による顕微授精

前節までの実験で GFP を導入した ES 細胞を用いて作製したキメラマウス精巣内生殖細胞の顕微授精により ES 細胞由来産子を効率的に作出することに成功した。この場合、GFP 蛍光を指標に生殖細胞を分別したが、ES 細胞に遺伝子導入する場合必ずしも GFP 遺伝子を並行導入するあるいはできるとは限らず、前節までの方法をそのまま利用できない可能性がある。そこで、GFP を導入しない ES 細胞由来精子をキメラマウス精巣内で分別するため、キメラ作製時に GFP を

ホスト胚に導入し、GFP を導入していない 3 種類の ES 細胞を用いキメラ個体を作成した。その結果、作成したキメラマウス精巣を UV 照射下で観察したところ、GFP 蛍光を強く発現している曲精細管領域と弱い領域が縞状に存在した。二つの領域の曲精細管をそれぞれ切り出して精子を採取し、顕微授精を行った結果、強い GFP 蛍光領域からはホスト胚由来の産子のみが得られ、弱い領域からは ES 細胞由来の産子が得られた (Table 4)。

以上、第 1 節から 3 節までの結果から、本章で開発した ES 細胞由来精子の分別による顕微授精はキメラ個体を作成する能力が低い ES 細胞、あるいは自然交配では目的の遺伝子改変マウスが得られない場合でも応用範囲の広い技術であることが証明された。

3. 幹細胞を用いた体細胞クローン個体作出法の開発

3.1. 神経幹細胞の採取とその特性解析

クローンマウスは卵丘細胞やセルトリ細胞などの分化した体細胞や多能性を持つ ES 細胞から作成され、後者で成功率が高いことが報告されている。このことは未分化なドナー細胞が体細胞クローン個体作出に適していることを示唆している。近年、特定の組織へ分化する種々の体性幹細胞が見つかり、ES 細胞が樹立されていない動物種において遺伝子改変動物作出の材料として期待されている。本章では未分化であると考えられる体性幹細胞の一種である神経幹細胞をドナー核として核移植を行い、体細胞クローン個体作出効率の向上と共に体性幹細胞利用の可能性を検索した。

生後 1~4 日齢の雄マウス脳から脳室周辺の細胞を採取した。採取後単離した細胞を浮遊培養し、球形の細胞塊を得た。得られた細胞塊が神経幹細胞の集まりによるニューロスフェアであることを確認するため、神経幹細胞マーカーである *musashi* 抗体および分化神経細胞マーカーである β III-tubulin 抗体で免疫蛍光染色を行った。得られた細胞塊は *musashi* 抗体陽性、 β III-tubulin 抗体陰性を示し、神経幹細胞塊であることが確認できた (Fig.4)。さらに、これらの細胞塊を接着培養したところ、培養 10~14 日目にニューロン、オリゴデンドロサイト、グリア細胞の分化神経細胞マーカーに対して陽性細胞が観察され、分化能を維持していることが示された (Fig.5)。これらの細胞塊をピペッティングにより単離した後再培養すると新たに細胞塊を形成することから、自己増殖能も持っていることがわかった。

3.2. 神経幹細胞核移植による体細胞クローン胚の発生能

ドナー細胞として、継代培養 3 回未満の神経幹細胞、卵丘細胞、セルトリ細胞および ES 細胞を使用し核移植を行い、作成した 2 細胞期胚を仮親子宮へ胚移植した。その結果、神経幹細胞ではクローン個体作出率は 0.5% (5/1072)であったの

に対し、卵丘細胞およびセルトリ細胞ではそれぞれ 2.7% (12/440)と 2.2% (10/451)であり、ES 細胞の場合では 3.5% (7/198)であった(Table 5)。神経幹細胞の核移植によって得られたクローン個体は正常な繁殖能力を示した(Fig.6)。次に、クローン胚の発生がどの段階で停止しているのかを体外胚培養により調べた。神経幹細胞の場合、2細胞期への発生率がセルトリ細胞や卵丘細胞と同様であったのに対し、4細胞期への発生率は急激に低下し桑実胚/胚盤胞期へ発生したものは 7.1%であった。分化した体細胞では 50%以上のクローン胚が桑実/胚盤胞期へ発生した。ES 細胞では 2細胞期への発生率が最も低く約 30%であったが、これらの大部分は桑実/胚盤胞期へ発生した(Table 6)。

以上、第 1 節および第 2 節の結果は、神経細胞であっても幹細胞ならば核移植による初期化が可能であることを示し、生後のマウス神経細胞から直接クローン個体を作成した、初めての成功例である。さらに、神経幹細胞は未分化状態を維持したまま増殖・培養が可能な細胞であることがわかった。本研究では未分化な体性幹細胞をドナー細胞として用いることにより作出効率の向上を期待したが、必ずしも高い結果ではなく、用いるドナー細胞に適した処理が必要であることが示唆された。今後、神経幹細胞は種々の改善が必要であるとはいえ核移植技術を用いたノックアウト動物作出などの材料として利用が期待できる。

3.3. 体細胞由来胚性幹細胞(ntES 細胞)注入によるクローン胚の発生能力向上

卵丘細胞などの体細胞核移植胚では胚盤胞期胚の内部細胞塊(ICM)における遺伝子発現の異常が報告されており、クローン胚で正常に遺伝子発現する ICM の数を増やすことで、クローン胚の発生能力向上の可能性を検索した。そこで、核移植技術に加えてキメラ作出技術を併用することを発想した。すなわち、体細胞核移植胚を作成後培養することで ntES 細胞を樹立し、この細胞を他の同じ起源を持つ体細胞クローン胚に移植することで、クローンキメラ胚を作製した。通常、キメラ胚を作成する場合胚盤胞期胚へ ES 細胞を注入するが、仮親への移植時間を考慮し、4~8細胞期胚の囲卵腔内へ ntES 細胞を注入しキメラ胚を作成した。対照として、ES 細胞を用いた。作出したクローンキメラ胚盤胞期胚について、ICM を認識する Oct4 抗体と栄養膜細胞を認識する cdx2 抗体による免疫染色後、全細胞数、Oct4 発現細胞数および個体への発生能を調べた。その結果、通常の卵丘細胞クローン胚で胚盤胞期での細胞総数が平均 41.4 個、cdx2 発現細胞数が 31.0 個、Oct4 発現細胞数が 7.2 個であったのに対し、胚間でバラツキはあるものの ES 細胞を注入した区では細胞総数の平均は 51.5 個、cdx2 発現細胞数は 36.5 個、Oct4 発現細胞数は 11.5 個と増加した(Fig.7 および Fig.8)。これらの結果から、ES 細胞の注入が胚盤胞期での細胞増殖を促進している可能性が示唆された。作出したクローンキメラ胚を仮親子宮に移植し個体への発生能を調べた。その結果、クローン産子は ES 細胞注入で 1 頭、ntES 細胞を注入した場合には生まれず、

クローン個体作出効率は向上しなかった (Table 7)。本節の結果, クローン胚に ES 細胞を注入することで胚盤胞期における細胞数が増加することが示されたものの, 胚移植してもクローン作出効率は改善されなかった。

以上, 本研究は実験動物として広く利用されているマウスを用い, 発生工学を利用した産子獲得技術の基礎研究として,

1. 顕微授精を併用した効率的な ES 細胞由来産子の作出について,
 - ・ ES 細胞を GFP で蛍光標識することによりキメラ個体での ES 細胞由来生殖細胞と宿主胚由来生殖細胞を区別できる
 - ・ 作出したキメラ個体のうち, 自然交配で産子に ES 細胞由来遺伝子導入が認められない場合でも精巣内精子の分別が可能で, ES 細胞由来精子の顕微授精により非常に効率よく ES 細胞由来産子が得られる
 - ・ ホスト胚に GFP 蛍光を発現させることで, キメラ個体で蛍光標識されていない ES 細胞由来生殖細胞を選択的に採取でき, 遺伝子改変したあらゆる ES 細胞に利用可能である

ことを明らかにし, ES 細胞を利用した遺伝子改変動物を作出する発生工学技術に新しい可能性を提供し, さらに,

2. 体性幹細胞を用いた体細胞クローン個体作出法の開発について,
 - ・ 体細胞クローンが生まれないと考えられていた生後の神経系細胞であっても神経幹細胞の核移植により作出可能である
3. ntES 細胞注入によるクローン胚の発生能力向上について,
 - ・ 体細胞クローン胚への ntES 細胞注入によりクローン胚盤胞期胚の細胞数を増加させることができる

ことを明らかにし, マウスも含めた哺乳類での体細胞クローン個体作出効率を向上させるための手がかりを提供するものと確信する。

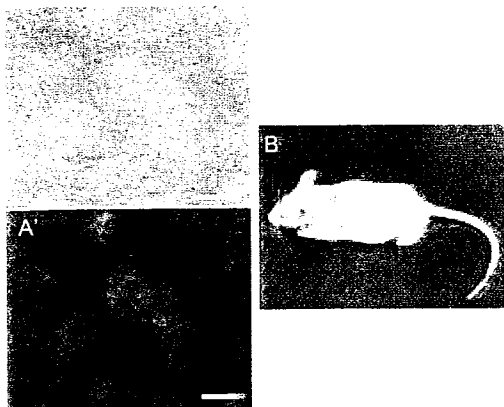


Fig. 1. Donor ES cells (129B6F1G1) and a chimeric male mouse produced by injection of these cells into blastocysts. The ES cells are shown under light (A) and fluorescence (A') microscopies. (B) A chimeric male mouse can be distinguished by their coat color. Scale bars = 600 μ m.

Table 1. Germ-line transmission of ES cells in chimeric mice by natural mating

Chimera No.	Type of donor ES cell	Percentage of ES-derived sperm	No. (%) of litters		
			Total	with black eyes	GFP-positive and black-eyed
1	129B6F1G1	30.2*	44	34(77)	13(30)
2	129B6F1G1	2.7*	23	3(13)	2(9)
3	129B6F1G1	0*	53	2(4)	1(2)
4	129B6F1G2	0*	31	0(0)	0(0)
5	EGFP	- **	44	1(2)	0(0)
6	EGFP	- **	27	0(0)	0(0)

* Based on GFP expression

** Mature sperm derived from EGFP ES cell line did not express GFP.

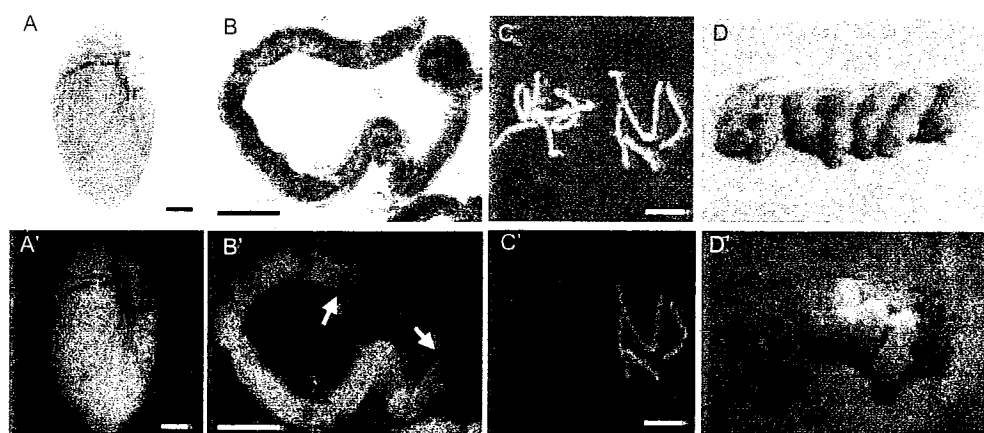


Fig. 2. Analysis of testes of chimeric mice with GFP-labeled ES cells and microinsemination using testicular sperm. (A) Testis derived from adult chimeric male mouse (Chimera No.1 of Table 1, eight weeks old). (A') The testis is shown under the excitation light for GFP. (B) A seminiferous tubule removed from the testis. (B') A seminiferous tubule under the excitation light. GFP-expressing male germ cells are distinguishable by their green color. Green and non-green regions of the seminiferous tubules were clearly separated (arrowhead). (C) Seminiferous tubules collected from testis of chimeric mouse. (C') The same tubules are shown under the excitation light for GFP. Green and non-green regions of seminiferous tubules were collected separately. (D) Two-day-old progeny with black eyes were produced with microinsemination using the sperm from green tubules. (D') The same progeny are shown under the excitation light for GFP. Half the progeny expressed GFP. Scale bars: (A), (A') = 1 mm; (B), (B') = 0.3 mm; (C), (C') = 0.5 mm.

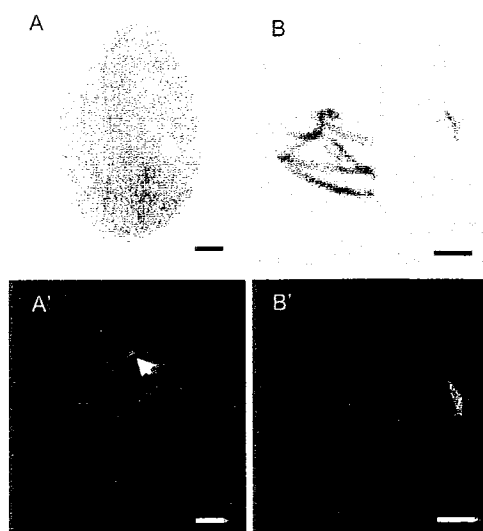


Fig.3. The testis of a chimeric mouse that did not produce progeny from ES cells by natural mating. (A, A') A testis from a chimeric male mouse with a very low rate of colonization by donor ES cells (Chimera No.4 of Table 1). Under the excitation light (A'), a very limited region expressed GFP (arrowhead). (B, B') Green and non-green seminiferous tubules were collected separately from the testis in (A). Scale bars (A), (A') = 1 mm; (B), (B') = 0.5 mm.

Table 2. Microinsemination using testicular sperm derived from GFP-labeled ES cells

Chimera No.*	Region of Seminiferous tubules	No. of embryos transferred**	No. (%) of litters		
			Total	With black eyes	GFP-positive and black-eyed
1	green	130	64	64(100)	39(61)
	non-green	79	30	0(0)	0(0)
2	green	89	46	46(100)	24(52)
	non-green	51	26	0(0)	0(0)
3	green	52	27	27(100)	16(59)
	non-green	46	16	0(0)	0(0)
4	green	47	15	10(67)	5(33)
	non-green	35	16	0(0)	0(0)
5	green	84	35	35(100)	16(46)
	non-green	78	26	0(0)	0(0)
6	green	36	16	11(69)	4(25)
	non-green	36	12	0(0)	0(0)

* The same number represents the same chimeric mouse in this table and in Table 1.

** All embryos were transferred at the two-cell stage.

Table 3. Microinsemination using round spermatids from green seminiferous tubules of 20-day-old chimeras

Chimera No.*	No. of embryos transferred**	No. (%) of litters		
		Total	With black eyes	GFP-positive and black-eyed
1	40	6	6(100)	2(33)
2	72	2	2(100)	1(50)
3	80	14	14(100)	7(50)

* All embryos were transferred at the two-cell stage.

Table 4. Microinsemination using testicular sperm derived from non-GFP labeled, transgenically marked ES cells

Type of donor ES cell	Region of Seminiferous tubules	No. of embryos transferred*	No. (%) of litters		
			Total	With black eyes	Ret9 transgenic
1	green	76	36	0(0)	-
	non-green	77	27	27(100)	-
2	green	43	18	0(0)	-
	non-green	64	29	29(100)	-
3	non-green	144	57	57(100)	28(49)

* All embryos were transferred at the two-cell stage.

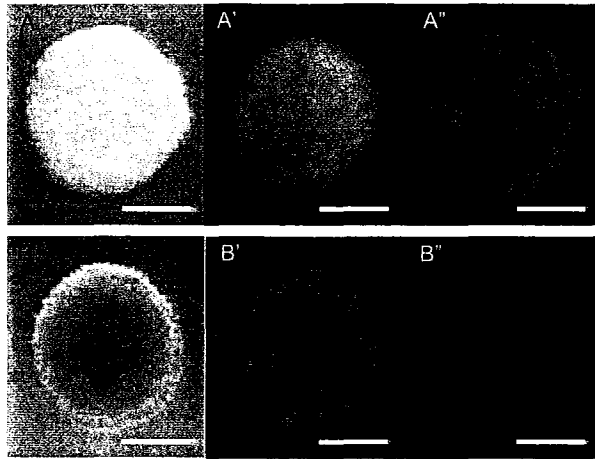


Fig. 4. Immunofluorescent staining of neurospheres. Neurospheres were positive for the neural stem cell marker, Musashi (A, A', A''), and were negative for the mature neural cell marker, β III-tubulin (B, B', B''). A: A bright-field image of neurospheres stained with Musashi antibody, A' : DAPI staining, A'' : Musashi antibody, a neural stem cell marker, B: a bright-field image of neurosphere stained with β III-tubulin antibody, B' : DAPI, B'' : β III-tubulin. Scale bar = 100 μ m.

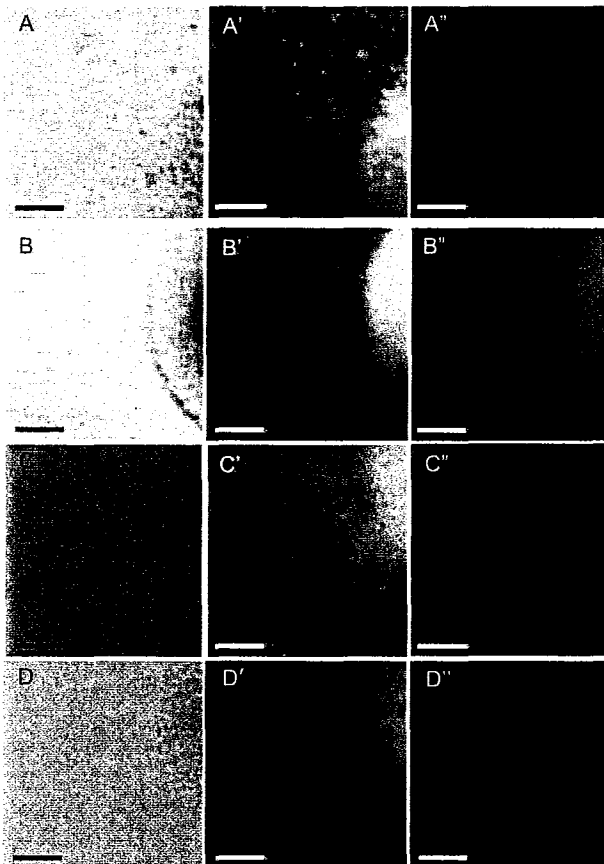


Fig. 5. Immunofluorescent staining of differentiated neurospheres. Neurospheres were cultured on gelatin-coated plates for 10 days. Morphologically differentiated neural cells were observed around the attached neurospheres. A: A bright-field image of neurospheres stained with Musashi antibody, A' : DAPI staining, A'' : Musashi, B: a bright-field image of β III-tubulin antibody, B' : DAPI, B'' : β III-tubulin. C: a bright field of mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody, C' : DAPI, C'' : GFAP, D: a bright field image of O4, anti-oligodendrocyte marker, D' : DAPI, D'' : O4. Scale bar = 30 μ m.

Table 5. Full term development of cloned embryos from NSCs, Sertoli, Cumulus and ES cell nuclei

Type of donor cell	No. of oocytes injected	No. of oocytes With PN(%)	No. of embryos developed to two-cell stage(%)*	No. of embryos transfereed	No. of live offspring (%)**
NSC	1887	1503(79.7) ^a	1097(71.8)	1072	5(0.5)
Sertoli	686	581(84.7) ^{a,b}	451(77.6)	451	10(2.2)
cumulus	573	529(92.3) ^{b,c}	440(83.2)	440	12(2.7)
ES	569	541(95.1) ^{b,c}	198(36.6) ^a	198	7(3.5)

* Percentages against number of pronuclear formation (PN).

** Percentages against number of ET.

^{a-c} $P < 0.05$

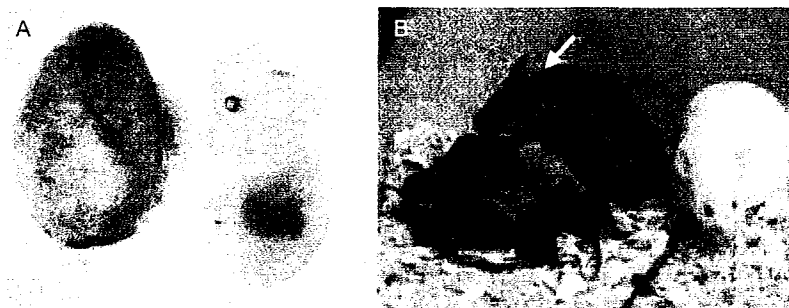


Fig. 6. Clone mice from neural stem cells. A: Clone mouse at 14.5 dpc. B: Adult clone mouse (arrow). The mouse has normal ability of reproduction.

Table 6. *In vitro* development of cloned embryos from NSCs, Sertoli, Cumulus and ES cell nuclei

Type of donor cell	No. of oocytes injected	No. of oocytes with PN(%)	No. of reconstructed embryos developed to		
			two-cell stage(%)*	4-8 cell stage(%)*	Morula/Blastocyst (%)*
NSC	333	295(88.6) ^{a,b}	214(72.5)	68(23.1)	21(7.1)
Sertoli	277	267(96.4) ^a	227(85.0)	ND	134(50.2) ^a
cumulus	319	239(74.9) ^b	180(75.3)	147(61.5) ^a	129(54.0) ^a
ES	374	363(97.1) ^a	135(37.2) ^a	118(32.5) ^b	111(30.6) ^b

* Percentages against number of pronuclear formation (PN).

^{a-c} $P < 0.05$.

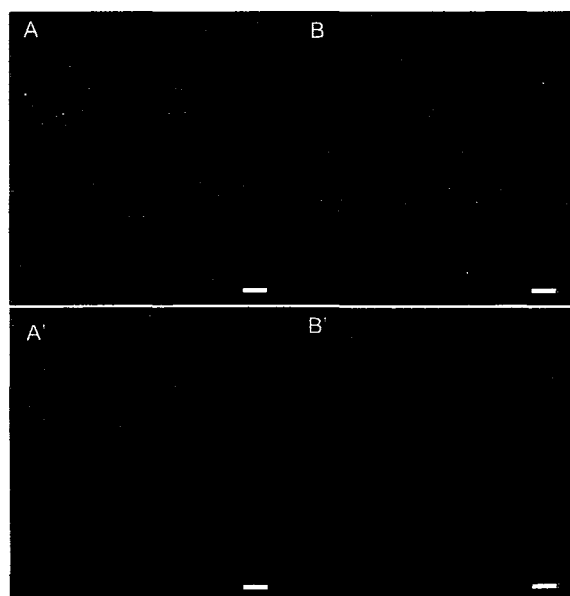


Fig.7. Cloned blastocyst from cumulus cells and cloned blastocyst from cumulus cell injected ES cells. A:DAPI staining of cloned blastocyst from cumulus cell. A':cdx2(Red) and Oct4(Green) antibody staining of A. B:DAPI staining of ES cell injected cloned blastocyst from cumulus cell. B': cdx2(Red) and Oct4(Green) antibody staining of B. Bar=10 μ m

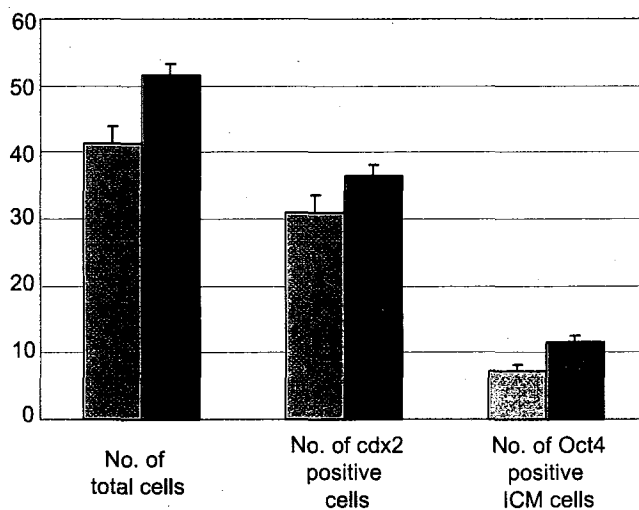


Fig.8. Blastocyst cell number of cloned embryos from cumulus cells and ES cell injected cloned embryos from cumulus cells. Each value indicates mean \pm SE.

■:cumulus clone, ■:cumulus clone + ES cell

Table 7. Effect of ntES cell injection into cloned embryos from cumulus cells

Treatment	No. of oocytes injected	No. of embryos that developed to		No. of embryos ES cell injected	No. of embryos transferred	No. of live offspring (%)*	No. of dead offspring (%)*	No. of only placenta (%)*
		2-cell stage (%)	4-cell stage (%)					
Cumulus clone	256	158 (61.7)	131 (51.2)	-	100	1(1.0)	0(0)	0(0)
GFP-ntES Cell injected	202	156 (77.2)	147 (72.8)	147	131	0(0)	0(0)	0(0)
ES cell injected	217	190 (87.5)	153 (70.5)	153	132	1(0.7)	0(0)	0(0)

* Percentages against number of embryo transfer.

論文審査結果要旨

現在のところ核移植技術による体細胞クローン個体作出の成功率は数%と低いうえに、体細胞クローン個体における様々な異常も報告され、成功率の向上および正常個体作出系の開発が望まれている。本研究では実験動物として広く利用されているマウスを用い、発生工学を利用した産子獲得技術の基礎研究として、まず、第一にES細胞を用いた遺伝子改変動物の作出効率を上げるために、従来の体外受精や自然交配ではなく、顕微授精技術を用いることを発想した。顕微授精技術では、1個の精子を直接卵子へ注入することから、精子数が少ない場合や運動能力を持たない精子からでも産子を得ることが可能である。第二に、体細胞クローン個体作出の効率向上を目的に体性幹細胞を用いた体細胞クローン個体作出法の開発および体細胞由来ES細胞注入法によるクローン胚の発生能力の改良を検索した結果、以下の成果を得た。

1. 顕微授精を併用した効率的なES細胞由来産子の作出について、(1) ES細胞をGFPで蛍光標識することによりキメラ個体でのES細胞由来生殖細胞と宿主胚由来生殖細胞を区別できる、(2) 作出したキメラ個体のうち、自然交配で産子にES細胞由来遺伝子導入が認められない場合でも精巣内精子の分別が可能で、ES細胞由来精子の顕微授精により非常に効率よくES細胞由来産子が得られる、

(3) ホスト胚にGFP蛍光を発現させることで、キメラ個体で蛍光標識されていないES細胞由来生殖細胞を選択的に採取でき、遺伝子改変したあらゆるES細胞に利用可能である、ことを明らかにし、ES細胞を利用した遺伝子改変動物を作出する発生工学技術に新しい可能性を提供した。

2. 体性幹細胞を用いた体細胞クローン個体作出法の開発について、(1) 体細胞クローンが生まれないと考えられていた生後の神経系細胞であっても神経幹細胞の核移植により作出可能である、(2) ntES細胞注入によってクローン胚の発生能力向上する、(3) 細胞クローン胚へのntES細胞注入によりクローン胚盤胞期胚の細胞数を増加させることができることを明らかにし、マウスも含めた哺乳類での体細胞クローン個体作出効率を向上させる技術を開発した。

本研究は応用動物科学において高く評価される。よって博士（農学）の学位を授与できるものと判定した。