

【総説】

マウス発生工学の技術革新

平手 良和

国立大学法人東京医科歯科大学統合研究機構実験動物センター

要約

マウスは古くから研究に供されてきた実験動物であり、基礎医学研究における哺乳類のモデル生物としてその重要性は今後も変わることはないだろう。ゲノム編集法の急速な発展により遺伝子改変体を容易に作製できるようになったが、その発展を縁の下で支えているのは発生工学技術である。本稿では発展著しい最新のマウス発生工学技術について概説する。取り上げる技術は“超”過剰排卵誘起法、発情周期の同調法、胚凍結、精子凍結、精巣上部尾部および胚の冷蔵輸送、そしてトリプル CRISPR である。これらの新技術により遺伝子改変体の作製が促進され、系統保存の信頼性が向上し、輸送手段は多様化した。これらはみな完成度の高い技術であるが、難易度が高いわけではなく導入障壁は比較的低い。各研究機関の動物実験施設でマウスの発生工学に携わる技術者は新しい技術を積極的に取り入れ、技術革新の恩恵を研究者に還元してほしい。

キーワード： ultra-superovulation, synchronization of estrus cycle, cryopreservation, transportation at a cold temperature; triple CRISPR

1. はじめに

実験動物の扱いやすさは繁殖・系統保存を自在にコントロールできるか否かによって決まるといっても異論はないかと思う。ゲノム編集法の急速かつ飛躍的な進展のおかげで、マウスでも種々の遺伝子改変体を比較的容易に作製できるようになった。ゲノム編集技術が華々しくマウス研究の世界を塗り替えていく中、それを縁の下で支えているのは発生工学技術である。マウスの発生工学技術はこの10年で大きく進展しており、一部の技術に至っては発生工学を専門としない一般の研究者でも実施可能なほどに簡易化されている。しかしながら、やはり発生工学というと専門外の研究者には敷居が高く感じられているのではないだろうか。本稿では技術的な解説は最小限とし、一般のマウス研究者にとっての新技術のメリットに重きを置いて解説する。

本稿で紹介する発生工学技術は以下のとおりである。
1) 抗インヒビン抗血清の投与により1匹のメスから最高で100個の卵子を採取できる“超”過排卵法。この方法には通常性成熟前のメスを使用する。2) 性成熟後のメスで超過排卵を行うと、得られる卵子数は発情周期に大きく影響されてしまう。性成熟後のメスで過排卵を行う場合は、プロゲステロンによる発情周期の同調と抗インヒビン抗血清の投与を併用する。これにより1匹のメスから60個程度の卵子を採取することができる。3) また、この発情周期同調法を用いることで、小さなメスコロニーから仮親や里親を効率よく準備することができる。4) 動物の施設間移動の際は、コストが高く逃亡や死亡のリスクもある生体での輸送に代わって、精巣上部尾部あるいは胚を冷蔵状態で輸送することができる。とりわけ精巣上部尾部の冷蔵輸送は、送り手側に発生工学の技術者がいない場合の生体輸送に代わる動物授受の手段として大変有用である。5) 大切な系統のオスが絶えそうになったら精巣上部尾部を摘出して精子凍結を行うのがよい。精巣上部尾部の摘出さえできればそこから精子を採取して凍結するのは比較的容易であり、発生工学を専門としない研究者でも実施可能である。いざという時のためにぜひ精子凍結をマスターしておきたい。6) 最後に紹介するのはトリプル CRISPR である。この

連絡先：平手良和 〒113-8510

東京都文京区湯島 1-5-45

TEL：03-5803-5783

FAX：03-5803-0373

E-mail：hirate.arc@cmn.tmd.ac.jp

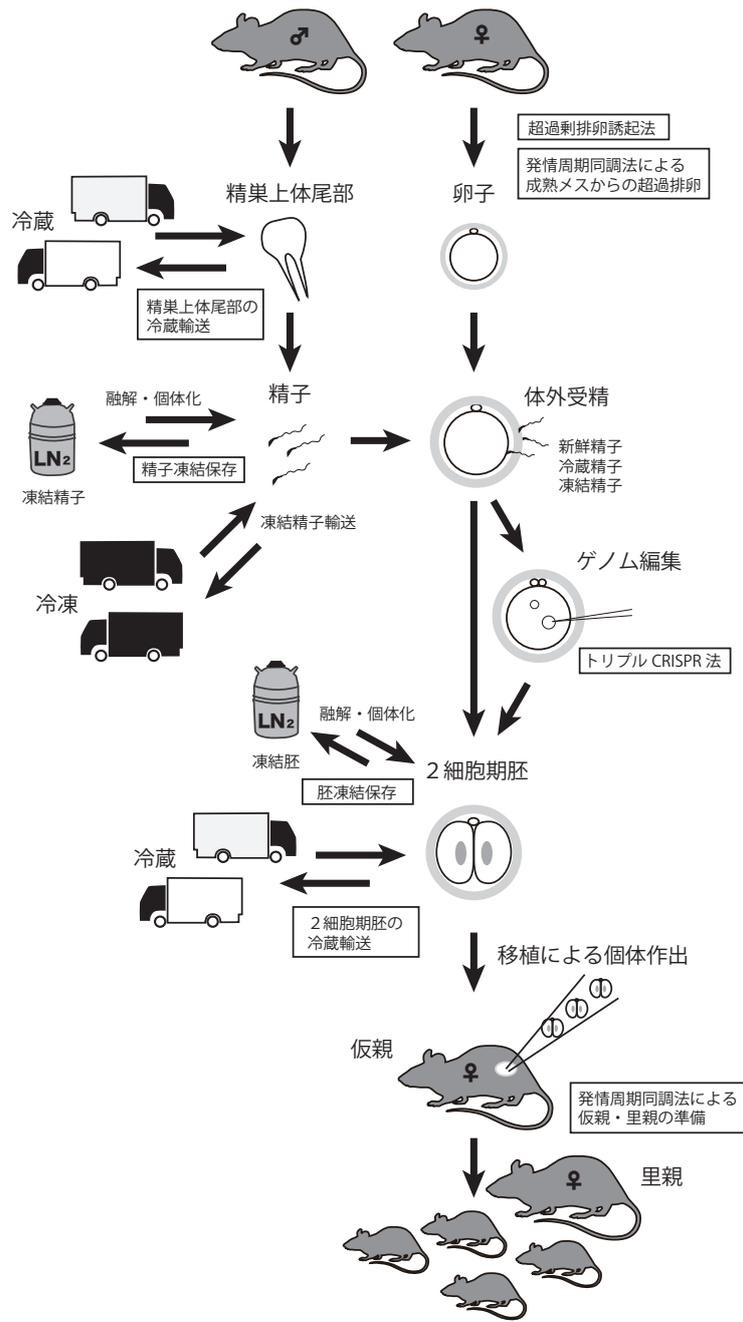


図. マウス発生工学図解

非常に効率の高いゲノム編集方法はインジェクションを行った個体 (F0 個体) で9割以上のノックアウトマウスを作出できるため、改変体のスクリーニングや繁殖という手間や時間をかけずに F0 個体を用いて実験を行うことができる。これらの新技術は、福祉的配慮の観点から供試動物数を大きく削減しつつ、解析に必要な個体を効率よく得るための手段の一つとして応用されている。これら新技術の恩恵を受けない手はない。本稿で紹介した技術の中に読者の研究に生かせそうなものがあればぜひ試してみてほしい。

2. 未成熟メスからの“超” 過剰排卵誘起法

過排卵法は内在性ホルモンと同様の作用を示すホル

モンを適切なタイミングで投与することにより過剰な排卵を誘発し、多くの卵子を得る方法である。過排卵処理によって得られた卵子を用いた体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) は発生工学技術の根幹をなすものであり、胚凍結も遺伝子改変マウス作製も卵子を得ることから始まる。したがって、過排卵法の改良は発生工学技術全体の底上げにつながる。1匹のメスから得られる卵子数を増やすことができればメスの使用数を削減できるので3Rの理念に適っているし、飼育スペースの縮小や経費節減にもつながる。

マウスの卵胞成熟は脳下垂体前葉から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) の作用により促進され、同じく脳下垂体前葉から分泌される黄体形成ホルモン (LH) に

よって排卵が誘起される。これまで一般的に行われてきた過排卵法では、FSH 様の作用を示す妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG、eCG と呼ばれる) の投与により多数の卵胞を发育させ、LH 様の作用を示すヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG) の投与により排卵を誘起して 1 匹の雌マウスから 30 個程度の成熟卵子を得ることができた。熊本大学動物資源開発研究施設 (熊本大学 CARD) の竹尾と中潟は FSH の分泌が发育卵胞中の顆粒膜細胞から放出されるインヒビンにより抑制されていることに着目し、PMSG と共に抗インヒビン抗血清を投与することで性成熟前のメス (4 週齢) から最高で 100 個程度、従来の 3~4 倍の卵子数を得ることができる “超” 過排卵誘起法を開発した^[1,2]。本法で使用する抗インヒビン抗血清と PMSG の混合液は CARD HyperOva[®] という商品名で九動株式会社 (<http://www.kyudo.co.jp/>) から入手可能である。

1 匹のメスから多くの卵子が得られることによるメリットは数多いが、とりわけトランスジェニックやノックアウトなどの遺伝子組換え系統をホモで維持しているとき、オスメスともホモの個体を使うことでホモの凍結胚を作製できることが大きな利点である。従来法でもホモ凍結胚の作製は原理的に可能であったが、3~4 週齢のメスをまとまった匹数準備することが必要だったため実際に行うことは難しかった。それに対して過排卵法であれば、3~4 週齢のメスが数匹いれば実施できる。従来の過排卵法ではメス親にオス親 (組換え体) と同じ遺伝的背景をもつ野生型を用いるため IVF により得られる凍結胚の遺伝子型は野生型またはヘテロとなる。それに対し、オス親だけでなくメス親もホモを用いて凍結胚を作製すれば、凍結胚はすべてホモとなる。凍結胚がヘテロの場合、実験に用いるホモ個体を得るには凍結胚から個体化したヘテロマウス同士の交配が必要となるが、ホモで凍結した場合は個体化したマウスをそのまま実験に用いることができ、時間を大幅に節約することができる。また、得られたホモのメス親とオス親からそれぞれ卵子と精子を採取して IVF を行い再びホモの凍結胚を作製したり、同一週齢のまとまった数のマウスが必要であれば、ホモ胚を複数の仮親に移植することで同一週齢のホモ個体の大きなコロニーを作ることにもできる。

3. 発情周期の同調による成熟メスからの過排卵誘起

前述のとおり性成熟前のメスで過排卵を行うことで 1 匹から 100 個の卵子を得ることができるが、この方法を性成熟後のメスで行った場合、PMSG-hCG 投与の 2 倍 (40 個) 程度の卵子しか得ることができない。理研バイオリソースセンター (理研 BRC) の長谷川らは、性成熟後のメスを用いた過排卵処理では排卵数は発情周期に大きく影響されること、そして、発情後期で過排卵処理を行うことにより最大の卵子数 (59 ± 7 個) が得られることを明らかにした^[3]。したがって、メスが発情後期のときに過排卵処理を行うとよいわけだが、マウスの発情周期を同調させる方法はなかったため、発情後期のメスを計画的に必要な数準備することは難し

かった。そこで長谷川らはプロゲステロンの投与によりモルモットの発情周期を同調できることに着目し、マウスにおいてプロゲステロン投与による同調を試みたところ、プロゲステロンを 1 日 1 回、2 日間投与することにより投与開始から 4 日目には 93% のメスが発情後期となることを見出した。このプロゲステロンによる発情周期同調と抗インヒビン抗血清による過排卵を組み合わせることで、性周期に影響されずに安定して 62 ± 5 個の卵子を得ることができることを報告した^[3]。野生型の採卵であれば 3~4 週齢の野生型メスを購入することでいつでも過排卵処理ができるが、組換えマウスの場合にはそうはいかない。性成熟後のメスからでも安定して多くの卵子を得ることができるようになったことは想像以上に大きなメリットである。本法の具体的な投与スケジュールは以下の通りである。抗インヒビン抗血清は 2 日間投与するほうが多く採卵できるため、1 日目と 2 日目にプロゲステロン投与、3 日目と 4 日目に抗インヒビン抗血清の投与、6 日目に hCG を投与するとその翌朝 (7 日目) に卵子を得ることができる。ここでひとつ注意して注意しておきたいことがある。性成熟前のメスの過排卵では抗インヒビン抗血清と PMSG の混合液 (CARD HyperOva[®]) が卵胞成熟促進に効果的だったが、性成熟後のメスで過排卵を行うときは PMSG の添加されていない抗インヒビン抗血清を用いる。抗インヒビン抗血清はセントラルリサーチ株式会社 (<http://www.cr-c.co.jp/>) から購入可能である。

4. 発情周期同調による仮親コロニーサイズの縮小

凍結胚を個体化するには、凍結胚を融解して偽妊娠状態にある仮親の卵管への移植を行う。偽妊娠の仮親を準備するには、仮親用に維持している ICR 等のマウス系統のコロニーから発情前期の状態にある個体を選び、精管結紮オスと交配させることで陰栓を付けさせ偽妊娠状態にさせる。1 回の移植に 2~3 匹の偽妊娠メスを用いる場合、陰栓が付かないことも想定して 5 匹程度の発情前期メスを交配させるが、確実に発情前期の状態にあるメスを 5 匹用意するには仮親用のメスを多数飼育しておく必要がある。発情前期の状態にあるメスは外生殖器の赤みがかった色合いや状態を観察して選ぶが、発情前期であると確信が持てる個体は意外に少なく、多数のメスを飼育していないと必要な数を用意するのは難しい。マウスの発情周期は通常 4~5 日でまわるので、移植に必要とする個体数の 4~5 倍のメスを飼育していればよいと思うかもしれないが、実際にはその中から必要な数の発情前期のメスを見つけ出すことは困難である。また、仮親から帝王切開で産仔を得ることもしばしばであり、そうなることを想定して仮親に加え里親も用意しておく必要がある。

理研 BRC の長谷川らは彼らが開発した発情周期同調法が仮親の準備にも効果的であることを明らかにした。彼らは ICR 系統のメスを用い、1 日目、2 日目にプロゲステロンを投与すると 3 日目に 85% のメスは発情後期になり、4 日目から精管結紮オスとの交配を開始すると

7日目に63%のメスに膣栓が確認できることを報告した^[4]。この膣栓率はプロゲステロン投与を行っていない仮親用のメスコロニーから発情前期のメスを選んで精管結紮オスと交配させた場合と同程度である。したがって、仮親用の大きなメスコロニーが用意できる施設であれば本法を行うことのメリットは感じられないが、大きなメスコロニーを用意することが困難な小規模施設では本法を導入することにより胚移植による凍結胚の個体化が可能となる。また、里親の準備にも本法を用いることができる。

5. 胚の凍結保存

胚の凍結保存はマウスの維持に要する経費、人的負担、および飼育スペースの削減に寄与するのはもちろんのこと、感染事故による系統の喪失や交配による遺伝的コンタミネーションなどのトラブルから系統を回復するためのリソースとして大変重要である。また、研究機関のあいだでマウスの授受を行うとき、生体の輸送に代わる手段として凍結胚での輸送が一般的になってきている。一般の研究者が凍結胚を取扱うことは少ないと思うが、輸送の際には取扱うことがあるかもしれない。そんなときに注意していただきたいのは、一般の研究者にとって細胞の凍結保存は馴染みがあるため、凍結胚を凍結細胞と同じように扱ってしまうことである。凍結細胞は-80℃でも保存できるタイプの保存液が市販されているが、凍結胚はたとえ一時的にでも-80℃で保管することはできず、液体窒素の液相または気相での保管となる。また、凍結胚を液体窒素タンクから出し入れする際はチューブの温度が上昇しないようデュワー瓶等に液体窒素を準備し、チューブを常に液体窒素で冷却しておくことが重要である。一時的であってもドライアイスでの保冷は行うべきではない。他機関から輸送されてきた貴重な凍結胚の取扱いが適切でなかったために、融解後に生存胚が得られなかったという泣くに泣けない事態もしばしば起きている。

凍結胚を適切に扱うためには凍結の原理について理解しておく必要がある。1985年にガラス化凍結法が開発されて以降はガラス化による急速凍結法が普及し、現在、国内のマウス胚凍結法の主流である熊本大学CARDの方法も理研BRCの方法も急速凍結法をベースとしている^[5,6]。急速凍結法で凍結された胚は過冷却状態にあり、細胞内の水はガラス化された状態となっている。したがって、ガラス転移温度(-130℃付近)より高い温度では脱ガラス化してしまうため細胞内に氷晶が形成されて胚は死んでしまう。ドライアイスや-80℃フリーザーで保管された凍結胚から生存胚が得られないのはそのためである。そのため凍結胚は必ず液体窒素タンクで保管する。また、凍結胚を輸送する際はドライシッパーと呼ばれる輸送容器を用いる。ドライシッパーを使用することで液体窒素の気相で-150℃以下の超低温中の試料を輸送できる。輸送中の温度を記録できる温度データロガーがあるとよい。

一般の研究者が胚凍結を行うのは少しハードルが高

いが、熊本大学CARDの胚凍結法で使用する試薬はアーク・リソース株式会社(<http://www.ark-resource.co.jp/>)から市販されており、発生工学に不慣れな研究者でも比較的容易に胚凍結を行うことができる。胚凍結を行う際は、試し起し用の10~20個の胚入りの凍結チューブを1本用意しておき、1週間程度液体窒素タンクで保管した後に融解して、*in vitro*で胚盤胞まで発生することを確認しておく。

6. 精子の凍結保存

胚凍結と並んでマウスの系統保存に用いられるのが精子凍結である。以前はC57BL/6背景の精子は凍結に弱く実用的ではなかったが、凍結技術自体の改良に加え、凍結精子を用いたIVFの改良により実用レベルになった。精子凍結およびIVFは熊本大学CARDの方法が優れており、必要な試薬は九動株式会社から購入することが可能である。

マウス精子の凍結保存は発生工学施設でなくても実施可能であり、一般の研究者にもぜひ挑戦していただきたい。精子凍結をマスターしておけば、大切な系統が絶えてしまいそうなおき、オスの精巢上部尾部を摘出してそこから採精した精子を凍結保存することで系統回復の望みを残すことができるし、他機関の研究者からマウス系統分与のリクエストがあったときに凍結精子を輸送することで迅速に対応できる。精巢上部尾部の摘出方法や精子凍結の手順は後述する熊本大学CARDのウェブサイトですく詳しく解説されているのでそちらを参照されたい。

7. 精巢上部尾部および胚の冷蔵輸送

他機関の研究者からマウス系統分与のリクエストがあったとき、生体での輸送は費用が高額であるうえに、輸送中のマウスの逃亡や死亡のリスクがある。また微生物学的統御の観点から生体での搬入が拒否されることもある。凍結胚や凍結精子での輸送によりこれらの問題の大半は解決するが、輸送にはドライシッパーを用いるため、その返却を考えると往復分の輸送費がかかってしまうところが難点である。この問題を解決したのが熊本大学CARDが開発した精巢上部尾部の冷蔵輸送法である^[7]。この方法では精巢上部尾部をクール宅急便で輸送することができるので大変割安である。冷蔵輸送された精巢上部尾部から精子を採取することで最大72時間はIVFが可能である。精子の前培養にはFERTIUP[®]・精子前培養培地を使用し、IVFにはCARD MEDIUM[®]高性能体外受精用培地を使用することで十分な数の受精卵を得ることができる。どちらの試薬も九動株式会社から入手することができる。冷蔵輸送は近距離であれば研究者自らがアイスボックス中で保冷しながら輸送することもできるが、長距離であればクール宅急便を利用する。必要な物品一式はCARD冷蔵輸送キットとして九動株式会社から市販されているので簡単に揃えることができる。冷蔵輸送のメリットは、一般的なクール宅急便で良いため輸送費が割安であること、またマウスに輸送ストレスを与えないということに加え、送り手側は

精巢上体尾部を摘出するだけでよく、発生工学技術を有していない施設からでも輸送可能であることである。デメリットとしては、冷蔵精子のIVFは系統によっては受精率が低く、十分な数の受精卵が得られない可能性があることである。こういった問題が懸念される時は2細胞期胚の冷蔵輸送を検討する^[8]。2細胞期胚もCARD冷蔵輸送キットを使用することでクール宅急便で冷蔵輸送できる。

8. トリプル CRISPR

遺伝子改変マウスの作製は発生工学の基盤をなす技術の一つであるが、近年のゲノム編集技術とりわけCRISPR/Cas9システムの普及により胚性幹細胞(ES細胞)での遺伝子組換えを行うことなく遺伝子改変マウスを作製できるようになった。CRISPR/Cas9システムはガイドRNA(gRNA)とCas9ヌクレアーゼの複合体がgRNAと相同なゲノム配列に結合してDNAを二本鎖切断し、その切断部位が修復される際に生じる欠失・挿入により変異を生じさせる^[9]。大変便利な方法であるが、従来のCRISPR/Cas9によるゲノム編集効率は良くても60~80%程度であり改良の余地が残されていた。理研生命システム研究センターの砂川らは、コンピューターモデルにより一つの標的配列に対するgRNAを高濃度で作用させるより、一つの遺伝子について異なる複数のgRNAを作用させるほうがゲノム編集効率の高いことを見出した。実際、一つの遺伝子に対して3種類のgRNAを同時に作用させると90%以上の効率でノックアウトマウスを作製できることが分かり、これをトリプルCRISPR法と命名した^[10]。2種類のgRNAを作用させる従来法の場合、ホモ個体を得るにはインジェクションを行った胚由来のマウス(F0世代マウス)を数回交配させる必要があり、インジェクションから解析まで半年以上の時間を要していたが、トリプルCRISPR法はF0世代で解析できるので圧倒的に早い。また、このノックアウト効率の高さのおかげで2つの遺伝子を同時にノックアウトする場合でも、計算上では80%以上の効率で作製できると期待される。大変ありがたいことに、この高効率なトリプルCRISPR法で使用するgRNAはマウス全遺伝子に対してデザインされており、その配列をウェブサイト(<http://crispr.riken.jp/>)で検索することができる。トリプルCRISPRは技術的には既存のCRISPR/Cas9の延長線上にあり目新しさはないが、変異体解析に要する時間を圧倒的に短縮したことのインパクトは大きく、今後のマウス変異体作製のスタンダードになりうる方法だと思われる。

9. 終わりに

日本のマウス発生工学技術はマウスのバイオリソース拠点である熊本大学CARDと理研BRCが中心となって精力的に開発が進められてきた。彼らの素晴らしい点は技術開発を行うだけでなく、それを普及させるための技術研修を行っているところである。新技術を導入したいが壁を感じてなかなか手が出せないでいるようなら、

ぜひ技術研修に参加することをお勧めする。すでに発生工学技術をお持ちの方であれば、熊本大学CARDのウェブサイト“CARDマウス生殖工学技術マニュアル”(<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/manual/index.html>)を参考にするとよい。非常に分かりやすいイラストや動画と簡潔な説明のおかげで難なく新技術をマスターすることができるだろう。この秀逸なマニュアルに加え、熊本大学CARDが開発した発生工学試薬は九動株式会社あるいはアーク・リソース株式会社から市販されているので、これを利用することで容易に新技術を導入できる。

本稿で発生工学技術の最新技術をまとめてみて、技術の完成度の高さに改めて目を見張る思いであった。動物実験は3Rの原則に則って実施されなければならないが、発生工学の新技術は3RのうちのRefinement(改善)にあたるし、これによって使用動物数のReduction(削減)を実現している。Replacement(代替)を進めるのは難しいと思っているのは古い世代の悲しい性で、新しい人たちはコンピューターモデルでトリプルCRISPRを開発して世界をリードする研究に邁進している。各研究機関の実験動物施設の技術者はぜひ貪欲に新技術に挑戦し、その恩恵を利用者に還元してほしい。本稿では7つの新技術を紹介したが、紙面の制約の関係で紹介できなかった新技術がほかにもまだまだたくさんある。発生工学技術の発展にたゆまぬ努力を続けているすべての研究者に敬意を表したい。

謝辞

素敵なマウスのイラストを作成してくださった理研生命機能科学研究センターの高瀬比菜子研究員と、本稿を通読し有益なアドバイスをくださった東京医科歯科大学疾患モデル動物解析学分野の鈴木仁美助教に感謝申し上げます。

参考文献

- 1 Takeo T and Nakagata N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS one* 10: e0128330. 2015.
- 2 Takeo T and Nakagata N. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. *Theriogenology* 86: 1341-1346. 2016.
- 3 Hasegawa A, Mochida A, Inoue H, *et al.* High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. *Biol reprod* 94: 21. 2016.
- 4 Hasegawa A, Mochida A, Ogonuki N, *et al.* Efficient and scheduled production of pseudopregnant female mice for embryo transfer by estrous cycle synchronization. *J reprod dev* 63:

- 539-545. 2017.
- 5 Nakao K, Nakagata N, and Katsuki M. Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim* 46: 231-234. 1997.
 - 6 Mochida K, Hasegawa A, Li MW, *et al.* High osmolality vitrification: a new method for the simple and temperature-permissive cryopreservation of mouse embryos. *PloS one* 8: e49316. 2013.
 - 7 Takeo T, Tsutsumi A, Omaru T, *et al.* Establishment of a transport system for mouse epididymal sperm at refrigerated temperatures. *Cryobiology* 65: 163-168. 2012.
 - 8 Takeo T, Kaneko T, Haruguchi Y, *et al.* Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology* 58: 196-202. 2009.
 - 9 山本 卓. ゲノム編集入門: ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9. 裳華房 2016.
 - 10 Sunagawa GA, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, *et al.* Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene. *Cell reports* 14: 662-677. 2016.

Technological innovation in mouse developmental engineering

Yoshikazu Hirate

Center for Experimental Animals, Tokyo Medical and Dental University

Abstract

The mouse is a classical and valuable laboratory animal. Certainly, mice are used continuously as a representative mammalian model organism in various fields of medical research. In parallel to the history of mice as laboratory animals, developmental engineering techniques have progressed significantly and have further supported their usefulness. Recently, developmental engineering supported an advancement in genome editing techniques. In this review, I describe the recent progress made in the developmental engineering of mice. The techniques I have selected are ultra-superovulation, synchronization of the estrus cycle, cryopreservation of embryos and spermatozoa, transportation of cauda epididymis and 2-cell embryos at a cold temperature (4-8 °C), and triple CRISPR. These innovative techniques promote the production of genetically modified mice, improve the reliability of freezing stocks of mice strains, and increase transportation options. These techniques are highly sophisticated, but easier to conduct than ever before. Technicians engaged in developmental engineering would benefit from learning these modern techniques, as they would give benefit to the researchers in their institution. These modern techniques push mouse research to a higher level.

Keywords : ultra-superovulation, synchronization of estrus cycle, cryopreservation, transportation at a cold temperature; triple CRISPR