

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

疾患関連遺伝子の機能解明のための疾患モデル動物資源の開発と

高度化に関する総合的研究

課題番号： H18-ゲノム-指定-005

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：松田潤一郎

(独立行政法人医薬基盤研究所)

平成18年3月

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

疾患関連遺伝子の機能解明のための疾患モデル動物資源の開発と高度化に関する
総合的研究

主任研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

研究要旨

本研究では、ヒトゲノム研究用資源としての疾患モデル動物の系統維持、胚・配偶子等の保存、供給、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行い、次のような成果を得、疾患モデル動物バンクの基盤整備が進んだ。

(1) 疾患モデル動物の維持管理、胚・配偶子等の保存、供給に関しては、①疾患モデルマウスやスナネズミなどの特殊実験動物について、効率良い繁殖維持法の改良、開発を行うとともに、マウスの体外受精能に関与する蛋白質を同定した。医薬基盤研究所において疾患モデル動物バンクを構築し、本格的な運用を開始した。②胚凍結保存法の改良を目指し、マウス胚における耐凍剤透過性チャンネルの発現を解明した。③凍結マウス精子のドライアイスによる簡便な輸送法開発を行った。④幼若ラットからの効率的採卵法を開発した。⑤採取する卵子の高品質化を目指して品質（発生能）に影響を与える分子（遺伝子・蛋白質・microRNA）の探索を行った。⑥近交系マウス卵子のガラス化保存の実用化に成功し、マウス体細胞クローンの遺伝子発現異常を解明するとともに、マウス新生仔卵巣から多数の発育期卵子を得、体外発育に成功した。⑦X-GFP マウスを用いることで容易に雌雄キメラマウスを作製することができ、さらに顕微授精の応用することで相同組換えマウスの効率的作製法開発が進んだ。(2) 遺伝学的及び微生物学的品質管理については、①新たな霊長類の実験動物としてのコモンマーモセットの遺伝的マーカーとして、酵素・蛋白質の遺伝的多型を明らかにした。②リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）汚染検査をより確実にを行うための、同居マウスからの汚染検出条件を明らかにした。

分担研究者

葛西孫三郎	高知大学農学部教授
中瀧直己	熊本大学動物資源開発研究センター教授
横山峯介	新潟大学脳研究所動物資源開発支援研究部門教授
鈴木治	独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部主任研究員
小倉淳郎	理化学研究所バイオリソースセンター室長
岡部勝	大阪大学微生物病研究所教授
加藤秀樹	浜松医科大学医学部附属動物実験施設助教授

研究協力者

滝本一広	国立感染症研究所動物管理室研究員
------	------------------

限度がある以上、ヒトへの応用のために実験動物が重要となる。なかでもヒトの病気のモデルである疾患モデル動物を用いることにより、個体での病気の発症機構の解明や、先進的な治療法、治療薬の開発研究が可能となる。一方遺伝子改変や網羅的な変異動物作製・解析が行われ、ますます多くの疾患モデル動物が開発されつつある。このようにヒトゲノム研究にとって貴重な疾患モデル動物を質の高い研究資源として確保し、研究者に供給する体制を長期的安定的に整備することは、ゲノム医学・創薬の発展に大いに寄与することが期待され、我が国として戦略的に取り組む必要がある。

そこで本研究では、疾患モデル動物がゲノム医学、ゲノム創薬などの研究にスムーズに有効に利用されるための疾患モデル実験動物研究資源の開発・高度化に向け、疾患モデル動物の系統維持、胚・配偶子等の保存、供給、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行う。これらにより、疾患モデル動物を用いたヒトゲノム研究、すなわちヒト疾患研究が飛躍的に進み、治療法、予防法、治療薬などの開発に結びつき、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

A. 研究目的

全ヒトゲノム塩基配列が解明され、ヒトゲノム情報に基づいて、病気を解明し、予防し、先進的な治療法を開発し、さらに画期的な治療薬を開発するなどのゲノム医学、ゲノム創薬が大いに期待されている。病態や病因の解析、予防法、治療法の開発には、個体レベルでの研究が必須であり、ヒトを用いた実験的研究に制約・

B. 研究方法

1) 疾患モデル動物の繁殖維持法の開発と疾患

モデル動物バンクの構築：

疾患モデル動物の系統維持法の改良として、傾斜飼育法を疾患モデルマウスに応用するとともに、スナネズミ 3 系統、マストミス 5 系統、ハムスター1 系統については繁殖特性に基づいた飼育法を工夫して継代維持した。受精卵・胚の作出法としての安定したマウス体外受精系の開発を目指し 4 系統のマウスについて精子のプロテオーム解析を行った。さらに高品質の疾患モデル動物が迅速に安定供給されるための疾患モデル動物バンクシステムの構築を目指した。

2) 耐凍剤透過性チャンネルのマウス胚での発現：

細胞膜の水透過性と耐凍剤透過性は、胚の耐凍性や凍結保存法に大きな影響を与える。耐凍剤透過性チャンネルであるアクアポリン 3 と尿素輸送体が、マウス桑実胚における耐凍剤透過にどの程度関与しているか調べた。方法としてはマウス 1 細胞期胚にアクアポリン 3 や尿素輸送体の double strand RNA を注入したのち、桑実期まで発育させて、その発現を抑制した。そして、耐凍剤透過性が低下するかどうかを調べた。また、耐凍剤透過性に対する尿素輸送体阻害剤の効果も調べた。

3) グローバルな凍結マウス精子の輸送に関する研究：

英国の MRC と CARD との間で遺伝子改変マウスの代表的なバックグラウンドの系統である C57BL/6J の凍結精子の授受を行い、お互いの施設に輸送された凍結精子を融解、体外受精により得られた胚を移植することにより、産子の作出が可能か否かについて検討を行った。実験には、C57BL/6J マウスの精巣上部尾部精子を用い、中瀉法により、精子の凍結保存を行った。続いて、凍結精子をドライアイス詰めた発泡スチロール箱にパッキングし、輸送を行った。授受した凍結精子は各施設で融解後、同系統の卵子を用いて体外受精を行い、得られた胚を受容雌の卵管へ移植し、産子への発生について検討した。

4) ラットの系統保存を目的とした生殖工学技術の開発・改良：

生殖工学技術を応用した効率的なラットの系統保存システムを確立するための基礎的データの収集を目的に、(1) 幼若個体からの効率的な採卵方法 (2) 採取した受精卵の正常性 (3) 近交系ラットから受精卵を得る場合の系統差について検討した。方法としては(1) 4・5・6 週齢の幼若 Wistar 系メスラットに 48 時間間隔で 50-350iu/kg(B.W.) の各種濃度の PMSG と 75iu/kg(B.W.) の hCG を腹腔内投与した。hCG 投与 26 時間後、卵管膨大部に存在する未受精卵を実体顕微鏡下にカウントした。対照として 12 週齢の成熟メスに同様のホルモン処置を行い比較した。(2) 過排卵処理した幼若個体を成熟

オスと交配して得た受精卵を培養し、胚盤胞への発生を観察した。(3) 近交系 2 系統 (SHR, LEW) の成熟メスについて、性周期に合わせたホルモン処理を行い、排卵数および受精率を比較した。

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発：

卵巣内には多量の卵子が存在する。この卵巣内卵子から高品質な (= 発生能が高い) 成熟卵子を効率良く得る方法が開発できれば、系統保存や生殖工学技術の開発・利用に大いに役立つものと考えられる。そこで幼若マウスの初回卵胞発育由来体外成熟卵子の発生能の差 (既に確認済み) を元に、卵巣レベル、卵子レベルの microRNA、mRNA、蛋白質の組成・量の関係をアレイ等で調べることによって発生能に関与する分子の探索を行った。実験方法としては、幼若マウスの初回卵胞発育時期の卵胞から卵子を採取し、体外成熟培養にて成熟卵子 (卵核法崩壊卵子) を得た。17 日齢由来卵子 (低発生能) と 24 日齢由来卵子 (高発生能) の mRNA をオリゴ DNA アレイにて比較した。蛋白質については 17 日齢から 25 日齢の 9 つの日齢由来の卵子を二次元電気泳動によりプロファイリングした。microRNA についても 17 日齢と 24 日齢の卵巣を用いたアレイ解析と 21 日齢由来卵子の microRNA クローニングを試みた。

6) 実験動物の系統保存および開発のための新規生殖工学技術の開発：

顕微授精技術・核移植クローン技術や胚・精子凍結技術などのマウスの新規生殖工学技術は、基礎細胞生物学に貴重な情報をもたらすのみならず、品種改良、遺伝子保存、再生医療実験モデルとしての応用などの期待も高まっている。今年度は特に 1) マウス卵子のガラス化凍結保存、2) 核移植クローン胚の技術開発、3) 卵子胎外発育系の開発を行った。方法としては、卵子ガラス化凍結保存は、成熟マウスより採取した MII 卵子を少量のエチレングリコールを含むガラス化液とともに Cryotop へ導入し、液体窒素で凍結・保存した。マウス核移植クローンは、Wakayama らの方法により実施し、2 細胞期胚より常法により cDNA を合成し、遺伝子発現の定量解析を行った。卵子の体外発育は、成長因子を含む培養液中で行った。

7) 相同組換えマウスの効率的作製のための生殖細胞保存・人工授精法の開発：

遺伝子相同組換えマウス作製における長期にわたる緻密かつ継続した作業を生殖細胞の凍結保存と人工授精を組み合わせることにより、簡便化および短縮化できる系をつくり、遺伝子改変動物の遺伝子資源の開発に寄与することを目的とした。雄の雌雄キメラでは雌性由来の細胞は精子に分化できないことから、雌性の胚に雄

性の ES 細胞を注入して作製した雄のキメラから生まれる仔は 100% ES 細胞由来であると予想される。そこで、雌雄胚選別法を用いて、雌性の胚に XY の核型を有する雄性の ES 細胞をインジェクションして ES キメラマウスを作製し、常に 100%の germline transmission が得られるか否かを検討した。

8) 遺伝的モニタリング-コモンマーモセットの酵素・タンパク遺伝的多型に関する研究:

酵素やタンパクの遺伝的多型は、実験動物の集団(系統)維持や個体識別において有用である。今回、血液のみをサンプルとして酵素、タンパクの遺伝的多型の検索を行った。導入経路が異なる 5 集団から無作為に選んだ 24 頭のコモンマーモセットを使用した。採血後血漿を分離し、血球洗浄を行った後 3 量の蒸留水(DW)で赤血球溶血液を調製した。セルロースアセテート膜(CA 膜)、等電点ゲル(IEF)およびポリアクリルアミドゲル(PAG)を用いて電気泳動を行い、各種酵素、タンパク染色を行った。

9) 微生物学的モニタリング-免疫寛容マウスにおける LCMV 汚染検査条件の検討:

マウスが新生児期あるいは胎内でリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に感染すると免疫寛容となるため、抗体検査では検出されにくく、適切な条件での検査が必要である。今回の研究では、免疫寛容マウスを作製し、その親マウスおよび同居成熟マウスとともに ELISA による抗体検出および RT-PCR によるウイルス遺伝子検出を行い、免疫寛容マウスの LCMV 汚染摘発に適切な条件を検討した。新生仔期に LCMV を接種した C3H/He に親マウスおよび成熟マウス(6 週齢)2 匹を同居させ、経時的に各臓器、血清および糞尿を採材した。ELISA により LCMV 特異抗体産生の推移および特異抗体の抗 IgG サブクラス抗体に対する反応性を調べ、RT-PCR によりウイルス遺伝子の検出を行い、免疫寛容マウスの LCMV 汚染摘発に適切な条件を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物については、各施設に於ける実験動物委員会等の承認を得、動物愛護の精神に従い苦痛の軽減、使用動物数の削減などに配慮し適切な取り扱いを行った。

C. D. 研究結果と考察

1) 疾患モデル動物の繁殖維持法の開発と疾患モデル動物バンクの構築:

4 系統の多様な疾患を示すモデルマウスについて傾斜飼育法を応用したところ、離乳率において明らかな改善が認められ、本法は疾患モデルマウスの簡便で効率良い飼育法として幅広く応用が可能なが判明した。スナネズミ、マストミスおよびハムスターなどの特殊実験動物は一般に繁殖困難なことが多く、動物種や系統ご

との繁殖特性に応じた飼育管理が必要であり、交配ペアの選抜を工夫し、出産後に雌親を雄親と分離したりするなどきめ細かな飼育管理に努め、継代維持を進めることが出来た。今後、発生工学の応用などを含め、さらに安定した飼育繁殖管理法の開発が望まれる。実験動物研究資源の基盤整備に関する研究成果の集大成として、今年度、医薬基盤研究所において疾患モデル動物バンクを正式に発足させた。事業内容は、①マウス系統の有償分譲、②凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス、③保護預かりのためのサポートサービス、④有用マウス資源の収集の 4 つであり、疾患研究、創薬研究などに役立つ動物資源バンクとしての発展が期待される。

2) 耐凍剤透過性チャンネルのマウス胚での発現:

マウス桑実胚において、アクアポリン 3 は、グリセロールとエチレングリコールの透過に深く関与していることが分かった。また、尿素輸送体は、グリセロール、アセトアミドおよび DMSO の透過に関与していることが示唆された。

3) グローバルな凍結マウス精子の輸送に関する研究:

各施設で融解した凍結精子を用いて体外受精を行った結果、23-25%の受精率が得られた。また、2細胞期胚へ発生した胚の移植により、移植胚の50-53%が産子へ発生した。本実験結果より、ドライアイス詰めにした発泡スチロール箱での凍結マウス精子のグローバルな輸送が可能であることが明らかとなった。

4) ラットの系統保存を目的とした生殖工学技術の開発・改良:

Wistar 系幼若ラットにホルモン処理を行った結果、成熟個体を用いた場合と同等、あるいはそれ以上の採卵数が得られた。さらに培養系を用いた発生能の検討においても高率に胚盤胞へ発生することが明らかとなり、幼若個体を用いることの有用性が確認された。SHR 系ラットはホルモン処理による過排卵誘起が有効であったが、LEW 系では無効であった。近交系ではホルモン感受性に系統差が存在することが示唆された。

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発:

オリゴ DNA アレイにより mRNA の変化のリストを作成した。蛋白質の二次元プロファイリングにより、全期間で強発現している蛋白質の同定を行った。一方、差次的発現蛋白質については量的問題から同定が出来なかった。microRNA については、まず卵巣レベルで関与の可能性を確認し、そのうえで卵子 microRNA のクローニングを行い、新規に 10 種類の microRNA が得られた。候補分子が得られたものの、発生能との関連を検証するにはさらに検討が必要と思われる。

6) 実験動物の系統保存および開発のための新

規生殖工学技術の開発：

C57BL/6、C3H/He、BALB/c、DBA/2 のすべての近交系マウスの卵子のガラス化保存に成功し、顕微授精後に産子を得ることができた。核移植クローンでは、2細胞期ですべての体細胞ドナー由来胚で共通して低下する eIF-1A (initiation factor) の上流にある転写因子を明らかにし、統計学的な解析により、これらの発現異常が、総体的にクローン胚の異常に繋がることを明らかにした。また、マウス新生仔卵巣から多数の発育期卵子を効率的に誘出し、顆粒膜細胞非依存的に液性因子のみで発育させることに成功した。

7) 相同組換えマウスの効率的作製のための生殖細胞保存・人工授精法の開発：

X-GFP マウスを用いることで、着床前の胚で雌雄の識別が可能となり、容易に雌雄キメラマウスを作製する系が確立できた。雌胚を用いて作製した ES キメラマウスの雄からは ES 細胞由来のアレルを持つ仔のみ誕生することが確かめられた。また、顕微授精を用いれば、未熟なキメラや不妊キメラからも ES 細胞由来のアレルを持つ産子を得ることができ、ノックアウトマウス作製の効率化の可能性を示した。

8) 遺伝的モニタリング-コモンマーモセットの酵素・タンパク遺伝的多型に関する研究：

血液のみをサンプルに用いた場合、調べられる項目も限られてくる。しかし幸運にもこの研究で GPI、TRF および Es に遺伝的多型が観察された。これらは集団や個体の識別に有用である。なお、今回は明確な差異の見られなかった Hb、EsD、PGM については、明瞭なバンドが観察できているので、今後多型が見出されることを期待したい。

9) 微生物学的モニタリング-免疫寛容マウスにおける LCMV 汚染検査条件の検討：

新生仔期に LCMV を感染させたが、免疫寛容にはならなかった。しかし、持続感染をしており、各臓器・糞尿・血清でウイルス遺伝子が検出された。持続感染マウスの親では 6 週目に抗 LCMV 抗体が検出されたが、同居マウスでは 8 週目でも抗 LCMV 抗体が検出されない場合があった。RT-PCR では、全同居マウスで 8 週目にウイルス遺伝子が検出された。抗 LCMV 抗体は、産生される IgG の量に関わらず LCM-NP 抗原に強い反応を示し、親および同居マウスでは抗 IgG2a 抗体を用いた ELISA で高い OD 値を示した。

E. 結論

本研究では、ヒトゲノム研究用資源としての疾患モデル動物の系統維持、胚・配偶子等の保存、供給、遺伝学的及び微生物学的品質管理などに関する総合的研究を行い、次のような成果を得、疾患モデル動物バンクの基盤整備が進ん

だ。

1) 疾患モデル動物の繁殖維持法の開発と疾患モデル動物バンクの構築：

疾患モデルマウスの繁殖維持法の開発を行い、傾斜飼育法が簡便で効率良い飼育繁殖法であることを明らかにするとともに、スナネズミなどの特殊動物の飼育管理技術を発展させた。また、体外受精技術の改良を目指し、マウス精子のプロテオーム解析を行い体外受精能に関与すると考えられる蛋白質を同定した。これまでの実験動物研究資源の基盤整備に関する研究の集大成として、医薬基盤研究所において疾患モデル動物バンクを構築し、本格的な運用を開始した。これにより疾患モデル動物を利用した疾患研究、創薬研究が飛躍的に進み、治療法・治療薬などの開発などが推進され、国民の健康・福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

2) 耐凍剤透過性チャンネルのマウス胚での発現：

桑実期以降のマウス胚では、透過特性の異なる複数の耐凍剤透過性チャンネルが耐凍剤を効率的に透過していることが明らかとなった。したがって、胚の凍結保存法は、耐凍剤透過性チャンネルの発現量と透過特性を考慮してデザインする必要があると考えられた。

3) グローバルな凍結マウス精子の輸送に関する研究：

ドライアイス詰めにした発泡スチロール箱にパッキングすることにより、凍結 C57BL/6J マウス精子のグローバルな輸送が可能となった。本法は、従来の輸送法に比べ、大幅な輸送コストの削減につながることから、極めて画期的な輸送法と考えられた。

4) ラットの系統保存を目的とした生殖工学技術の開発・改良：

週齢に応じた適切なホルモン投与量を選択することによって、幼若ラットからの効率的採卵が可能であることが確認された。採取した受精卵を培養した結果、正常な発生能を有することが示唆された。

5) 卵巣内卵子の有効活用による新規生殖工学技術の開発：

本研究では採取する卵子の高品質化を目指して品質（発生能）に影響を与える分子（遺伝子・蛋白質・microRNA）の探索を行い、差次的に発現される遺伝子のリストが得られた。蛋白質についても強発現分子のリストを得たが、量的問題から差次的蛋白質については同定できなかった。卵子に存在する microRNA も同定した。ただし、これら情報の検証・解釈にはさらなる研究が必要と思われる。

6) 実験動物の系統保存および開発のための新規生殖工学技術の開発：

近交系マウス卵子のガラス化保存の実用化に

成功した。マウス体細胞クローンのゲノム初期化異常に最も近接した転写因子遺伝子発現異常を捉えた。マウス新生仔卵巣から多数の発育期卵子を効率的に誘出し、顆粒膜細胞非依存的に液性因子のみで発育させることに成功した。これらの成果は今後の実験動物の発生工学技術の基礎として、バンク事業の安定的および発展的運営に大きな基盤技術になると期待される。

7) 相同組換えマウスの効率的作製のための生殖細胞保存・人工授精法の開発：

①X-GFP マウスを用いると容易に雌雄キメラマウスを作製することができた。②雌胚と ES 細胞からなるキメラマウスの雄からは ES 細胞由来のアレルを持つ仔だけが誕生した。③雌胚を用いて作製した ES キメラマウスは不妊になることがあったが、顕微授精によって、germline transmission をレスキューできる可能性を示した。

8) 遺伝的モニタリング-コモンマーモセットの酵素・タンパク遺伝的多型に関する研究：

財団法人実験動物中央研究所のコモンマーモセットの遺伝的マーカーとして、酵素・タンパクの遺伝的多型に関する基礎的研究を行った結果、GPI, TRF1 および Es に遺伝的多型が確認された。

9) 微生物学的モニタリング-免疫寛容マウスにおける LCMV 汚染検査条件の検討：

LCMV 汚染の可能性のあるマウスと同居し、ELISA により LCMV 汚染の有無を調べる場合には、複数のマウスを最低 6 週間同居させる必要があることが示唆された。また、8 週間同居することにより RT-PCR での検出が可能になるので、抗体検査と合わせて実施することにより、より確実な検査が可能になると思われる。自然感染の場合、LCMV に対する特異抗体は IgG2a に最も多く、ELISA の二次抗体として抗 IgG2a も有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

別掲。

H. 知的所有権の取得状況

(特許出願) 鈴木 治・岩田祐子、「筋障害の簡便検査方法および筋障害検査用キット」、特願 2006-114385 (2006 年 4 月 18 日出願)、(独) 医薬基盤研究所の TLO 機関であるヒューマンサイエンス財団に譲渡の上、申請中。

疾患モデル動物資源の開発と高度化に関する研究

主任研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

研究要旨

疾患モデルマウスの繁殖維持法の開発を行い、傾斜飼育法が簡便で効率良い飼育繁殖法であることを明らかにするとともに、スナネズミなどの特殊動物の飼育管理技術を発展させた。また、体外受精技術の改良を目指し、マウス精子のプロテオーム解析を行い体外受精能に関与すると考えられる蛋白質を同定した。これまでの実験動物研究資源の基盤整備に関する研究の集大成として、医薬基盤研究所において疾患モデル動物バンクを構築し、本格的な運用を開始した。これにより疾患モデル動物を利用した疾患研究、創薬研究が飛躍的に進み、治療法・治療薬などの開発などが推進され、国民の健康・福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

A. 研究目的

ゲノムサイエンスの急激な発展により、ゲノム医学、ゲノム創薬に対する期待がますます高まっている。ヒトゲノム研究を推進するためには個体レベルでの研究が必須であり、とくにヒトゲノム情報に基づいて作製されたヒト疾患モデル動物などを用いた研究が重要である。貴重な疾患モデル動物を質の高い研究資源として開発し、研究者に供給する体制を長期的安定的に整備することは、ヒトゲノム研究の推進のために我が国として戦略的に取り組む必要がある。そこで本研究では、疾患モデル動物がゲノム医学、ゲノム創薬などの研究にスムーズに有効に利用されるために、疾患モデル動物の系統維持法の改良を行うとともに、受精卵・胚の作出法としての安定したマウス体外受精系の開発を目指し精子のプロテオーム解析を行った。さらに高品質の疾患モデル動物が迅速に安定供給されるための疾患モデル動物バンクシステムの構築を目指した。これらにより、疾患モデル動物を用いたヒトゲノム研究、すなわちヒト疾患研究が飛躍的に進み、治療法、予防法、治療薬などの開発に結びつき、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

B. 研究方法

1) 各種疾患モデル動物の系統維持法の改良

疾患モデルマウスのうち繁殖が困難な4系統、すなわち4C30（拡張型心筋症）、BK0（GM1 ガングリオシドーシス）、EL（てんかん）、ICGN（ネフローゼ）について、妊娠確認後から分娩3～5日後まで飼育ケージを約30度傾斜させて飼育する傾斜飼育法を適応して

飼育法の改良を試みた。疾患モデルとして多用途で用いられている各種実験動物としてスナネズミ3系統（MGB、MGW、MGR）、マストミス5系統（MST、MCC、MWC、RI-7、RI-M）、ハムスター1系統（HAW）について、繁殖学的特性に基づき飼育方法を工夫し、継代維持を行った。

2) マウス精子のプロテオーム解析

マウスの体外受精の成績には大きな系統差が認められており、動物資源として受精卵や胚を得る場合に問題となっている。そこでマウス体外受精系の改良を目指して受精能力に関与するマウス精子蛋白質の検索を行った。体外受精能の異なる3系統（129x1/SvJ、C57BL/6J、DBA/2J）のマウスの精巣上体精子から蛋白質を抽出し、2次元電気泳動を行い、その泳動像を比較し受精能力と含有量が相関する蛋白質の検索を行った。泳動像上の特徴的なスポットはPeptide Mass Fingerprinting分析を行い蛋白質を同定した。

3) 疾患モデル動物バンクシステムの構築

ゲノム医学、ゲノム創薬などの研究に高品質の疾患モデル動物が迅速に安定的に供給されることを目指して、①マウス系統の有償分譲、②凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス、③保護預かりのためのサポートサービス、④有用マウス資源の収集の4つの事業内容で疾患モデル動物バンクシステムの構築を医薬基盤研究所において行った。そのために各種規定・依頼書を整備するとともに、依頼管理・資源管理データベースを構築し、最新の資源情報をホームページにて公開した。

（倫理面への配慮）

実験動物については、医薬基盤研究所実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に従

い苦痛の軽減、使用動物数の削減などに配慮し適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

1) 通常の飼育方法では繁殖の困難な疾患モデルマウス 4 系統すなわち 4C30、BK0、EL、ICGN について、初産から 3 産次までの離乳率について通常飼育法と傾斜飼育法の比較を行ったところ、前者では 5~7 割程度の離乳率であったが、後者ではほぼ 9 割以上の離乳率を示し、明らかに繁殖効率が改善された。繁殖成績の悪い疾患モデル動物の飼育方法として、傾斜飼育法が繁殖率向上に有効であることが示された。てんかん抵抗性のスナネズミ MGR はとくに繁殖成績が悪い系統であるが、交配ペアを組むにあたって成熟個体を確認してから兄妹ペアを組むことで繁殖継代を進めることが出来た。スナネズミの他の 2 系統とマストミス 5 系統、ハムスター 1 系統については、一部の系統（マストミス MST、RI-7）で離乳率の低下が一時的に認められたが、出産後に雌雄を分離するなどの工夫により繁殖成績が向上し継代維持を進めることが出来た。

2) 体外受精能の異なる 3 系統のマウスの精子蛋白質の二次元電気泳動像を比較したところ、受精能と含有量が相関する蛋白質が 4 つ（PEBP1、PHGPx、PGK2、ENOA）同定された。中でも PEBP1（フォスファチジルエタノールアミン結合蛋白質 1）は、受精能獲得時に精子から脱落することが重要であり、その脱落の度合いに系統差があることから受精能の系統差の一因である可能性が示された。

3) 疾患モデル動物バンクとして次の事業を開始し、本格的なバンクシステムとして構築した。①マウス系統の有償分譲（凍結胚 50 個を融解し、仮雌親 2 匹に移植後、生まれた個体すべてを分譲）、②凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス（マウス系統の情報は非公開で資源を保管するサービス）、③保護預かりのためのサポートサービス：凍結胚・凍結精子作製および保護預かり資源からの生体作出サービス④有用マウス資源の収集。また最新の資源情報として疾患モデルマウスなど 22 系統の詳細情報をホームページ（<http://animal.nibio.go.jp/>）にて公開し、疾患別マウス一覧表、分譲までにかかる期間についても情報提供を行うなど、きめ細かな対応を行った。

D. 考察

1) 自然発症マウスや遺伝子改変疾患マウス

など多くの疾患モデルマウスが系統化され、医学研究や創薬研究に用いられているが、これらの系統の中には繁殖が困難なマウスも多い。今回、4 系統の多様な疾患を示すモデルマウスについて傾斜飼育法を応用したところ、離乳率において明らかな改善が認められ、本法は疾患モデルマウスの簡便で効率良い飼育法として幅広く応用が可能なが判明した。傾斜飼育法では哺乳親と産仔との物理的接触が密となり哺乳行動が容易であり、巣作りも行いやすくなるなどの理由で離乳率が向上したことが考えられた。スナネズミ、マストミスおよびハムスターなどの特殊実験動物は一般に繁殖困難なことが多く、動物種や系統ごとの繁殖特性に応じた飼育管理が必要であった。今回は、交配ペアの選抜を工夫し、出産後に雌親を雄親と分離したりするなどきめ細かな飼育管理に努め、継代維持を進めることが出来た。今後、さらに安定した飼育繁殖管理法の開発が望まれ、そのためには体外受精-胚移植などを始めとした生殖工学技術の応用も重要課題と考えられる。

2) 疾患モデル動物として重要なマウスは、体外受精系が利用可能であり繁殖補助技術として応用されたり、受精卵や胚の効率良い採取法として生物資源保存に利用されている。しかし、マウスの系統によって体外受精率にばらつきがあり、受精率の悪い系統があるなど大きな障害となっている。今回、体外受精能の系統差に関与すると考えられる 4 つの精子蛋白質が同定された。とくに PEBP1 は受精能獲得に関与する蛋白質と考えられ、受精能獲得時に精子から脱落し減少する度合いが大きいほど、受精能力の高い系統である可能性が示唆された。今後、これらの蛋白質を指標にしてマウス体外受精能の系統差をより詳細に明らかにするとともに、体外受精技術の改良への応用が期待される。

3) 医薬基盤研究所において本格的な疾患モデル動物バンクの構築を行った。このバンクは疾患研究や創薬研究に役立つ疾患モデル動物を中心に資源収集し、高品質の実験動物を関連研究者に安定的に供給し利用してもらうためのものであり、いままで私たちが行ってきた実験動物研究資源の基盤整備に関する研究成果の集大成である。今年度、疾患モデル動物バンクとして正式発足し、厚生労働省の実験動物研究資源バンクとしての基盤が構築された。今後、さらに疾患研究、創薬研究などに真に役立つ動物資源バンクとして発展させるために、とくに厚生労働省傘下のナショ

ナルセンターなどとの連携を深めるとともに、関連研究機関および企業などの利用者ニーズを把握し、貴重な資源の寄託や利用を広める必要があろう。

E. 結論

疾患モデルマウスの繁殖維持法の開発を行い、傾斜飼育法が簡便で効率良い飼育繁殖法であることを明らかにするとともに、スナネズミなどの特殊動物の飼育管理技術を発展させた。また、体外受精技術の改良を目指し、マウス精子のプロテオーム解析を行い体外受精能に関与すると考えられる蛋白質を同定した。これまでの実験動物研究資源の基盤整備に関する研究の集大成として、医薬基盤研究所において疾患モデル動物バンクを構築し、本格的な運用を開始した。これにより疾患モデル動物を利用した疾患研究、創薬研究が飛躍的に進み、治療法・治療薬などの開発などが推進され、国民の健康・福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y: Motor and Reflex Testing in GM1-Gangliosidosis Model Mice. *Brain Dev*, Volume 29, Issue 4, May 2007, Pages 210-216.
- (2) Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Oshima A. β -Galactosidase Deficiency (β -Galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. In *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. eds. Scriver et al. Part 16: LYSOSOMAL DISORDERS Chapter 151 pp.1-32. The McGraw-Hill Companies, 2006. http://genetics.accessmedicine.com/mmbid/public/co_contents/toc_part16.html
- (3) Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Analyses of the cDNA and genomic DNA sequences encoding the luteinizing hormone β -subunit precursor protein in the rabbit. *Gen Comp Endocrinol*. 2007 Feb;150(3):514-9.
- (4) Kawai Y, Hata T, Suzuki O, Matsuda J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. *J Reprod Dev*. 2006 Aug;52(4):561-8.
- (5) Cho A-R, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa

T, Kon Y, Asano A, Sasaki N, Aguil T. Deficiency of the tensin2 gene in the ICGN mouse, an animal model for congenital nephrotic syndrome. *Mammalian Genome*, 17(5):407-16, 2006.

- (6) Okada T, Ishii Y, Masujin K, Yasoshima A, Matsuda J, Ogura A, Nakayama H, Kunieda T, Doi K. The critical roles of serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (SGK3) in the hair follicle morphogenesis and homeostasis: the allelic difference provides novel insights into hair follicle biology. *Am J Pathol*, 168(4):1119-33, 2006.
 - (7) Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Medicine*, 12(4):466-472, 2006.
 - (8) 松田潤一郎：基盤研実験動物開発研究室の紹介－特に基盤研動物資源バンクについて－。関西実験動物研究会会報, 2006, 27:69-71.
 - (9) 岡田太郎, 舛甚賢太郎, 石井寿幸, 八十島昭, 松田潤一郎, 小倉淳郎, 中山裕之, 国枝哲夫, 土井邦雄「SGK3はマウス毛形成および毛周期の重要な制御因子である」、日本疾患モデル学会記録, 22:12-18, 2006.
 - (10) 鈴木義之, 一ノ宮悟史, 丸山貴美子, 戸田寛子, 渡辺浩史, 岩崎博之, 黒澤美枝子, 小川誠一郎, 飯田真己, 松田潤一郎, 「GM1ガングリオシドーシスモデルマウスを用いた新しい治療法の開発」、日本疾患モデル学会記録, 22:33-40, 2006.
- ##### 2. 学会発表
- (1) 高野 薫, 小浦美奈子, 野口洋子, 梶本健吾, 松田潤一郎, 「傾斜ケージによるマウス疾患モデル系統の繁殖成績の改善」、日本実験動物技術者協会関東支部懇話会 (2007年2月)
 - (2) 松田潤一郎, 「医薬基盤研究所実験動物資源バンクで維持している小型齧歯類－有用性と繁殖関連技術－」、宮崎大学フロンティア科学実験総合センターシンポジウムバイオリソースとしての小型哺乳類の可能性 (2006年11月)
 - (3) 小浦美奈子, 高野 薫, 野口洋子, 山田-内尾こずえ, 松田潤一郎, 鈴木 治, 「シリアンハムスターの卵巣移植による産仔の作出」、日本繁殖生物学会 (2006年9月)

- (4) 松田潤一郎、「基盤研実験動物開発研究室の紹介ー特に基盤研動物資源バンクについてー」、関西実験動物研究会(2006年6月)
- (5) 鈴木 治・小浦美奈子・高野 薫・野口洋子・山田-内尾こずえ・松田潤一郎、「心拡張を呈するシアル酸転移酵素多発現マウスの心臓糖蛋白質の解析」、日本実験動物学会(2006年5月)
- (6) 鈴木 治・小浦美奈子・高野 薫・野口洋子・山田-内尾こずえ・松田潤一郎、「心拡張を呈するシアル酸転移酵素多発現マウスの心臓糖蛋白質の解析」、日本実験動物学会(2006年5月)
- (7) 河合康洋・鈴木 治・松田潤一郎、「マウスの精子の細胞質小滴におけるユビキチンの発現」、日本実験動物学会(2006年5月)
- (8) 山田-内尾こずえ・小浦美奈子・高野 薫・野口洋子・國枝孝典・河合康洋・鈴木 治・松田潤一郎、「医学・創薬を支える疾患モデル動物バンクを目指して」、日本実験動物学会(2006年5月)
- (9) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. MicroRNA profiling of ovaries during the first wave of folliculogenesis in mice. ASCB (アメリカ細胞生物学会、2006年12月)
- (10) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence comparison of α - and β -subunit precursor proteins of luteinizing hormones in laboratory animals. SSR (アメリカ繁殖学会、2006年7月)
- (11) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Sequence comparison of α - and β -subunit precursor proteins of follicle-stimulating hormones in laboratory animals. ENDO (アメリカ内分泌学会、2006年6月)
- (12) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Tissue difference of protein sialylation in transgenic mice harboring Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3GalII) transgenes. EB2007(ASBMB: アメリカ生化学・分子生物学会、2006年4月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業「疾患研究のための実験動物研究資源の基盤整備に関する総合的研究」班研究事業）分担研究報告書

耐凍剤透過性チャンネルのマウス胚での発現
分担研究者 葛西孫三郎 高知大学農学部教授

研究要旨

細胞膜の水や耐凍剤に対する透過性は、胚の耐凍性や凍結保存法に大きな影響を与える。本研究では、マウス桑実胚をもちいて、耐凍剤透過の機構についてしらべた。Glycerol と ethylene glycol は、主に水・耐凍剤チャンネルであるアクアポリン3を介した促進拡散によって透過していると考えられた。acetamide と DMSO は、主にアクアポリン3以外の耐凍剤透過性チャンネルを介した促進拡散によって透過していると考えられた。一方、propylene glycol はリン脂質二重膜を介した単純拡散によって透過していると考えられた。また、glycerol、DMSO および acetamide の透過の一部には、耐凍剤透過性チャンネルの一つである尿素輸送体が関与していることが強く示唆された。卵子や胚の凍結保存法は、水や耐凍剤を透過するこれらのチャンネルの発現量とその透過特性を考慮して、デザインする必要があると考えられる。

A. 研究目的

遺伝的疾患モデル動物の保存には胚の凍結保存が非常に有効である。細胞膜の水透過性と耐凍剤透過性は、胚の耐凍性や凍結保存法に大きな影響を与える。マウスでは、桑実期以降の胚で水や耐凍剤に対する透過性が向上する。我々は、この時期に、水やグリセロールの透過の主要な透過経路が、リン脂質二重膜を介した単純拡散からチャンネルを介した促進拡散に転換することをすでに明らかにした。さらに、水・耐凍剤チャンネルであるアクアポリン3（以下 AQP3）がこれらの透過に関与していることを示唆した。しかしながら、他の耐凍剤の透過機構については明らかではない。また、AQP3 が glycerol の透過を実際にどの程度担っているかは、必ずしも明らかではない。そこで、AQP3 の発現を抑制した桑実胚を用いて、AQP3 が、桑実期のマウス胚における耐凍剤に対する透過に、どの程度関与しているか調べた。その結果、一部の耐凍剤の

透過に AQP3 以外の耐凍剤透過性チャンネルが関与していることが示唆されたことから、中性低分子透過性チャンネルである尿素輸送体（以下 UT）に着目し、マウス桑実胚の耐凍剤に対する透過性に UT が関与しているかどうかを調べた。

B. 研究方法

過排卵処理した ICR 系マウスの卵管から 1 細胞期胚を回収し、約 20 μ l のマウス AQP3 double strand RNA (以下 dsRNA) (1 μ l/ μ l) や様々なマウスの UT の dsRNA (1 μ l/ μ l) を注入した。そして、53-55 時間培養し、桑実期にまで発育した胚 (dsRNA 注入桑実胚) を実験に用いた。無処理で桑実期まで培養した胚 (体外培養桑実胚) と排卵卵子 (卵子) を対照として用いた。

卵子や桑実胚を 25°C の等張の PB1 液から 25°C の耐凍剤を含む様々な中性低分子を添加した PB1 液に浸し、その体積変化から、two parameter formalism を用いて、各溶

質に対する透過係数を算定した。一部の実験では、過排卵処理した ICR 系マウスの子宮から回収した桑実胚（体内桑実胚）と卵子について、25°C で溶質に対する透過性を測定したのち、15°C でも溶質に対する透過性を測定し、25°C と 15°C での透過係数から透過の温度依存性を示す Arrhenius 活性化エネルギーを算出した。

マウス胚における UT の mRNA の発現の有無を調べる実験では、過排卵処理した ICR 系マウスの卵管と子宮から回収した卵子、4細胞期胚（体内4細胞期胚）、8細胞期胚（体内8細胞期胚）および体内桑実胚を用い、それらを 0.1%PVA 添加 PBS で洗浄したのち、微量の同液と共に液体窒素で凍結した。そして、実験に用いるまで-80°C で保存した。

[実験1] AQP3 の発現を抑制したマウス桑実胚の耐凍剤透過性

卵子、体外培養桑実胚および AQP3dsRNA 注入桑実胚を 25°C の 10% (v/v) glycerol, 8% (v/v) ethylene glycol, 9.5% (v/v) DMSO, 1.5 M acetamide あるいは 10% (v/v) propylene glycol を添加した PB1 液に浸し、その体積変化から耐凍剤透過係数を算定した。耐凍剤を除去したのち、15°C で同様にして耐凍剤透過係数を算定し、各耐凍剤の透過の Arrhenius 活性化エネルギーを算出した。

[実験2] AQP3 の発現を抑制したマウス桑実胚の中性低分子に対する透過性

卵子および AQP3dsRNA 注入桑実胚を 25°C の 1.36 M urea, 1.75 M formamide, 1.75 M propionamide あるいは 1.5 M erythritol を添加した PB1 液に浸し、その体積変化から、UT が選択的に透過するこれらの中性低分子に対する透過性を調べた。

[実験3] マウスの体内桑実胚および AQP3 の発現を抑制したマウス桑実胚の耐凍剤透

過性に対する UT 阻害剤の影響

体内桑実胚および AQP3dsRNA 注入桑実胚を 25°C の 10% glycerol, 8% ethylene glycol, 9.5% DMSO, 1.5 M acetamide あるいは 10% propylene glycol を添加した PB1 液に浸し、その体積変化から耐凍剤透過係数を算定した。耐凍剤を除去した後、UT 阻害剤である phloretin (0.7 mM) で処理 (150 秒) し、同様にして耐凍剤透過係数を算定し、耐凍剤透過に対する UT 阻害剤の影響を調べた。

[実験4] マウス桑実胚における UT の mRNA の発現

これまでに明らかになっている 10 種の UT の mRNA が、マウス桑実胚で発現しているかどうかを調べるために、-80°C であらかじめ保存しておいた卵子、体内4細胞期胚、体内8細胞期胚および体内桑実胚を用いて RT-PCR を行い (nested PCR 法)、発現の有無を調べた。

[実験5] UT の発現を抑制したマウス桑実胚の耐凍剤透過性

マウス桑実胚で mRNA の発現が確認された UT が、桑実胚の耐凍剤透過に関与しているかどうかを調べた。すなわち、無処理桑実胚、UT-A2dsRNA 注入桑実胚、UT-A5dsRNA 注入桑実胚および UT-B1dsRNA 注入桑実胚を 25°C の 10% glycerol, 9.5% DMSO, あるいは 1.5 M acetamide を添加した PB1 液に浸し、その体積変化から 25°C での耐凍剤透過係数を算定した。UT の発現を抑制することによって、これらの耐凍剤に対する透過性が抑制されるかどうかを調べた。

(倫理面への配慮)

卵子や胚の回収は、マウスを頸椎脱臼あるいは炭酸ガス吸引により安楽死させてから行った。本研究は、高知大学農学部動物実験委員会より承認を受けている。組み換え DNA 実験については、高知大学遺伝子組

み換え実験安全委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

[実験 1] AQP3 の発現を抑制したマウス桑実胚の耐凍剤透過性

体内桑実胚の glycerol, ethylene glycol, acetamide および DMSO に対する透過性は卵子と比べてかなり高く、Arrhenius 活性化エネルギーは卵子と比べてかなり低かったことから、これらの耐凍剤は主にチャンネルを介した促進拡散によって透過していると推察された。一方、体内桑実胚の propylene glycol 透過性は低く、Arrhenius 活性化エネルギーは卵子と同様に高かったことから、リン脂質二重膜を介した単純拡散によって透過していると推察された。

AQP3dsRNA 注入桑実胚の glycerol 透過性と ethylene glycol 透過性は、いずれも体外培養桑実胚の透過性と比べてかなり低かったが、卵子の透過性より数十倍高かった。したがって、これらの物質の多くが AQP3 を介して透過しているが、一部は他のチャンネルを介して透過している可能性が示唆された。一方、AQP3dsRNA 注入桑実胚の acetamide と DMSO に対する透過性は、体外培養桑実胚と同様に高く、卵子の透過性よりかなり高かった。したがって、これらの物質は AQP3 以外のチャンネルを介して透過していることが強く示唆された。また、AQP3dsRNA 注入桑実胚の propylene glycol 透過性は、卵子の透過性よりはやや高かったものの、体外培養桑実胚と同様に低かった。したがって、propylene glycol は、Arrhenius 活性化エネルギーの値からも推察されたように、主にリン脂質二重膜を介して透過していると考えられた。

[実験 2] AQP3 の発現を抑制したマウス桑実胚の中性低分子に対する透過性

AQP3dsRNA 注入桑実胚は、卵子と比べ

て、UT が選択的に透過する中性低分子を効率よく透過した。したがって、UT 様の中性低分子透過性チャンネルが発現している可能性が強く示唆された。

[実験 3] マウスの体内桑実胚および AQP3 の発現を抑制したマウス桑実胚の耐凍剤透過性に対する UT 阻害剤の影響

phloretin は、体内桑実胚の glycerol 透過性と DMSO 透過性を有意に低下させた。phloretin は、AQP3dsRNA 注入桑実胚の glycerol 透過性と DMSO 透過性も有意に低下させた。したがって、桑実胚のチャンネルによる glycerol と DMSO の促進拡散に、UT が関与していることが示唆された。

[実験 4] マウス桑実胚における UT の mRNA の発現

マウス桑実胚で UT が発現している可能性を調べるために、UT の mRNA の有無を調べた。調べた 10 種の UT のうち、マウス桑実胚では UT-A1b, UT-A2b, UT-A5, UT-B1 の mRNA が検出された。したがって、これらの UT が、マウス桑実胚における glycerol, DMSO および acetamide の透過に関与している可能性が示唆された。

[実験 5] UT の発現を抑制したマウス桑実胚の耐凍剤透過性

UT-A2dsRNA 注入桑実胚は、体外培養桑実胚と比べて、glycerol 透過性と DMSO 透過性は変わらなかったが、acetamide 透過性は有意に低かった。一方、UT-A5dsRNA 注入桑実胚と UT-B1dsRNA 注入卵子では、いずれの耐凍剤に対する透過性も体外培養桑実胚の透過性と有意な差はなかった。したがって、UT のうち少なくとも UT-A2 は、桑実胚における acetamide の透過に関与していることが示唆された。

D. 考察

我々は、これまでの研究から、マウス桑

実胚における水や glycerol の透過は、主に AQP3 を介して透過していることを強く示唆してきた。本研究から、glycerol の透過に AQP3 が深く関与していることが確かめられた。さらに、EG の透過にも AQP3 が関与していることが明らかとなった。一方、DMSO および acetamide の透過には AQP3 は関与せず、主に別のチャンネルによって透過していることが強く示唆された。propylene glycol については、卵子と同様に単純拡散によって透過していると考えられた。

本研究から、マウス桑実胚における耐凍剤透過には、AQP3 以外の耐凍剤透過性チャンネルとして、UT が関与していることが示唆された。特に、UT の阻害剤である phloretin によって、体内桑実胚および AQP3dsRNA 桑実胚のいずれにおいても glycerol と DMSO の透過が阻害されたことから、これらの耐凍剤の透過に UT が深く関与していることが示唆された。また、UT-A2dsRNA 注入桑実胚は、acetamide に対する透過が有意に低下したことから、一部の UT は、acetamide の透過にも関与していることが明らかとなった。今後、UT を含む AQP3 以外の耐凍剤チャンネルによるマウス胚の耐凍剤透過機構をさらに明らかにする必要はある。

E. 結論

桑実期以降のマウス胚では、AQP3を含む複数の耐凍剤透過性チャンネルが耐凍剤を透過していることが明らかとなった。また、チャンネルの種類によって、透過する耐凍剤が異なることが示唆された。初期胚における耐凍剤透過性の向上は、他の哺乳動物種の胚でも観察されることから、多くの哺乳動物種の胚で同様の透過機構が働いていると推測される。したがって、疾患モデル動物を含む哺乳動物の胚の凍結保存法は、それぞれの耐凍剤透過性チャンネルの発現量と透過特性を考慮して

デザインする必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Edashige, M. Tanaka, N. Ichimaru, S. Ota, K. Yazawa, Y. Higashino, M. Sakamoto, Y. Yamaji, T. Kuwano, D.M. Valdez Jr., F.W. Kleinans, M. Kasai. Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biology of Reproduction*, 74, 625-632, 2006.
2. J.F. Guenther, S. Seki, F.W. Kleinans, K. Edashige, D.M. Roberts, P. Mazur. Extra- and intra-cellular ice formation in stage I and II *Xenopus laevis* oocytes. *Cryobiology*, 52, 401-416, 2006.
3. D.M. Valdez Jr., T. Hara, A. Miyamoto, S. Seki, M. Kasai, B. Jin, K. Edashige. Expression of aquaporin-3 improves the permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology*, 53, 160-168, 2006.
4. K. Edashige, D.M. Valdez Jr., T. Hara, N. Saida, S. Seki, M. Kasai. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to be cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 53, 96-106, 2006.
5. Y. Yamaji, D.M. Valdez Jr., S. Seki, K. Yazawa, M. Kasai, C. Urakawa, B. Jin, F.W. Kleinans, K. Edashige. Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Cryobiology*, 53, 258-267, 2006.
6. S. Seki, T. Kouya, R. Tsuchiya, D. M. Valdez Jr., T. Hara, B. Jin, M. Kasai, K. Edashige. The permeability to water and cryoprotectants of immature and mature oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology*, 54, 121-124, 2007.

2. 学会発表

1. K. Edashige, S. Ota, M. Tanaka, D.M. Valdez Jr., S. Seki, T. Hara, B. Jin, M. Kasai. The role of aquaporin-3 in the movement of water and cryoprotectants across the plasma membrane in mouse morulae. 43rd meeting of the Society for Cryobiology, July 24-27, 2006, Hamburg, Germany.
2. K. Edashige, S. Seki, N. Saida, D.M. Valdez Jr., T. Hara, M. Kasai. Issues in the cryopreservation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. 43rd meeting of the Society for Cryobiology, July 24-27, 2006, Hamburg, Germany.
3. D.M. Valdez Jr., T. Hara, A. Miyamoto, S. Seki, B. Jin, M. Kasai, Edashige K. Artificial expression of aquaporin-3 improves the permeability of immature oocytes to water and cryoprotectants in the medaka (*Oryzias latipes*). 43rd meeting of the Society for Cryobiology, July 24-27, 2006, Hamburg, Germany.
4. 太田悟史、桑野竜永、田中光信、宇都宮有夕美、Jin Bo、葛西孫三郎、枝重圭祐 マウス桑実胚における耐凍剤存在下での水と耐凍剤の透過性 第99回日本繁殖生物学会大会 2006年9月名古屋
5. 関信輔、神谷俊光、土屋龍馬、Delgado Jr. Montes Valdez, Jin Bo、葛西孫三郎、枝重圭祐 ゼブラフィッシュ卵子の体外成熟培養法の改良 第99回日本繁殖生物学会大会 2006年9月名古屋
6. 神谷俊光、関信輔、Delgado Jr. Montes Valdez, Jin Bo、葛西孫三郎、枝重圭祐 ゼブラフィッシュ未成熟卵子の水および耐凍剤に対する透過性的人為的向上 第98回日本繁殖生物学会大会 2006年9月名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
（分担）研究報告書

グローバルな凍結マウス精子の輸送に関する研究

中潟直己 熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発部門（CARD）教授

研究要旨

英国のMRCと熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発部門（CARD）との間で、ドライアイス詰めにした凍結精子の授受を行い、お互いの施設に輸送された凍結精子から産子が得られるか否かについて検討を行った。MRCおよびCARDにおいて、輸送された凍結精子を用いた体外受精で得られた胚の移植により、少なくとも一部は、正常な産子へ発生した。

A. 研究目的

近年、様々な目的で遺伝子改変マウスの授受が世界的に行われているが、生きたマウス個体での授受は、病原微生物学的観点および国内外の法的規制の問題から、凍結胚での授受が行われている。しかしながら、1匹から採取できる数や採取法の簡便性などの観点から、遺伝子改変マウスの場合、胚より精子での凍結保存が急速に普及し始めている。そこで、本実験では、英国のMRCとCARDとの間で凍結精子の授受を行い、お互いの施設に輸送された凍結精子から産子が得られるか否かの検討を行った。

B. 研究方法

実験には、C57BL/6Jマウスの精巣上体尾部精子を用い、中潟法により、精子の凍結保存を行った。続いて、凍結精子をドライアイス詰めにした発泡スチロール箱にパッキングし、輸送した。なお、英国MRCとCARD間の凍結精子の輸送は、国際宅配便（ワールド・クーリアー社）にて行った。授受した凍結精子は各施設で融解後、同系統の卵子を用いて体外受精を行い、得られた胚を受容雌の卵管へ移植し、産子への発生について検討した。なお、CARDにおける実験の実施は、本学動物実験委員会へ動物実験計画書を提出、審査を受けた後、本学の動物実験指針に従って行った。

C. 研究結果

各施設で融解した凍結精子を用いて体外受精を行った結果、23～25%の受精率が得られた。さらに、2細胞期胚へ発生した胚の移植により、移植胚の50～53%が産子へ発生した。

また、得られたすべての産子は、病原微生物学的にクリーンであった。

D. 考察

従来、凍結精子はドライシッパー（液体窒素保管器に液体窒素吸着剤を内蔵したもの）を用いて輸送していたため、輸送先から再び輸送元へドライシッパーを返却しなければならず、特に海外の輸送に関しては、その往復の輸送費が10万円以上と高額になっているのが現状である。本実験結果より、ドライアイス詰めにした発泡スチロール箱での凍結マウス精子のグローバルな輸送が可能であることが明らかとなり、輸送コストを半減することが可能となった。

E. 結論

ドライアイス詰めにした発泡スチロール箱を用いることにより、凍結されたマウス精子のグローバルな輸送が可能となった。特に、これにより、輸送コストの半減が可能となったことは、極めて意義深いものと思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko T, Yanagi M, Nakashima T, Nakagata N.: The improvement in fertilizing ability of cryopreserved mouse spermatozoa using laser-microdissected oocytes. *Reproductive Medicine and Biology* 5:249-253, 2006.

- 2) Anzai M, Nishiwaki M, Yanagi M, Nakashima T, Kaneko T, Taguchi Y, Tokoro M, Shin SW, Mitani T, Kato H, Matsumoto K, Nakagata N, Iritani A.: Application of Laser-assisted Zona Drilling to In Vitro Fertilization of Cryopreserved Mouse Oocytes with Spermatozoa from a Subfertile Transgenic Mouse. *Journal of Reproduction and Development* 52:601-606, 2006.
- 3) Kaneko T, Nakagata N.: Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology* 53:279-282, 2006.
- 4) Kaenko T, Yamamura A, Ide Y, Ogi M, Yanagita T, Nakagata N.: Long-term cryopreservation of mouse sperm. *Theriogenology* 66:1098-1101, 2006.
- 5) Hoshii T, Takeo T, Nakagata N, Takeya M, Araki K, Yamamura K.: LGR4 Regulates the Postnatal Development and Integrity of Male Reproductive Tracts in Mice. *Biology of Reproduction* 76:303-313, 2007

2.学会発表

- 1) 井手幸恵、柳田朋子、尾木真美、福本紀代子、町田宏美、土山修治、金子武人、中瀬直己: FERTIUM精子前培養液を用いた凍結精子の体外受精成績について、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 2) 福本紀代子、井手幸恵、柳田朋子、町田宏美、尾木真美、土山修治、中村直子、吉住正等美、金子武人、浦野徹、中瀬直己: 透明帯穿孔卵子を用いたMHV感染マウス凍結精子の体外受精について、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 3) 井上岳人、中務胞、山村研一、中瀬直己: 新規凍結保存液を用いたC57BL/6およびC57BL/6由来キメラマウス精子の凍結保存、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 4) 柳 美穂、井手幸恵、尾木真美、柳田朋子、町田宏美、福本紀代子、中島竜之、金子武人、

中瀬直己: 透明帯穿孔卵子を用いたマウス凍結精子の体外受精について研究、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸

- 5) 金子武人、中瀬直己: マウス精子のフリーズドライ保存法に関する、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 6) 尾木真美、柳田朋子、井手幸恵、福本紀代子、町田宏美、土山修治、金子武人、中瀬直己: マウス 未受精卵子の低温保存に関する研究、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 7) 伊藤一成、中務胞、小島健太、山村研一、中瀬直己、渡辺元、田谷一善: ヤギ抗インヒピン血清を用いたマウス過排卵処置の検討、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 8) 柳田朋子、尾木真美、井手幸恵、福本紀代子、町田宏美、土山修治、金子武人、中瀬直己: アルビノC57BL/6Jにおける体外受精および胚の凍結保存について、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 9) 上田直矢、中務胞、山村研一、中瀬直己: 凍結キメラ胚を用いた遺伝子破壊マウスの作製 -Part 2-、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 10) 高田理恵、中務胞、松隈豊和、山村研一、中瀬直己: マウス2細胞期胚の冷蔵保存(4°C)について、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 11) 松隈豊和、中務胞、井手幸恵、小川真美、柳田朋子、福本紀代子、町田宏美、山村研一、中瀬直己: 冷蔵保存(4°C)マウス8細胞期胚を用いたキメラマウス作製、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 12) 町田宏美、井手幸恵、柳田朋子、福本紀代子、尾木真美、土山修治、金子武人、中瀬直己: 国際間で輸送された凍結胚の融解および移植成績について、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 13) 土山修治、尾木真美、柳田朋子、井手幸恵、福本紀代子、町田宏美、金子武人、中瀬直己: 熊本大学CARDにおけるマウス胚移植成績、第53回日本実験動物

- 学会総会、2006,5.11-13、神戸
- 14) 今川隆成、金子武人、中島竜之、中瀬直己；ラット人工授精法に関する研究、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
 - 15) 木村信哉、金子武人、中瀬直己；凍結精子を用いたラットICSIに関する研究、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
 - 16) 西園啓文、竹尾透、入江徹美、中瀬直己；高性能マウス精子凍結・体外受精システムFERTIUMの開発、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
 - 17) 中務胞、中村誠司、藤田恒久、田中雅深、夏目里恵、崎村建司、山村研一、中瀬直己；C57BL/6由来ES細胞株RENKAを用いた遺伝子破壊マウス作製について、第53回日本実験動物学会総会、2006,5.11-13、神戸
 - 18) 金子武人、中瀬直己；マウス精子フリーズドライにおける保存液の改良、第47回日本哺乳動物卵子学会、2006.5.27-28、東京
 - 19) Takehito Kaneko, Naomi Nakagata；39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction(SSR) (July 29 - August 1) Necessity of chelating agent in freeze-drying of mouse spermatozoa ,Omaha
 - 20) 金子武人、中瀬直己；マウス精子フリーズドライ保存法に関する研究、第99回日本繁殖生物学会大会2006.9.7-9、名古屋
 - 21) 木村信哉、金子武人、中瀬直己；ICSIを用いたラット凍結精子からの産子の作出 第99回日本繁殖生物学会大会2006.9.7-9、名古屋
 - 22) 松村修、中務胞、河野淳子、松岡暁美、副島由美、山村研一、中瀬直己；遺伝子破壊マウス凍結精子を用いた簡便なPCR解析方法の開発、第40回日本実験動物技術者協会総会、2006.10.27-28、

京都

- 23) 松隈豊和、中務胞、井手幸恵、尾木真美、柳田朋子、福本紀代子、町田宏美、山村研一、中瀬直己；低温輸送したマウス8細胞期胚を用いてのキメラマウス作製、第40回日本実験動物技術者協会総会、2006.10.27-28、京都
 - 24) 井上岳人、中務胞、山村研一、中瀬直己；凍結融解マウス精子の体外受精時の精子前培養培地内の精子濃度と受精成績の関係、第40回日本実験動物技術者協会総会、2006.10.27-28、京都
 - 25) 今川隆成、金子武人、中瀬直己；透明帯穿孔卵子を用いたラット凍結/融解精子の体外受精の試み、第40回日本実験動物技術者協会総会、2006.10.27-28、京都
 - 26) 木村信哉、金子武人、中瀬直己；ICSIを用いた凍結ラット精子からの産子の作出、第40回日本実験動物技術者協会総会、2006.10.27-28、京都
 - 27) 金子武人、柳町隆造、中瀬直己；国際空輸されたフリーズドライマウス精子からの産子の作出、第51回日本生殖工学医学会・学術講演会、2006.11.8-10、大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

ラットの系統保存を目的とした生殖工学技術の開発・改良

分担研究者 横山峯介 新潟大学脳研究所 教授

研究協力者 藤澤信義 新潟大学脳研究所 助手

研究要旨

マイクロインジェクション法によるトランスジェニックラット作製に用いる受精卵および体外受精に用いる未受精卵の効率的な採取法を確立することを目的に、Wistar 系幼若個体を用いて基礎的検討を行った。ホルモン処理による過排卵誘起を行った結果、成熟個体を用いた場合と同等以上の採卵数が得られた。さらに培養系を用いた発生能の検討においても高率に胚盤胞へ発生することが明らかとなり、幼若個体を用いることの有用性が確認された。また、近交系の中にはホルモン低感受性系統と高感受性系統が存在することが示唆された。

A. 研究目的

ラットは体格が大きいため手術がし易く、一個体から多くの実験材料を得ることができるといって、マウスには無い有用性を持っている。これまでに蓄積された豊富なデータを基に、生活習慣病等の新たな疾患モデルやトランスジェニック系統の開発が進められており、生殖工学技術を応用した効率的なラットの系統保存システムを確立することの重要性が増している。本研究ではその基盤となる採卵に関する基礎的データの収集を目的に、幼若個体からの効率的な採卵法、採取した受精卵の正常性の検討を行った。また、近交系から受精卵を採取する場合の系統差について調べた。

B. 研究方法

(1) ホルモン処理による過排卵誘起

4・5・6週齢の幼若 Wistar 系メスラットに 48 時間間隔で 50-350iu/kg(B.W.)の各種濃度の PMSG と 75iu/kg(B.W.)の

hCG を腹腔内投与した。hCG 投与 26 時間後に摘出した卵管を 2 枚のスライドグラスに挟んで圧扁することにより、膨大部に存在する未受精卵を実体顕微鏡下にカウントした。対照として 12 週齢の成熟メスに同様のホルモン処置を行い比較した。成熟個体の場合、膣スメア像の観察により 4 日性周期を 2 回以上連続して回帰することを確認し、発情後期に PMSG を投与した。

(2) 初期胚の培養

5 週齢幼若メスに hCG を投与後、同系成熟オスと一晚同居させ、自然交配を行った。幼若個体はオスとの同居に先立ち、ピンセットで人為的に膣を開口した。同居の翌日、膣スメア中の精子を観察し、交尾の有無を判定した。hCG 投与後 50~54 時間後に卵管を摘出したのち、mR1ECM(Miyoshi et al. 1994)培養液で内腔をフラッシングし、2 細胞期胚を回収した。3 回洗浄した後、同液で 96 時間培養(37℃、5%CO₂、95%Air)