

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06045

研究課題名(和文) 希少な異種マウスのES細胞樹立と4倍体胚盤胞補完法による系統保存と個体復元

研究課題名(英文) Establishment of ES cell lines and production of chimeric mice using tetraploid blastocyst complementation from wild-derived mouse strains

研究代表者

持田 慶司 (Mochida, Keiji)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任技師

研究者番号：60312287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本プロジェクトにより異種マウスであるSPR2系統(M. Spretus)、ZBNおよびSPI系統(M. spicilegus)、亜種のCASTおよびCASP系統(M. m. castaneus)、更に実験用マウスのC3H/He系統それぞれから高品質な受精卵の作出によりES細胞の樹立に成功した。また異種マウスで初めて凍結胚でのSPR2系統の保存および異種間胚移植に成功した(2020年論文発表済み)。更に樹立したSPR2系統のES細胞にレンチウイルスを介してNeon-GFP遺伝子を導入し、そのES細胞の90%を超える寄与率の異種間キメラマウス作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高効率でのES細胞の樹立とES細胞由来の産子獲得は、異種間での細胞や臓器の作製や移植のための最も容易な動物モデルとなる。学術的には異種の細胞の共存や拒絶、胎盤形成や交雑不妊など免疫機構の解明、野生由来マウス系統の持つ遺伝子の多様性の利用等、種間差に基づく幅広い応用研究への発展が考えられる。社会的には異種間での臓器作製や授受のための再生医療研究への利用、免疫寛容を利用した不妊治療、更に希少動物や絶滅危惧種の保存や復元等への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have succeeded in establishing ES cells by producing high quality fertilized eggs from the interspecific SPR2 (M. spretus), ZBN and SPI (M. spicilegus) strains, the subspecies CAST and CASP (M. m. castaneus) strains, and the laboratory mouse C3H/He strain. Then, we succeeded in preserving frozen embryos of the SPR2 strain and in interspecies embryo transfer (published in 2020). In addition, we introduced the Neon-GFP gene into the ES cells of the SPR2 ES cell line via lentivirus, and succeeded in producing heterologous chimeric mice with a contribution rate of over 90% from the ES cells.

研究分野：生殖工学

キーワード：異種マウス ES細胞 4倍体補完法 凍結保存 キメラマウス 異種間胚移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、多能性幹細胞の移植によりマウス生体内にラット組織を作製させる研究、更にそれら臓器による移植治療の成功例が報告されている。このような異種間での臓器の作製や授受は再生医療研究での究極的な目標の一つと言える。そこでもっとも利用しやすい実験系として、実験用マウスとその近縁の異種マウスを用いた基礎研究が重要となる。しかし齧歯動物における異種間胚移植の成功例は報告されていないことから、本研究における ES 細胞株の樹立による新しい系統保存および異種産子獲得のための技術開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究において異種マウスの希少な受精卵もしくは白血球細胞から増殖可能な ES 細胞を作製して凍結保存を行うと共に、胎盤組織にのみ発生する実験用マウス由来の 4 倍体胚盤胞等へ ES 細胞を注入することで個体復元を行う新しい保存方法の確立を目的とする。

異種マウス系統の ES 細胞株が初めて樹立できれば、半永久的な種の保存が可能となるだけでなく、様々な応用利用が考えられる。本研究では ES 細胞へ遺伝子導入することで、初めての遺伝子改変異種マウスの作出を最終的な到達目標と設定する。

3. 研究の方法

(1) 高品質な胚盤胞の作出：実験用マウスである C3H/He 系統、亜種マウスである *Mus musculus castaneus* に属する 2 系統 (CASP, CAST)、異種マウスである *Mus spretus* に属する SPR2 系統、*Mus spicilegus* に属する 2 系統 (ZBN, SPI)、*Mus caroli* に属する 1 系統 (Car) を用いて、体外受精もしくは自然交配により受精卵を獲得し、体外受精後の胚移植による体内発育もしくは体外培養等により良質な胚盤胞期胚の作出を進める。

(2) ES 細胞株の樹立・培養・保存：得られた胚盤胞をフィーダー細胞 (マウス胎仔線維芽細胞) 上に播種し、15%KSR、LIF、2 inhibitor (CHIR99021 と PD0325901) の培地で培養を続ける。増殖した内部細胞塊をガラスキャピラリーでピックアップして継代し、トリプシン(またはトリプルセレクト)で well ごと継代していき、ES 細胞を樹立する。ES 細胞の品質確認には染色体数のカウント、Sry 遺伝子による雌雄確認およびテラトーマ形成による三胚葉への発生確認を行う。また、凍結保存には一般的な細胞の保存にも利用されているセルバンカーの使用を試みる。

(3) 様々な系統のホスト胚の作出：ICR 系統の 2 倍体および電気刺激で細胞融合させた 4 倍体胚、白い毛色の C57BL/6 および B6C3F1 系統の胚、生殖系列に寄与しない Nanos 胚をそれぞれ準備して、ES 細胞の注入や凝集を行うホスト胚として利用する。これらの胚を当室で開発した高浸透圧ガラス化法を用いて凍結保存し、いつでも利用できるように準備しておく。

(4) ES 細胞の注入等によるキメラ胚の作出：樹立した ES 細胞株はホスト胚の 8 細胞期もしくは胚盤胞期に注入もしくは凝集法により融合させる。注入法はマイクロマニピュレーターを用いた顕微操作により、ES 細胞を微小ガラスキャピラリーを用いて胚盤胞の腔内部もしくは 8 細胞期胚の細胞の隙間へ注入する。凝集法は培養用ディッシュに微小な窪みを作成し、透明帯を除去した 8 細胞期胚と ES 細胞を一日共培養して行う。

(5) 胚移植による個体復元および異種系統の確認：ES 細胞を注入した胚盤胞を偽妊娠 2.5 日目、8 細胞期胚は 0.5 日目のレシピエント (ICR 系統) の子宮もしくは卵管内へそれぞれ移植する。19.5 日目に帝王切開もしくは自然分娩により産子を獲得し、必要に応じて準備した里親に保育させる。毛色の確認によりキメラ個体を交配させて生殖系列への寄与を確認する。

応用研究として、

(6) ES 細胞への遺伝子導入による遺伝子改変異種マウスの作出：樹立した ES 細胞へレンチウイルスを介したトランスフェクションにより neon-GFP 遺伝子を導入する。ホスト胚へ蛍光発色を確認した ES 細胞を注入し、キメラマウスを作製する。

(7) 核移植による ES 細胞株の樹立と産子作出：受精卵を用いず、血液中の白血球を用いた核移植技術を介した ES 細胞の樹立を試みる。亜種系統である CASP および CAST 系統について、ES 細胞を樹立し、ICR および B6D2F1 系統の 8 細胞期胚もしくは胚盤胞へ ES 細胞を注入して産子作出を行う。

(8) ガラス化保存 回収した胚を異種間胚移植して系統保存を行う：Mus spretus の SPR2 系統をガラス化保存後に回収し、ICR もしくは B6C3F1 系統の偽妊娠マウスへ胚移植し、保存胚からの個体作製を試みる。

4 . 研究成果

(1) ES 細胞株の樹立：C3H/He および CASP 系統では体外受精により受精卵を作出後、胚培養で発生した胚盤胞を用いて、それぞれ 4 および 3 ラインの ES 細胞株を樹立することに成功した。異種マウスである ZBN、SPI、系統では体外受精後に前核期で胚移植を行うことで、in vivo で発生した胚盤胞からそれぞれ 6 および 4 ラインの ES 細胞株を樹立できた。SPR2 系統は交配によって得られた胚から 7 ライン樹立できた。更に樹立した SPR2 の D1 株には、レンチウイルスを介したトランスフェクション法により neon-GFP 遺伝子の導入に成功した。白血球による核移植でも CASP (雌 8, 雄 5 株) および CAST (雌 6, 雄 8 株) 系統について ES 細胞株の樹立に成功した。

(2) ES 細胞株の品質評価：樹立した ES 株について、染色体のカウント、Sry 遺伝子による雌雄確認およびテラトーマ形成による三胚葉への発生確認を行った。染色体数の正常性について、 $2n=40$ の確率は CASP 系統で 20, 44%、ZBN 系統で 0, 38, 62, 78%、SPI 系統で 68, 74, 76%、SPR2 系統で 0, 14, 18, 25, 43, 80%であった。テラトーマの形成は SPI および SPR2(neon GFP+)系統でそれぞれ確認できた。核移植由来 CASP および CAST 系統の ES 株で三胚葉への発生まで確認できた。

(3) キメラ個体の作出と生殖系列への寄与：ZBN 系統について、ICR の 6-8 細胞期胚へ凝集法により ES 細胞を導入したところ、76 個の移植胚に対して 8%の着床率で死亡胎仔が 1 匹のみだった。4 倍体胚では 53 個移植してもまったく着床しなかった。2 倍体胚を用いた注入法では、62%が着床し、18 匹 (34%) が出生、うち 1 匹がキメラ個体 (キメラ毛色率 25%) であった。一方で胚盤胞への注入では 2 倍体では 78 個移植して 68%が着床し、18 匹 (23%) が出生、うち 3 匹がキメラ個体であった。なお、注入する ES 細胞数が 10 個の場合にキメラ 3 個体 (キメラ率 5-15%) が得られ、15-20 個を注入した群ではキメラ個体は得られなかった。4 倍体の胚盤胞へ注入した場合、着床率は 19% (10/52) であり、産子へは発生しなかった。得られたキメラ個体は繁殖により生殖系列に異種系統の遺伝子が挿入されていないことを確認した。

SPI 系統について、同様に ICR 系統の 2 倍体および 4 倍体胚の 6-8 細胞期胚および胚盤胞へ ES 細胞を注入したところ、2 倍体の胚盤胞のみから 13 匹の産子 (出生率 13%) が得られ、その

うちの6匹がキメラ個体であった。しかしキメラ率は5-15%程度であり、繁殖により生殖系列に挿入されていないことを確認した。

SPR2(neon GFP+)系統について、ICRの6-8細胞期胚にES細胞を注入した場合、24個の注入胚を移植して13匹出生、うち2匹がキメラ個体(キメラ率5, 15%)であった。B6アルビノ系統の胚に注入したところ、産まれた5匹のうち1匹が90%以上のキメラ率で強い蛍光発色を確認できたが、出生後約7日で死亡し、次世代を獲得できなかった。ICR系統の胚盤胞への注入では産まれた14匹中2匹がキメラ個体であり、キメラ率は60%と25%であったが、交配によって生殖系列に挿入されていないことを確認した。また、B6C3F1アルビノの8細胞期胚へES細胞を注入したところ、18匹の子供が得られたが、毛色キメラの個体は得られなかった。

ゲノム編集胚の利用について、ICR系統の受精卵にsgNanos3およびCas9 mRNAを注入して、生殖細胞を作れない胚を作製した(Miura, 2021)。この胚盤胞へSPR2(neon GFP+)のES細胞を注入したところ、8匹(雌4雄4)の子供が得られ、現在も繁殖実験を進めている。

核移植由来ES細胞について、CAST系統のES細胞をICRマウスの胚盤胞へ注入することで11匹の仔が得られ、そのうちの5匹は黒目を有するキメラ個体であった。更に交配によって野生色の個体が生まれたことから、ES細胞を用いた亜種野生由来マウスの系統保存に成功した。

異種間胚移植について、Mus spretusのSPR2系統から自然交配により受精卵を獲得しガラス化保存を行った。加温回収した胚をICRもしくはB6C3F1系統の偽妊娠マウスへ移植したところ、それぞれ27%および63%で産子を獲得し、齧歯動物で初めての異種間胚移植に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 MOCHIDA Keiji, HASEGAWA Ayumi, OGONUKI Narumi, INOUE Kimiko, OGURA Atsuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Early production of offspring by <i>in vitro</i> fertilization using first-wave spermatozoa from prepubertal male mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 467 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 MOCHIDA Keiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of assisted reproductive technologies in small animal species for their efficient preservation and production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2020-033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Kamimura Satoshi, Inoue Hiroki, Matoba Shogo, Hirose Michiko, Honda Arata, Miura Kento, Hada Masashi, Hasegawa Ayumi, Watanabe Naomi, Dodo Yukiko, Mochida Keiji, Ogura Atsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Loss of H3K27me3 imprinting in the Sfmbt2 miRNA cluster causes enlargement of cloned mouse placentas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16044-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Michiko, Honda Arata, Fulka Helena, Tamura-Nakano Miwa, Matoba Shogo, Tomishima Toshiko, Mochida Keiji, Hasegawa Ayumi, Nagashima Kiyoshi, Inoue Kimiko, Ohtsuka Masato, Baba Tadashi, Yanagimachi Ryuzo, Ogura Atsuo	4. 巻 117
2. 論文標題 Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2513 ~ 2518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1917595117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu J, Mochida K, Hasegawa A, Inoue K, Ogura A	4. 巻 64
2. 論文標題 Identification of quantitative trait loci associated with the susceptibility of mouse spermatozoa to cryopreservation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 117-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2017-148.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa A, Mochida K, Matoba S, Inoue K, Hama D, Kadota M, Hiraiwa N, Yoshiki A, Ogura A	4. 巻 104
2. 論文標題 Development of assisted reproductive technologies for Mus spretus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 234-243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Qiu J, Hasegawa A, Mochida K, Ogura A, Koshimoto C, Matsukawa K, Edashige K	4. 巻 98
2. 論文標題 Equilibrium vitrification of mouse embryos using low concentrations of cryoprotectants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2020.11.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 持田慶司, 廣瀬美智子, 長谷川歩未, 三浦健人, 井上貴美子, 小倉淳郎
2. 発表標題 野生由来亜種および異種マウスの系統保存のためのES細胞の樹立
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川歩未、持田慶司、富島俊子、廣瀬美智子、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎
2. 発表標題 マウスの性周期同期化による様々な系統の偽妊娠雌の作出
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 持田慶司
2. 発表標題 生殖工学技術を駆使した実験用小動物の保存と生体の復元
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 持田慶司、廣瀬美智子、長谷川歩未、三浦健人、井上貴美子、水野沙織、吉木淳、小倉淳郎
2. 発表標題 野生由来亜種および異種マウスからのES細胞株樹立の取り組み
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 持田慶司、廣瀬美智子、長谷川歩未、三浦健人、渡邊奈穂美、井上貴美子、水野沙織、吉木淳、小倉淳郎
2. 発表標題 野生由来マウスからのES細胞の樹立と異種間キメラマウスの作出
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉金莎、持田慶司、長谷川歩未、井上貴美子、小倉淳郎
2. 発表標題 マウス精子の凍結保存感受性に関する責任遺伝子検出の試み
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川歩未、持田慶司、富島俊子、廣瀬美智子、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎
2. 発表標題 プロゲステロン投与によるマウスの性周期同期化の応用
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 持田慶司
2. 発表標題 抗インヒピン血清を用いたマウスの過剰排卵と性周期同期処理による効率化
3. 学会等名 第36回日本受精着床学会総会・学術講演会、Art Forum 2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 持田慶司、劉金莎、長谷川歩未、井上貴美子、小倉淳郎
2. 発表標題 マウス精子の凍結感受性に関わる表現型と遺伝子座の解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川歩未、持田慶司、富島俊子、廣瀬美智子、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎
2. 発表標題 プロゲステロン投与による計画的な偽妊娠雌マウスの作出
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越後貫成美、長谷川歩未、廣瀬美智子、本多新、寛山隆、持田慶司、中村幸夫、小倉淳郎
2. 発表標題 NOD/SCIDマウスへの発生工学的手法の応用
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 持田慶司、廣瀬美智子、長谷川歩未、三浦健人、井上貴美子、小倉淳郎
2. 発表標題 野生由来垂種および異種マウスの系統保存のためのES細胞の樹立
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川歩未、持田慶司、富島俊子、廣瀬美智子、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎
2. 発表標題 マウスの性周期同期化による様々な系統の偽妊娠雌の作出
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上貴美子、越後貫成美、上村悟氏、井上弘貴、的場章悟、廣瀬美智子、三浦健人、羽田政司、長谷川歩未、持田慶司、小倉淳郎
2. 発表標題 クローンマウスの胎盤過形成はSfmbt2 miRNAクラスターのインプリント消失により引き起こされる
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 持田慶司、廣瀬美智子、長谷川歩未、三浦健人、渡邊奈穂美、井上貴美子、水野沙織、吉木淳、小倉淳郎
2. 発表標題 野生由来異種マウスを用いたES細胞の樹立とキメラマウスの作出
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝工学基盤技術室 http://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/ 遺伝工学基盤技術室 https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------