

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03151

研究課題名(和文) ゴールデンハムスターを用いた新たな遺伝子改変モデルプラットフォームの確立

研究課題名(英文) Establishment of platform for new gene-modified models using golden hamsters

研究代表者

小倉 淳郎 (Ogura, Atsuo)

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・室長

研究者番号：20194524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、マウスで未解明の遺伝子のKOおよびノックイン(KI)モデルの作出を試み、信頼性の高い系統凍結保存法も開発することにある。ハムスターKO技術の効率化では、抗インヒビン血清とeCG(equine chorionic gonadotrophin)の1:1混合液を注射し、i-GONAD法と組み合わせることにより、妊娠率と出産数の向上に成功した。ハムスター胚の凍結保存技術の開発では、自然交配3日後の8-16細胞期胚を子宮灌流により採取、凍結保存を行い、妊娠雌へ移植することで、凍結融解胚由来の産子作出に成功した。また、精子凍結法に応用するための人工授精法の開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、遺伝子改変動物のほとんどは、マウスあるいはラットで作製されているが、これらの種は、特殊な進化をしていることから、一部のノックアウト動物が無表現型、あるいは予想外の表現型を示すこと知られている。そこで、マウス・ラットとは分類学的に離れた小型げっ歯類であるゴールデンハムスターを用いてノックアウト系システムを作出したところ、精子先体酵素アクロシンや卵子PIWILなどの遺伝子のノックアウトで、マウス・ラットでは得られない表現型を得ることができた。これらは哺乳類一般に共通する遺伝子機能である可能性が高いことから、ハムスターノックアウト系の科学的意義を明らかにすることができたと言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to generate CRISPR/Cas9 KO and knock-in (KI) model hamsters for analyze the genes not yet understood in mice, as well as to develop reliable strain cryopreservation methods. In the improvement of hamster KO technology, the injection of a 1:1 mixture of anti-inhibin serum and eCG (equine chorionic gonadotrophin) combined with the i-GONAD method successfully increased the pregnancy rate and the number of births. In the development of cryopreservation technology for hamster embryos, 8- to 16-cell stage embryos at 3 days after natural mating were obtained by uterine perfusion, cryopreserved, and transferred to pregnant females. Finally we successfully produce litters derived from frozen and thawed embryos. We also succeeded in developing an artificial insemination method to be applied to the sperm freezing method and offspring production.

研究分野：実験動物学

キーワード：ハムスター ゲノム編集 ノックアウト動物 i-GONAD法

1. 研究開始当初の背景

現代の医学・生物学の発展は、多くの動物実験によって支えられている。特に遺伝子機能解析やモデル動物の作出には、遺伝子改変動物が大きく貢献してきた。とくにマウスは、小型で取り扱いが容易であり、かつ基盤的生殖技術(体外受精など)、遺伝的制御技術(近交系など)および膨大に蓄積されたマウスゲノム情報により、これまでもそして今後も first choice のモデルとしての地位は不変である。しかし、改変された遺伝子が徐々に飽和状態に近づいてくると、どうしても解決できない実験用マウスの動物種としての特性が明らかになってくる。元のマウス種 (*Mus musculus*) は進化速度が速く、一部の遺伝子が他の哺乳類と異なる変異を遂げており、さらに実験用マウスは、もともと限られた遺伝的プールから作出されたという特殊性をもつ。また、KO マウスをヒト疾患モデルとする場合、繁殖様式、脂質代謝、糖代謝などの生理学的な相違は、どうしても超えられない壁となる。これらを原因として、一部の遺伝子(10-20%程度と概算される)のマウス KO は表現型を示さず、またあったとしても報告に値しない程度の変化しか示さない。double/triple knockout を用いた表現型解析により機能が確認されることがあるが、他の多くは「無くても影響がない遺伝子」とみなされてしまう。すなわち哺乳類一般におけるこれらの遺伝子の存在意義の過小評価につながっている可能性があった。

一つの解決方法は、マウスの優れた利便性を失わずに、モデル動物を効率的に作出・利用できる動物種を開発することである。そして、これらの動物は KO 動物の無表現型の可能性を減らすために、マウスと遺伝的に離れていることが理想である。ゴールデン(シリアン)ハムスター (*Mesocricetus auratus*) はこれらの条件を満たす動物の一つである。すなわち、

- ・ 性成熟が早い(7週間程度)
- ・ 正確に4日性周期を維持する(数ヶ月後の実験まで計画可能)
- ・ 通常のPMSG(妊馬血清性腺刺激ホルモン)を用いて過剰排卵が可能(40-50個/雌)
- ・ 発情期雌と雄の同居後、直ちに交配と腔内精子を確認出来る。
- ・ 妊娠期間が有胎盤動物で最も短い(16日)
- ・ 多産である(5-10匹)
- ・ 体外受精が容易(哺乳類最初の精巢上体精子による体外受精が成功)
- ・ 体重100-150g程度であり、取り扱いや飼育コロニー維持が容易。
- ・ また、進化上マウス・ラットの系統から早く分かれており、遺伝学的操作によってマウス・ラットとは異なる結果を得ることが期待できる。

一方でハムスターは、強力な体外胚発生停止という大きな欠点がある。ゴールデンハムスターの体外操作胚の2細胞期における発生停止、すなわち2-cell block が極めて強力であることは古くから知られており、哺乳類胚で最も培養が困難と言われているほどである。このため、ハムスターの遺伝子改変システムはほとんど作製されなかった。

しかし、近年、高橋、大塚らによる GONAD (Genome-editing via oviductal nucleic acids delivery system) 法が開発された (Ohtsuka et al. Sci Rep 5: 11406, 2015)。これはマウス卵管内に Cas9 mRNA とガイド RNA を注入し、卵管ごと電気をかけることにより受精卵内へ Cas9 mRNA とガイド RNA を取り込ませる方法である。採卵、胚操作、胚移植のすべての操作が省略できる優れた CRISPR KO 改良法である。小倉らは、いくつかの工夫の末に、GONAD 法によりハムスター-KO の作出が可能であることを確認した。

2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は、以下の3つである。

(1) ハムスター-KO 技術の効率化: 応募者はすでに GONAD 法によりハムスター-KO が可能であることを確認した。しかしながら効率は十分でなく(産子の10-30%)、モザイクが多発するという欠点がある(KOの30-70%)。胚の発生時期との対応や Cas9 濃度などの調整により、これらの欠点を解決する。

(2) ハムスター-KI 技術の開発: KO による研究成果が得られれば、マウスの場合と同様に、conditional KO や発現の正確な解析のために KI 動物が必要になると予想される。GONAD 法の応用による KI ハムスター作出法を開発する。

(3) 胚凍結保存技術の開発: 開発した KO/KI ハムスターシステムを安全かつ効率的に保存するための胚凍結保存技術を開発する。これは本研究成果を将来にわたって生かすために必須の技術開発である。

3. 研究の方法

(1) の KO 個体作出には、基本的に大塚らの GONAD 法を用いる(図1)。Cas9 はタンパク質で導

入する（なぜかハムスター透明帯は mRNA を通過させにくい）。本研究で最適化すべき条件は、電気パルスの条件（穿孔用および導入用パルスの電圧、長さ、回数）および gRNA-Cas 導入時期（胚発生ステージ）である。産子出生率、KO/KI 率、非モザイク率がバランス良く得られるように、これらの条件を最適化する。

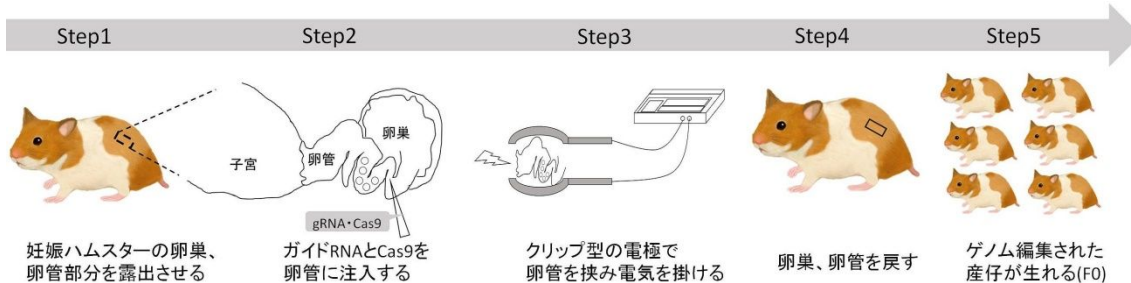


図1. ハムスター GONAD 法。体外操作に敏感なハムスター受精卵を取り扱うことなく、KO 個体を作出することができるのが大きな利点である。

(2) ハムスターKI 技術の開発では、コンストラクト設計およびその導入のタイミング（胚発生ステージ）など様々な因子を考慮する。まずはオリゴ DNA を用いた点突然変異の導入から開始し、蛍光タンパク質や tag タンパク質などの KI、そして最終的に flox KI の作成までを行なう。試行錯誤的な要素もあるが、マウスのストラテジーも生かせる部分があるので、マウスの最新の情報を常に検討をする予定である。

(3) ハムスター胚の凍結保存技術の開発では、発生停止をできるだけ避けるために、発生後期の胚を用いる。これまでに「PMSG 注射 3 日後に交配 3 日後の晩に子宮から 8-16 期細胞を採取」が最適であることを確認している（この翌日は着床が始まり、胚が採取しにくい）。これらの胚の生存率が最も高い凍結融解方法を開発し、偽妊娠ハムスターの卵管または子宮へ移植し、出生率を確認する。以上の実験により、最適なハムスター胚の凍結保存法を開発する。

4. 研究成果

(1) ハムスターKO 技術の効率化：ハムスターKO 技術の効率化では、in vivo 卵管内 electroporation である GONAD 法の実験条件の適切化を行った。これまで、GONAD 後の出生率が低いことが明らかとなったので、day 1 の卵管内の卵子を検索したところ、多くの場合で未受精卵であることがわかった。過排卵用の PMSG の注射の dose を下げることによって、ある程度妊娠率の向上に成功したが、さらに、抗インヒピン血清と eCG (equine chorionic gonadotrophin) の 1:1 混合液を Day 1 に注射することにより、妊娠率と出産数の格段の向上に成功した。実際にこの方法を応用し、3 系統のノックアウトハムスターを作出した。

(2) KI ハムスターの作出を i-GONAD 法で実施するためには、ドナーDNA が、厚いハムスター透明帯を通過し、細胞膜も通過し、最終的に核へ至らなければならない。これは、一般的な電気穿孔法ではかなり難しいことがわかった。そこで、ドナーDNA をアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、卵管内の 1-cell 受精卵の前核に取り込ませる技術の開発を開始した。その基礎実験として、卵管内の受精卵へ EGFP を AAV ベクターによって導入することを試みた。Intact の透明帯は通過しなかったため、還元型グルタチオンを同時に卵管へ導入する実験を行っているところである。この還元型グルタチオンによって、デキストランが透明帯を通過するようになったことを確認した。

(3) 胚の凍結は、ガラス化法により実施した。凍結および融解の培養液は、ハムスター胚培養用の HECM-3 とすることにより、少なくとも、これらの液への暴露のみでは、胚盤胞まで発生することを確認した。しかし、凍結融解をすると、発生率が落ちるため、凍結融解に何らかのダメージがあることが明らかであった。このため、胚移植後の妊娠率も低下するため、レシピエント雌に妊娠雌（色違い）を用いた。その結果、初めて凍結融解胚由来の産子を得ることができた。さらに凍結融解液および暴露時間の調整により、効率を上げる予定である。凍結精子を用いた系統保存には、通常は体外受精 胚移植系を用いるが、ハムスターでは、特に発生初期の受精卵を体外で扱うことを避けなければならないため、人工授精による固体化を目指すこととした。当初、凍結融解後の精子の運動率はほぼ 0% であったが、凍結液の改良により、20% 程度まで改善した。一方、新鮮精子を用いて、人工授精の基礎技術の確立も進めた。その結果、精巢上体精子を swim-up により採取し、偽妊娠交配後の雌の子宮へ注入することにより、ほぼ 100% 妊娠することを確認した。今後、凍結融解精子を用いた人工授精を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Loubalova Zuzana, Fulka Helena, Horvat Filip, Pasulka Josef, Malik Radek, Hirose Michiko, Ogura Atsuo, Svoboda Petr	4. 巻 23
2. 論文標題 Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-021-00746-2	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 該当する

1. 著者名 廣瀬美智子、小倉淳郎	4. 巻 278
2. 論文標題 ハムスター：マウス/ラットの未踏の地へ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1149 ~ 1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 小倉淳郎、廣瀬美智子	4. 巻 84
2. 論文標題 実験動物としてのゴールデンハムスターの有用性 (I) ゴールデンハムスターの実験動物としての歴史と特徴	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Labio 21	6. 最初と最後の頁 9 ~ 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小倉淳郎、廣瀬美智子、富島俊子
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたノックアウトハムスターの作出
3. 学会等名 第94回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ogura A, Ogonuki N
2. 発表標題 Recent advancements of assisted fertilization using spermatogenic cells
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬美智子、小倉淳郎
2. 発表標題 GONAD法によるノックアウトハムスターの作成
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小倉淳郎
2. 発表標題 実験動物を用いた生殖技術の開発とその応用
3. 学会等名 第57回東北生殖医学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuo Ogura
2. 発表標題 Development of reproductive engineering techniques for small laboratory species
3. 学会等名 2019 Congress of Executive Director for Animal Reproduction Branch of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小倉淳郎ら	4. 発行年 2020年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 368
3. 書名 繁殖生物学改訂版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

遺伝工学基盤技術室 https://kougaku.brc.riken.jp/ja/Bioresource_Engineering_Division https://kougaku.brc.riken.jp/en/ 遺伝工学基盤技術室 https://kougaku.brc.riken.jp/ja/Bioresource_Engineering_Division https://kougaku.brc.riken.jp/en/ 遺伝工学基盤技術室 https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/Bioresource_Engineering_Division https://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/indexE.html

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
---------	---------

米国	University of Hawaii			
チェコ	Institute of Molecular Genetics, CAS			