

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640059

研究課題名(和文)染色体導入・除去技術による迅速コンソミックマウス作製システムの構築

研究課題名(英文) Development of rapid system for generation of consomic mice via chromosome transfer and elimination technologies

研究代表者

香月 康宏 (KAZUKI, Yasuhiro)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90403401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コンソミックマウスシステムは多因子疾患の原因遺伝子の絞り込み・遺伝子の単離に大きな役割を果たしてきた。しかしながら、その作製過程には数年単位の時間と労力がかかることが課題であった。本研究では、染色体導入技術と染色体除去技術を組み合わせることで、細胞レベルでコンソミックシステムを樹立し、その細胞を用いて迅速にコンソミックマウスを作製するためのシステム構築を目指した。具体的には細胞融合技術、染色体導入技術を駆使することで11番染色体が除去可能な129系統マウスES細胞にB6系統の11番染色体断片を導入することに成功した。本システムは迅速にコンソミックマウスを作製するための有用なシステムになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Use of consomic mice played an important role to identify the responsible gene of the multiple factor disease. However, it was a problem that several years and a lot of labor for the manufacture process have been needed. In this study, I aimed to generate rapid system for generation of consomic mice by constructing the consomic cells in vitro via chromosome transfer and elimination technologies. Using whole cell fusion and chromosome transfer technique, I succeeded in introducing a B6-derived chromosome 11 into 129-derived mouse ES cells in which the 129-derived chromosome 11 can be eliminated. The system will be expected to be a useful tool for the generation of consomic mice rapidly.

研究分野：染色体工学

キーワード：リサーチバイオリソース

1. 研究開始当初の背景

コンソミックマウスとは、受容系統のある染色体丸ごと1対(2本)を供与系統の染色体で置き換えたマウスである。コンソミック系統はこれまで一般的だったコンジェニック系統、リコンビナント・インブリード系統の弱点を克服し利点を合わせ持ったものと言える。コンソミック系統が樹立されると、精神疾患や癌を含めて多因子疾患の原因遺伝子の絞り込み・遺伝子の単離に非常に役立つことから様々な系統のコンソミックマウスが作製されてきた。しかしながら、上記作製過程には5~10年という歳月がかかる上に、しばしば雄の妊性低下や産児数の低下などが原因で目的のマウスが得られないことが課題であった。

一方、我々はこれまでに染色体導入技術および染色体除去技術の開発を試みてきた。染色体導入技術として、動物細胞に任意のヒト染色体を移入することが可能な正常ヒト染色体ライブラリーを構築し、特定のヒト染色体を任意の細胞に導入する技術の確立に成功している。また、染色体除去技術として、多田博士(京都大)らにより、4倍体ES細胞から特定のマウス染色体を除去する技術が報告されている。染色体導入技術および染色体除去技術は従来の単一または少数の遺伝子の導入・除去ではなく、染色体レベルで遺伝子群を導入・除去することができる点で世界でも類をみないユニークなアプローチである。

2. 研究の目的

本研究の目的は上記の課題を解決するために、染色体導入技術および染色体除去技術を使った2つの染色体工学的アプローチで迅速にコンソミックマウス系統を作製するシステム構築を目指した。具体的には本システムが機能するかを確かめるため、129系統マウスの特定の染色体をB6系統の染色体

に入れ換えたコンソミックマウス系統を作製することを目指した。

3. 研究の方法

以下の4つのステップで研究を実施した。

(1) FISHによる挿入部位の同定

耐性遺伝子(neo耐性)が導入されたB6マウス由来胎仔線維芽細胞から染色体標本作製し、FISH解析により挿入部位を同定した。

(2) A9細胞との細胞融合

微小核細胞形成能を有するマウスA9細胞(BS耐性)と上記B6由来胎仔線維芽(neo耐性)をポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。具体的にはそれぞれの細胞 1×10^6 個を培養用フラスコ(25cm²)に同時に植え込み、一日間培養した。PBS(-)で細胞表面を2回洗浄した後に3mlのポリエチレングリコール溶液で1分間処理し、さらに3mlのポリエチレングリコール溶液で1分間処理した。PEG溶液を吸引後、無血清DMEMで3回洗浄し、通常の培養液(10%FBS、DMEM)で一日間培養した。次にPBS(-)で細胞表面を洗浄後、トリプシン添加によって細胞を分散し、G418(800 μ g/ml)及びブラストサイジンS(4 μ g/ml)を含む二重選択培養液(10%FBS、DMEM)に懸濁した細胞をプラスチック培養皿に植え込み、2~3週間選択培養した。G418およびBSの二重薬剤選択により、A9形質を持った細胞株を取得し、PCR法、FISH法により、解析を行った。

(3) A9細胞からCHO細胞への染色体導入

上記(2)で作製したマウス11番染色体を保持するA9細胞クローンからCHO細胞に微小核細胞融合法にてマウス11番染色体を導入した。具体的にはドナーA9細胞にコルセミド(0.05 μ g/ml、20%FCS、DMEM、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、48時間)を処理することで微小核を形成させ、サイトカラシンB処理、遠心分離により目的染色体を保持する微小核細胞を濃縮後、CHO細胞にポリエチレングリコールを用

いて細胞融合を行った。次に G418 選択により、neo 耐性 CHO 細胞株を取得し、PCR 法および FISH 法により、解析を行った。

(4) 129 系統由来マウス ES 細胞への染色体導入

これまでに 129 系統マウス ES 細胞の特定の染色体上の特定の部位に 2 つの loxP を逆向に連結したカセット (染色体除去カセット) が挿入されたマウス ES 細胞ライブラリーが多田博士 (京都大) らによって樹立されている。この ES 細胞と特定の細胞を融合し、Cre を発現させることで、特定の染色体が除去できることが確かめられている。上記ライブラリーの中から、染色体除去カセット 11 番導入 ES 細胞を選別し、以下の実験に利用した。

上記 (3) で作製した B6 系統由来のマウス 11 番染色体を保持する CHO 細胞クローンから 129 系統由来のマウス ES 細胞に微小核細胞融合法にてマウス 11 番染色体を導入した。具体的にはドナー CHO 細胞にコルセミド (0.1 µg/ml、20% FCS、F12、37 5% CO₂、72 時間) を処理することで微小核を形成させ、サイトカラシン B 処理、遠心分離により目的染色体を保持する微小核細胞を濃縮後、129 系統由来のマウス ES 細胞にポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。次に G418 選択により、neo 耐性マウス ES 細胞株を取得し、PCR 法および FISH 法により、解析を行った。

4. 研究成果

(1) FISH による挿入部位の同定

FISH 解析により挿入部位を同定したところ、B6 マウス由来胎仔線維芽細胞中でマウス 11 番染色体に薬剤耐性遺伝子が導入されていることを確認した。

(2) A9 細胞との細胞融合

細胞融合により獲得できたクローンを PCR 法、FISH 法により、目的の染色体が導入されたド

ナー A9 ハイブリッド細胞を作製した。

(3) A9 細胞から CHO 細胞への染色体導入
BS 耐性株をクローニングし、拡大培養後に PCR 解析、FISH 解析を行い、目的のマウス 11 番染色体が CHO 細胞に導入できたクローンを選抜した。

(4) 129 系統由来マウス ES 細胞への染色体導入

薬剤耐性株をクローニングし、拡大培養後に PCR 解析、FISH 解析を行ったところ、129 系統由来のマウス ES 細胞に B6 系統由来の断片化したマウス 11 番染色体が導入されたクローンが得られた。今後は完全長のマウス 11 番導入マウス ES 細胞を獲得し、129 系統由来のマウス 11 番染色体を除去し、コンソミック細胞およびマウスを作製する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 香月康宏 (2016 年 5 月 27 日) 染色体工学技術によるヒト化動物の作製と医学・薬学応用 (招待講演) 第 23 回 HAB 研究機構学術年会 (茨城県・つくば市)
- (2) 香月康宏 (2015 年 5 月 29 日) 染色体工学技術を用いた新規トランスクロモソミック動物作製システムの開発 (招待講演) 日本実験動物学会平成 27 年度奨励賞講演 (京都府・京都市)
- (3) 香月康宏 (2015 年 3 月 17 日) 染色体工学技術によるヒト化モデル動物作製法の開発と応用 (招待講演) 理化学研究所バイオリソースセンター・ゲノム編集マウスワークショップ (茨城県・つくば市)

[その他]

平成 27 年 5 月 29 日、第 62 回日本実験動物学会総会 (第 27 回) 奨励賞受賞、<http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/535/nihonjikkendoubutu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香月 康宏 (KAZUKI Yasuhiro)
鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90403401