

平成 18 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 19 年 3 月 1 日提出

ふりがな	さきむら けんじ	所属・職	新潟大学 脳研究所 ・ 教授
開発代表者名	崎村 建司		
開発課題名	C57BL/6 由来 ES 細胞を用いたコンディショナルノックアウトマウス作成支援事業		
<p>開発経過及び成果（開発目標に対する成果を計画書に記載した内容に対応させて記載すること）</p> <p>本研究開発支援事業の目的は、我々が開発した「C57BL/6 純粋遺伝的背景におけるコンディショナルノックアウトマウス作成系」を用いて脳の部位・時期特異的に標的遺伝子を欠損させることを目的とする研究を支援し、我が国の脳研究の世界に対する独自性を高めることである。このために、統合脳 5 領域の班員が C57BL/6 純粋遺伝的背景コンディショナルノックアウトマウス作成に取り組むプロジェクトを支援することとし、「C57BL/6 由来 ES 細胞を用いたコンディショナルノックアウトマウス作成支援事業」の名称で班員から申込者を募集した。その結果、2 名の計画班員と 5 名の公募班員から合計 7 件の応募があった。これらの申請の内容について、3 名の審査委員と崎村、三品により検討した結果、いずれも統合脳の発展に資するものであり、かつ多大な成果が期待できることから、7 名全員のマウス作成支援を今年度は施行することに決定した。</p> <p>支援対象者は以下の 7 名であり、11 系統のマウスを作成する予定である。</p> <p>第 3 領域 公募 富山大学大学院医学薬学研究部臨床分子病態検査学講座 大塚稔久 第 4 領域 公募 神戸大学バイオシグナル研究センター 向井秀幸 第 3 領域 公募 群馬大学大学院医学研究科高次細胞機能学 白尾智明 第 3 領域 公募 神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座神経発生学分野 寺島俊雄 第 4 領域 公募 東京大学医科学研究所癌細胞シグナル研究分野 手塚 徹 第 3 領域 計画 新潟大学大学院医歯学研究科 五十嵐道弘 第 3 領域 計画 北海道大学大学院医学研究科 渡辺雅彦</p> <p>これらの支援者とは直ちに連絡を取り、具体的な作成計画の打ち合わせをおこない、準備のできたところから作成を始めた。現在までに、計画班員のものは全て順調にマウス作成が進んでおり、当初計画していた 4 系統のマウスでキメラマウスが取れており、そのうち何系統かは生殖系列遺伝を確認して年度内に引き渡せる予定である。一方、公募班員のものはラボ間で作成の進捗状況が異なっているが、全体的には順調に推移していると考えている。とりわけ、大学院生等を派遣して行ったケースでは、着手してから 3 ヶ月でキメラマウス作成段階まで来ており、申し分のない速度で進捗している。</p> <p>昨年度着手した計画班員 4 件 8 系統のマウスは全てキメラマウスの作成が終わり、各研究者に引き渡している。また、公募班員 5 件 7 系統のうち、3 件 4 系統はマウスの作成に成功した。また残る 2 件のうち 1 件 2 系統も ES 細胞のスクリーニングの段階まで来ており、1 件を除いて終了する目処が立った。</p>			

開発成果を踏まえた今後の展開

本研究リソース開発は、我々が樹立した C57BL/6 由来 ES 細胞 RENKA を用いて、脳機能解析に有用なコンディショナルノックアウトマウスを作成し、統合脳の班員で共通リソースとして利用することを目的とする。C57BL/6 系統マウスの有用性は今更述べるまでもないが、2006 年 9 月より米国 NIH が始めたマウス遺伝子の網羅的ノックアウト計画でも C57BL/6ES の使用を謳っており、質の高い個体レベルの解析には均一な遺伝的背景が必須である。とりわけ行動解析をおこなう脳研究においては、その実績から C57BL/6 系統での遺伝子組換えが待望されてきた。しかしながら、これまでに報告されている C57BL/6 系統での遺伝子改変マウスは 50 系統にも満たないのが現状である。我々が樹立した C57BL/6 由来 ES 細胞株 RENKA を用いた遺伝子組換えマウスの作成法は、その生殖系列遺伝の効率が高く、17 年度の本研究支援でも 12 系統の生殖系列遺伝するキメラマウスを作出している。したがって、純粋 C57BL/6 遺伝子背景を持つ遺伝子変異マウスの大規模な開発は、この分野で我が国の世界に対する独自性を高めることになり、大きな意義を持つ。とりわけ、このようなマウス研究開発を班研究としておこなう意味は、共通財産としてのマウスリソースにある。コンディショナルノックアウト法は、標的遺伝子に loxP を持つ標的マウスとその標的を部位・時期選択的に組換える Cre マウスの交配でおこなわれる。このことは、ある研究者の興味で作成された標的マウスを、別の研究者が異なった興味で研究できるということである。今回は、マウス作成支援を要する研究者を公募の形で選考し、対象となる遺伝子を決定した。この支援をするときの条件として、将来作成したマウスは統合脳というコミュニティーのリソースとして活用することに同意してもらっている。したがって、一定の時間が経過した後は、作成したマウスは公開され、他の研究者にも使用する道が拓けている。同一コミュニティーということで、マウス使用に関する研究内容の調整が可能であり、個別に作成するよりも、経費や時間面などではるかに効率的である。このことを担保するためには、作成したマウスを一定時間が経過した後に班員に公表し、共同研究に供することが重要である。

18 年度は、2 名の計画班員と 5 名の公募班員からの合計 11 系統のマウス作成を支援してきた。また、17 年度は、4 名の計画班員と 5 名の公募班員からの合計 15 系統のマウス作成を支援してきた。これまでにその内の 12 系統で、生殖系列遺伝を確認し、体外受精により SPF 化した後に各研究者に送付している。今後、遺伝子全欠損を引き起こす必要がある場合は、生殖細胞で Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの交配をおこなう。また、我々の持つ部位選択的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスによるコンディショナルノックアウトマウス作成をおこなう場合は、共同研究ベースでマウスの交配をおこなう。それぞれの解析対象マウス（コンディショナルノックアウトマウス）は、作成依頼者が中心となり解析をおこなう予定である。

本プロジェクトを遂行するにあたり問題となっている点を以下にあげておく。まず、施設ごとに異なるマウス受け入れの基準である。作成したマウスを SPF 化して送付しなければならないが、その受け入れ基準が施設ごとに異なっており、そのことにより時間と手間を要する点である。一般的には、凍結胚、凍結精子での移送が最も簡便で安全なものであると思われるが、対応出来ない施設もある。この問題を解決するには、学会などの主導で安全基準を整備し、施設間でのマウス移送の基準を作る必要がある。次に、研究室内の負担の問題である。今年度は公募班員の 5 件に加え計画班員の申請を 2 件引き受けたために、当初想定していたより負担が重くなった。具体的には、直接指導する研究者の時間的・精神的負担の増加と、ES 細胞の培養やマウス飼育に関わる人の負担増加である。とりわけ、飼育マウスの増加による飼育施設の経費やテクニシャンの時間外手当など、当初予定していた以上に経費がかかり、今後の計画を進める上で考慮しなければならない。