

トランスジェニック動物作出関連の新しい方式

CSKリサーチパーク

鈴木 宏志

はじめに

トランスジェニックマウスが登場してから、はやくも十数年が過ぎた。この間、遺伝子の過剰発現系から、遺伝子欠損系へと技術的な進歩も着実に図られ、ヒトの疾患モデル動物としてや多くの遺伝子機能の解析に貢献しており、トランスジェニックテクノロジーは、生命科学の進展に不可欠な領域として成長したと考えられる。さらにこの技術は、マウスのみならず、ヒツジ、ブタ、ウシなどの中型あるいは大型動物にも応用され、資質の改良や生理活性物質の産生系として期待されている。昨年は、臓器移植のドナーを目的としたトランスジェニックブタが話題となった。中型、大型動物におけるトランスジェニック動物の開発では、長い妊娠期間や性成熟までに要する期間といった繁殖生理学的に回避し得ない条件が存在するので、その作出効率の改善が問題となるように思われる。したがって、胚性幹(ES)細胞の利用や胚の操作性の向上は、中型、大型動物におけるトランスジェニック動物の開発においては、重要な研究テーマであると考えられる。マウスにおいても、トランスジェニック動物としての質的な改善や作出効率の向上を図るために、遺伝子の調節発現、相同組換え、遺伝子導入法やキメラ作出法に関する幾つかの検討がなされており、これらの成果が、大型動物にも応用されていくものと思われる。

本稿では、最近開発されたES細胞と透明帯除去胚との共培養によるキメラ動物の作出法について、筆者らの成績を紹介する。

1、透明帯除去胚と凍結融解ES細胞との共培養によるキメラマウスの作出

最近の発生工学の潮流は、ES細胞に遺伝子操作を加え、このES細胞と初期胚とのキメラ胚を作成して個体へと発生させ、キメラ個体の生殖細胞に寄与したES細胞由来の遺伝子を、次世代以降で発現させて遺伝子機能の解析を個体レベルで行おうとするものである。ES細胞は、万能性を保持した内部細胞塊由来の細胞株であるが、胚体外組織への分化能に乏しいので、ES細胞そのものから産仔を得ることは極めて困難と考えられており、ES細胞の遺伝子を個体の染色体上で発現させるためには、初期胚との間でキメラ胚を作成し、産仔へと発生させる手段がとられてきた。このキメラ胚の作成には胚盤胞の胞胚腔内にES細胞を注入する方法がとられてきたが、この方法は複雑な操作と熟練を要するため、研究遂行上の大きな負担となっており、技術改革が望まれていた。

キメラ胚作成に要する時間と労力のほとんどは、ES細胞の胚盤胞への注入操作およびES細胞の培養とそれに伴うフィーダー細胞の準備に費やされており、特に、ES細胞培養のための毎日の培養液の交換は負担が大きい。そこで、8細胞期から桑実期にある胚の透明帯を除去し、凍結融解直後のES細胞と共培養を行うことによって、キメラマウスが得られるか否かについて検討した。

供試胚は、体外受精および体内受精の双方で得た。C57BL/6J系マウスに、過排卵処理を行い、同系統の精巢上体尾部精子を用いて体外受精を行い、精子添加後72時間に発生した桑実胚を供試胚とした。また、体内受精胚は、C57BL/6J系マウスに、過排卵処理後同系統の雄と交配させ、Day 2に卵管灌流によって、8細胞期から桑実胚を回収することによって得た。胚の透明帯は、酸性タイロード液に短時間暴露することによって除去した。

ES細胞は、エンドセリン-1 (ET-1) 遺伝子の第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子の挿入によって中断した相同組換え体のひとつA9を用いた。A9は、マウス胎仔繊維芽細胞層（フィーダー細胞）上で、ES細胞用培養液(SCM+LIF)を用いて培養した。ES細胞をトリプシン-EDTA処理によって単一細胞化した後、あらかじめ氷冷しておいたDMSO添加SCMを用い、クライオチューブ内で凍結した。凍結時の細胞濃度は $3 \sim 5 \times 10^6$ cells/mlとし、DMSOの最終濃度は10%とした。クライオチューブは、発泡スチロール製容器に入れ、 -80°C のディープフリーザー内で冷却および凍結させた後、液体窒素中で保存した。ES細胞の融解は、液体窒素中から取り出したクライオチューブを、直接 37°C の温水中に浸漬することによって行った。細胞懸濁液を、ゲラチンコートしたシャーレに移し換え1.5時間培養した後、接着している細胞を回収して細胞濃度が $5.5 \sim 20.0 \times 10^5$ cells/mlとなるよう調整し、共培養用培地に再懸濁した。ES細胞とフィーダー細胞との細胞懸濁液中のフィーダー細胞の割合は、10%以下であった。

透明帯除去胚は、バクテリオロジカルシャーレ上の流動パラフィンで覆われた $15 \mu\text{l}$ のES細胞懸濁液に移し換え、 37°C 、5% CO_2 、95%空気の条件下で共培養を行った。3時間から3.5時間の共培養の後、胚をマルチプレートテラサキ上の $100 \mu\text{M}$ EDTA添加Whitten's培地内で15~16時間培養した。培養後、桑実胚から胚盤胞に発生した胚を、偽妊娠2日目のICR系受容雌に移植した。産仔は、自然分娩あるいは帝王切開によって娩出させた。キメラの判定は、毛色と眼の色素によって行った。ES細胞の生殖系列への伝達を確認するために、性成熟に達したキメラマウスを、あらかじめ得られていたET-1遺伝子欠損ヘテロ接合の雌マウスと交配させた。ES細胞の生殖系列への伝達は、産仔の眼の色素とET-1遺伝子欠損ホモ接合体に特徴的な表現型である下顎の形成不全をはじめとする顔面の形態異常によって確認した。

透明帯を除去した体外あるいは体内受精に由来する8細胞期から桑実胚を 5.5×10^5 cells/mlおよび $16.4 \sim 20.0 \times 10^5$ cells/mlの濃度の凍結融解ES細胞と共培養し、さらに一晚培養後の胚盤胞への発生率は、それぞれ、62%および27%であった。移植後の産仔への発生率は、ES細胞の濃度が高い実験区で低い傾向にあり、さ

らに、高濃度区においてはキメラマウスが得られなかった。得られた4例のキメラマウスのES細胞の寄与率は、40~100%であり、このうち交配実験が可能であった3例中2例にES細胞の生殖系列への伝達を確認された。また、産仔に観察された顔面の形態異常の出現率については、期待される割合とほぼ一致する結果であった。

以上のように、透明帯除去8細胞期胚とあらかじめ遺伝子操作を施した凍結融解直後のES細胞とを共培養した後、さらに一晚培養し、桑実胚から胚盤胞にまで発生した胚を移植した結果、ES細胞が生殖系列に寄与したキメラ個体を得ることに成功した。この結果は、凍結融解直後のES細胞が、フィーダー細胞を除去することなく、透明帯除去胚との共培養によるキメラマウス作成に利用し得ることを初めて示したものである。キメラ胚作成のために費やされる時間と労力のほとんどは、ES細胞の培養と胚盤胞へのES細胞の注入操作に払われていたが、透明帯除去胚と凍結融解ES細胞の利用により、高度な熟練を要する顕微操作技術とキメラ胚作成前のES細胞の培養は、もはや必須なものではなくなった。

ES細胞の胚へのあまりに高い寄与は、正常な着床前および着床後の胚発生の障害となると云われているが、本実験においては、共培養に供した桑実胚は、高い胚盤胞への発生率を示したが、移植後の産仔への発生率は極めて低いものであった。完全なコンパクションを呈している桑実胚は、十分な数のES細胞を取り込むことができないのか、あるいは多くのES細胞が取り込まれたために胚の発生が阻害されたのかは、本実験の結果からは明らかにすることはできなかった。

そこで、ES細胞とのキメラ形成能に及ぼす透明帯除去胚のコンパクションの影響について、より詳細に検討を加えた。

2、共培養によるキメラマウス作出効率に及ぼす透明帯除去胚のコンパクションの影響

ICR系雌マウスに過排卵処理を施した後、同系統の雄と交配させ、Day 2に卵管からコンパクション前(8C)およびコンパクション開始後(8-M)の8細胞期胚を回収した。胚の透明帯は0.5%のプロナーゼを用いて除去した。ES細胞はTT2を用いた。融解後のTT2細胞は、細胞数が $5.5 \times 10^5 \sim 5.5 \times 10^6$ cells/mlとなるように5%のFCSを含むWhitten's培地に懸濁し、バクテリオロジカルシャーレ上に15 μ lのドロップを作製して、その上を流動パラフィンで覆った。透明帯除去胚とES細胞との共培養は、上述した方法で行い、共培養終了後、胚をマルチプレートテラサキ上の100 μ M EDTA添加Whitten's培地内で20~23時間培養した。

8-M胚を高濃度(5.5×10^6 cells/ml)のES細胞と共培養した結果(15%)、低濃度(5.5×10^5 cells/ml)で共培養した場合(32%)と比べ、胚盤胞への発生率が有意に減少したが、8C胚においては、すでに 5.5×10^5 cells/mlのES細胞濃度において、129個のうちわずか7個(5%)が胚盤胞に発生したのみであり、残りの胚のほとん

どは桑実胚であったので、この発生率の減少は観察されなかった。だが、7個の胚盤胞と30個の桑実胚の合計37個の移植胚から、17例の産仔が得られた事実から、この桑実胚が産仔への発生能を有していることが明らかとなった。しかし、キメラマウスが桑実胚に由来するか否かについては、依然として不明であった。そこで、移植時における胚の発生段階とES細胞の産仔への寄与率との関係について解析を行ったところ、胚盤胞を移植した場合、得られた産仔におけるキメラマウスの割合は、0~25%であったが、桑実胚を移植した場合のキメラマウスの割合は、産仔の13~60%であり、胚盤胞由来のキメラマウスでは、ES細胞の寄与率が低い傾向が認められた。この観察は、胚盤胞においては、ES細胞が生殖細胞を含む多くの組織に寄与し得るほど取り込まれていないことを示唆するものであった。また、8-Mと 5.5×10^6 cells/mlのES細胞濃度の組み合わせで共培養し、桑実胚を移植した場合に、最も高い率(60%; 6/10)でキメラマウスが得られたが、6例のキメラのうち4例は離乳に至る前に死亡した。以上の成績から判断すると、8-Mにおいては低いES細胞濃度では接着するES細胞数が少ないので、胚は高率に胚盤胞へと発生するが、高濃度のES細胞との共培養では接着するES細胞数が多くなるために、胚盤胞への発生が妨げられるものと考えられ、また、8Cにおいては、ES細胞濃度にかかわらず胚は多くのES細胞と接着するために、胚盤胞への発生が低率であったと考えられた。

そこで、コンパクション前の胚は、コンパクション開始後の胚よりも、多数のES細胞が接着し得るか否かについて、直接的な証拠を得るためにES細胞の濃度が 5.5×10^5 cells/mlの条件で、共培養開始後1時間および3時間におけるES細胞の接着数を8Cおよび8-M胚を用いて比較検討した。その結果、いずれの時間においても、ES細胞の接着数は、8Cと8-M胚との間に差は認められないものであった。しかしながら、8C胚に多数のES細胞が接着した場合、胚盤胞への発生率は有意に減少したが、8-M胚においては、ES細胞の接着数にかかわらず、胚盤胞への発生率に差は認められなかった。

これらの成績は、コンパクション前の胚は、ES細胞の接着によって着床前の発生が影響を受けることを明確に示しており、8C胚由来の桑実胚の移植によって高率にキメラマウスが得られる原因のひとつは、ES細胞に対する接着性の問題よりもむしろ、多数のES細胞の接着に起因する胚発生の遅延であると結論付けられる。

むすび

従来、ES細胞と初期胚とのキメラ胚の作成には、培養中のES細胞をマイクロマニプレーターを用いて、胚盤胞の胞胚腔内に注入する方法が取られてきた。この方法は、高価な機材と熟練した技術を必要とするばかりでなく、注入前にフィーダー細胞の準備やES細胞の培養に5~7日間を要する。上述のように、凍結融

解直後のES細胞と透明帯除去胚との共培養によるキメラ作出法は、操作が簡便であり、実験に要する期間も大きく短縮することが可能である。さらに、効率良くキメラマウスを得るために、移植時における胚の選別が可能であるので、受容雌の数の削減も図ることができる。今後、トランスジェニック動物の作成においては、遺伝子工学的技術の開発のみならず、生殖工学的手法を駆使した胚の初期発生過程の制御により、一層の作出効率の向上が図られるものと考えられる。