

実験動物マウスリソース 事業の進捗

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・実験動物開発室
吉木 淳

はじめに

2018年4月1日より国立研究開発法人理化学研究所(理研)は第四期中長期計画を開始しました。バイオリソースセンター(写真1)は、バイオリソース研究センター(BioResource Research Center: BRC)と改称し、世界最高水準のバイオリソースの収集・保存・品質管理・提供を行うとともに、バイオリソースの利活用に資する研究開発を推進します。バイオリソースは生物遺伝資源とも呼ばれ、生命科学の研究開発において必要不可欠な研究材料です。理研BRCは研究コミュニティの要望を受けて2001年に設立され、2002年度からは文部科学省(2015年度より文部科学省/国立研究開発法人日本医療研究開発機構:MEXT/AMED)のナショナルバイオリソースプロジェクト(National BioResource Project: NBRP)^[1]の中核機関として選定され中心的な役割を果たしています。理研BRCでは、バイオリソースの中で最も重要な実験動

物マウス、実験植物シロイヌナズナ、ヒトおよび動物由来の培養細胞株、遺伝子材料、微生物およびこれらのバイオリソースに付随する特性情報の整備を実施しています。本稿では、理研BRCで進めている実験動物マウスの整備計画やその進捗をご紹介します。

社会ニーズ・研究ニーズに応える品揃え

マウスは近交系、ゲノム情報、ゲノム改変技術の開発・整備ならびに疾患研究の膨大な知見の蓄積等、科学的な利点に加え、時間・コストの面でも優れた哺乳類モデル生物です。特に、脳・神経、発生・再生、免疫等の研究分野では、個体レベルの高次生命現象の理解が必要です。癌・認知症・生活習慣病等の疾患発症の分子機構の解明ならびに治療法の開発にもモデル動物が欠かせません。今日の超高齢社会や精密医療に向けた社会ニーズ・研究ニーズに応じて、高次生命現象の理解ならびに疾患克服の研究・開発に必

要な系統の拡充を目指し、最先端ゲノム編集や遺伝子発現制御技術を用いて開発されたマウス系統を収集しています。例えば、次世代型アルツハイマー病モデル^[2]、オートファジー関連系統^[3]、iPS細胞の樹立系統^[4]、細胞周期可視化Fucciマウス^[5]、ゲノム多様性の研究に有用なMSM/Msをはじめとする野生マウス由来系統^[6]等、世界トップレベルの研究によって開発された我が国独自の品揃えを進めています。中でも、西道隆臣博士および齋藤貴志博士ら(理研・脳科学総合研究センター)により開発されたC57BL/6-*App*^{tm3 (NL-G-F) Tcs/TcsRbrc} (RBRC06344)系統は、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の一つである*App*遺伝子に患者で発見されたSwedish変異(NL)、Iberian変異(F)およびArctic変異(G)をノックインした次世代型アルツハイマー病モデルマウスで、患者のアミロイド病理をよく再現し^[2]、アルツハイマー病の予防・治療研究の標準モデルとして世界中から多数のリクエストを受けています。

微生物学的品質管理

動物実験を含む研究開発では、実験結果の再現性の確保が最重



写真1

要課題となっています。そのためには、実験動物の厳格な品質管理が必要です。民間ブリーダーの供給するマウスの微生物学的品質はSpecific-Pathogen-Free (SPF)として高度に維持されています。国内研究機関から多数のマウス系統の寄託を受けて、保存・提供する理研BRCにおいても、利用者に提供するマウスの微生物学的品質については、実験再現性の確保のため厳格に管理し、検査実施項目と検査結果を公開しています。まず、大学や研究機関から寄託されたマウスは検疫施設で受入れ検査を実施し、帝王切開または胚移植により清浄化してバリア施設へ導入しています。自家検査によれば、寄託マウスの約50%が腸管内原虫や蟻虫に汚染しているため、清浄化操作は不可欠です。バリア施設では個別換気ケージによる飼育と囲マウス・汚れ床敷を用いた定期検査により病原微生物を監視しています。対象病原微生物によっては維持系統のマウスから直接試料を採取して囲検査を補完しています。

遺伝的品質管理

遺伝的品質管理については、系統の種類あるいは遺伝子変更の方法に応じて検査項目を設定しています。リソースセンターには、同じ蛍光蛋白遺伝子と異なるプロモータを連結した融合遺伝子を有する系統が多数保存されています。それらを識別可能なPCR検査が不可欠です。例えば、トランスジェニックマウスについては、トランスジーン特異的なPCRプライマーにより、プロ

モータとその制御下で発現する遺伝子を検出するPCR検査を行います。ノックアウトマウスについては、*neo*遺伝子や*lacZ*遺伝子などのマーカー遺伝子のみの検出では系統の識別が困難なため、標的遺伝子特異的なPCRプライマーを設計して検査します。さらに、すべての遺伝子改変マウスを対象としたKOサーベイ検査は、他の遺伝子組換えマウスとのコンタミがないことを確認するための検査です^[7]。異なる遺伝子組換えマウス同士を交配後の子孫で、意図しない遺伝子の残存を検出することもできます。さらに、コンディショナル系統として必要な構造を確認するloxP/FRT検査やマイクロサテライトマーカーまたはsingle nucleotide polymorphism (SNP)マーカーを用いたPCRによる遺伝背景検査も必要に応じて実施しています。今後もマウスリソースの国際ハブ機関として、世界最高水準の品質を目指し、実験再現性の確保に貢献します。

付加価値向上

多くの研究者は文献情報から特定の系統にアクセスしています。マウス系統の利用価値は文献情報が豊富なほど高く、また、ゲノム情報、遺伝子発現情報や表現型情報の充実により利用しやすくなります。利用が増えるとともに文献情報や付随情報が増えるというポジティブサイクルに繋がります。利用者の皆様には成果論文のフィードバックをお願いしていますが、利用者ご自身からのご連絡は残念ながら極めて

少ないのが現状です。そこで、理研BRCではGoogle Scholarのアラート機能などを利用してウェブ上に公開された論文中から理研BRCから提供したマウスを検索して利用者の成果の収集に努めています。これまでに800編超のハイ・インパクトな研究論文が発表されています。こうして収集した文献情報は理研BRCのウェブカタログに掲載しているほか、NBRPの情報センターが整備する論文成果のデータベースResearch Resource Circulation (RRC)からも公開されています。

理研BRCのマウス表現型解析開発チーム(田村勝チームリーダー)で整備している疾患表現型解析プラットフォーム^[8]も系統の特性情報の充実に大きな役割を果たしています。この表現型解析プラットフォームは国際マウス表現型解析コンソーシアム(International Mouse Phenotyping Consortium: IMPC)^[9]との連携により構築され、400項目に及ぶ健康・疾患に関わる検査項目が含まれています。国際連携により世界18機関で再現性の高い検査項目とプロトコルを確立して公開しています。個別研究では、実験操作の影響の評価は、研究者が専門とする特定の組織・臓器に限られます。それぞれの遺伝子は異なる組織・臓器において時空間特異的な働きをしているため、網羅的な解析プラットフォームにより個々の遺伝子の機能や薬効を総合的に評価することができます。

NBRPの各プログラムとの連携

実験動物マウスリソースの整

備はNBRPの中核的拠点整備プログラムの中核機関として実施しています。NBRPには、各中核機関が収集・保存・提供するバイオリソースについて、ゲノム情報を整備することにより、付加価値の向上をはかり、我が国のバイオリソースの独自性・先導性を高めることを目的として行う「ゲノム情報等整備プログラム」があります。今日、より精度の高いゲノム情報の整備は、正確なゲノム編集を行うためには必須の要件です。また、各バイオリソースの収集、増殖、品質管理、保存、提供等に係わる技術開発を行う「基盤技術整備プログラム」もあります。最近では下記のNBRPプログラムとの連携によりマウス系統の付加価値や品質管理技術の向上を進めています。

【ゲノム情報等整備プログラム】

- H28年度「1分子リアルタイムDNAシーケンサーによるMSM/Ms系統のリシーケンスと公開」課題管理者 高田 豊行 国立遺伝学研究所
- H27年度「1分子長鎖再解読に基づく標準マウスゲノム配列および構造決定と公開」課題管理者 権藤 洋一 理化学研究所

【基盤技術整備プログラム】

- H28年度「ゲノム編集による難治疾患モデル整備のための基盤技術開発」課題管理者 吉木 淳 理化学研究所
- H26年度「Cre-driverマウスリソースの質の向上を目指したCre-loxP遺伝子組換えアトラ

ス化」課題管理者 杉山 文博 筑波大学 生命科学動物資源センター

国際ハブ機能

マウスリソースの国際ハブ機関として、国際マウス系統データベース(International Mouse Strain Resource:IMSR)^[10]にわが国の研究者が開発したマウス系統を登録し、世界に発信しています。IMSRは世界のマウスリソースのウェブ・ワンストップショップです。遺伝子名で系統を検索すると世界中のマウス系統が一覧でき、保有機関のサイトへ飛んで注文できる仕組みです。理研BRCはこれまでに海外39ヶ国800機関にマウスを提供しています。研究者個人で海外のリクエストに応えることは大きな負担です。理研BRCにマウスを寄託すれば、海外からの問い合わせメールを転送するだけで、そうした負担から解放され、研究に専念できます。また、ほとんどの系統は凍結精子や凍結胚として保存されているため、理研BRCでは、海外の凍結リソースを個体化する技術支援を国内の研究者に提供しています。

また、IMPC^[9]に参画し、全蛋白質コード遺伝子のノックアウトマウス系統の作製・保存・表現型解析・提供の計画を分担しています。研究者にノックアウトマウスと世界標準の疾患表現型データを利用可能とすることで、遺伝子機能の総合的な理解に基づく疾患研究の基盤構築^[11, 12]と医療のイノベーションに貢献する計画です。これまでに、7,400超の遺伝

子のノックアウトマウスを作製・保存し、5,700遺伝子のノックアウトマウスの表現型解析が国際連携で実施され、6,100万データポイントに及ぶ多次元データセットがホームページから公開されています。

さらに、理研BRCと南京大学 Model Animal Research Center (MARC)は、アジアの若手研究者と技術者を主なターゲットに国際マウスワークショップを共同開催しています。第1回は2012年8月27日～29日に理研BRCがホストとなり、つくばで開催し、以後毎年、南京大学MARCと理研BRCが交互にホストをしています。2017年からは韓国ソウル国立大学が参加しています。今年7月には、第7回マウスワークショップ“Humanized Mouse Models”を南京大学MARCで開催しました(写真2)。南京大学の大学院生を中心に中国から69名が研修生として参加し、講師には、南京大学、蘇州大学、吉林大学、上海生化学及び細胞生物学研究所、広州生物医学研究所の教授陣と理研BRCから8名の講師が参加しています。次回は、2019年8月26日(月)から28日(水)、“Precision modeling of human diseases in mice and cell resources”をテーマに理研BRCで開催予定です。年明けには詳しい予定をホームページからご案内し、受講生を募集しますので、奮ってご応募ください。

ゲノム編集マウスへの対応

2013年に発表されたCRISPR/



写真2

Cas9を用いたゲノム編集技術^[13]によりノックアウトマウスの作製が簡便になり、この2～3年で寄託されるゲノム編集マウスが急速に増加しています。IMPCでも各遺伝子のノックアウトマウスの作製は、相同組換えES細胞を用いて開始していましたが、全遺伝子のノックアウトを目標とする大型プロジェクトの中では、ゲノム編集の簡便性とコスト優位性、作製期間短縮のメリットは圧倒的となりました。2014年からパイロット実験を重ね、現在では理研BRCを含めすべてのIMPC生産拠点でCRISPR/Cas9を用いたノックアウトマウス生産が行われています。一方、簡便性かつ迅速な作製法であるため、大量に作製され十分な品質管理が行われないまま研究コミュニティに溢れるのではないかと懸念もあり、2014年にはマウスリソース機関の国際会議がミュンヘンで開催され、マウスリソース機関が厳格な品質管理を行うことで一致しました^[14]。

理研BRCでもゲノム編集マウスの収集・保存にあたっては、初代ゲノム編集マウスのお大半がモザイク個体であり、実験再現性に

問題があるため、2世代目以降の系統化済みマウスを受入れること、編集部位のシーケンス情報は必須であること、チェックリストを用いて寄託者から正確な情報を収集すること、簡便な凍結精子保存を基本とすることなど、基本方針を定めています。最近では、当初問題視されていたオフターゲット編集は大きな問題にならないこと^[15]、ゲノム編集が正確に行われているか切断部位を中心に広範なゲノム領域の変異の有無の確認が必要であること^[16]など、遺伝品質に関する重要な報告がされています。

今後のマウスリソース整備について

ゲノム編集技術の進展が大きな鍵になると思われます。患者さんのゲノム情報の解読が先行し疾患の原因遺伝子の候補が多数あり、個体レベルの検証が求められています。理研BRCでは新規に次世代ヒト疾患モデル開発研究チーム(天野孝紀チームリーダー)が設置され活動を始めています。内外の疾患研究コミュニティとの連携を深めて新しいモデルの整備を行う計画です。IMPCでは、既に全蛋白コード遺

伝子のノックアウトが進行し、稀少疾患の研究コミュニティとの連携も進んでいます。さらに、非コード領域のゲノム機能の個体レベルでの解明についても議論されています。ゲノム編集技術の改良は急速に進んでいるため、より複雑なゲノム改変が自在にできる日も遠くないものと思われます。再現性あるリソースの整備を常に念頭に、技術の進歩を先取りして新たなニーズに常に応えられるマウスリソースの整備に努めてまいります。

謝辞

当事業をご支援いただいている研究コミュニティの利用者の皆様に深謝申し上げます。実験動物開発室の職員の皆様のご協力ならびに小幡裕一センター長のご助言・ご指導に感謝いたします。

参考文献とURL

1. <http://www.nbrp.jp/>
2. Saito T *et al.* Nature Neurosci 17, 661-663 (2014)
3. Mizushima N *et al.* Mol Biol Cell 15, 1101-1111 (2004)
4. Okita K *et al.* Nature 448, 313-317 (2007)
5. Sakaue-Sawano A *et al.* Cell 132, 487-498 (2008)
6. Takada T *et al.* Mamm Genome 26(7-8):331-337 (2015)
7. Nakata H *et al.* Exp Anim 58, 437-442 (2009)
8. http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/business/pipeline.html
9. <http://www.mousephenotype.org/>
10. <http://www.findmice.org/>
11. Dickinson ME *et al.* Nature 537, 508-514 (2016)
12. Meehan TF *et al.* Nat Genet 49, 1231-1238 (2017)
13. Wang H *et al.* Cell 153(4):910-918 (2013)
14. Nature 509, 399 (2014)
15. Nutter LMJ *et al.* Nat Methods 15(4):235-236, (2018)
16. Kosicki M *et al.* Nat Biotechnol 36(8):765-771 (2018)