

表 題 胚性幹細胞を利用した病態モデル動物の作製に関する研究

論文の区分 論文博士

著 者 名 山本智

所 属 武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 基盤技術研究所
自治医科大学 医学部 生化学講座 機能生化学部門

2014年10月15日申請の学位論文

紹 介 教 員 生体分子医学専攻 分子生化学専攻科
職名・氏名 教授 遠藤仁司

目次

第1章 序論	2
第2章	
Y染色体上にGFPを有するTgマウスを使用したXO ES細胞の選択	7
第1節 はじめに	7
第2節 材料と方法.....	8
第3節 結果	12
第4節 考察	19
第3章	
複雑な遺伝背景を有したマウスを用いたKOマウスの作製.....	21
第1節 はじめに	21
第2節 材料と方法.....	22
第3節 結果	27
第4節 考察	30
第4章 総合討論	32
謝辞.....	37
引用文献	38

第1章 序論

病態モデル動物とは、医学研究においてヒトの病態に類似した性質を示す動物を言い、病因の解明や治療・予防のモデルとして使用されている。酵母、線虫、ショウジョウバエ、魚類、小型哺乳類、大型哺乳類など多くの種が利用されているが、中でもマウス(*Mus Musculus*)およびラット(*Rattus Norvegicus*)は100年以上の間、その中心を担ってきた。その理由として、小型で飼育が簡便であること、世代交代が早いこと(1世代3ヶ月)、遺伝子のほぼ99%がヒトの遺伝子と共通していること (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) が挙げられる。

病態モデル動物は、実験的発症モデルと自然発症モデルに大別される。前者は『主として正常な動物を対象に、種々の実験的処置を加えてヒトに類似した病態を人為的に作出しようとするもの』、後者は『動物に自然発症する病態に注目して、ヒトとそれとのアナロジーを求め、ヒト疾患の病態解明、治療、予防に役立たせようとするもの』と定義されている (米川, 2004)。

実験的発症モデルは更に遺伝子に変化を与えるものと変化を与えないものに分類される。遺伝子に変化を与えない手法には、病気を誘引する薬剤または食餌を投与する方法や外科的手術がある。例えばストレプトゾトシン投与による1型糖尿病モデルや食事誘導性肥満モデル、冠動脈結紮手術による心筋梗塞モデルが挙げられる。この方法の利点は、大量に入手できる正常な動物を購入して、任意の数の動物を比較的短期間に作出できることである。一方で、遺伝子に変化を与える手法は、発生工学技術を用いて人為的に疾患に関連する遺伝子(ゲノム)を改変する方法である。

遺伝子を改変する発生工学技術は、トランスジェニック(Tg)マウス作製法の開

発 (Palmiter et al., 1982)、マウス胚性幹細胞(ES 細胞)の樹立 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) およびそれに続く標的遺伝子改変マウスの作製法の開発 (Thomas and Capecchi, 1987)、ヒトおよびマウスの全塩基配列の決定 (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001; Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) によって、マウスを中心にして、この 30 年間で劇的な発展を遂げた。近年ではゲノムワイド関連解析(GWAS)、マイクロアレイ、全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIPseq)、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)などにより多因子疾患の発症関連遺伝子が数多く明らかにされており、ヒトの病態への外挿性を向上させるために、これらを応用した病態モデル動物の作製がこれまで以上に盛んになることが予想される。また、その作製方法においてもゲノムを操作する新しい技術として Zinc Finger Nucleases (ZFNs) (Geurts et al., 2009) や Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) (Tesson et al., 2011)、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated (CRISPR/Cas) system (Wang et al., 2013) に代表されるゲノム編集技術や transposon-tagged mutagenesis (Kitada et al., 2007) などの革新的な技術が開発されたことによってマウスだけでなくラットを含む幅広い種で遺伝子改変動物の作製が可能となっており、この 10 年の病態モデル動物作製を取り巻く環境の変化は特に目覚ましい(図 1)。

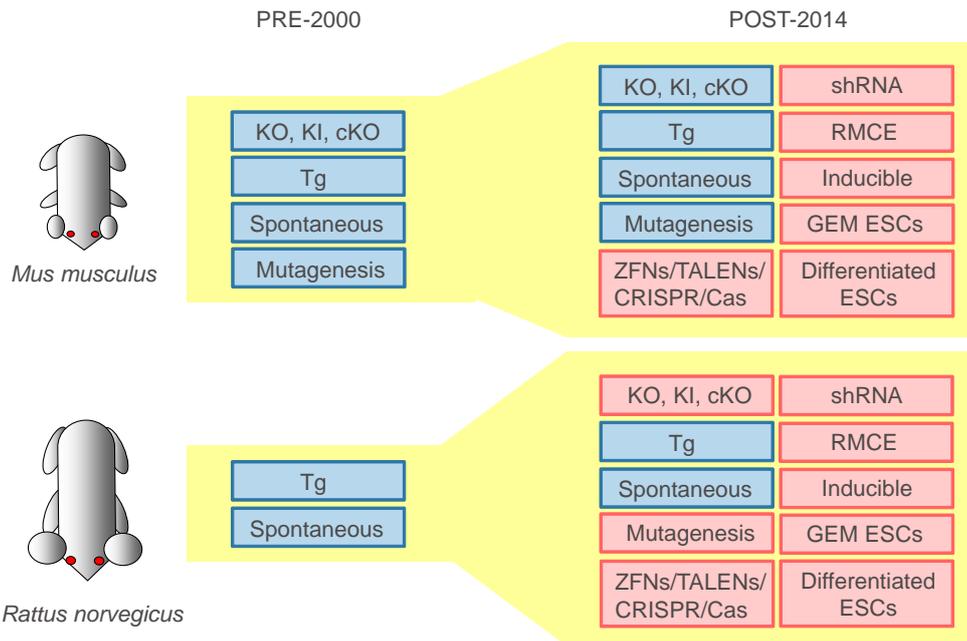


図1 マウスおよびラット病態モデル動物作製の発展 (Dow らの文献より改変)

マウス、ラットの遺伝子操作を行うためにこの14年間で利用可能となった技術を赤枠で示した。Tg: transgenic, KO: knockout, KI: knock-in, cKO: conditional knockout, RMCE: recombinase-mediated cassette exchange, GEM ESCs: genetically engineered organisms-derived ES cells

とりわけゲノム編集技術は簡便さとノックアウト効率の高さから単純な標的遺伝子欠損(Knockout; KO)動物を作製する方法として急速に拡大しており、その報告前までは主流であったES細胞を用いた遺伝子改変動物の作製方法に変わって台頭してきている。しかしながら、それぞれの手法には利点および欠点が存在することから状況にあわせて使い分けることが重要である。すなわち、ゲノム編集技術は短期間かつ低コストであり、受精卵培養技術が確立しているマウス・ラットにおいてはすべての系統に応用できるという汎用性の高さを有している一方で、類似配列が切断されてしまうオフターゲットの影響が指摘されている (Fu et al., 2013)。また、コンディショナル KO や標的遺伝子置換 (Knock-in; KI)マウスの報告はあるものの (Yang et al., 2013; Wefers et al.,

2013; Hermann et al., 2012; Cui et al., 2011; Meyer et al., 2010)、一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)を利用した方法を除いては未だ実用的ではないという現状がある。ES細胞を用いた遺伝子改変動物の作製方法については後述する問題があるものの蓄積データの多さと標的配列の自由度の高さが利点である。

表1 標的遺伝子欠損動物作製技術の比較

Technology	Production term (vector to F1 hetero)	Application (KO/KI/CKO)	Vector construct	Target sequence	KO efficiency (zygote)	Strain	Remarks
ES cells	8-10 mo.	KO / KI / CKO	Established	Almost all	Depend on strain	Limited	
ZFNs	4-6 mo. (7-9 mo.)	KO (KI?)	Very difficult	Limited	Good	Almost all	Mosaicism of F0 offspring /off-target
TALENs	4-6 mo. (7-9 mo.)	KO (KI?)	Easy	Limited (better than ZFNs)	Good	Almost all	Mosaicism of F0 offspring /off-target
CRISPR/Cas	2-4 mo. (5-7 mo.)	KO/ (KI?) / CKO	Very easy	Limited (better than ZFNs)	Very Good	Almost all	Mosaicism of F0 offspring /off-target /multiple mutation

ES細胞は初期胚もしくは胚盤胞の内部細胞塊から単離され、多能性と自己複製能を有する。適切な培養条件下において胚を構成するすべての細胞に分化する能力を維持しながら素早くかつほぼ無限に増殖する。ES細胞を胚盤胞へ注入する方法でキメラマウスを作製すると、高い効率でES細胞が生殖細胞に分化し、キメラマウスを交配することによりES細胞由来の産仔を取得することが可能である。このような特性と遺伝子ターゲティング技術を組み合わせることによりKOマウスやKIマウスの作製が可能となった (Capecchi, 2005)。近年では、KOマウス作製の外部サービスや様々な施設からの提供サービスが利用可能になっており、多くの研究者がそれらを手軽に利用できる状況になっている。さらには、国際的なKOマウスプロジェクトにより、20000あると言われている遺伝子の大部分を網羅するKOマウスライブラリーが確立されつつあ

る ([International Mouse Knockout Consortium, 2007](#); [Feero et al., 2010](#))。このような研究基盤の整備により、遺伝子改変動物を用いた実験は生命現象の解析、医薬品の開発に必須となっている ([Zambrowicz et al., 2003](#); [McNeish et al., 2004](#))。

しかしながら、ES 細胞を介した標的遺伝子改変動物の作製には 3 つの問題点がある。第一の問題点は、作製に多大な時間と労力が必要となることである。例えば、KO マウス作製の外部サービスを利用した場合、一つの遺伝子を単純に欠失するためには\$30,000 から\$100,000 の費用がかかり、ほぼ一年の歳月が必要である。作製から実際の試験に使用するためには繁殖も必要であり、通常は試験までに一年半から二年の月日を要することになる。第二の問題点は、遺伝背景の変化による表現型への影響である。標的遺伝子改変マウスは作製された施設によって用いられた ES 細胞の遺伝背景が 129 系統や C57BL/6 系統、交雑系統などと多様である。交配後、遺伝背景が変化し、しばしば表現型解析の結果を複雑にすることが知られている。第三の問題点は、生殖系列移行能を有する ES 細胞に限られたマウスの系統でしか樹立されていないことである。そこで、本研究では、第一の問題点の解決のため、Y 染色体上に GFP 遺伝子が位置する Tg マウスから ES 細胞を樹立し、雄特異的な蛍光を指標として一株の雄性 ES 細胞から雌雄の ES 細胞クローンを効率的に取得する方法を開発した (第 2 章; [Yamamoto et al., 2014](#))。また、第二、第三の問題点の解決のため、多遺伝子変異および複雑な遺伝背景を有するマウスから生殖系列移行能を有する ES 細胞を樹立し、KO 動物を作製することにより問題の改善を検討した (第 3 章; [Yamamoto et al., 2013](#))。

第2章 Y染色体上にGFPを有するTgマウスを使用したXO ES細胞の選択

第1節 はじめに

KOマウスを作製するには多大な時間と労力が必要である。なぜなら、KOマウス作製には以下のステップを必要とするからである。(1) ターゲッティングベクターの作製(1-2ヶ月)、(2) ES細胞での相同組換え(1-2ヶ月)、(3) 相同組換えES細胞からのキメラマウス作製(1-2ヶ月)、(4) キメラマウスから標的アレルを有するヘテロ欠損マウスの取得(4ヶ月)、(5) 交配によるホモ欠損マウスの作製(4ヶ月)。これらのステップの中でもとりわけ(4)と(5)において、マウスの成長を待つ必要があることから多くの時間を必要とする。作製時間を短縮するための解決策の一つとしてステップ4において完全にES細胞由来のF₀産仔を作製することが可能である四倍体補完法が広く応用されている (Nagy et al., 1990)。ステップ5については、変異アレルをES細胞内でホモにするために Bloom's syndrome gene の応用 (Horie et al., 2011) や雄性の半数体ES細胞を利用する方法 (Yang et al., 2012) が報告されている。しかしながら、これらの方法は雄しか作製することができないという問題点がある。すなわち、これは次世代を作製する際に、ヘテロ欠損の状態へ戻る必要があることを意味する。

マウスES細胞において、自然発生的に1-3%の頻度でY染色体が脱落し、39, XOの細胞が出現する (Eggan et al., 2002; Kobayashi et al., 2004)。ヒトにおいて、X染色体のモノソミー(45, X)はほとんどの場合、胎児の段階で自然流産する。また、生存した女性はターナー症候群として知られており、不妊である (Sybert et al., 2004)。一方で、マウスにおいて、XO個体は正常に発生し、妊性を有することが知られている (Russell et al., 1959)。この現象に基づいてEgganらは40, XYの雄性ES細胞から39, XO ES細胞のサブクローンを単離し、

それぞれの ES 細胞クローンから四倍体胚補完法によって産仔を作製することによって、一つの標的遺伝子改変 ES 細胞クローンから雄と雌を作製することに成功した (Eggan et al., 2002)。これらのヘテロマウスを intercross することによってホモ変異マウスを作製可能であり、雌雄ヘテロマウスを作製するための outcross を回避することによる大幅な作製期間の短縮が可能となった。39, XO ES細胞を単離するためには限界希釈とサザンブロット法による Y 染色体の検出が必要であり、着床前の胚や ES 細胞で性別を判定するには一般的に、胚もしくは細胞の一部をサンプリングして PCR、Barr 小体の染色、核型検査を行う。これらはすべて侵襲的であり、労力を必要とし、しばしば間違いも生じる。非侵襲的な方法としては Hadjantonakis らが X 染色体上に GFP を有するマウスを利用して XX と X^{GFP}Y の交配によって蛍光を示さない雄を判定可能であることを報告している (Hadjantonakis et al., 1998)。

そこで、本研究では C57BL/6J マウスの受精卵前核へマイクロインジェクションすることによって Y 染色体上に GFP を有する Tg マウス(Y-GFP マウス)を作製した。Y-GFP マウスにおいては、明確に光る雄と光らない雌による非侵襲的な性判定が可能である。本研究では、Y-GFP マウスから ES 細胞を樹立し、その特性を応用することによって Y 染色体の脱落した 39, XO ES 細胞を簡便に区別する方法を確立した。

第 2 節 材料と方法

実験動物

マイクロインジェクションに用いる前核期胚のための雌雄 C57BL/6J マウス、Mouse embryonic fibroblast (MEF) 作製のための妊娠 C57BL/6J マウス、胚移植用偽妊娠親の作成に用いる雌性 ICR マウスおよび精管結紮した同系統の雄性

マウスは日本クレア (Tokyo, Japan) から購入した。すべての動物は、使用時まで自治医科大学実験医学センターにおいて、12 時間サイクルでの照明調節の条件下で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。すべての動物実験は、自治医科大学動物実験委員会の承認を受けた上で、動物実験指針に則って行った。

Tg マウスの作製

Tg マウスは以前記述された標準的なプロトコールに従って作製した (Hogan et al., 1986)。Tg マウスの発現プラスミドを構築するために、強発現で熱安定な 2 つの変異を有する GFP 遺伝子(S65T/S147P)を、大阪大学宮崎教授より分与された pCAGGS 発現ベクター (Ichida et al., 2000; Niwa et al., 1991) へサブクローニングした。pCAGGS-GFP を *SaI* と *Bam*HI 処理後に DNA 断片を 1%アガロースゲルで分離、精製し、10mM Tis-HCl(pH7.5)、0.25mM EDTA で 500 コピー/μL の最終濃度へ溶解した。C57BL/6J マウスの受精卵前核へ DNA を注入後、偽妊娠 ICR マウスの子宮へ移植し、産仔を取得した。

培地およびフィーダー細胞

ES 細胞樹立培地として ES/KSR 培地 [17.5% KnockOut™ Serum Replacement (Invitrogen, Carlsbad, CA)、1% penicillin- streptomycin- glutamine (Invitrogen)、0.1mM MEM non-essential amino acids solution (Invitrogen)、1% β₂-mercaptoethanol (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)、1000 IU/mL ESGRO LIF (Millipore, Billerica, MA) を含む KnockOut™ D-MEM (Invitrogen)]を基礎培地として使用した。フィーダー細胞としてマイトマイシン C 処理をした MEF を用いた。MEF の培養には 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) を添加した KnockOut™ D-MEM 培

地を使用した。

Y-GFP 由来 ES 細胞の樹立および培養

雄性 Y-GFP マウスと雌性 C57BL/6J マウスの交配 3.5 日後に、二酸化炭素により安楽死させ、摘出した子宮を DMEM/10%FBS 培地で灌流し、胚盤胞を取得した。酸性タイロイド液 (Millipore, Billerica, MA) で透明帯を除去した後、ES/KSR 培地を分注した 4 穴マルチディッシュ (Nunc, Rochester, NY) のフィーダー細胞上へ 1 穴あたり 1 個ずつ移して培養を開始した。培養 5-7 日後に、伸長した栄養膜細胞上で直径 100 μm 程度に増殖した内部細胞塊 (inner cell mass, ICM) をマウスピペットで拾い上げ、パラフィンオイル (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で被った 5 μL の trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA) のマイクロドロップ中へ 1 個ずつ移し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間処理した。マウスピペットで FBS を少量加えてトリプシン反応を停止させた後、静かにピペッティングして細胞を分散した。分散した細胞をマウスピペットで吸引し、予め ES/KSR 培地を分注した 4 穴マルチディッシュのフィーダー細胞上へ播種した。播種 2-3 日後に形成された ES-like 細胞を trypsin-EDTA で処理し、コロニーの数に応じて 4 穴プレートあるいは 35mm ディッシュのフィーダー細胞上へ移し、継代した (継代数 1)。培地交換は継代時に行った。細胞の凍結にはセルバンカー (Juji field, Tokyo, Japan) を用いた。Y-GFP 由来 ES 細胞の蛍光確認には共焦点レーザー顕微鏡および実体蛍光顕微鏡を用いた。

セルソーティング

Trypsin-EDTA (Invitrogen) 処理後に phenol red を含まない DMEM 培地に懸濁することによって ES 細胞の単一細胞懸濁液を用意した。解離した細胞は

BD FACS Aria III cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) によって GFP 陽性細胞と陰性細胞へ分離した。

FISH 解析

脾臓リンパ球もしくは Y-GFP 由来線維芽細胞から染色体を準備し、プローブとして GFP DNA を用いて常法に従って解析を行った (Matsuda and Chapman, 1995; Liu et al., 1997)。

PCR による性判別

ES 細胞の性別は *Sry* および *Ube1X*, *Y* 遺伝子のダイレクト PCR 法により決定した。DNA の調整および PCR 反応は、REDEExtract-N-Amp kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) を用いて行った。PCR プライマーとして以下を用いた。 *Sry* Forward: 5' -AAG CGA CCC ATG AAT GCA TTC ATG GTG TGG T-3' , *Sry* Reverse: 5' -GAG GTC GAT ACT TAT AGT TCG GGT ATT TCT CTC TGT G-3'、 *Ube1XY* Forward: 5' -TGG TCT GGA CCC AAA CGC TGT CCA CA-3' , *Ube1XY* Reverse: 5' -GGC AGC AGC CAT CAC ATA ATC CAG ATG-3'。PCR 反応後の *Sry* の増幅産物は 214 bp, *Ube1X* の増幅産物は 217 bp、 *Ube1Y* の遺伝子断片は 198 bp であった。PCR 反応は製造者の指示に従って行った。

サザンブロット法による Y 染色体の検出

フェノールクロロホルム法によってゲノム DNA を抽出した。対照の雌雄サンプルは各性別の C57BL/6J マウスの腎臓からゲノム DNA を抽出した。サザンブロット法には 5 µg のゲノム DNA を使用した。 *EcoRI* で制限酵素処理した後、

1% アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後、ゲルをアルカリ変性、中和し、10x standard saline citrate (SSC)を用いてナイロン膜上 (GE Healthcare, Waukesha, WI) へ転写した。プローブは Y 染色体特有の繰り返し配列 (Bishop and Hatat, 1987; Bradbury et al., 1990) を検出するために以下のプライマーを用いて PCR によって合成した 1568 bp の増幅断片を使用した。Forward: 5' -AAT TCA TAT CCA ATG GTT AAC AGT C-3' , Reverse: 5' -CAT ATA TAT GAC AGA GGC AAC AGC-3'。プローブのラベリングおよび検出は DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Basel, Switzerland) を使用した。

第3節 結果

Y-GFP マウスの作製

F₀世代において、全身性の蛍光を有する 14 匹の founder マウスを選択した。驚くことに、そのうちの 1 系統は雄性でしか蛍光が観察されなかった。この系統の雄性 Tg と野生型の雌性 C57BL/6J の交配で得られた雄性産仔はすべて GFP 陽性であり、雌はすべて GFP 陰性であった。雄と雌は Y 染色体特異的な GFP 蛍光によって胚盤胞および E10.5 の胚で確実に見分けることが可能である (図 2)。FISH 解析によって GFP シグナルは雄性 Tg マウス由来の繊維芽細胞の Y 染色体上に検出された (図 3)。これらの結果から導入遺伝子である GFP が Tg マウスの Y 染色体上に局在していることが示された。

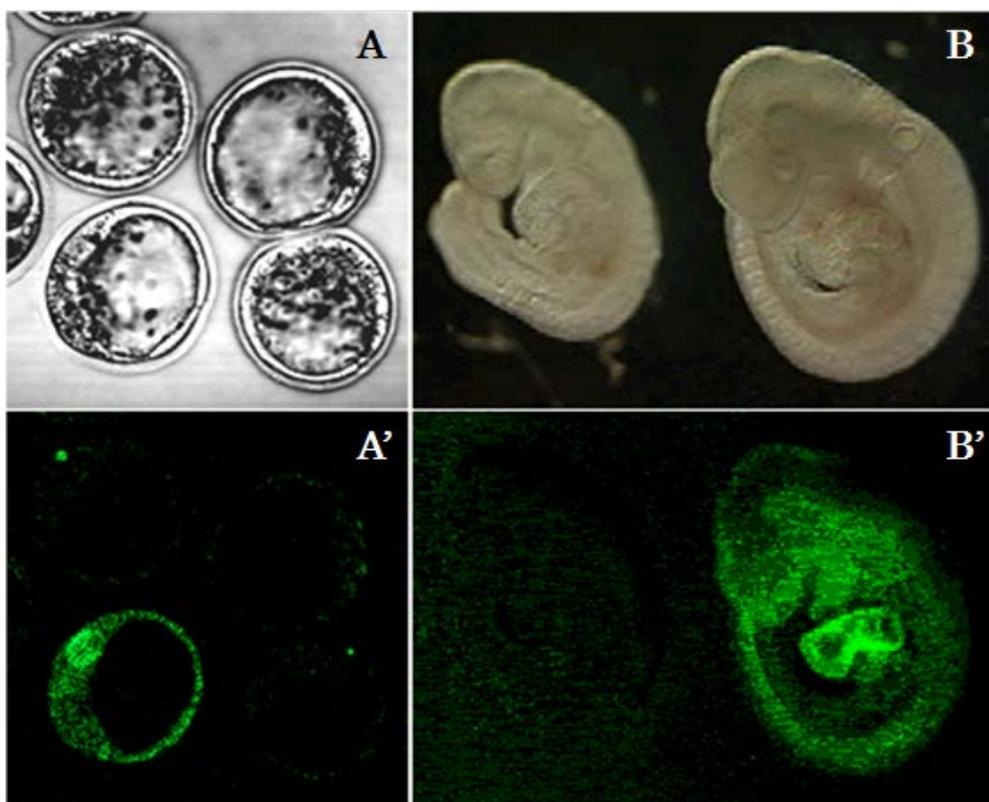


図2 着床前および妊娠中期の胚の GFP 蛍光による雌雄の判別

E3.5 の胚盤胞の共焦点顕微鏡像 (A, 明視野; A', GFP(緑)) および E10.5 胚の実体蛍光顕微鏡像 (B, 明視野; B', GFP(緑)).

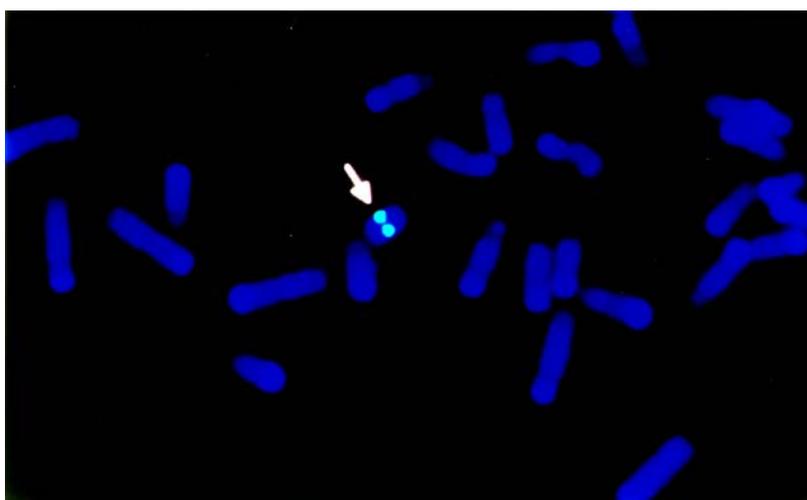


図3 Y-GFP マウスの FISH 核型解析

発現プラスミドの DNA 断片をビオチン化して用いた。矢印は GFP の導入遺伝子の位置を示す。

Y-GFP 由来 ES 細胞の Y 染色体脱落頻度

雄の ES 細胞を Y-GFP マウスの胚から樹立した。核型解析よりこの ES 細胞は 40、XY であった(data not shown)。Y 染色体脱落の頻度は共焦点顕微鏡下で蛍光を観察することによって確認した(図 4)。6cm dish に生やした 206 コロニー(継代数 3)のうち 11 コロニーが発光を消失しており、1.5%が部分的に蛍光を欠失していた。共焦点顕微鏡下で GFP 陰性クローン(#1)と陽性クローン(#16)を単離して培養した(図 5)。核型解析を行ったところ、#1 は Y 染色体を欠く 39、XO であり、#16 は 40、XY であった(図 6)。

単離した雄の 40、XY ES サブクローン(#16)を継代時に蛍光を観察したところ、最初の継代(P3+1)では Y 染色体の脱落はなかったが、3 回目の継代(P3+3)でおよそ 1.7%のコロニーで蛍光の消失が観察された(表 2)。

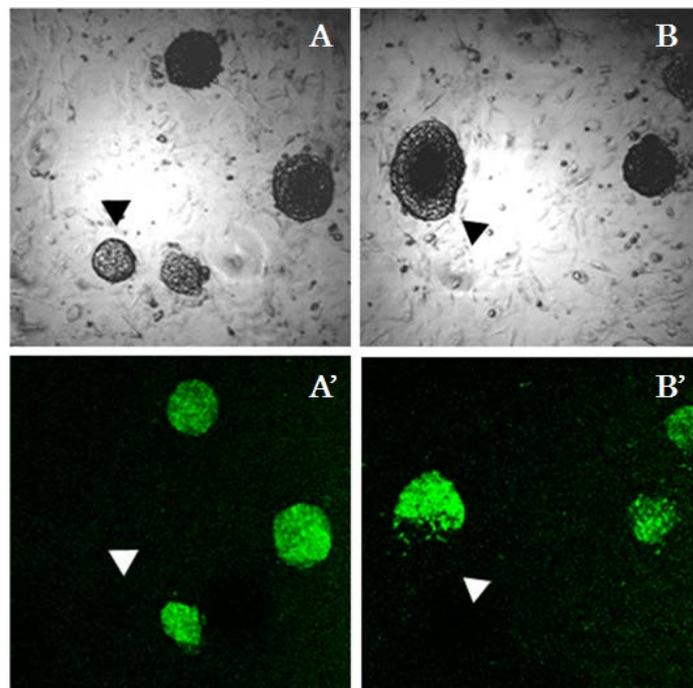


図 4 Y-GFP より樹立した ES 細胞の GFP 蛍光

矢印が GFP 陰性の ES 細胞コロニーを示す。蛍光を消失したコロニー (A, 明視野; A', GFP(緑))と一部の蛍光を消失したコロニー (B, 明視野; B', GFP(緑))。

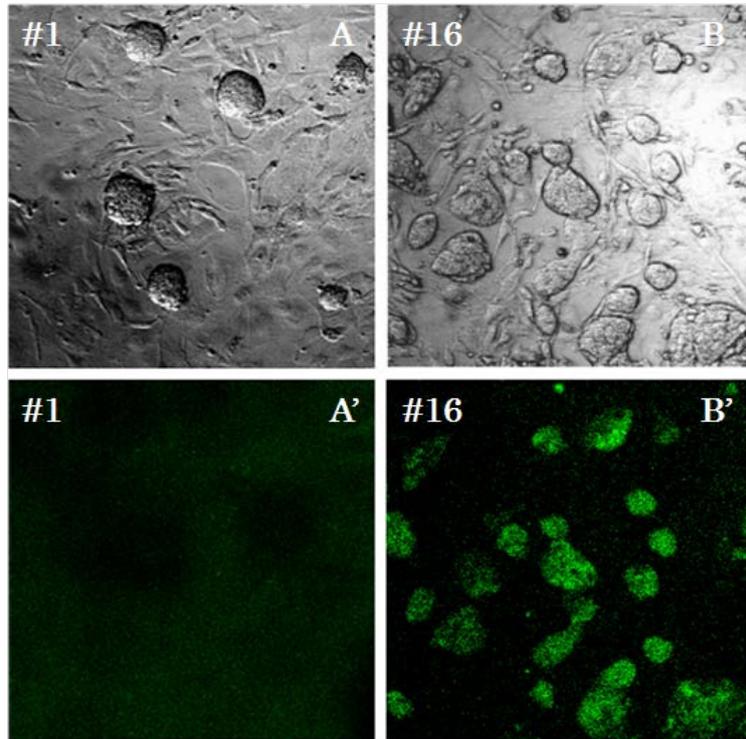


図5 単離培養した ES 細胞のサブクローン

GFP 陰性 ES 細胞コロニーより得られたサブクローン#1 (A, 明視野; A' , GFP(緑))と GFP 陽性 ES 細胞コロニーより得られたサブクローン#16 (B, 明視野; B' , GFP(緑))。

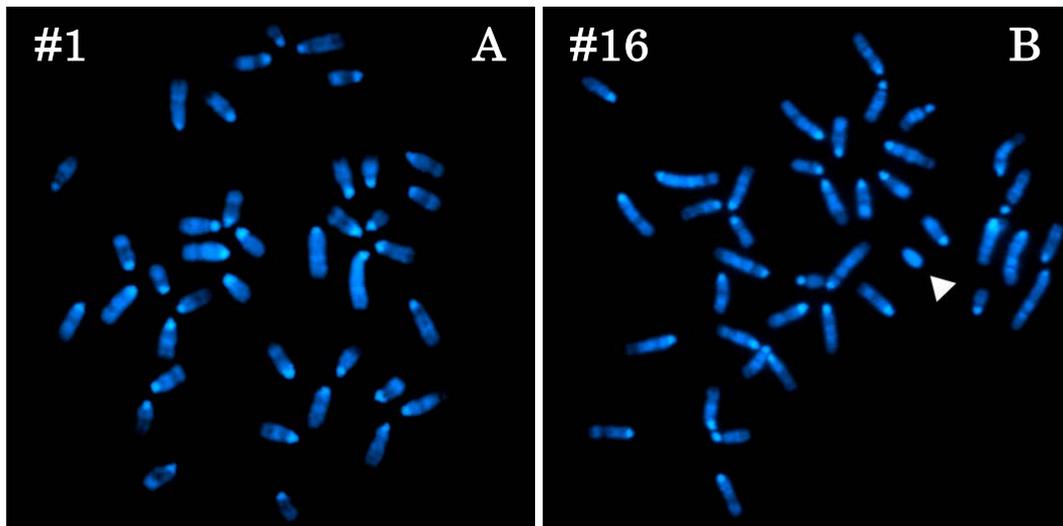


図6 単離培養した ES 細胞のサブクローンの核型解析

GFP 陽性 ES 細胞(#1)と GFP 陰性 ES 細胞(#16)の分裂中期の核型を示す。矢印が Y 染色体を示しており、GFP の蛍光が観察できない#1 においては Y 染色体が欠失している。

表 2 単離培養前後の Y-GFP 由来 ES 細胞クローンの GFP 蛍光

ES clone (passage nos.)	GFP (+)	GFP (-)	Partially lacked GFP	Total ES colonies
XY-ES (P3)	192 (93.2 %)	11 (5.3 %)	3 (1.5 %)	206 (100 %)
#1 cloned XO-ES (P3+1)	0 (0 %)	82 (100 %)	0 (0 %)	82 (100 %)
#16 cloned XY-ES (P3+1)	97 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	97 (100 %)
#16 cloned XY-ES (P3+3)	117 (97.5 %)	2 (1.7 %)	1 (0.8 %)	120 (100 %)

Y 染色体脱落 ES 細胞の選択

Y 染色体が脱落し、蛍光が観察されなくなった 39, XO の ES 細胞を効率的に選抜するために、フローサイトメトリーによって GFP 陽性 ES 細胞と GFP 陰性 ES 細胞を分別した。側方散乱および前方散乱により分別した ES 細胞を FITC により GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞の 2 つの集団に分離した(図 7A)。各集団について、再度、同様の作業を行うことにより、ソーティングした細胞の 99.5% 以上が同じ分画に存在することを確認した(図 7B, 7C)。次に、分別した細胞の Y 染色体の有無を確認するため、*Sry* および *Ube1X,Y* 遺伝子の検出(図 8A, 8B)、そしてサザンブロット法による Y 染色体の検出を行った(図 8C)。これらの結果は GFP 陰性 ES 細胞が Y 染色体を欠如していることを示した。さらに、我々はフローサイトメトリーにより継代に伴う常染色体と Y 染色体脱落頻度を比較した。常染色体脱落頻度を調べるために Ichida らが作製した GFP Tg マウスより樹立した ES 細胞を用いた (Ichida et al., 2000)。分別直後と 5 回の継代後に染色体の脱落を観察したところ、常染色体が 0.8%であったのに対し、Y 染色体では 2.9%の脱落細胞が含まれていた(図 9)。フローサイトメトリーによって観察した Y 染色体の脱落頻度は ES 細胞コロニーの単離試験で観察された脱落頻度と同様の傾向を示した。

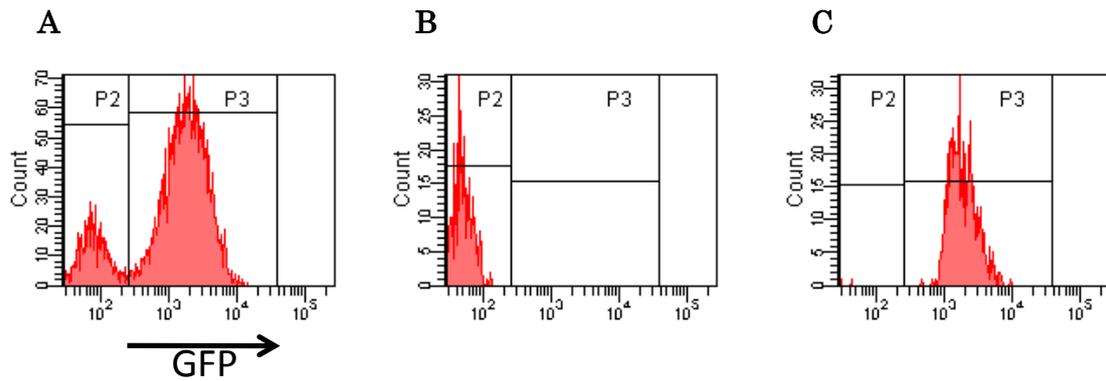


図7 フローサイトメトリーによる GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞の分離

GFP 陰性および陽性細胞はそれぞれ P2 領域および P3 領域から集められた。Y 軸は細胞数を X 軸は GFP の蛍光を示す。

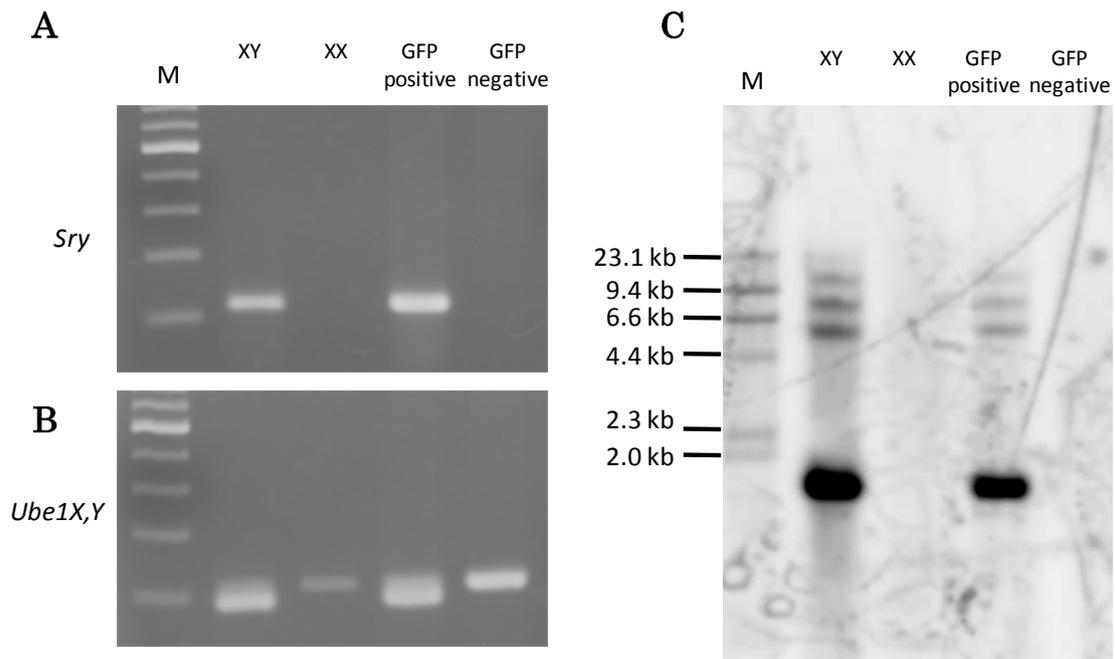
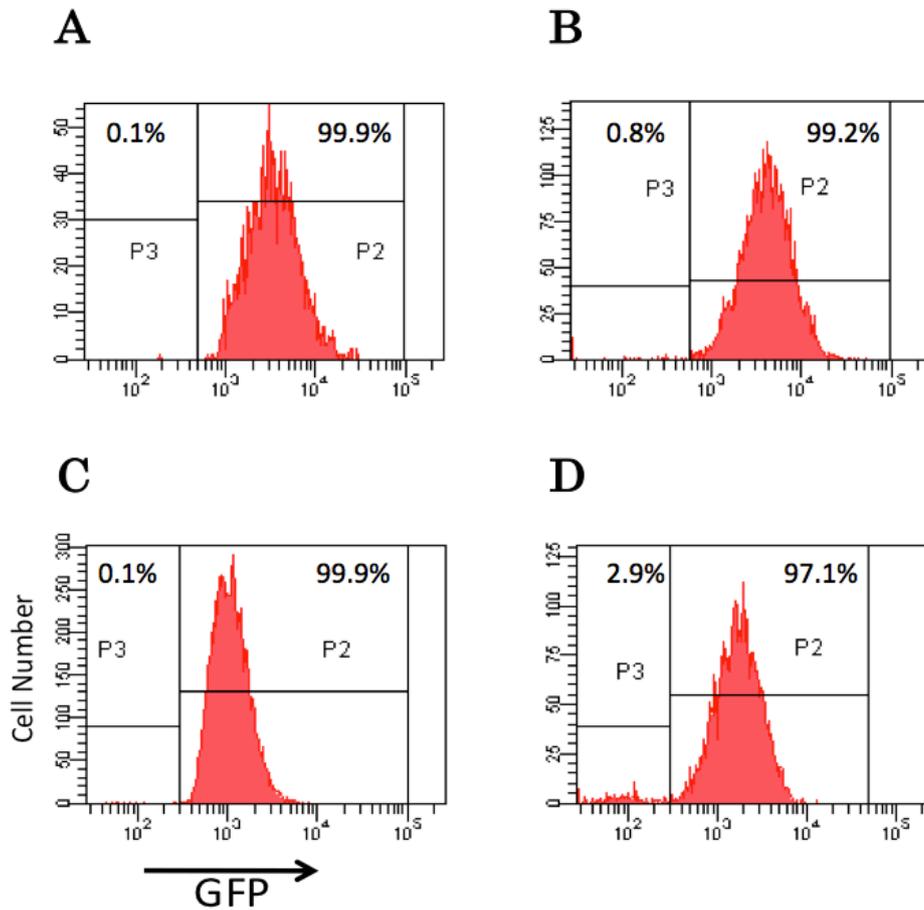


図8 Y染色体の検出

フローサイトメトリーによって分別した GFP 陽性細胞と陰性細胞の Y 染色体の有無を PCR およびサザンブロット法によって解析した。*Sry* 遺伝子(A)および *Ube1X,Y* 遺伝子(B)の PCR による遺伝子型解析、Y 染色体上のリピート配列を認識するプローブを用いたサザンブロット法による解析(C)はいずれも GFP 陰性細胞において Y 染色体を脱落していることを示した。M: 100bp ladder



ES cells from GFP-Tg mice	after sorting	GFP(+) cell counts (%)	GFP(-) cell counts (%)
Autosomal GFP	0 passage	1822 (99.9)	1 (0.1)
	5 passage	4397 (99.2)	36 (0.8)
Y-chromosomal GFP	0 passage	8526 (99.9)	10 (0.1)
	5 passage	3623 (97.1)	108 (2.9)

図9 常染色体 GFP Tg マウス由来 ES 細胞と Y-GFP 由来 ES 細胞における GFP 遺伝子の脱落頻度の比較

それぞれの ES 細胞をフローサイトメトリーにより GFP 陽性(+)と GFP 陰性(-)細胞に分離後、フィーダーレスで培養を行った。継代数 0 の常染色体 GFP ES 細胞(A) と Y-GFP 由来 ES 細胞(C)および継代数 5 の常染色体 GFP ES 細胞(B) と Y-GFP 由来 ES 細胞(D)。

第4節 考察

本研究では前核期卵注入法によって Y 染色体上に GFP 遺伝子を有する Tg マウスを作製した。このマウス系統において雄のみ蛍光が確認でき、少なくとも E2.5 で非侵襲的に雌雄判定が可能であった。通常、キメラマウスを作製する際に用いられる ES 細胞は雄である。一方で ES 細胞を導入する胚盤胞の性別は雌雄 50%の頻度で混在しているため、しばしば作製したキメラマウスは雄と雌の細胞が混在した個体となり、両性具有や妊性を示さないことが知られているが、本 Tg マウスより蛍光を有する胚盤胞を選別した場合はこの問題を回避することが可能である。

次に、このマウスから ES 細胞を樹立し、Y 染色体脱落 ES 細胞のマーカールとして有用であるかを検討した。以前の研究からマウス ES 細胞において Y 染色体が脱落して 39, XO になる頻度は 1.3–2.7%であることが報告されている (Eggan et al. 2002)。本研究において、継代数 3 の ES 細胞を使用して Y 染色体の異常は 5.3%であった。元株から GFP 陽性株を単離して培養した#16 株において、3 回の継代後に Y 染色体の消失が 1.7%の頻度で観察された。これはマウス ES 細胞の Y 染色体の消失が培養中に比較的起こりやすいことを示唆した。以前の報告において、マウス ES 細胞中で高頻度の染色体異常が観察されている (Sugawara et al. 2006)。彼らの実験に用いられた細胞の継代数は不明であるが、調べられた細胞株のうち 33.5%に何らかの染色体異常があった。さらには、染色体異常を有する ES 細胞の 25.7%で Y 染色体の消失が観察されている。染色体異常は不均衡な構造による染色体の再編成もしくは自己複製に有利に働くなど、より生存に働きかける変異の選択が時間の経過とともに固定されるために起こると考えられている (The International Stem Cell Initiative, 2011)。

我々はフローサイトメトリーにより樹立した Y-GFP ES 細胞から XO の GFP

陰性細胞を単離することができた。これらの GFP 陰性細胞は PCR により *Sry* 遺伝子を検出せず、また、サザンブロット法によって Y 染色体が存在しないことが明らかとなった。Eggan らは XY 細胞由来の XO ES 細胞を用いて四倍体胚補完法により雌個体を作製し、ホモ接合体マウスの作製を加速することが可能であることを報告している。しかしながら、XO ES 細胞を得るために、限界希釈法で ES 細胞コロニーを単離し、PCR およびサザンブロット法による Y 染色体の確認を行わなければならない、労力を必要とする。我々が樹立した Y-GFP 由来 ES 細胞は劇的にこの作業を簡便化する。

我々が樹立した Y-GFP Tg マウスは雄を非侵襲的に選別可能とした初めての報告であり、このマウスおよび派生した ES 細胞はジーンターゲティング技術においてより効率的な動物作製に応用可能なツールになりえる。

第3章 複雑な遺伝背景を有したマウスを用いた KO マウスの作製

第1節 はじめに

近年、複数の遺伝子が関与する疾患のモデル動物を開発するために、同一個体への複数の変異の導入が試みられている (Oddo, et al., 2009; Jacques et al., 2010)。通常、遺伝子に変異を持つマウスに新たな変異を導入するには、それぞれの変異を有する系統を交配して、その産仔から希望の遺伝子型を有するものを選択する必要がある。しかしながら、この過程は多大な時間と労力を必要とする。さらに、遺伝子改変動物は作製された施設によって用いられた ES 細胞の遺伝背景が 129 系統や C57BL/6 系統、交雑系統などと多様であり、交配後、遺伝背景が変化し、しばしば表現型解析を複雑にしている。とりわけ、行動、認知、神経生理の分野ではその問題が指摘されている。例えば、129 系統は C57BL/6J マウスと比較して学習能が低いことが知られている (Balogh et al., 1999, Bothe et al., 2004)。また、アルツハイマー病(AD)に関与するヒトアミロイド β (A β)前駆体タンパク質(APP)の変異体を発現する Tg2576 マウスでは、遺伝背景を C57BL/6、CBA、B6SJL F1 へそれぞれ置換したところ不安行動や認知能に変化が生じたことが報告されている (Lassalle et al., 2008)。このような問題を解決するには、新たな変異を導入したい個体から受精卵もしくは ES 細胞を取得し、それらを利用して遺伝子改変操作を行う必要がある。

アルツハイマー病モデルの一つであるトリプルトランスジェニックマウス (3xTg-AD マウス)は M146V 変異を有する presenilin1(PS1) KI マウスの受精卵へスウェーデン型変異(KM670/671NL)を有するヒト APP 遺伝子、P301L 変異を有するヒト Tau 遺伝子を導入して作製された (Oddo et al., 2003)。本系統はヒト A β 蛋白および Tau 蛋白の蓄積や認知能の異常などのいくつかの AD の所

見を特徴とするモデルマウスであり、本マウスへ新たな変異を導入することは AD に関連することが予測される遺伝子の機能解析を行うために魅力的な方法である。しかしながら、本マウスは複雑な遺伝背景を有する。すなわち、これら 3 つの変異はホモ接合体として維持され、また、PS1 KI マウスの遺伝背景は 129/C57BL6 の交雑である。なお、その対照マウスは 129/C57BL6 の交雑個体を別集団として維持している。

本研究において、3 遺伝子に変異を有し複雑な遺伝背景の 3xTg-AD マウスから生殖系列移行能を有する ES 細胞を樹立し、新たな遺伝子を導入する方法を確立した。

第 2 節 材料と方法

実験動物

3xTg-AD マウスは Oddo らによって作製され、Dr. LaFerla より武田薬品工業株式会社に分与された (Oddo et al., 2003)。Mouse embryonic fibroblast (MEF) 作製のための妊娠 C57BL/6J マウス、インジェクションのホストとなる二倍体の胚盤胞取得のための雌雄 C57BL/6J マウス、四倍体の胚盤胞取得のための雌雄 ICR マウス、胚移植用偽妊娠親の作成に用いる雌性 ICR マウスおよび精管結紮した同系統の雄性マウスは日本クレア (Tokyo, Japan) から購入した。動物は実験期間中、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ で飼育し、飼料および水を自由摂取させた。飼育室の明暗切り替えは 12 時間毎(7:30-19:30)に設定した。本研究に記載の実験および動物飼育条件は、武田薬品工業株式会社の実験動物倫理委員会の定める倫理基準に則って実施した。

3xTg-AD マウスの胚盤胞取得

3xTg-AD マウスの胚盤胞を取得するために体外受精を用いた。培養は全て 37°C, 5% CO₂ で行った。24 週齢以上の雌性 3xTg-AD マウスに 5 IU の pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Asuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を腹腔内投与し、その 48 時間後に 5 IU の human chorionic gonadotropin (hCG; Asuka Pharmaceutical) を腹腔内投与し、過排卵処理した。hCG 投与 15-16 時間後に二酸化炭素暴露により安楽死させた雌性マウス卵管から卵丘細胞に含まれた卵子を採取し、ミネラルオイルで覆われた 200 μ L の HTF 培地 (九動, Saga, Japan) 中で培養した。24 週齢の雄性 3xTg-AD マウスより摘出した精巢上体尾部から採取した精子をミネラルオイルで覆われた 200 μ L の HTF 培地中へ移し、1 時間培養した。最終の精子濃度が 100-200 個/ μ L になるように卵子を含む培地中へ注入して 6 時間培養を行った。前核が確認できた受精卵を M2 培地 (DS ファーマバイオメディカル, Osaka, Japan) 中で洗浄した後、mW 培地 (三菱化学メディエンス, Tokyo, Japan) 中で胚盤胞まで発生させた。

ES 細胞の樹立および培養

培地および ES 細胞の樹立、培養は第 2 章で示した方法を用いた。

キメラマウス作製

二倍体胚と四倍体胚のいずれかと雄性 ES 細胞ライン(#1, #3, #5, #7)よりキメラマウスを作製した。雄性 C57BL/6J マウスと交配させた同系雌性マウスを交配 3.5 日後、二酸化炭素暴露により安楽死させ、二倍体の胚盤胞を採取した。四倍体胚盤胞の作製は Kubiak ら (Kubiak et al., 1985) の方法を改変して行った。以下、簡潔に記述する。過排卵処理した雌性 ICR マウスを同系雄性マウスと交配し、hCG 投与 42 時間後に雌性マウスより 2 細胞期胚を取得した。2 細胞期胚

を 0.5 mmoles/L CaCl₂、0.1 mmoles/L MgSO₄ を含む 0.3 moles/L mannitol 溶液で浸した petridish parallel platinum electrode (Nepagene, Chiba, Japan) 上におき、スクエア式細胞融合遺伝子導入装置 (ECM2001, BTX, Holliston, MA) で電圧 180V、50 μsec の直流パルス を 3 回通電することにより電氣的に融合させて四倍体胚を作製し、mW 培地にて胚盤胞まで培養した。用意した二倍体および四倍体の胚盤胞(ホスト胚)へ 20-30 個の ES 細胞を注入後、偽妊娠 ICR マウスの子宮へ移植し、キメラ産仔を取得した。キメラ個体への ES 細胞の寄与率は毛色によって判断した。

遺伝子ターゲティングベクターの構築

receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) 遺伝子を含む BAC クローン (Advanced GenoTechs, Tsukuba, Japan) を利用して大腸菌内相同組換え技術 (Gene Bridges, Heidelberg, Germany) により標的部位を loxP-PGK-Hygr^r-loxP ユニットへ置換した。置換部位の 5' 側、3' 側に 5-6 kbp の相同領域を含む断片を diphtheria toxin fragment A (DT-A) を持つベクターへサブクローニングしてターゲティングベクターを作製した(図 10)。AseI で制限酵素処理により直鎖化した後、1/10 TE にて 1 μg/μL に調整してエレクトロポレーションに用いた。

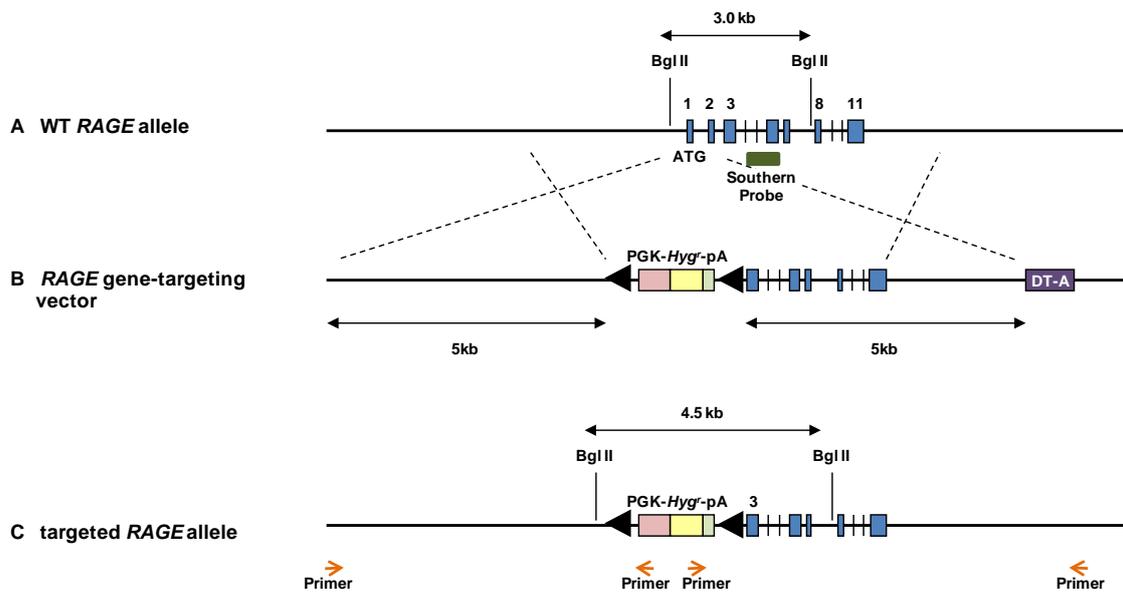


図 10 RAGE 遺伝子欠損マウスの作製デザイン

エキソン2と3を含むゲノム領域を loxP-PGK-Hygr-loxP ユニットへ置換した。WT: wild type, DT-A: diphtheria toxin fragment A

エレクトロポレーション

900 μL の electroporation buffer (DS ファーマバイオメディカル) で懸濁した 1×10^7 個の ES 細胞へ 20 μg の直鎖化した DNA を導入した。ターゲッティングベクターの導入には Genepulser II (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた (0.24 kV, 500 μF)。エレクトロポレーション後、 2.5×10^6 個の ES 細胞を 10 cm^2 dish 中のハイグロマイシン耐性 feeder (Millipore) 上へ分注した。エレクトロポレーション 24 時間後より 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin B (Invitrogen) を添加した。培地はマイクロピペットを使用して毎日交換した。薬剤選択 8 日目に増殖しているハイグロマイシン耐性の ES 細胞コロニーを 96 well plate へ拾い上げ、ES/KSR 培地で培養した。培養 3 日後に 2 枚の 96 well plate へ分割し、1 枚は凍結保存に、もう 1 枚は DNA 抽出に用いた。

相同組換え ES 細胞のスクリーニング

Puregene kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を使用してゲノム DNA を抽出し、30 μ L の TE buffer へ溶解した。最初にターゲティングベクターに用いた相同領域の外側と loxP-PGK-Hygr^r-loxP ユニット内に設計した以下のプライマーを用いて PCR スクリーニングを行った。Forward: 5' -CCC TCT GGA CTG AAG ACT GGT ATC-3'、Reverse: 5' -CAT CTG CAC GAG ACT AGT GAG ACG-3'。PCR 反応は 94 °C 1 分間の変性後、98 °C 10 秒、68 °C 1 min/kb を 35 サイクル行った。次に、PCR スクリーニングで陽性であったコロニーについて各遺伝子のコピー数を qPCR による loss-of-native-allele assay を用いて確認した (Valenzuela et al., 2003)。遺伝子がターゲティングされるとゲノム中のコピー数が 2 コピーから 1 コピーへ減少することを利用し、*GnRHR* 遺伝子のコピー数を内部標準として各遺伝子のコピー数を検出した。qPCR 反応は TaqMan universal PCR master mix (ABI) を使用した。プライマーおよびプローブは以下を用いた。*RAGE* Forward: 5' -TCC TAC ACA CGC ACA CCC C-3' , *RAGE* Reverse: 5' -GGG TGA TAG CAT CAT TGT GGG-3' , *RAGE* probe: 5' -CCC CAC CTC TCC CCT TCC ACC C-3'、*GnRHR* Forward: 5' -TGT ATG CCC CAG CTT TCA TG-3' , *GnRHR* Reverse: 5' -GGC TGA GTG ATG GCC AGG-3' , *GnRHR* probe: 5'-TGG TGG TGA TTA GCC TGG ACC GCT-3'。

遺伝子型判定

遺伝子組換え処理を行っていない ES 細胞由来のキメラマウスを C57BL/6J マウスと交配した。ES 細胞由来ゲノムの F1 産仔への伝達は 3xTg-AD マウスの特徴であるアグーチ色の体毛により判別した。遺伝子組換え ES 細胞由来のキメ

ラマウスは 3xTg-AD マウスと交配した。標的遺伝子の産仔への伝達は PCR による遺伝子型の解析により判定した。尻尾より puregene kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出し、ハイグロマイシン耐性遺伝子の有無および相同組換え ES 細胞をスクリーニングした際の PCR 条件により判定した。

第3節 結果

ES 細胞の樹立

体外受精による受精卵を 3 日間培養することにより取得した胚盤胞(図 11A) 30 個を ES/KSR 培地で 7-9 日間培養したところ、ICM の増殖が半数の 15 個の胚盤胞について観察された(図 11B)。直径 100 μm 以上に成長した 15 個の ICM を単離し、トリプシン処理後、ピペッティングにより解離すると、単細胞に分散した。分散した細胞をフィーダー細胞上へ播種すると 2-3 日で細胞は増殖し、多数の ES 様細胞塊が観察された(図 11C)。単離した 15 個の ICM 由来の ES 様細胞塊はいずれも少なくとも継代数 2 まで培養を継続することができ、凍結保存できた細胞株を樹立株とした。これら 15 株のうち、雌性は 4 株および雄性は 11 株であった。

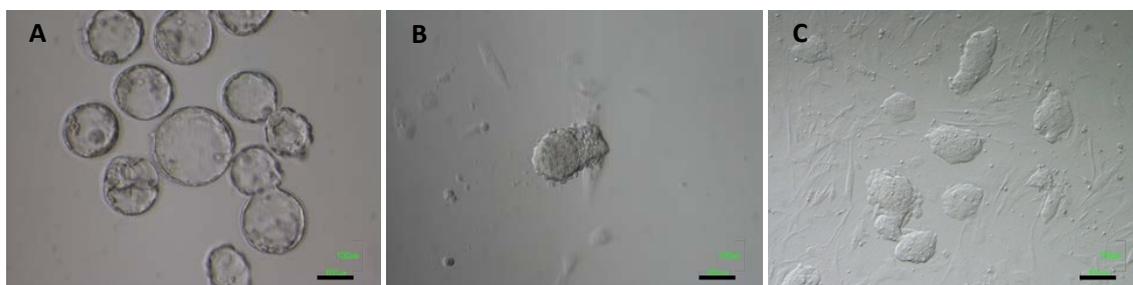


図 11 3xTg-AD マウスからの ES 細胞の樹立

(A) 体外受精後 72 時間目の胚盤胞、(B) ES/KSR 培地で 7 日間培養後の内部細胞塊、(C) 3xTg-AD マウス由来 ES 細胞のコロニー Bars=100 μm .

Non-targeted ES 細胞からのキメラマウス作製

樹立した雄性 ES 細胞株(#1, #3, #5, #7)のうち 4 株について個体発生への寄与を確認するために、まず、二倍体胚を用いてキメラマウスを作製した(表 3)。すべての細胞株からキメラマウスが取得され、アグーチ色の体毛の比率によりキメラ率を判定した。キメラマウスの多くに ES 細胞の高い寄与が認められた(表 3A)。さらに、雄性キメラマウスを C57BL/6J マウスと交配し、ES 細胞由来ゲノムの次世代への伝達能を産仔の毛色により判定したところ、#1、#5、#7 の 3 ラインの ES 細胞に生殖系列移行能を確認した。一方、四倍体胚を用いることでキメラ率が 100%の ES 細胞由来個体(ES mice)を取得したが、#3 株については離乳産仔が確認できなかった。#1、#5、#7 の 3 ラインについては交配した ES mice はすべて生殖系列移行能を有していた(表 3B)。

表 3 non-targeted ES 細胞からのキメラマウス作製

(A) 二倍体 (ホスト胚; C57BL/6J)

Line	Passage No.	No. of embryos transferred	No. of pups born (%) ^a	No. of offspring weaned (%) ^b	No. of chimeras mated	No. with >50% coat color (%) ^c	No. of germline transmitter (%) ^d
#1	P5	44	18 (41)	15 (83)	14	14 (100)	6 (43)
#3	P5	47	21 (45)	5 (24)	4	0 (0)	0 (0)
#5	P5	63	33 (52)	30 (91)	23	22 (96)	21 (91)
#7	P5	56	28 (50)	20 (71)	12	12 (100)	7 (58)

(B) 四倍体 (ホスト胚; ICR)

Line	Passage No.	No. of embryos transferred	No. of pups born (%) ^a	No. of offspring weaned (%) ^b	No. of chimeras mated	No. with >50% coat color (%) ^c	No. of germline transmitter (%) ^d
#1	P5	180	21 (12)	2 (10)	1	1 (100)	1 (100)
#3	P5	197	3 (2)	0 (0)	-	-	-
#5	P5	220	58 (26)	25 (43)	9*	9 (100)	9 (100)
#7	P5	229	24 (10)	16 (67)	6*	6 (100)	6 (100)

a 産仔数/ 移植胚数

b 離乳産仔数/ 産仔数

c 50%以上のキメラ率を有するキメラ数/ 交配したキメラ数

d 生殖系列キメラ数/ 交配したキメラ数

*ES 細胞株(#5, #7)を用いて四倍体補完法により作製した ES mice については一部を生殖系列移行試験に用いた。

RAGEKO マウスの作製

樹立した ES 細胞が遺伝子改変作業に使用可能であることを確かめるためにエレクトロポレーションによる相同組換え体の取得および相同組換え体からの KO マウスの作製を試みた。3xTg-AD マウスには変異 PS1 KI マウスを作製する過程において使用されたネオマイシン耐性遺伝子が残存している (Guo et al., 1999)。そこで、薬剤耐性にはハイグロマイシンを用いた。薬剤選択後に出現した 272 クローンを PCR により遺伝子型解析を行い、14 クローンの相同組換え

ES 細胞を取得した(相同組換え効率 5.1%)。相同組換え ES 細胞の個体発生への寄与を確認するためにキメラマウスを作製した(表 4)。二倍体および四倍体の両方の宿主胚を用いてキメラマウスを取得した。雄性キメラマウスを 3xTg-AD マウスと交配したところ、標的遺伝子の次世代への伝達を確認された。

表 4 相同組換え ES 細胞からのキメラマウスの作製

Clone No.	Host blastocysts	No. of embryos transferred	No. of pups born (%) ^a	No. of offsprings weaned (%) ^b	No. of chimeras Mated	No. with >50% coat color (%) ^c	No. of germline transmitter (%) ^d
RAGE #143	diploid (C57BL/6J)	82	10 (12)	2 (20)	1	1 (100)	1 (100)
RAGE #143	tetraploid (ICR)	238	11 (0.5)	1 (5)	1	1 (100)	1 (100)

a 産仔数/ 移植胚数

b 離乳産仔数/ 産仔数

c 50%以上のキメラ率を有するキメラ数/ 交配したキメラ数

d 生殖系列キメラ数/ 交配したキメラ数

第 4 節 考察

本研究において、我々は 3 遺伝子の変異を有し、かつ、複雑な遺伝背景の 3xTg-AD マウスから生殖系列移行可能な ES 細胞を樹立した。また、これらの ES 細胞を用いて遺伝子改変マウスの作製が可能であることが確認された。さらに、今回確立した方法論は他の多くの遺伝子あるいは複雑な遺伝背景を持つマウス系統に応用可能であることを示す。

一般的に、遺伝子改変マウスの表現型は遺伝背景によって影響をうけるため、戻し交配によって望まれる遺伝背景へ置換することが広く行われている。しかしながら、理論上は 12 世代の交配を行う必要があり、多大な労力および時間がかかる。また、変異させた遺伝子周囲のゲノム領域は完全には置換できないため、解析には注意が必要である。そのような問題を回避するために、望まれる

遺伝背景を有する系統を用いて遺伝子改変操作をすることが重要である。例えば、近年までは ES 細胞の樹立および維持がしやすいという理由から 129 系マウス由来の ES 細胞が汎用されたが、最近では、C57BL/6 系マウス由来の ES 細胞が使用されることが多くなっている (Brook et al., 2003; Schoonjans et al., 2003; Baharvand et al., 2004; Tanimoto et al., 2008)。

本研究では複雑な遺伝子背景および 3 種の改変遺伝子を有するマウスである 3xTg-AD マウスから ES 細胞を取得して新たな変異を導入することに成功した。3xTg-AD マウスは細胞内 A β の蓄積、細胞外 A β プラークの形成、tau 病変が加齢依存的に認められることから、A β と Tau の両病変の相互関係の研究や、創薬研究に広く使用されている (Elder et al. 2010)。今後、本研究で樹立した ES 細胞を用いて、例えばゲノムワイド関連解析(GWAS)などで同定されたアルツハイマー病のリスク遺伝子を改変することにより現モデルよりもさらにヒトの病態を反映したモデルマウスの開発に応用可能であるとともに、薬剤標的遺伝子の改変による薬効試験への応用が期待される。

第4章 総合討論

ヒトの持つ多種多様な生命機能およびその異常により生じる種々の疾患の要因を明らかにするためにモデル系を構築することは必要不可欠である。モデル系を構築する際に重要な点としては『迅速かつ効率的な作製手法』と『ヒトの病態を模倣する正確性』が挙げられる。本研究では医学研究のためのモデル動物として盛んに用いられている ES 細胞を介した遺伝子改変マウスに着目し、上記を解決するためのアプローチを検討した。

迅速かつ効率的な遺伝子改変マウス作製系の構築

ES 細胞を介した遺伝子改変マウスを実験に用いるためには、遺伝子改変マウスの作製と作製したマウスの繁殖が必要である。通常、劣勢形質の表現型解析が多く、キメラマウスと野生型マウスの交配によるヘテロ個体の作製、ヘテロ個体同士の交配によるホモ個体の作製により解析個体を樹立することになる。マウスの生活環は 3 ヶ月であることから解析個体の樹立にはキメラマウスの作製から最低 6 ヶ月を有することになる。本研究ではこの期間を短縮すべく、Y 染色体上に GFP 遺伝子が位置する Tg マウスから ES 細胞を樹立し、雄特異的な蛍光を指標として一株の雄性 ES 細胞から雌雄の ES 細胞クローンを効率的に取得する系を確立した。これにより F₀ 世代で雌雄のキメラマウスを得られることになり、つづく F₁ 世代でホモ個体を取得することが可能となる。これまでに Eggen らは 40, XY ES 細胞由来の 39, XO ES 細胞を用いて四倍体胚補完法により 40, XY ES 細胞由来の雄個体と 39, XO ES 細胞由来の雌個体を作製し、F₁ 世代でホモ個体を作製することにより作製系を加速することが可能であることを報告している (Eggen et al., 2002)。この報告の中で、39, XO ES 細胞を得るために限界希釈法で ES 細胞コロニーを単離し、PCR およびサザンブロット法に

よる Y 染色体の検出を行った。本研究では Y-GFP 由来 ES 細胞を用いることにより非蛍光を示す 39, XO ES 細胞をフローサイトメトリーにより効率的に選択することに成功した。また、マウス ES 細胞の Y 染色体の消失が培養中に比較的起こりやすいことを示した。

一方で遺伝子改変マウスの作製技術の進歩も著しい。その一つが本研究の第 3 章で用いた四倍体補完法によるキメラマウスの作製である。四倍体を用いて生まれた ES 細胞由来の産仔は正常な形態的、生理学的、神経学的特徴を示し (Schwenk et al., 2003)、体細胞核移植由来のクローンマウスで観察される生存直後の呼吸障害による死亡が観察されず (Eggan et al., 2001)、ヘテロもしくはホモ接合体に変異をもつ ES 細胞から生まれた F₀ 産仔はほぼ 100% ES 細胞由来であるため、直接表現型解析に使用できることが報告されている (Guillemot et al., 1994; Seibler et al., 2003; George et al., 2007)。さらに生殖系列移行が保障されている(すべての精子が ES 細胞由来)ため、体外受精法の使用により効率的に次世代を取得することができる。

また、遺伝子改変操作手法として近年目覚ましい発展をとげているのがゲノム編集技術である。ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas system に代表されるそれらの方法は前核期卵へのマイクロインジェクションを基礎としているため、技術的に簡便であり生殖系列移行に対する懸念も少ない。さらには、その切断効率の高さから F₀ 世代で大量のホモ欠損個体を取得できるため理想的な遺伝子欠損動物の作製方法となってきた (Mashiko et al., 2013)。しかしながら、これらの技術による場合、単純な遺伝子欠失は可能であるが、精緻な技術が要求される遺伝子置換や近年多用されている Cre-loxP システムを用いた部位特異的あるいは誘導型欠失などは未だ検討の余地が残るのが現状である。一方で、ES 細胞を用いた標的遺伝子改変技術は複雑で正確な遺伝子の修飾が可能である。ES

細胞の培養技術においても自己複製能の維持が GSK3 阻害剤である CHIR99021、MEK 阻害剤である PD184352、FGFR 阻害剤である SU5402 の 3 つの阻害剤(3i)もしくは CHIR99021、MEK 阻害剤である PD035901 の 2 つの阻害剤(2i)で可能であるという画期的な発見により一昔前の難しさはなくなっていることから (Ying et al., 2008)、ES 細胞を利用した遺伝子改変操作についてもその重要性は失われることはないと考えられる。

ヒトの病態を模倣する正確性

ヒトの病態をより正確に模倣するためのアプローチは動物種の選択、ヒトの病態に関与する遺伝子変異の導入そしてヒト化である。本研究においては複数のヒトの病態に関与する変異を有するアルツハイマー病モデルマウスから樹立した ES 細胞にさらなる遺伝子改変操作を実施することによりアルツハイマー病の治療を模倣するマウスの作製を行った。この手法は代謝性疾患や神経変性疾患などの複数の遺伝子に関与する疾患の病態解明に非常に有効であると考えられる。

動物種については、20 世紀初頭の近代医学の発展と共にヒト個体を実験の対象にできないという理由から、飼育繁殖が容易な哺乳類であるといった種々の条件を満たすマウスおよびラットがモデル動物として汎用されてきた。とりわけラットはマウスと比較して、その適度な大きさから生体試料の採取や外科的手術、各種臓器機能の測定が容易である。さらには、代謝性疾患領域、行動学、薬剤開発の安全性評価に長い間使用されてきており、多くのデータが蓄積されている。近年では生殖系列移行能を有するラット ES 細胞の樹立が報告され、KO ラットが作製可能となっており (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008; Tong et al., 2010)、我々のグループもラット ES 細胞を介した KO ラットを報告してい

る (Yamamoto et al., 2012)。さらに、現在では、ゲノム編集技術を利用することにより霊長類での標的遺伝子改変が可能となっている (Niu et al., 2014; Liu et al., 2014)。

医学研究においてヒトの病態を理解するための理想的な手法は疾患に関わるヒトの細胞や臓器を実験材料に用いることである。最近では、患者に由来する疾患 iPS 細胞の応用 (Inoue et al., 2014) や幹細胞からの臓器形成 (Lancaster et al., 2014) といったヒトの細胞および臓器モデルを構築する試みが盛んにされており、これまで採取が困難であった神経細胞などへの応用が期待されている (Heilker et al., 2014)。また、動物モデルとしてはヒト化マウスが開発されている。ヒト化マウスとはマウスの遺伝子・細胞・組織の一部がヒトのものに置換されたマウスをいい、大別すると、(1) ES 細胞の KI 技術などを応用してヒトの遺伝子に対応するマウスの内在遺伝子のプロモーター下で制御するようにした遺伝子レベルでのヒト化マウスと、(2) 免疫不全マウスにヒトの正常細胞や疾患細胞を移植し定着させた細胞・組織レベルでのヒト化マウスが存在する (McCune et al., 1988)。前者(1)のように KI 技術による遺伝子レベルでのヒト化は未だ ES 細胞を介してしか安定的に実施できないことから本研究で示した研究手法は必要であると考えられる。

今後の研究の進展

20 世紀後半には遺伝子解析技術、遺伝子操作技術および胚操作技術の著しい進歩により、ヒト個体の表現型や病態に対応する遺伝子を特定し、マウスにおいて対応する遺伝子を欠損させたり、ヒトの遺伝子をそれらに発現させたりすることによりマウスの個体レベルでヒトの病態を模倣することが可能になった。そのような遺伝子改変操作により作製された病態モデル動物は創薬にも応用さ

れており、標的探索・標的の概念検証・化合物の評価に広く使用されている。近年では、病態モデル動物の作製技術の進歩が著しく、さらには、技術間の相性がよく、その組み合わせによって新たな病態モデルを作製できる可能性がある。そのため、より多くの選択肢をもち、各技術の欠点を補いながら様々な角度からヒトの疾患を理解していきたい。

謝辞

本研究の遂行と、論文作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました自治医科大学大学院 医学研究科 人間生物学系 生体分子医学専攻分野 分子生物学専攻科 遠藤仁司 教授、富永薫 准教授、自治医科大学 実験医学センター 長尾恭光 准教授に深く感謝いたします。

本研究遂行のためにご支援ご協力を頂きました、自治医科大学 生化学講座 機能生化学部門講師 黒岩憲二 博士ならびに同部門研究補助員 太田恵理子 氏ならびに加藤千代子氏に感謝いたします。

また、日頃より有益なご討論、ご助言を頂きました、自治医科大学 生化学講座 機能生化学部門の各位ならびに武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 基盤技術研究所 KO/Tg Generation グループの各位に心より感謝いたします。

引用文献

- Baharvand H, Matthaehi KI. Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 40(3-4):76-81, 2004
- Balogh SA, McDowell CS, Stavnezer AJ, Denenberg VH. A behavioral and neuroanatomical assessment of an inbred substrain of 129 mice with behavioral comparisons to C57BL/6J mice. *Brain Res.* 836(1-2):38-48, 1999
- Bishop CE, Hatat D. Molecular cloning and sequence analysis of a mouse Y chromosome RNA transcript expressed in the testis. *Nucleic Acids Res.* 15(7):2959-69, 1987
- Bothe GW, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG. Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes Brain Behav.* 3(3):149-57, 2004
- Bradbury MW, Isola LM, Gordon JW. Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(11):4053-7, 1990
- Brook FA, Evans EP, Lord CJ, Lyons PA, Rainbow DB, Howlett SK, Wicker LS, Todd JA, Gardner RL. The derivation of highly germline-competent embryonic stem cells containing NOD-derived genome. *Diabetes* 52(1):205-8, 2003
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135 (7):1287-98, 2008
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet.* 6(6):507-12, 2005
- Cui X, Ji D, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 29(1):64-7, 2011
- Dow LE, Lowe SW. Life in the fast lane: mammalian disease models in the genomics era. *Cell* 148(6):1099-109, 2012
- Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch

- R. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol.* 20(5):455-9, 2002
- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(11): 6209-14, 2001
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 77(1):69-81, 2010
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156, 1981
- Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine--an updated primer. *N Engl J Med.* 362(21):2001-11, 2010
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 31(9):822-6, 2013
- George SH, Gertsenstein M, Vintersten K, Korets-Smith E, Murphy J, Stevens ME, Haigh JJ, Nagy A,. Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(11): 4455-60, 2007
- Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325(5939):433, 2009
- Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL,. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature.* 371(6495): 333-6, 1994
- Guo Q, Fu W, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat. Med.* 5(1):101-6, 1999
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A. Non-invasive sexing of preimplantation stage mammalian embryos. *Nat Genet.* 19(3):220-2, 1998
- Hermann M, Maeder ML, Rector K, Ruiz J, Becher B, Bürki K, Khayter C, Aguzzi A, Joung JK, Buch T, Pelczar P. Evaluation of OPEN zinc finger

- nucleases for direct gene targeting of the ROSA26 locus in mouse embryos. *PLoS One* 7(9):e41796, 2012
- Hogan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, pp.153-173, 1986
- Horie K, Kokubu C, Yoshida J, Akagi K, Isotani A, Oshitani A, Yusa K, Ikeda R, Huang Y, Bradley A, Takeda J. A homozygous mutant embryonic stem cell bank applicable for phenotype-driven genetic screening. *Nat Methods* 8(12):1071-7, 2011
- Ichida M, Hakamata Y, Hayakawa M, Ueno E, Ikeda U, Shimada K, Hamamoto T, Kagawa Y, Endo H. Differential regulation of exonic regulatory elements for muscle-specific alternative splicing during myogenesis and cardiogenesis. *J Biol Chem.* 275(21):15992-6001, 2000
- Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J.* 33(5):409-17, 2014
- International Mouse Knockout Consortium, Collins FS, Rossant J, Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell* 128(1):9-13, 2007
- International Stem Cell Initiative, Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, Baker J, Baker D, Munoz MB, Beil S, Benvenisty N, Ben-Yosef D, Biancotti JC, Bosman A, Brena RM, Brison D, Caisander G, Camarasa MV, Chen J, Chiao E, Choi YM, Choo AB, Collins D, Colman A, Crook JM, Daley GQ, Dalton A, De Sousa PA, Denning C, Downie J, Dvorak P, Montgomery KD, Feki A, Ford A, Fox V, Fraga AM, Frumkin T, Ge L, Gokhale PJ, Golan-Lev T, Gourabi H, Gropp M, Lu G, Hampl A, Harron K, Healy L, Herath W, Holm F, Hovatta O, Hyllner J, Inamdar MS, Irwanto AK, Ishii T, Jaconi M, Jin Y, Kimber S, Kiselev S, Knowles BB, Kopper O, Kukhareenko V, Kuliev A, Lagarkova MA, Laird PW, Lako M, Laslett AL, Lavon N, Lee DR, Lee JE, Li C, Lim LS, Ludwig TE, Ma Y, Maltby E, Mateizel I, Mayshar Y, Mileikovsky M, Minger SL, Miyazaki T, Moon SY, Moore H, Mummery C, Nagy A, Nakatsuji N, Narwani K, Oh SK, Oh SK, Olson C, Otonkoski T, Pan F, Park IH, Pells S, Pera MF, Pereira LV, Qi O, Raj GS, Reubinoff B, Robins A, Robson P, Rossant J, Salekdeh GH, Schulz TC, Sermon K, Sheik Mohamed J, Shen H, Sherrer E, Sidhu K, Sivarajah S, Skottman H, Spits C, Stacey GN, Strehl R, Strelchenko N, Suemori H, Sun B, Suuronen R, Takahashi K, Tuuri T, Venu P, Verlinsky Y, Ward-van

- Oostwaard D, Weisenberger DJ, Wu Y, Yamanaka S, Young L, Zhou Q. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol.* 29(12):1132-44, 2011
- Jacques TS, Swales A, Brzozowski MJ, Henriquez NV, Linehan JM, Mirzadeh Z, O' Malley C, Naumann H, Alvarez-Buylla A, Brandner S. Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *EMBO J.* 29(1):222-35, 2010
- Kitada K, Ishishita S, Tosaka K, Takahashi R, Ueda M, Keng VW, Horie K, Takeda J. Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nat Methods.* 4(2):131-3, 2007
- Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development* 131(3):539-49, 2004
- Kubiak JZ, Tarkowski AK,. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res.* 157(2): 561-6, 1985
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345(6194):1247125, 2014
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A,

Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 411(6838):720, 2001

Lassalle JM, Halley H, Daumas S, Verret L, Francés B. Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice. *Behav. Brain Res.* 191(1):104-110, 2008

Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135 (7):1299-310, 2008

Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, Liu X, Zhao E, Wang C, Lin S,

- Jing B, Si C, Lin Q, Chen X, Lin H, Pu X, Wang Y, Qin B, Wang F, Wang H, Si W, Zhou J, Tan T, Li T, Ji S, Xue Z, Luo Y, Cheng L, Zhou Q, Li S, Sun YE, Ji W. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 14(3):323-8, 2014
- Liu J, Koyano-Nakagawa N, Amasaki Y, Saito-Ohara F, Ikeuchi T, Imai S, Takano T, Arai N, Yokota T, Arai K. Calcineurin-dependent nuclear translocation of a murine transcription factor NFATx: molecular cloning and functional characterization. *Mol Biol Cell*. 8(1):157-70, 1997
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:7634–7638, 1981
- Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 3:3355, 2013
- Matsuda Y, Chapman VM. Application of fluorescence in situ hybridization in genome analysis of the mouse. *Electrophoresis* 16(2):261-72, 1995
- McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241(4873):1632-9, 1998
- McNeish J. Embryonic stem cells in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 3(1):70-80, 2004
- Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, Kühn R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(34):15022-6, 2010
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Esvara P, Eyras E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K,

Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420(6915):520-562, 2002

Nagy A, Góczy E, Diaz EM, Prideaux VR, Iványi E, Markkula M, Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110(3):815-21, 1990

Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W, Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 156(4):836-43, 2014

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression

- transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108(2):193-9, 1991
- Oddo S, Caccamo A, Cheng D, LaFerla FM. Genetically altering Abeta distribution from the brain to the vasculature ameliorates tau pathology. *Brain Pathol.* 19(3):421-30, 2009
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39(3):409-21, 2003
- Palmiter RD, Chen HY, and Brinster RL. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29(2):701-10, 1982
- Russell WL, Russell LB, Gower JS. Exceptional inheritance of a sex-linked gene in the mouse explained on the basis that the X/O sex-chromosome constitution is female. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 45(4):554-60, 1959
- Schoonjans L, Kreemers V, Danloy S, Moreadith RW, Laroche Y, Collen D. Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells* 21(1):90-7, 2003
- Schwenk F, Zevnik B, Brüning J, Röhl M, Willuweit A, Rode A, Hennek T, Kauselmann G, Jaenisch R, Kühn R. Hybrid embryonic stem cell-derived tetraploid mice show apparently normal morphological, physiological, and neurological characteristics. *Mol Cell Biol.* 23(11):3982-9, 2003
- Seibler J, Zevnik B, Küter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kühn R, Schwenk F. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res.* 31(4): e12, 2003
- Sugawara A, Goto K, Sotomaru Y, Sofuni T, Ito T. Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan. *Comp Med.* 56(1):31-4, 2006
- Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med.* 351(12):1227-38, 2004
- Tanimoto Y, Iijima S, Hasegawa Y, Suzuki Y, Daitoku Y, Mizuno S, Ishige T, Kudo T, Takahashi S, Kunita S, Sugiyama F, Yagami K. Embryonic stem cells derived from C57BL/6J and C57BL/6N mice. *Comp Med.* 58(4):347-52, 2008
- Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y,

- Vincent AI, Meng X, Zhang L, Gregory PD, Anegon I, Cost GJ. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol.* 29(8):695-6, 2011
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51(3):503-12, 1987
- Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying QL. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 467 (7312):211-3, 2010
- Valenzuela DM, Murphy AJ, Friendewey D, Gale NW, Economides AN, Auerbach W, Poueymirou WT, Adams NC, Rojas J, Yasenchak J, Chernomorsky R, Boucher M, Elsasser AL, Esau L, Zheng J, Griffiths JA, Wang X, Su H, Xue Y, Dominguez MG, Noguera I, Torres R, Macdonald LE, Stewart AF, DeChiara TM, Yancopoulos GD. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol.* 21 (6):652-9, 2003
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N,

- Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-51, 2001
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153(4):910-8, 2013
- Wefers B, Meyer M, Ortiz O, Hrabé de Angelis M, Hansen J, Wurst W, Kühn R. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(10):3782-7, 2013
- Yamamoto S, Nakata M, Sasada R, Ooshima Y, Yano T, Shinozawa T, Tsukimi Y, Takeyama M, Matsumoto Y, Hashimoto T. Derivation of rat embryonic stem cells and generation of protease-activated receptor-2 knockout rats. *Transgenic Res*. 21(4):743-55, 2012
- Yamamoto S, Ooshima Y, Nakata M, Yano T, Matsuoka K, Watanabe S, Maeda R, Takahashi H, Takeyama M, Matsumoto Y, Hashimoto T. Generation of gene-targeted mice using embryonic stem cells derived

- from a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Transgenic Res.* 22(3):537-47, 2013
- Yamamoto S, Nagao Y, Kuroiwa K, Hakamata Y, Ichida M, Saito-Ohara F, Tominaga K, Endo H. Rapid selection of XO embryonic stem cells using Y chromosome-linked GFP transgenic mice. *Transgenic Res.* 23(5):757-65, 2014
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 154(6):1370-9, 2013
- Yang H, Shi L, Wang BA, Liang D, Zhong C, Liu W, Nie Y, Liu J, Zhao J, Gao X, Li D, Xu GL, Li J. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell* 149(3):605-17, 2012
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453 (7194):519-23, 2008
- Zambrowicz BP, Sands AT. Knockouts model the 100 best-selling drugs--will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov.* 2(1):38-51, 2003
- 米川博通, 生命科学におけるモデル動物の意義. モデル動物の作製と維持, 森脇和郎, 山村研一, 米川博通 (編): 71-76, 2004