



RESEARCH MODELS

C57BL/6マウス 未来の遺伝子組換えモデル作出における C57BL/6Nマウスの役割

著者：

Rosalba Sacca, PhD, Director,
Scientific Development,
Charles River

Bruce Elder, PhD, Director,
Corporate Rodent Genetics,
Charles River

Katherine Wasson, DVM, PhD,
Associate Director, Mouse
Biology Program, University of
California, Davis

序論

動物種のなかにおいて、人間の生物学や病態のモデルとして、マウスは重要な役割を果たしてきた。1985年におけるマウス胚性幹細胞（mES細胞）の分離（Doetschman et al., 1985; Smithies, O. et al., 1985）ならびにそれについて、mES細胞における相同組換えを利用してマウスゲノムを思い通りに変異させることができるようになったこと（Thomas et al., 1986; Kuehn et al., 1987）によって、この独創的な技術を哺乳類の生物学のあらゆる局面に応用することができるようになった。さらに近年、マウス遺伝学に関する広範囲な情報が得られるようになって、近交系ES細胞株を使ってきわめて短期間で近交系ノックアウト（KO）マウスを作成できるようになった。また、分子生物学の発展にともなって、遺伝子改変マウスモデル（GEMM）は、生物機能を理解するための有益な手段となってきた。さらに、KOマウスは、創薬過程において幅広く使われるようになってきた。

過去20年間にわたって、世界中において、数千系統のKOマウスが作出されてきた。これらの重要な資源を利用して、創薬研究者たちは、可能性のある薬剤の標的の役割について研究をすることができるようになった。KOマウスは、標的の機能、選択性、あるいは可能性のある有害な毒性を調べるための有益な手段となったのである（Sacca et al., 2009）。たとえば、遡及的に評価すると、KOマウスの表現型は、100種類のベストセラー薬剤において、標的に対する治療効果と相関関係があることが示された（Zambrowicz et al., 2003）。このことは、新たな標的の評価におけるKOマウスの有用性を明確に示すものである。

これらのノックアウトマウスの有用性ならびにこれらのノックアウトマウスを用いてヒト疾患の研究を促進すること

ができる可能性が認識され、米国、欧州、およびカナダにおいて、マウスゲノムでタンパク質をコードしているすべての遺伝子（約21,000個）をノックアウトすることを意図して、2006年、いくつかの国際プログラムが立ち上げられた。これらのプログラムは、標準化されたC57BL/6NのES細胞株を用いておこなわれている。なぜなら、遺伝子改変マウスモデル（GEMM）の作製において、近交系ES細胞株を使用することには多くの利点があり、また異なる遺伝的背景の系統を使用すると、解析方法に著しい相違がみられるからだ。

本論文の意図するところは、これらの国際的共同体の現時点での成果の要点ならびに現時点でおこなわれている最善の実施例について記載することである。たとえば、マウス作製の標準化を確かなものにするためのC57BL/6N系統の利用あるいは今後数年間にこれらのプログラムによって得られるデータの表現型解析などである。

C57BL/6モデルの歴史と役割

近交系C57BL/6の開発は、ジャクソン研究所のClarence Littleによって、1921年に始まった。当時、「黒色の垂系統」（C57BL）と「褐色の垂系統」（C57BR）が確立され、それぞれ独立して繁殖・維持されていた。C57BLは、さらに2つの垂系統に分かれ、それぞれ、「6垂系統」および「10垂系統」とよばれた。これら2つの垂系統は、最終的に、今日われわれが知っているC57BL/6およびC57BL/10という2つの近交系を生み出すこととなった。これら2系統が分離された頃には、C57BL垂系統は高度に近交化されていたので、開発中の他の系統がこの垂系統に影響を及ぼしていたとは考えられていなかった。

つづく数十年の間に、その他の数百の近交系が開発さ

EVERY STEP OF THE WAY

れ、関心のある形質が選択されてきた。たとえば、C57BL/6 系統は、麻薬やアルコールに対する強い嗜好を有するので、薬物乱用の遺伝的研究によく使われている (Peirce et al., 1998)。1980 年代に遺伝子組換え技術が出現したのにもなって、C57BL/6 系統は、遺伝的解析のための手段として、きわめて多く使われるようになった。C57BL/6 系統は、(他の多くの近交系とくらべて) 比較的繁殖成績がよく、また系統の由来も明確であるので、研究者たちは、ゲノムライブラリーといった大規模な生物資源の基盤として C57BL/6 系統を利用した。

このような生物資源の基盤としての利用法のおかげで、B6 系統は他の目的にも多く使われるようになっていった。1980 年代末には、Martin Evans、Mario Capecchi、Oliver Smithies らが率いるいくつかの研究グループによって、初めてのノックアウトマウスが作製された。変異を誘導するために使われた ES 細胞は、近交系 129 に由来するものであったが、大部分の変異系統は、ただちに B6 背景に交配され、さらに繁殖・維持されて解析がつづけられた。1990 年代中頃までには、科学界において、多くの遺伝子改変マウスが作出されていた。その結果、このような生物学的資源の遺伝的背景としての B6 垂系統はさらに多く使われるようになった。

1999 年、「ヒトゲノムプロジェクト (Human Genome Project)」の一環として、3 つの主要な配列決定センターが研究共同体を設立し、マウスゲノムの配列決定に着手した。細菌の人工染色体 (BAC) ライブラリーを構築するにあたって、科学界においては、どの系統のマウスを使用するか多くの議論がなされた。BAC ライブラリーは、研究の基盤をなすものである。最終的に、C57BL/6 系統を使うことが決定された。その理由の一部として、そのときまでに、遺伝子組み換えマウスの作製において B6 マウスが多く使われていたこと、繁殖成績がよいこと、そして系統維持の記録が比較的良好に残されていることが挙げられる (Battey et al., 1999)。2002 年、マウスのゲノム配列が初めて公表された (Waterston, 2002)。この配列は、C57BL/6 の J 垂系統にもとづいており、現在利用することができる他のマウスのゲノム配列の基準となっている。

C57BL/6 系統が広く使われるようになった結果、世界中で多くの B6 の垂系統が作出された。これらの垂系統はすべて C57BL/6 とよばれるものの、C57BL/6 という名称の後にいくつかの文字列 (研究室コード/ラボコードとよばれる) を付けることによって区別される。たとえば、主要な繁殖・

供給業者 (チャールス・リバー、タコニック、ハーラン、ジャクソン研究所) の B6 垂系統は、それぞれ、C57BL/6NCrl、C57BL/6NTac、C57BL/6NHsd、C57BL/6J とよばれている。Crl、Tac、および Hsd 垂系統における “N” は、これらの垂系統がもともと米国国立保健研究所 (NIH) において確立されたことを示している。研究者がこれらの垂系統の名称を記載することはきわめて重要である。なぜなら、分離して維持された系統は、時間の経過とともに、遺伝的浮動のために変異を起こすからである。このような変異によって、今日使われている多くの C57BL/6 垂系統のあいだには、表現型の違いがみられることがあり得るのだ (Bothe et al., 2004; Bryant et al., 2008; Mulligan et al., 2008; Mekada et al., 2009; Zurita et al., 2011)。

たいていの場合、垂系統間における一塩基多型 (SNP) が生理学的または行動学的な差異に関連しているか否かについてはわかっていないが、いくつかの垂系統間において遺伝子変異があることが知られている。多くの C57BL/6J 垂系統は、ニコチンアミドトランスヒドロゲナーゼ (Nnt) 遺伝子座に変異をもっているが、N 垂系統は、この遺伝子座に関しては野生型である (Freeman et al., 2006; Mekada et al., 2009)。今日までのところ、 α -シヌクレイン (Snca) 遺伝子座に変異をもつことが知られているのは、C57BL/6J0laHsd 垂系統のみである (Specht and Schoepfer, 2001)。また、これまで調べられた C57BL/6 のすべての N 垂系統は、crumbs ホモログ遺伝子において、網膜変性 8 (rd8) とよばれる変異 (*Crb 1^{rd8}*) をもっている (Mattapallil et al., 2012)。この 2 つの変異は表現型に関連しており、ある種の研究に影響を及ぼしたり、あるいは及ぼさなかったりする。重要なことは、研究者がこれらの変異について知っておくことである。

これらの変異が知られているので、研究者は、C57BL/6 バックグラウンドの遺伝子組換えモデルの共同研究者から当該垂系統に関する正確な情報を得ることが重要である。さらに、垂系統間における SNP の影響が不明の場合もあるので、研究者は、野生型の C57BL/6 マウスを適切な垂系統と交配するための方法を標準化しておくことを推奨する。そして、その垂系統バックグラウンドのマウスコロニーを提供しつづけることが重要である。

モデル作製業界

マウスの全ゲノム配列が公表されたので (Waterston, R. H. et al., 2002)、世界中の科学界のさまざまな分野のメンバー

が集まり、全ゲノム規模でのノックアウトマウスを着実に均一に広く生産するために話し合いがおこなわれた (Austin, Batty et al., 2004; Auwerx, Avner et al., 2004)。協調して全ゲノム規模でのノックアウトマウスを作出する動機づけの背景には、均一なマウスを作製すること、作出されたマウスを分配して広く入手可能にすること、生産規模を拡大して科学界が負担する全費用を低下させること、研究のための手段がいつでも利用できるようにして、データを得るための時間を短縮すること、そして手段や資源の基盤を提供して、未来の科学研究に貢献することなどが挙げられる。

これらの世界中の共同研究者たちは、次のようなことを考慮すべきであることを提案した。すなわち、高生産性の ES 細胞作製を可能にする自動化された技術、一定の割合の ES 細胞から生殖系列解析済みの生きたマウスを作製し、それらのマウスを用いて開発コンセプトを実証したり品質管理や品質保証を実施したりすること、レポーター組織を解析して、遺伝子発現部位を証明したり発見したりすること、あるいは、第一段階の表現型解析およびトランスクリプトーム解析を実施して、研究の準備を促進したり、遺伝子機能に関する仮説にもとづいた疑問の提起を促したりすることなどである。また共同研究者たちは、研究の重複を避けたり、国や機関を越えた情報発信を最大化したりするためには、これらの活動は国際的なレベルにおいて協調されなければならないということを推奨した。

後者の提言（国際的なレベルにおいて協調されなければならないということ）に取り組むために、「国際ノックアウトマウスコンソーシアム (International Knockout Mouse Consortium: IKMC)」が設立された (Collins, FS and Rossant, J, 2007)。そのメンバーは、欧州委員会 (European Commission) の FP6 プログラム、ゲノムカナダ、NIH、およびテキサスゲノム医学研究所 (Texas Institute for Genomic Medicine: TIGM) によって構成されていた。IKMC は、上記共同研究者による前者の提言を支援した。すなわち、資金を提供して、公表されたマウスゲノムを資源に変換することができるように組織的な監督をおこなった。これらの資源は、現在では、科学界において広く利用されている。米国内においては、モデル作製の機会を支援するために、NIH がいくつかの申請要綱 (RFA) を作成した。これらの RFA のひとつから、アグーチの C57BL/6N ES 細胞株が作製された。この ES 細胞株は、IKMC におけるモデル作製の基盤となった (Pettitt, SJ, Liang, Q, et al., 2009)。2つ目の

RFA から、現在「ノックアウトマウスプロジェクト (KOMP) フェーズ 1 (Knockout Mouse Project (KOMP) Phase 1)」とよばれるプロジェクトが立ち上がった。KOMP フェーズ 1 は、資金を提供することによって、約 8,500 ライブラリーの C57BL/6N 標的欠失またはコンディショナル標的 ES 細胞を作製した。そして、初めての生きた生殖系列解析済みかつ PCR で検証された生きたノックアウトマウス 500 匹の作製を開始した。3つ目の RFA は、資金を提供することによって、KOMP の資源庫を設立した。この資源庫には、KOMP によって作製された変異アレルが収集、保管された。そこには、冷凍保存されたコンストラクト、標的 ES 細胞、胚、精子、あるいは生きたマウスが保管されており、それらは科学コミュニティに分配されている。

IKMC のウェブサイト (www.knockoutmouse.org) では、ベクターの作製、ES 細胞、あるいは生きた変異マウスについての記載がなされている。このウェブサイトには、NIH が資金を提供した KOMP が作製した資源のみならず、EC の「欧州コンディショナルマウス変異プログラム (European Conditional Mouse Mutagenesis Program: EUComm)」およびゲノムカナダの北米コンディショナルマウス変異プログラム (North American Conditional Mouse Mutagenesis Program: NorComm)」が作製した資源も含まれている。またこのウェブサイトには、その他の資源、公表文献、ならびに資源の入手先、入手方法なども掲載されている。

さらに最近、2011 年 9 月には、2 万系統のノックアウトマウスの表現型を系統的に記録し、普及するための国際的な研究共同体が立ち上がった。この研究共同体は、4 大陸にまたがる 22 の研究所によって構成されており、その資金は NIH、欧州の複数の政府、ならびにパートナー機関から提供される。この研究共同体は、(2021 年まで) 10 年間継続する計画であり、これまで IKMC によって作出されたアイソジェニック C57BL/6 バックグラウンドのホモ接合体変異マウスの解析に焦点を合わせている。IMPreSS とよばれる表現型解析法は、ヒト疾患について解明することを目指している。対象疾患としては、神経筋疾患、知覚障害、心血管障害、代謝疾患、呼吸器疾患、血液疾患、神経疾患などが含まれており、それぞれのマウス系統から収集したパラメーターを解析する。表現型に関するデータは、自由に検索することができるデータベース (www.mousephenotype.org) に記録し、だれでも利用することが可能である。

結論

マウスは、現在の研究において、圧倒的に多く使われている動物モデルである。近年のマウス遺伝学および遺伝子導入技術の飛躍的な進歩によって、マウスは強力なシステムとなった。そのようなシステムを利用して、疾患の経路や薬剤による介入についてより深く理解することができるようになった。このような研究に適したマウスの系統や亜系統を選択することがきわめて重要である。なぜなら、系統や亜系統によって、ある特定のモデルにおいてみられる表現型が影響を受けることがあるからだ。したがって、研究者は、ある亜系統が研究に及ぼすかもしれない影響について理解しておかなければならない。「国際マウスノックアウト (International Mouse Knockout)」プログラムにおいて C57BL/6N マウスが使われたことによって、さまざまな資源を利用することができるようになった。これらの資源は、すべて、それぞれ特定の亜系統において作製されたものである。このようなマウスの遺伝学的な品質を維持することは、これらのマウスモデルから得られたデータの正確性を保証するためにきわめて重要である。

文献

- Austin, C.P., Batty, J. et al. The Knockout Mouse Project. *Nat. Genet.*, **36**:921-924 (2004).
- Auwerx J, Avner P et al. The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. *Nat. Genet.*, **36**:925-927 (2004).
- Batty J, et al. An action plan for mouse genomics. *Nat. Genet.*, **21**:73-75 (1999).
- Bothe, G.W. et al. Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes Brain Behav.*, **3**:149-157 (2004).
- Bryant, C.D. et al., Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet.*, **22**:315-331 (2008).
- Collins, F.S., Rossant J. A Mouse for All Reasons. *Cell*, **128**:9-13 (2007).
- Doetschman, T.C. et al. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **87**:27-45 (1985).
- Freeman, H.C. et al. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*, **55**:2153-2156 (2006).
- Kuehn, M.R. et al. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, **326**(6110):295-298 (1987).
- Mattapallil, M.J. et al. The Rd8 mutation of the *Crb1* gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**(6):2921-2927 (2012).
- Mekada, K. et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp. Anim.*, **58**:141-149 (2009).
- Mulligan, M.K. et al. Alcohol trait and transcriptional genomic analysis of C57BL/6 substrains. *Genes Brain Behav.*, **7**:677-689 (2008).
- Peirce, J.L. et al. A major influence of sex-specific loci on alcohol preference in C57BL/6 and DBA/2 inbred mice. *Mamm. Genome*, **9**:942-948 (1998).
- Pettitt, S.J., Liang, Q. et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat. Methods*, **6**:493-495 (2009).
- Sacca, R., et al. Genetically Engineered Mouse Models in Drug Discovery Research. In: *Mouse Models for Drug Discovery. Methods in Molecular Biology*, 602, G. Proetzel, M.V. Wiles, eds. Humana Press pp. 37-54 (2010).
- Smithies, O. et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, **317**(6034):230-234 (1985).
- Specht, C.G., Schoepfer, R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci.*, **2**:11 (2001).
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, **51**:503-12 (1987).
- Waterston, R.H. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**:520-562 (2002).
- Zambrowicz, B. P., & Sands, A.T. Knockouts model the 100 bestselling drugs? will they model the next 100? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**(1):38-51 (2003).
- Zurita E. et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res.*, **20**(3):481-489 (2011).

翻訳：順天堂大学国際教養学部 久原 孝俊