



RESEARCH MODELS

マウスの研究において遺伝的浮動(genetic drift)を最小化し、実験の再現性を最大化するための戦略

著者:

Janine Low-Marchelli, PhD,
Senior Technical Information
Scientist,
The Jackson Laboratory

翻訳:

順天堂大学国際教養学部
久原 孝俊 (くはら たかとし)

要約:

遺伝的浮動(genetic drift)は、すべての独立したマウス繁殖コロニーにおいて起こる可能性があり、実験の再現性と科学的結論に悪影響を及ぼす可能性がある。遺伝的浮動によって引き起こされる自然発生突然変異は、数年間にもわたって認識されない可能性があり、たまたまそのような突然変異がかかわるような特定の研究が実施されてはじめて認識されることがある。遺伝的浮動を完全に阻止することはできないものの、コロニーの管理を注意深く実践することにより、遺伝的浮動ならびに科学の発見におよぼす影響を最小限にとどめることができる。それぞれのマウス繁殖コロニーは、その規模や管理方法が異なることがあるので、亜系統名を含む、完全で正確なマウス系統名を使用することが科学界全体に利益をもたらす。

マウスを使った研究における遺伝的安定性の重要性

一般的なライフサイエンス研究者にとって、マウスの遺伝的背景について考慮することがあるとしても、実際に実験を実施したあとで考慮する必要がある。研究者の最優先事項は、病気を理解し、論文を投稿し、そして研究資金を調達することである。しかしながら、これらの目的を達成するためには、マウスのコロニーにおける遺伝的安定性を維持すること、すなわち遺伝的浮動を阻止することがきわめて重要である。

研究用のマウスは、科学研究におけるユニークな生きた要素である。研究用のマウスは、その生涯を通して変化する要素であり、そして重要なことは、その変化が世代を越えて伝わることである。結局のところ、遺伝的に受け継がれるDNA シークエンスの変化は、野生における種の多様性と進化の基盤である。進化圧がない場合でも、DNA シークエンスの変化は起こる。一見、これらの変異は、個体の遺伝的構成において、重要で

はないサイレントな変動であるように見える。しかし、これらの一見重要ではないと思われる変異が、説明することができない、実験の再現性のなさの原因になりうる場合がある。

マウスを使用する研究者は、ここで難問にぶつかる。それは、研究用のマウスを作製するためには繁殖が必要であり、繁殖には遺伝的多様性を増大させるという特有のリスクがあり、そのため、実験の多様性を増大させてしまうというリスクがあるということである。

実験ごとに、そして論文ごとに、データの多様性が生じることは、科学の進展にはつながらない。

本論文は、マウスを使用する研究者に対して、研究の進展に影響を及ぼす可能性のある遺伝的浮動に関して、遺伝的浮動を最小限にする最善の実践方法を紹介し、マウスコロニーにおいて遺伝的浮動が起こった場合に、遡って解決する方法を提供することを目的としている。公表する論文や研究資金申請書などにおいては、正式なマウスの系統名を使用し、繁殖世代の情報を添付して注意深く報告することは、動物実験の再現性と責任ある動物の使用を推進するために研究者が簡単に実践できることの一部分である。

マウスコロニーにおける遺伝的浮動の出現機序とその頻度

同系交配または兄妹交配は、マウスゲノムのすべての遺伝子座においてヘテロ接合性を減少させる強力な方法であり、表現型の均一性と実験の再現性の基盤となっている。

遺伝的ホモ接合体は、対照群と実験群とのあいだの単一の変数の比較を可能にし、したがって、その変数に対する結果の差異を明らかにすることができる。

EVERY STEP OF THE WAY

別々に維持されている2系統の近交系マウスは、野生種と同様、時間の経過とともに変化していく。DNA複製と減数分裂のあいだに、一塩基多型 (SNP)、欠失、逆位、重複、その他のエラーの形で自然突然変異が起こる可能性がある。マウス集団に起こる、このような無作為の自然突然変異の発現、消失、また固定の過程は、遺伝的浮動と呼ばれる (Lee Silver, 1995)。

繁殖を積極的に行っているコロニーで起こる遺伝的浮動の頻度はさまざまであるが、かなり頻度が高いと予測されている。5-8週齢で性成熟に達するマウスの平均的な繁殖期間は3-4ヶ月である。一般的に、産仔は交配後約3週間で産まれる。100万匹を超えるマウスで評価した毛色の変異から計算した自然突然変異率に基づくと、1つの表現型の変異は、1.8繁殖世代ごとに起こる可能性があることになる (Drake et al., 1998; Russell and Russell, 1996)。

生殖細胞系列に自然突然変異を保有するマウスを繁殖して、当該変異を増大させるリスクは、大規模コロニーよりも小規模コロニーで高くなる (図 1A)。マウスのどの生殖細胞系列変異についても、産仔のほぼ半数は、この変異に関してヘテロ接合体となる (図 1B)。近交系の繁殖コロニーにおいては、マウス集団にこれらの変異が固定される (ホモ接合体になる) 可能性は25%である (Chamary and Hurst, 2004; Drake et al., 1998)。

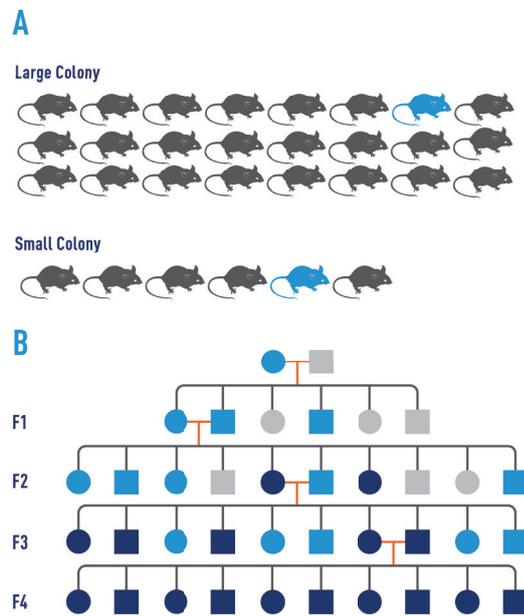


図1. 自然突然変異を増大させるリスクは、大規模コロニーに比較して小規模コロニーで高い。A) 何らかの変異を有するマウス (水色) を繁殖に使用する確率は、大規模コロニーよりも小規模コロニーで高い。B) 各繁殖サイクルにおいて、新しい変異が集団内で確立する可能性は25%である。たとえば、変異について、メンデル遺伝では、F1世代が50%の野生型 (灰色) と50%のヘテロ接合体 (水色) から構成されることが予測される。偶然に2匹のヘテロ接合体が繁殖に使われると、F2世代は25%の野生型、50%のヘテロ接合体、そして25%のホモ接合体 (濃い青) から構成されることになる。コロニー全体がこの変異のホモ接合体で固定されるまで、繁殖が継続する可能性がある (F3、F4)。しかし、繁殖に使われるマウスの遺伝子型によって、ゲノムにはどちらかの方向への遺伝的浮動が引き起こされる – すなわち、変異がコロニー内に固定される確率は、それがコロニーから完全に失われる確率と同等である。

遺伝的浮動が起こった指標：亜系統の命名

亜系統とは、親コロニーとは遺伝的に異なることが疑われるまたは知られている近交系の分岐である (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#substrains>)。

遺伝的浮動は、どのような近交系の集団でも、コロニーが異なると別々に起こる可能性があるため、亜系統の表示は、系統名の重要な構成要素である。亜系統は、実験動物研究協会(The Institute for Laboratory Animal Research: ILAR)によって割り当てられた固有の施設記号を追記することによって命名される(<http://dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>)。施設記号は、特定の系統を作製した、または維持している機関、研究室、または研究者等を識別する(表1)。施設記号が順次系統名に追記されるため、当該系統の系譜は、系統名のみから判別することが可能である。たとえば、C57BL/6NJ系は、米国国立衛生研究所(N)で長年にわたって維持された系統であり、現在ではジャクソン研究所(J)によって生産・供給されていることを表している(図3)。その延長線上で考えると、亜系統名は、一般的に、2つの系統間に遺伝的変異があることを示している。

Lab Code	Organization
CrI	Charles River Laboratories
Hsd	Envigo (formerly Harlan Laboratories)
J	The Jackson Laboratory
N	National Institutes of Health
Rj	Centre D'Elevage R. Janvier
Tac	Taconic Farms, Inc.

表1. マウス亜系統の命名法に見られる一般的な研究室コード。実験動物研究協会(The Institute for Laboratory Animal Research: ILAR)は、マウスコロニーを作製および維持する機関、研究室または個々の研究者に固有の略記号を割り当てて管理している。

遺伝的差異の疑い：世代数

親系統から分離して20世代(約5-6年間)連続して近親交配されて維持された系統は、いずれも遺伝的差異を有することが疑われるので、亜系統であると考えられる。さらに、繁殖世代数は合算されるため、2つの研究室が共通の祖先からマウスを入手してそれぞれ10世代繁殖する場合、2つのコロニーは20世代離れていると見なされ、おのおのの研究室は互いに異なる亜系統を持つこととなる(図2)。

生物学的研究に最初に使われたマウスの近交系統(たとえば、C57BL/6、DBA、C3H、BALB、CBA、およびその他)は、ほぼ100年前に確立された系統であり、今日まで継続的に論文で汎用されている。これらの系統は、200回以上近交系間で継続して交配され、また世界中の複数の機関がそれらを繁殖させている。そのため、かなりの遺伝的浮動がこれらすべての系統に時間の経過とともに生成している。遺伝的浮動のため、既存の亜系統において観察されることは、それらの亜系統の祖先の近交系において観察されることは異なる可能性がある。

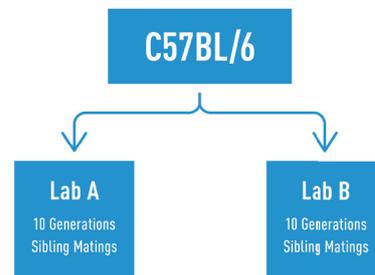


図2. 亜系統の生成。亜系統は、20世代連続して近親交配された後で生成する。これらの2つの研究室においては、個別には20繁殖世代を超えていないが、研究室Aと研究室Bは、互いに20世代離れている。系統名に施設記号を追記することは、他の亜系統と比較して、ある1つの亜系統に遺伝的浮動が起こったか否かについて一般的な情報を提供する。

既知の遺伝的差異：観察された表現型の差異による亜系統の命名

さらに、亜系統は、近交系の 2 グループのあいだにおいて、表現型の違いが観察されたときにも命名される。しかし、一般的に、コロニー内でホモ接合体が固定された後で、これらの自然突然変異が明らかな表現型の変化を示したり、注意深いコロニー管理者または研究者がマウスで何か「違う」と認識したりするまでは、この変異は数年にもわたって気づかれることなく、系統内に保有され続ける可能性がある。このように、遺伝的浮動を認識することができるか否かは、それぞれの研究室しだいなのである。すなわち、ある課題に対する実験結果がたまたま当該変異に依存しており、そのために、予想外の実験結果が単なる「実験の失敗」などではないと認識し、やがて、その異常な表現型の原因になっている変異の同定へとつながっていくのである。

例えば、C3H 系統に由来する亜系統コロニーが、2名のジャクソン研究所の研究者によって 2 系統作出されたが、これらの 2 つの亜系統は、長年にわたって、異なる系統であるとは見なされていなかった。Walter Heston 博士は、1930年代にこの亜系統を確立していた（現在の C3H/HeJ）。1952年に Heston は、彼のマウスの一部をジャクソン研究所の研究者である Henry Outzen 博士に譲渡した（現在の C3H/HeOJ）。1960年代後半に、Heston の系統はリポ多糖類（LPS）に抵抗性があり、一方 Outzen の系統は、LPS に対する感受性を持ったままだった。その後この変異は、病原体認識ならびに自然免疫系の活性化に関与する遺伝子である Tlr4 にマップされた（Poltorak et al., 1998a; Watson et al., 1978）。Tlr4 遺伝子内のヌクレオチド 2342 の C が A に置換されていることが同定された時点で、その変異は、すでに Heston の亜系統において、おそらく 1958年から 1965年のあいだに固定されてしまっていたのである（Poltorak et al., 1998b）。Heston の C3H 亜系統が LPS で処置されることがなかったら、Tlr4 変異は認識されることもなく、この亜系統における基礎免疫学の研究結果は、大きな物議をかもしものになった可能性がある。

ゲノムシーケンスは亜系統で特異的

偶然の発見は別として、遺伝的浮動が起こったか否かを明確に同定するための唯一の方法は、当該系統のゲノムシーケンスを調べて、それを基準系統のゲノムシーケンスと比較することである。C57BL/6J の雌は、マウスゲノム・シーケンシング・コンソーシアムによって最初に完全にシーケンスが調べられたマウスである（Chinwalla et al., 2002 および www.ensembl.org/Mus_musculus）。今日までに、他の 15 系統の主要な近交系マウスのゲノムシーケンスが完全に調べられている。これらの系統はすべて「J」亜系統であり、「J」はジャクソン研究所の公式な ILAR 施設記号を示している（Adams et al., 2015 および www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Strains）（表 2）。

さらに 20 以上の近交系が追加され、C57BL/6J マウスを基準ゲノムとして、SNP、インデル (indel)、あるいは構造的変化を同定するために、ショートリード法 (short read approach) を使ってシーケンスが調べられてきた（Frazer et al., 2007 および www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project）。

さらに、特定の亜系統についての既知の SNP データは、マウスフェノームデータベース (Mouse Phenome Database: MPD) で閲覧し比較することができる。MPD は、最も頻繁に論文に発表されるマウス系統に関して、共同で標準化された遺伝子型と表現型のデータベースである (<http://phenome.jax.org>)。

Mouse Strain, Full Nomenclature	JAX® Strain Number	Complete Sequence in Ensembl	Number of Datasets in MPD	Protected by GSP
C57BL/6J	000664	Y	237	Y
129S1/SvimJ	002448	Y	133	Y
A/J	000646	Y	177	
AKR/J	000648	Y	114	
B6.129P2-ApoE ^{tm1Unc} /J	002052	Y	7	Y
BALB/cJ	000651	Y	93	
BALB/cByJ	001026		118	Y
C3H/HeJ	000659	Y	158	Y
C57BL/6NJ	005304	Y	2	Y
CAST/EiJ	000928	Y	97	
CBA/J	000656	Y	110	Y
DBA/1J	000670		36	Y
DBA/2J	000671	Y	166	Y
FVB/NJ	001800	Y	133	Y
LP/J	000676	Y	84	
NOD/ShiLtJ	001976	Y	106	Y
NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /J	001303	Y	8	Y
NZO/HiLtJ	002105	Y	49	
PWK/PhJ	003715	Y	43	
SPRET/EiJ	001146	Y	34	
WSB/EiJ	001145	Y	67	

表2. 最も一般的に使われている近交系について利用可能なシーケンスと表現型の特徴付けデータは、亜系統に特異的なものである。「J」マウス亜系統のみが完全にシーケンスが調べられており、Ensembl に保存されている(この表では、「Y」は「yes」を意味する)。これらの亜系統の多くは SNP アノテーションを持ち、ここでは C57BL/6J 亜系統が基準ゲノムである。SNP 情報とともに、亜系統に特異的な何千もの表現型の特徴が個別に定量化されており、それらはマウスフェノームデータベース(Mouse Phenome Database: MPD) で解析可能となっている。これらの系統の多くは、ジャクソン研究所が特許を持つ遺伝的安定性プログラム(Genetic Stability Program: GSP) によって保護されており、チャールスリバー社によって欧州と日本で販売されている。

遺伝的背景が研究結果に影響を及ぼす

C3H の例で上述したように、亜系統は、研究結果に影響を及ぼす自然突然変異を獲得する可能性がある。実験が、最適な亜系統を使用する等適切に制御されなかった場合、実験の再現性に破滅的な結果を引き起こす可能性がある。

これらの自然突然変異が維持機関、販売業者、または個々の研究室のいずれで起こるにせよ、研究者は、どのようにして自分たちの実験にとって「最良」の亜系統を知ることができるのだろうか？

残念ながら、簡単な回答はない。遺伝的背景が問題であるか否かを決定する最善の方法は、制御された、併行実験を行って、比較することである。ある特定の実験結果を得るために、既存の亜系統すべてを調べることは不可能なため、研究結果に遺伝的背景が及ぼす影響を理解するための次善の策は、査読のある論文において他の研究者が観察したことを参照し、そして同一の亜系統を使って得られた知識を土台として、実験を継続することである。

C57BL/6亜系統

確かに、亜系統間の違いは、すべての近交系マウスに存在する。しかし、これまで、C57BL/6が世界で最も高頻度に論文発表で使われた系統であり、PubMed には 37,000件が載っている(表 3)。そのため、本論文では、C57BL/6系統において公表されている違いについて焦点を絞って紹介する。

オリジナルのジャクソン研究所C57BL/6J 亜系統を使った論文数は、現在 16,000件を超えている。オリジナルのC57BL/6J に由来する亜系統については、少数の他の論文が存在する。およそ 1,200件の論文が C57BL/6N 由来の亜系統を使用している。国際ノックアウトマウス・コンソーシアム (International Knockout Mouse Consortium: IKMC) のプロジェクトにおいて、最終的には、マウスゲノムの全 20,000遺伝子が C57BL/6N ES 細胞内で遺伝子ターゲットングされることから、数年以内に、C57BL/6N 亜系統の使用が顕著に増えることが予想されている (<http://www.mousephenotype.org/>)。

Search Term	PubMed Entries
C57BL/6	37122
C57BL/6ByJ	112
C57BL/6J	16390
C57BL/6J0laHsd	53
C57BL/6JBomTac	11
C57BL/6JRj	7
C57BL/6N	1182
C57BL/6NCrl	71
C57BL/6NJ	11
C57BL/6NHsd	41
C57BL/6NTac	78

表3. 公表文献中に多く見られるC57BL/6亜系統の発表数。論文公表時に、C57BL/6亜系統についての以下の検索用語が PubMed データベースに入力され、引用数が記録された。

ジャクソン研究所からのオリジナルの C57BL/6J 亜系統は、1951年に米国国立衛生研究所(NIH)に譲渡された。NIHの亜系統C57BL/6Nは、その後複数の機関に譲渡された。それらの機関には、チャールスリバー社(C57BL/6NCrl, 1974年)、Harlan社 (現 Envigo社, C57BL/6NHsd, 1974年, 1988年)、そしてTaconic社 (C57BL/6NTac, 1991年) が含まれる。2005年に、N 亜系統がジャクソン研究所に戻り、それはC57BL/6NJ 亜系統として知られている。現在では、少なくとも100世代を超えた繁殖によって、C57BL/6J 亜系統は、すべてのC57BL/6N 亜系統と区別されている(図 3)。

いくつかの論文において、J と N 亜系統のあいだには、遺伝的浮動によって生じた遺伝性の表現型の違いがあることが示されている。特定の研究テーマによっては、ある亜系統が他の亜系統よりも適している可能性がある (Bryant, 2011)。過去の例および最近の例を以下にいくつか記載する。

- C57BL/6J マウスは、C57BL/6N 亜系統と比較して、突然変異 Nnt 遺伝子を発現しており、この遺伝子はグルコース介在性のインスリン分泌に関与している (Freeman et al., 2006)。
- C57BL/6J マウスは、アルコールに対する強い嗜好性を示し、一方 C57BL/6NCrl には、そのような嗜好性は認められない (Mulligan et al., 2008)。これらの亜系統を比較する量的形質遺伝子座マッピング解析が、依存症に関与する遺伝子のより深い理解につながる可能性がある。
- C57BL/6N 亜系統は、網膜変性症対立遺伝子 Crbrd8 を保有し、一方 C57BL/6J 亜系統は、野生型対立遺伝子を保有する (Mattapallil et al., 2012)。
- C57BL/6J0laHsd マウスは、 α -シヌクレインとマルチメリン-1 (multimerin-1) をコードする遺伝子の自然欠失を起こすホモ接合体である (Specht and Schoepfer, 2001, 2004)。 α -シヌクレインは、パーキンソン病の神経系において凝集している。C57BL/6J0laHsd 亜系統における上記欠失は、プリオン病介在性のシナプス毒性には寄与しないようである (Asuni et al., 2010) が、全体的に運動ニューロンの変性に影響する可能性がある (Pelkonen and Yavich, 2011; Peña-Oliver et al., 2012)。
- また、C57BL/6J0laHsd マウスは、C57BL/6J および C57BL/6JRccHsd 亜系統と比較して、低い骨密度を有している (Liron et al., 2017)。
- C57BL/6NHsd マウスは、Dock2 変異を有しており、B 細胞のシグナル伝達と免疫寛容に影響を及ぼすが、他の主要な C57BL/6 亜系統には、この変異は見られない (Mahajan et al., 2016)。

この最後に示されている最近の例では、ある研究室において、研究中に2系統の異なる C57BL/6 亜系統を使って結論が引き出された結果、研究の進展が約 10 年後退したことが示さ

れている (www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2016/may/why-it-took-2-years-for-a-harvard-research-lab-to-get-back-to-research)。元の研究においては、Siae 遺伝子ノックアウトマウスを作製するために、由来の不明確な「C57BL/6」亜系統を遺伝的背景として使った実験として発表された (Cariappa et al., 2009)。2009年に論文が最初に発表されたとき、Siae は B 細胞の発達とシグナル伝達に関与すると考えられていた。Siae 変異マウスは、後にジャクソン研究所由来の特定の C57BL/6J 亜系統に戻し交配された。驚いたことに、C57BL/6J を背景とするマウスを用いた実験では、研究室での以前の発表論文を再現することができなかった (Mahajan et al., 2016)。数年間にわたって、いくつかの市販されている C57BL/6 亜系統を解析した後、別の遺伝子である、Dock2 のコピー数変異が C57BL/6NHsd マウスの系統で自然発生していたことが発見された。実際には、Dock2 がこれらの B 細胞機能の異常を起こしていたのである。この例は、研究に使用するすべてのマウスの起源を注意深くモニターして理解すべきであるという教訓として使われるべき事例である。遺伝的浮動の可能性があるため、近交系マウスの異なる亜系統を入れ替えて使用してはならないのである。

特定の研究テーマに加えて、遺伝的浮動によって生じた自然突然変異が表現型に及ぼす影響も、いくつかの実験要素に左右される可能性のあることに留意すべきである。たとえば、C57BL/6J 系統の Nnt 変異は、野生型 Nnt でレスキューしたトランスジェニック C57BL/6J マウスと比べて、in vitro でインスリン分泌を低下させていることが明らかになった (Freeman et al., 2006)。他の研究では、C57BL/6J と C57BL/6NTac 亜系統において、in vitro または in vivo で測定されたインスリン分泌に有意な差は認められなかった (Wong et al., 2010)。さらに、飼料中の脂質含有量に依存する可能性があることから、Nnt 変異の状態と飼料誘発性肥満およびインスリン応答性との関係は明確ではない (Nicholson et al., 2010)。同様に、低脂肪飼料を給与された2系統の J 亜系統 (J, JWehi) と 4 系統の N 亜系統 (NTac, NHsd, NCrl, NJ) は、グルコース負荷への応答において、同等のインスリン分泌プロフィールを持つことが示された。しかし、高脂肪飼料を給与された C57BL/6NJ 亜系統は、グルコース負荷に対してインスリン減少応答を示したが、これは Nnt 変異の状態、体重増加、脂肪量、摂餌量、または β 細胞の面積の差異では説明することができなかった (Hull et al., 2017)。

その他のいくつかのC57BL/6亜系統間の違いが公表されている。恐怖、不安、疼痛、アンフェタミンに対する応答などの行動における差異が文献に記載されている(Bryant et al., 2008)の中で要約されている)。さらに広範囲にわたって、亜系統間の違いは他の多くの基準値にも存在する。とくに、C57BL/6JとC57BL/6NTac亜系統は、欧州マウス疾病クリニック(European Mouse Disease Clinic: EUMODIC)コンソーシアムの4箇所の別個のマウスセンターによる、413種類のパラメータを用いた包括的な標準化された表現型決定パイプライン(EMPreSS)で比較された(Simon et al., 2013)。上記4箇所の表現型決定センターにおいて、JとNTacマウスは、驚愕反応、自発運動量、握力、心血管系の特徴、代謝パラメータ、および臨床生化学を含む、いくつかの分野で差異を示した。

総合的に考えると、遺伝的背景は、再現性と生物学的プロセスの一般化に影響を及ぼす可能性がある、実験デザインを構成する一要素である。困ったことに、「C57BL/6」がPubMedではほぼ37,000件記載されている中で、これらの論文の大半が亜系統名を記載していないのである。

遺伝的浮動を抑制するコロニー管理の実施

すべての繁殖コロニーが遺伝的浮動の影響を受ける。しかしながら、遺伝的浮動を抑制すること、すなわち遺伝的浮動による、実験の再現性への影響を最小限にすることが可能なたくさんのコロニー管理戦略が存在する。これらの戦略には、適切な系統名の使用、よく考えられた繁殖の実施、凍結保存の利用が含まれる。以下は、マウスコロニーを維持するときに、採用することが可能な最善の実践例である。

命名法と適切な報告

完全に適切なマウス系統名を使うことによって、不確実性を取り除き、実験に使用する亜系統の正確な識別を可能にする。

- 日常のコロニー管理では、ケージカードと実験ノートに、**亜系統名を含む、正確な系統名を記した色付きの事前印刷したラベルを使う**

ラベルを事前に印刷することは、書くときの誤りを減少させ、正確な系統名の記載を強化する。異なる色のラベルまたはケージカードを使うことは、似ている系統名や外観を持つ系統が隣り合って収容され、かつ多くの人が共有して使用する飼育室では特に重要である。

- 研究室におけるミーティングでは、プレゼンテーション用スライドの中で**適切な系統名を使うよう訓練する**
これらの形式ばらない「非公式」なコミュニケーションは、それらの図やデータが最終的にポスター、口頭発表、論文発表および研究資金申請書の形式になると、結局は、「公式な」コミュニケーションになる。
- 論文発表や研究資金申請書には、**最初に系統が記述されるときに、亜系統名を含む完全な系統名を使う**
系統名が本文と図の中でどのような略号として使われているかを規定する(「以下…という」)。「実験方法」の項では、完全な系統名および亜系統名を使う。研究室名、機関名、または当該系統の販売業者とカタログ番号などで系統の起源を識別する。世代数と採用した繁殖計画も含める(下記参照)。さらに、ARRIVE ガイドラインを参考にすること(www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines)。



図4. 兄妹交配コロニーの維持。2つ以上(水色対紺色)の近交系コロニー維持用の妹-兄(丸-四角)のペアまたはトリオだけを交配し、決して、1つの兄妹交配コロニー内の繁殖用マウスを他の兄妹交配コロニー内の繁殖用マウスと交配してはならない。仮に異常な表現型(オレンジ色)が1つの兄妹交配コロニー内に生じたとしても、異常な個体を容易に識別して取り除くことができる。そのとき、異常な表現型が生じなかった兄妹交配コロニー(兄妹交配コロニー1、水色)を2つの新たな兄妹交配コロニーに分けることができる。そうすれば、最初から新たにコロニーを再構築するための無駄な時間を費やすことはない。

近親交配、兄妹交配コロニー、世代数

近親交配は、コロニー内の逸脱した表現型の素早い識別を可能にする。兄妹交配コロニーは、影響を受けた、または影響を受けた可能性のある近交系マウスの排除を容易にする(図4)。世代数により、コロニー内の遺伝的浮動の潜在的リスクを素早く識別することができる。

- **近親交配** : 兄妹だけで交配する。
- **兄妹交配コロニー** : 各繁殖に使われた雌親および雄親を記録する。コロニー内に 2つ以上の兄妹交配コロニーを維持し、1つの兄妹交配コロニー内の繁殖用マウスを他の兄妹交配コロニー内の繁殖用マウスと交配してはならない。
- **世代数** :
 N = 戻し交配の世代数
 F = 親から始まる近親交配(妹 x 兄)の世代数
 p = 凍結保存
 $+$ = 移入前の分離世代の情報
 $?$ = 不明な世代数

たとえば、「N6F12+F8」は、6回戻し交配され、近親交配が12回、そして他の研究室に移動されて、そこで近親交配が8回行われた系統を示す。20世代の継続的な近親交配で垂系統が確立し、おそらく遺伝的浮動が起こった可能性があることを考慮すると、このコロニーの遺伝的背景をリフレッシュすることが賢明であると言える。

データ収集と定期的評価

最善の繁殖の実践に加えて、系統内において表現型の変化が起こっていないかを定期的に観察することが必要である。

遺伝的浮動が懸念される場合、「表現型の変化」とは、観察可能な、または測定可能なものを意味する。たとえば、外観、行動、繁殖成績、または実験結果などを意味する。遺伝的浮動の識別は、コロニー維持者または研究者が、第一に表現型の変化に気付くこと、第二にそれについて何らかの行動をとることから始まる。

一部の系統については、基準特性との比較が役立つ可能性がある。マウスフェノームデータベース(Mouse Phenome Database: MPD)には、そのような情報が含まれている。マウスフェノームデータベースは、系統または表現型で検索可能であり、すべてのデータ収集プロトコルも含まれている (<http://phenome.jax.org>) (表2)。

表現型がコロニー内で変化した場合、遺伝的浮動は、調べるべき多くの変動要因の1つである。考慮すべきいくつかの課題は次のとおりである。

- 何匹のマウスが影響を受けていて、それらのマウスは、特定のケージまたは兄妹交配コロニーに由来するか追跡することができるか?
- そのコロニーは、当該施設内で何年間または何世代存在してきたか?
- 最後のリフレッシュ(次項参照)はいつで、使われたマウスの起源は何だったか?

コロニーについてのしっかりとした注釈または参照できるデータがない場合、表現型が変化したかどうかを確定することは困難な可能性がある。

遺伝的背景のリフレッシュ

5-10世代の近親交配の後、コロニー内の遺伝的浮動の蓄積を除去する、または予防するために、マウスコロニーを「リフレッシュする」ことが必要となる。遺伝的背景をリフレッシュするためのいくつかの方法を以下に示す。

- **戻し交配**：遺伝子組み換え変異マウス(Genetically Engineered Mutant Mouse: GEMM)系統を、コロニー内の遺伝的浮動を抑制する方法を実践している、評判の良いマウス維持機関または販売業者から購入した適切な近交系または交雑マウス系統に戻し交配させる。戻し交配は、雌雄両方の性染色体が確実にリフレッシュされるように、雄と雌両方の生殖細胞系列を通して行うべきである。当該系統がすでに野生型に対してヘテロ接合体またはヘミ接合体として交配されている場合、販売業者から直接入手した近交系マウスを野生型繁殖動物として使うことで、遺伝的背景を「リフレッシュ」する。世代数を記録するときは、各戻し交配またはリフレッシュの数を追加の「N」で示す(上述の「近親交配、兄妹交配コロニー、世代数」の項を参照)。
- **新たな繁殖動物の購入**：近交系については、コロニー内の遺伝的浮動を抑制する方法を実践している、信頼のおけるマウス維持機関または販売業者から直接購入した新しい繁殖用マウスでコロニーを再開すべきである。
- **凍結ストックからの個体復元**：遺伝的浮動を阻止する唯一の方法は、マウスの繁殖を止めることである。使用頻度の少ないユニークなマウス系統は、遺伝的浮動を防ぎ、系統が消失することを防ぎ、動物の使用と維持費用を削減するために、常に精子または胚として凍結保存すべきである。この凍結保存された材料は、遺伝的浮動や繁殖の誤りを経験したコロニー、あるいは疾病や自然災害で失われたコロニーの回復に使うこともできる。

遺伝的背景の検証

- **遺伝子汚染のリスクを見つけ出すためにゲノムスキャンを実施する**：ゲノムスキャンまたは SNP アレイは、C57BL/6J 対 C57BL/6N のような密接な類縁関係のある垂系統間の区別を可能にする。
- **ゲノムをシーケンスする**：SNP アレイによって、コロニー内の遺伝的浮動を識別することはできない。ある系統が遺伝的浮動を起こしたか否かを知る唯一の方法は、その系統のゲノムのシーケンスを完全に調べ、基準系統のシーケンスと比較することである。

遺伝的浮動を抑制する高度な方法

積極的に繁殖させているコロニーで遺伝的浮動が起こった場合に、個別の研究室が、同様に遺伝的浮動を経験する可能性のあるマウス維持機関または販売業者からマウスを再度購入することによって、コロニーをリフレッシュできるのは何故なのでしょう？

ひとつの理由として、マウス維持機関と販売業者は、小さなコロニーよりも遺伝的集団のボトルネック効果の可能性が少ない、きわめて大きなコロニーを維持している(図 1A)。もうひとつの理由として、多くの維持機関と販売業者は、高度な方法に加えて、完全な系統名、兄妹交配コロニー/繁殖制限、凍結保存などの前述したコロニー管理戦略を専門的に実施している。

ジャクソン研究所での大きな生産コロニー内の遺伝的浮動を推定するために、69の近交系世代数と19年間の継続的繁殖で分離されたC57BL/6Jマウスのシーケンスが調べられた。これら二つのスナップショットのあいだでは、669のユニークなSNPが識別された。これらの669のSNPのうち、7つのSNPはアミノ酸配列の変化またはRNAプライス部位の変化を引き起こした。このように、タンパク質機能に影響を及ぼす可能性のある一つの変異は、10世代毎に起こり(7SNP/69世代)、これらのSNPには、大規模な表現型の違いを起こす可能性のある欠失、逆位、重複などの大きな障害は含まれていない。研究室における大学院生またはポストドクの研究期間が平均5年間くらいであり、主任研究員の個人的な研究キャリアは20年以上に及び、そして科学研究全体は永遠に続くことを考慮すると、個別のマウスコロニーは、重大な影響を及ぼす遺伝的浮動を経験する可能性があることを示している。世界中に長年にわたって、維持機関としてマウスを供給してきたジャクソン研究所は、遺伝的浮動をできる限り最少化し、ジャクソン研究所の系統を

使用する研究者が安定的で再現性のあるゲノムを継続的に利用できるようにすることを求められている。

ジャクソン研究所の系統は、いくつかの実践を組み合わせることによって、遺伝的浮動の蓄積から守られている。ジャクソン研究所の「J」という施設記号を持つすべての系統は、遺伝的浮動を抑制し、検出するように設計された2つのプログラムのうち、1つまたは両方を通して維持されている。2つのプログラムとは、遺伝的安定性プログラム(Genetic Stability Program: GSP)と遺伝的品質管理(Genetic Quality Control: GQC)プログラムである。「J」系統として供給されている系統には、米国内でジャクソン研究所の施設で繁殖されて直接供給されている全系統ならびに欧州と日本のチャールスリバー社で繁殖、供給されている「J」系統が含まれる。これらの地域全体で継続性を維持するために、コロニー管理の実践は、ジャクソン研究所によって定期的な評価と承認を受けている。このコロニー管理システムには、同一の凍結材料を用いて、定期的に既存の生存コロニーに凍結材料を注入すること(次項で説明される GSP)、または生存コロニーを完全に再創成することが含まれる。つまり、これらの活動によって、効果的に亜系統の分岐を防ぐことができるのである。

最も頻繁に同系交配される「J」系統の遺伝的安定性プログラム (GSP)

最も頻繁に使用される近交系「J」系統は、遺伝的浮動の蓄積を積極的に予防するための独特な戦略により維持されている。米国特許商標局は、ジャクソン研究所の遺伝的安定性プログラム (GSP) に 2009年と 2012年に特許権を授与した (Wiles et al., 2009, 2012, <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/patented-genetic-stability-program>)。GSP 系統は、遺伝的浮動の蓄積を避けるため、2細胞期胚として凍結保存され、定期的に創始兄妹交配コロニーに再注入される。

GSP の実践が無い場合、創始繁殖コロニーは、単一の兄妹交配に由来したものになる。年に2回 から4回、新たな兄-妹ペアが、創始コロニーから新たな創始ペアとしてコロニーを再確立するために選択される。GSPの実践が無いコロニー管理方法を利用すると、今日の創始コロニーは、遺伝的浮動のために、数年後の創始コロニーとは遺伝的に異なるものになってしまう。

GSP 実践の下では、凍結保存した胚の追跡可能なストックは、単一の創始コロニーに由来する。この胚のストックが5世代毎

に、生存創始繁殖コロニーを再確立するために使われる。凍結保存胚から復元したマウスで創始コロニーを定期的に再確立することは、一定の期間に継代される世代数を減少させる。そのため、GSP実践下での「J」系統は、空間的に(地理的に異なる施設において)遺伝的浮動から保護され、また重要なことに、時間的にも遺伝的浮動から保護されることになる(表 3)。

遺伝的品質管理プログラム

GSPの実践に加えて、すべての「J」系統は、遺伝的品質管理(Genetic Quality Control: GQC)プログラムの下で維持される (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-control-program>)。このプログラムは、上述したように、個別の研究室が利用することができる典型的なコロニー管理プログラムの多くを統合しているが、非常に高度な説明可能な記録を残している。

実験動物管理の専門家は、毛色、体のサイズの異常、体重、骨格構造、行動、繁殖成績、腫瘍感受性、寿命などの表現型変異を識別するための、厳しい訓練プログラムを受ける。特定の系統に予想される特徴から逸脱するすべてのマウスはさらに調査されて、その異常マウスが由来する兄妹交配コロニーは追跡調査され、必要に応じて処分される。

さらに、兄妹交配コロニーは、増殖用コロニーと供給用コロニーから分離された創始コロニーの中で維持される。兄妹交配コロニーは、Petkov et al., 2004に基づいたSNPパネルを使って、遺伝的異常または遺伝的汚染の兆候について定期的にスクリーニングが行われる。

欧州および日本のチャールスリバー社によって繁殖された JAX™ マウス

ジャクソン研究所とチャールスリバー社は、欧州、日本、韓国、台湾の生物医学研究者にJAX™マウスを地域的に供給する企業契約を締結している。ジャクソン研究所の繁殖プログラムと遺伝的品質管理ガイドラインに厳密に従って、チャールスリバー社は、欧州と日本でJAX™マウスを繁殖しているので、これらのJAX™マウスは、ジャクソン研究所によって繁殖されるマウスと遺伝的品質が同等である。さらに詳細な情報については、www.criver.com/jaxmice を参照してください。

結論

遺伝的浮動は、積極的に繁殖を実施しているマウスコロニーでは避けられない現実であり、研究の結果と再現性に大きな影響を及ぼす可能性がある。遺伝的浮動を完全に除去することはできないが、個別の研究室でも大規模なマウス維持機関や販売業者においても、遺伝的安定性を維持するためのコロニー管理戦略を実施することが可能である。実験の再現性と科学的発見は、マウスの正確な亜系統名の使用と繁殖情報の注意深い報告に依存している。

本件に関する連絡先 :

日本チャールス・リバー(株)マーケティング・ビジネスデベ
ロップメント部または営業部までお願いします。

Tel: 045-474-9336, 045-474-9340

mail: web_order@crl.com

参考文献

- Adams, D.J., Doran, A.G., Lilue, J., and Keane, T.M. (2015). The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 26, 403–412.
- Asuni, A.A., Hilton, K., Siskova, Z., Lunnon, K., Reynolds, R., Perry, V.H., and O'Connor, V. (2010). Alpha-synuclein deficiency in the C57BL/6J^{OlaHsd} strain does not modify disease progression in the ME7-model of prion disease. *Neuroscience* 165, 662–674.
- Boleij, H., Salomons, A.R., van Sprundel, M., Arndt, S.S., and Ohl, F. (2012). Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129mouse substrains. *PLoS One* 7, e42544.
- Bryant, C.D. (2011). The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1245, 31.
- Bryant, C.D., Zhang, N.N., Sokoloff, G., Fanselow, M.S., Ennes, H.S., Palmer, A.A., and McRoberts, J.A. (2008). Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J. Neurogenet.* 22, 315–331.
- Cariappa A., Takematsu H., Liu H., Diaz S., Haider K., Boboila C., Kallou G., Connole M., Shi H.N., Varki N., Varki A., Pillai S. (2008). B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med.* 2009Jan 16;206(1):125-38.
- Chamary, J.-V., and Hurst, L.D. (2004). Similar Rates but Different Modes of Sequence Evolution in Introns and at Exonic Silent Sites in Rodents: Evidence for Selectively Driven Codon Usage. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1014–1023.
- Chinwalla, A.T., Cook, L.L., Delehaunty, K.D., Fewell, G.A., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Graves, T.A., Hillier, L.W., Mardis, E.R., McPherson, J.D., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.
- Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* 148, 1667–1686.
- Frazer, K.A., Eskin, E., Kang, H.M., Bogue, M.A., Hinds, D.A., Beilharz, E.J., Gupta, R.V., Montgomery, J., Morenzoni, M.M., Nilsen, G.B., et al. (2007). A sequence-based variation map of 8.27million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* 448, 1050–1053.
- Freeman, H.C., Huggill, A., Dear, N.T., Ashcroft, F.M., and Cox, R.D. (2006). Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* 55, 2153–2156.
- Hull, R.L., Willard, J.R., Struck, M.D., Barrow, B.M., Brar, G.S., Andrikopoulos, S., and Zraika, S. (2017). High fat feeding unmasks variable insulin responses in male C57BL/6 mouse substrains. *J. Endocrinol.* 233, 53–64.
- Liron, T., Raphael, B., Hiram-Bab, S., Bab, I.A., and Gabet, Y. (2017). Bone Loss in C57BL/6J-^{OlaHsd} Mice, a Substrain of C57BL/6J Carrying Mutated Alpha-Synuclein and Multimerin-1. *Genes. J. Cell. Physiol.*
- Mahajan, V.S., Demissie, E., Mattoo, H., Viswanadham, V., Varki, A., Morris, R., and Pillai, S. (2016). Striking Immune Phenotypes in Gene-Targeted Mice Are Driven by a Copy-Number Variant Originating from a Commercially Available C57BL/6 Strain. *Cell Rep.* 15, 1901–1909.
- Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.-C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. (2012). 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, 2921–2927.
- Mulligan, M.K., Ponomarev, I., Boehm, S.L., Owen, J.A., Levin, P.S., Berman, A.E., Blednov, Y.A., Crabbe, J.C., Williams, R.W., Miles, M.F., et al. (2008). Alcohol trait and transcriptional genomic analysis of C57BL/6 substrains. *Genes Brain Behav.* 7, 677–689.

- Nicholson, A., Reifsnyder, P.C., Malcolm, R.D., Lucas, C.A., MacGregor, G.R., Zhang, W., and Leiter, E.H. (2010). Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obes. Silver Spring Md* *18*, 1902–1905.
- Pelkonen, A., and Yavich, L. (2011). Neuromuscular pathology in mice lacking alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* *487*, 350–353.
- Peña-Oliver, Y., Buchman, V.L., Dalley, J.W., Robbins, T.W., Schumann, G., Ripley, T.L., King, S.L., and Stephens, D.N. (2012). Deletion of alpha-synuclein decreases impulsivity in mice. *Genes Brain Behav.* *11*, 137–146.
- Petkov, P.M., Cassell, M.A., Sargent, E.E., Donnelly, C.J., Robinson, P., Crew, V., Asquith, S., Haar, R.V., and Wiles, M.V. (2004). Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* *83*, 902–911.
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., et al. (1998a). Genetic and Physical Mapping of the Lps Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region. *Blood Cells. Mol. Dis.* *24*, 340–355.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998b). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* *282*, 2085–2088.
- Russell, L.B., and Russell, W.L. (1996). Spontaneous mutations recovered as mosaics in the mouse specific-locus test. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 13072–13077.
- Silver, L. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications* (Oxford, New York: Oxford University Press)
- Simon, M.M., Greenaway, S., White, J.K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E.J., et al. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* *14*, R82.
- Specht, C.G., and Schoepfer, R. (2001). Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci.* *2*, 11.
- Specht, C.G., and Schoepfer, R. (2004). Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein-deficient mice. *Genomics* *83*, 1176–1178.
- Watson, J., Kelly, K., Largen, M., and Taylor, B.A. (1978). The Genetic Mapping of a Defective Lps Response Gene in C3H/HeJ Mice. *J. Immunol.* *120*, 422–424.
- Wiles, M.V., Taft, R., and Eicher, E.M. (2009). Methods for maintaining genetic stability of inbred animal strains.
- Wiles, M.V., Taft, R., and Eicher, E.M. (2012). Methods for maintaining genetic stability of inbred animal strains.
- Wong, N., Blair, A.R., Morahan, G., and Andrikopoulos, S. (2010). The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology* *151*, 96–102.

