

※青字は、記載にあたっての説明ですので、ご記入の際は削除して下さい。

※枚数制限はありませんが、「記載のポイント」を踏まえて記述してください。

課題番号

06-031

## 平成21年度シーズ発掘試験（発掘型）研究報告書

報告日：平成22年4月18日

技術分野

91

課題名：医薬研究のための、疾患モデルマウス迅速作製技術の開発

研究期間：平成21年7月16日～平成22年3月31日

### 1. 担当コーディネータ

氏名（役職）	百瀬 博一（コーディネーター）		印
所属機関名	信州大学 産学官連携推進本部 ライフサイエンス分野		
連絡先	所在地	〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1	
	TEL/FAX	0263-37-2071	
	E-mail	dmomose@shinshu-u.ac.jp	

### 2. 代表研究者（代表研究者のみ記入してください。）

氏名（役職）	新藤 隆行（教授）		印
所属機関名	国立大学法人信州大学大学院医学系研究科		
連絡先	所在地	〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1	
	TEL/FAX	0263-37-3192/0263-37-3437	
	E-mail	tshindo@shinshu-u.ac.jp	

### 3. 共同研究者（JSTと委託研究契約を締結した共同研究機関の場合のみ記入してください。）

氏名（役職）			
所属機関名			
連絡先	所在地		
	TEL/FAX		
	E-mail		

## 4. 試験研究の結果報告

### (1) 試験内容

#### (1) 遺伝子改変マウス作製のための新規コアカセットベクターの開発

従来のターゲティングベクターでは、改変 ES 細胞を選択する際、細胞の遺伝子の抽出と遺伝子サザン分析により、数 100 個もの細胞株のスクリーニング作業を行う必要があり、大変な労力と時間を要する。この行程を効率化するため、SCOT (Speed Conditional Gene Targeting) ベクターを考案した。本研究では、SCOT ベクターにより、ES 細胞を識別する方法について検討した。

#### (2) 胚の確保、胚培養系に関する新規手法の開発

従来、遺伝子改変マウス作製においては、自然交配した雌マウスから、必要な時期に胚を回収し、利用されてきた。この方法では、胚の安定した回収が望めない結果、実験を何度も繰り返す必要がある。胚培養系を改良することで、遺伝子改変マウス作製に求められる各種の胚を安定供給する手法について検討した。

#### (3) 100%生殖キメラマウスを作成するためのマウス系統の開発

効率よく生殖系列に乗るキメラマウス作成のために、専用のマウス系統 (Getter mouse) を考案した。Getter mouse では、雌雄どちらかの胚のみを蛍光選別する事を目的とする。本研究においては、Getter mouse ラインの樹立を試みた。

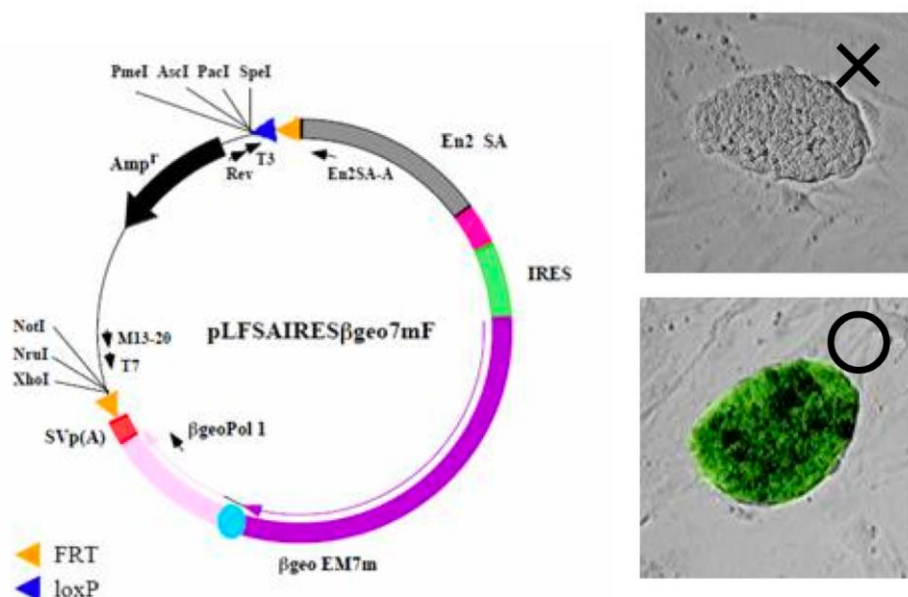
### (2) 得られた成果

#### (1) 遺伝子改変マウス作製のための新規コアカセットベクターの開発

遺伝子改変マウスの作製には、ターゲティングベクターが必要とされる。従来のターゲティングベクターは、一般に、改変すべき遺伝子を構成する塩基配列の一部が変異された配列、ネオマイシン耐性遺伝子及びチミジンキナーゼ遺伝子をそれぞれ構成する遺伝子配列を有し、これらは強力なプロモータ (pGK プロモータ等) によって強制発現させられる。しかし、このターゲティングベクターでは、改変 ES 細胞を選択する際、DNA がランダムに挿入された細胞株の排除効率は低く、サザンブロット分析や PCR 分析等の手段を用いて、目的とする細胞株を選別する作業を更に行う必要がある。

我々は、視覚的に検出可能なマーカーをコードする配列を導入し、ノックアウト動物の作製を簡便化できる SCOT (Speed Conditional Gene Targeting) ベクターを考案した。SCOT ベクターは、検出配列の他、原核生物の増殖を阻害する薬剤耐性マーカーをコードする耐性配列、原核生物で機能するプロモータ配列、下流配列の発現を誘導する調節配列などを含む。本研究で基本的なベクター設計と構築を終了し、実際に ES 細胞に導入した場合、相同組換えを起こしたクローンを識別出来ることを確認した。

## SCOT基本ベクター



### (2) 胚の確保、胚培養系に関する新規手法の開発

従来、遺伝子改変マウス作製においては、自然交配した雌マウスから、必要な時期に胚(受精卵、8細胞期、胚盤胞)を回収し、利用されてきた。この方法では、胚の安定した回収効率が望めない結果、実験を何度も繰り返す必要がある。この問題解決として、人工受精による受精卵の確保が考えられるが、自然発生胚に比べると構成細胞数が少ない場合が多く、全てが個体に発生するほどのクオリティーのものは得られない。そこで我々は、自然発生胚と同様のクオリティーの胚を得ることを可能とする培養プロトコール、多段階培養法を考案した。培養液の組成の最適化について検討を続けている。

### (3) 100%生殖キメラマウスを作成するためのマウス系統の開発

従来の方法では、germline transmissionを示すキメラマウスを得るためには、数多くのキメラマウスの作製と、それらの検定交配が必要であり、大変な時間、手間、コストがかかる。我々は、100%の確立で生殖系列に乗るキメラマウス作製のために、専用のマウス系統(Getter mouse)を考案した。

本研究では、Y染色体に蛍光遺伝子配列を挿入するノックインマウスを作成することで、雄胚のみを蛍光選別する方法を試みた。しかし、Y染色体には重要な遺伝子が近距離に連続、重複して配列しているためか、試みた遺伝子操作によっていずれもES細胞の増殖が停止してしまい、今回の研究ではマウス系統を選るまでには至らなかった。方法を改良し、引き続き系統の樹立を試みたい。

## 外部発表・特許出願等

\* 今回の研究課題成果についてのみ、平成21年度中に掲載・発表・出願等したものをカウントしています。

\* 今回の研究課題成果についてのみで結構です。

項	目	数
① 発表論文	国内論文数	0
	海外論文数	0
② 口頭発表	国内発表数	2
	海外発表数	0
③ マッチングイベントへの参加（発表）	参加（発表）数	0
④ 展示会出展	出展数	0
⑤ 特許出願	国内出願数	0
	外国出願数	0
⑥ 掲載/放映 (採択記事は除く)	雑誌掲載数	0
	新聞掲載数	0
	テレビ放映数	0
⑦ 他事業への展開	採択数	1

## ① 発表論文

該当なし

## ② 口頭発表

第6回 GPCR 研究会基調講演  
アドレノメデュリン受容体活性調節システムとその病態生理学的意義  
2009.5 東京  
(招待講演の中で、本技術の概要について紹介を行った)

第24回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 特別講演  
アドレノメデュリンとその受容体システム  
2009.7 長野  
(招待講演の中で、本技術の概要について紹介を行った)

③ マッチングイベントへの参加（発表） 該当なし

④ 展示会出展（③ マッチングイベントを除く） 該当なし

⑤ 特許出願：(4) に記載。 該当なし

⑥ 掲載・放映 該当なし

## ⑦ 他事業への展開

独立行政法人科学技術振興機構  
重点地域研究開発推進プログラム(育成研究)  
抗体医薬開発に向けた 次世代疾患モデルマウスの迅速作製技術開発  
→ 事業自体の廃止

独立行政法人科学技術振興機構  
研究成果最適展開支援事業 A-STEP

本格研究開発ステージ、ハイリスク挑戦タイプ研究課題  
創薬シーズ開発の効率化に向けた 次世代疾患モデルマウスの迅速作製技術開発  
→ 採択

### (3) 今後の展開

(株)免疫生物研究所との共同で申請した、科学技術振興機構 研究成果最適展開支援事業 A-STEP 本格研究開発ステージ、ハイリスク挑戦タイプ研究に、本研究の展開を狙った研究課題「創薬シーズ開発の効率化に向けた次世代疾患モデルマウスの迅速作製技術開発」が採択となった。また技術の実用化に向け、日本科学未来館研究施設にて、免疫生物研究所の連携による共同研究を開始した。

A-STEP の事業によって研究成果を発展させ、引き続き技術の実用化を目指したい。

### (4) 知的財産権について

A-STEP 研究の中で、技術の確立と実施例を積んだ上で、今後各項目の知財を押さえていく予定である。

### (5) 今後のフォローアップ等について（コーディネータ記載）

#### ① 本試験終了1年後までに行う活動予定

- ・ S C O T 法特許出願、以降優先権主張による出願を継続。
- ・ A - S T E P 課題を推進し、疾患モデル動物の事業化の可能性を検証する。

#### ② 3年後までに行う活動予定

- ・ 疾患モデル動物の事業化の推進し、免疫生物研究所の新規事業として成立させる
- ・ 製薬企業との連携を確立し、高効率な抗体生産方法の研究開発を実施
- ・ A - S T E P に続く大型研究補助金を獲得し、抗体医薬研究を加速する
- ・ 抗体医薬生産方法特許出願、以降優先権主張による新規出願を継続

#### ④ 3年後以降の長期的活動

- ・ 製薬企業との共同研究を推進する