

令和元年度 共同研究報告書

研究区分		分子生体防御分野
研究課題		ゲノム編集動物作製のための技術開発とそれを利用した排尿機能障害、雄性不妊疾患モデル動物の作製
新規・継続の別		新規 ・ 継続
研究代表者	所属	旭川医科大学教育研究推進センター
	職名・氏名	准教授・上田 潤
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	旭川医科大学教育研究推進センター
	職名・氏名	教授・松本 成史
	所属	旭川医科大学教育研究推進センター 動物実験技術支援部門
	職名・氏名	技術職員・日野 千紘
受け入れ教員	職名・氏名	教授・高岡 晃教
概要 (100～150 字程度)		本研究課題ではゲノム編集動物作製を行うが、貴研究所において野生型のラットを用いて体外受精を行い、体外受精胚にマイクロマニピュレーターを用いてゲノム編集を施すことを予定している。この実験と合わせて、本学では作製が困難な長鎖ノックインマウスの作製なども同様の手順で行うことを予定している。
研究目的 (300 字程度)		ゲノム編集技術の登場によって、疾患モデル動物の作製が容易となってきた。しかし、ゲノム編集動物作製の大部分は未だにマウスを用いて行われており、ラットなどの他の動物種での実施数は少ない。マウスが疾患モデル動物作製に有用であることは論を俟たないが、排尿機能障害などの一部の疾患では、施術のしやすさなどの関係からラットの方がより有効である。このことからラットにおいても遺伝子改変作製が求められているが、ラットの体外受精技術が広く普及していないことからこのことが実現に至っていない。本研究課題ではノックインなどの様々なゲノム編集ラットの作製をより簡便に行う技術を開発することを目的としている。
研究内容・成果 (1000 字程度)		本年度は貴研究所にてゲノム編集に必要なマイクロマニピュレーター操作を行うための準備段階として、装置のセットアップ及び技術習得のための手技練習を行った。技術習得にはしばらく鍛錬が必要とされるため、引き続き手技練習を継続したい。 また、マニピュレーター操作に用いる受精卵の作製は本学で行うため、本学と貴研究所間の胚の移動方法を、マウス胚を用いて検討した。本学で体外受精を行ったマウス胚を前核期で冷蔵保存し、翌日冷蔵状態で持参し、貴研究所にてマニピュレーター操作に用いた。冷蔵胚は凍結保存胚の移動に用いる液体窒素やドライシッパーのような大掛かりな容器は不要で、保冷剤と発泡スチロールの保冷容器のみで移動できた。胚の状態も健常で、新鮮胚と比較してやや

	透明帯が軟化しているが、マニピレーター操作に用いることに問題は認められなかった。また、37℃・5%CO₂条件下に戻して培養すると2細胞期胚に発生した。今後はラットの体外受精胚においても同様の保存状態で移動が可能かどうか検討を進めたい。更に、ゲノム編集後の胚は本学に戻して移植するため、胚へのダメージがより軽減できる移動方法を検討しなければならない。 一方、本年度は本研究課題の基礎となるラット体外受精の再現性を得るための条件について、これまで研究した内容をまとめて論文として報告した (Hino, <i>et al.</i>, <i>Theriogenology</i>, 2020)。ラット体外受精技術については1970年代から報告されてきたが、安定して高い体外受精率を得ることは難しく、技術の普及は遅れていた。本研究では、過排卵処理を施した雌ラットの採卵工程にかかる時間と安楽死処分の方法が体外受精率に影響を及ぼすことを明らかとし、ラット体外受精の再現性を高める方法を確認した。また、この方法で作製したラットの体外受精胚を用いて、エレクトロポレーション法によってゲノム編集ラットも作製している。今後は、貴研究所のマニピレーターを用いて、体外受精胚からゲノム編集ラットの作製を行う予定である。
成果	【学会報告】 参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと 特になし 【論文発表】 著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF入力のこと Chihiro Hino, Jun Ueda, Hiroshi Funakoshi, Seiji Matsumoto, <i>Theriogenology</i>, 144 (2020) 146-151, IF=2.299 【新聞報道】 特になし