

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-141073

(P2004-141073A)

(43) 公開日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	4 B 0 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2002-310328 (P2002-310328)	(71) 出願人 503360115
(22) 出願日 平成14年10月24日 (2002.10.24)	独立行政法人 科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年4月26日 社団法人日本実験動物学会発行の「第49回日本実験動物学会総会講演要旨集」に発表	(72) 発明者 崎村 建司 新潟県新潟市関屋浜松町205-1
	Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11 GA18 HA08 HA14 4B065 AA91X AB01 AC20 BA01 BA24 BB21 BB40 BD09 CA44 CA46

(54) 【発明の名称】 近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株及び該細胞株を用いたキメラマウス

(57) 【要約】

【課題】 汎用近交系マウスC57BL/6由来の生殖系列細胞分化能を有するES細胞株、該細胞株を用いたキメラマウス、その樹立及び作製方法を提供すること。

【解決手段】 近交系マウスC57BL/6の雌のマウスから、受精後胚盤胞形成前の胚を採取し、インピトロ、ES細胞用培地中で培養し、該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離し、該胚をフィーダー細胞培地中に播種して培養し、該培養胚からES様形態で生育しているものの細胞塊を採取し、該細胞塊をトリプシンを含有するES細胞用培地を用いて分散処理し、該細胞をフィーダー細胞培地及びES細胞用培地を用いて継代培養して、生殖系列細胞分化能を有する汎用近交系マウスC57BL/6由来のES細胞株を樹立する。該ES細胞を用いてキメラマウスを作製することにより、生殖系列遺伝をす

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 近交系マウス C 5 7 B L / 6 の雌雄を交配する工程、(b) 該雌のマウスから受精後胚盤胞形成前の胚を採取し、インピトロ、ES細胞用培地中で培養する工程、(c) 該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離し、フィーダー細胞培地中に播種して培養する工程、(d) 該培養胚からES様形態で生育しているものの細胞塊を採取し、該細胞塊をトリプシンを含有するES細胞用培地を用いて分散した後、フィーダー細胞培地中に播種して培養する工程、(e) 該(d) の工程を繰り返した後、周りに分化した細胞が認められないコロニーを選択する工程、及び(f) 該コロニーをES細胞用培地を用いて継代培養し増殖した後、保存する工程、からなることを特徴とする近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法。

10

【請求項 2】

(b) 工程における胚の発生段階及び採取時期を管理された条件で正確に行うために、(a) 工程において、近交系マウス C 5 7 B L / 6 の雌雄を交配するに際して、雌のマウスに性腺刺激ホルモンを投与して交配することを特徴とする請求項 1 記載の近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法。

【請求項 3】

(b) 工程における雌のマウスからの受精後の胚の採取を、2.5日胚の時期において行い、インピトロで培養することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法。

20

【請求項 4】

(b) 工程 ~ (f) 工程において用いるES細胞用培地として、KO-ES培地を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法。

【請求項 5】

(f) 工程において、コロニーをES細胞用培地を用いて継代培養し増殖した後、凍結保存することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法。

【請求項 6】

近交系マウス C 5 7 B L / 6 が、近交系マウス C 5 7 B L / 6 N C r j であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法。

30

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか記載のES細胞株の樹立方法により樹立された近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株。

【請求項 8】

近交系マウス C 5 7 B L / 6 N C r j に由来し、生殖系列細胞分化能を有するES細胞 R E N K A 株 (受託番号 : F E R M B P - 8 2 2 5) 。

【請求項 9】

(g) 請求項 7 又は 8 に記載の近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株、或いは該細胞株を遺伝子工学的に形質転換したES細胞株を、ES細胞用培地及びフィーダー細胞培地を用いて培養・増殖する工程、(h) 予め胚供給用雌雄のマウスを交配して採取した宿主胚を、ES細胞用培地を用いて培養する工程、(i) (g) 工程で調製したES細胞株を、(h) 工程で調製した宿主胚に導入する工程、及び(j) ES細胞株を導入した宿主胚を偽妊娠させた仮親用雌マウスの子宮に移植する工程、からなることを特徴とするキメラマウスの作製方法。

40

【請求項 10】

キメラマウスの作製に用いるES細胞用培地を、ES細胞株の樹立において用いたES細胞用培地と同一の培地を用いることを特徴とする請求項 9 記載のキメラマウスの作製方法。

50

【請求項 1 1】

E S 細胞用培地、K O - E S 培地であることを特徴とする請求項 1 0 記載のキメラマウスの作製方法。

【請求項 1 2】

E S 細胞をフィーダー細胞上で培養・増殖する工程を、I C R 系統マウスの 1 4 日胚より調製したネオマイシン耐性線維芽細胞フィーダー上で、播種する細胞数と継代時期を厳密に制御して分化を抑制した状態で行うことを特徴とする請求項 9 ~ 1 1 のいずれか記載のキメラマウスの作製方法。

【請求項 1 3】

(i) 工程において、E S 細胞株を 8 細胞期の宿主胚へ注入することを特徴とする請求項 9 ~ 1 2 のいずれか記載のキメラマウスの作製方法。 10

【請求項 1 4】

E S 細胞株を導入する宿主胚として、I C R 系統のマウスの胚を用いることを特徴とする請求項 9 ~ 1 3 のいずれか記載のキメラマウスの作製方法。

【請求項 1 5】

請求項 9 ~ 1 4 のいずれか記載の方法により作製されたキメラマウス。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、近交系マウス C 5 7 B L / 6 由来生殖系列細胞分化能を有する E S 細胞株、その樹立方法、及び該細胞株を用いたキメラマウス、その作製方法に関する。 20

【0 0 0 2】

【従来技術】

E S 細胞は、胚幹細胞 (e m b r y o n i c s t e m c e l l : E S c e l l) と呼ばれ、胚盤胞の内部細胞塊より樹立される未分化な株化細胞をいう。E S 細胞を初期胚に注入し、キメラマウスを作製すると、生殖細胞を含むすべての細胞に分化することができる。生殖系列のキメラマウスを交配すると、E S 細胞由来の子孫を作り出すことができるため遺伝子ターゲティングなどにより予め特定の遺伝子进行操作しておけば、任意のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを作製することができる。

【0 0 0 3】

E S 細胞を用いた遺伝子ノックアウト法等は、生命現象を分子レベルで解析するのに優れた方法である。とりわけ脳の機能は個体レベルで解析することが必須であり、遺伝子ノックアウト法は無くてはならない技術になってきている。しかし、現在ほとんどのノックアウトマウス作製に用いられている E S 細胞は 1 2 9 系統由来であるが、このマウス系統は脳梁の形成不全があり、脳高次機能を解析する上で必須の行動解析に向かない。そこで、これまで作製されたノックアウトマウスは、行動解析に実績がある近交系マウス C 5 7 B L / 6 系統に戻し交配され、行動学的な解析がなされてきた。ところが変異を指標に選択をする限り、変異導入領域を中心にした遺伝子領域に戻し交配で完全に入れ換えることは不可能であり、遺伝子背景の問題を克服するには、純系のマウス由来 E S 細胞を用いるしか方法がない。 30 40

【0 0 0 4】

これまでに、近交系 C 5 7 B L マウス由来の細胞株で生殖系列細胞への分化能を維持している細胞株としては、いくつかの報告がされている。例えば、C 5 7 B L マウス由来の細胞株として、雄の細胞株 (B L - 1 1 1) (E x p e r i m e n t a l C e l l R e s e a r c h 1 9 7 , 2 5 4 - 2 5 8 , 1 9 9 1) が報告されている。また、その他の近交系マウスである D B A に由来する細胞株として、これも雄の細胞株が報告されている (E x p e r i m e n t a l C e l l R e s e a r c h 2 2 1 , 5 2 0 - 5 2 5 , 1 9 9 5) 。更に、近年、汎用近交系 C 5 7 B L / 6 N 系マウス由来の生殖系列細胞への分化能を有する細胞株として、該マウスの透明帯からイン ビトロで孵化させた胚盤胞から採取した汎用近交系 C 5 7 B L / 6 N 系マウス由来の雌の E S 細胞が開示され 50

ている（特開2001-61470号公報）。

【0005】

しかしながら、これまでにC57BL/6系統等から樹立されたES細胞株として、いくつかの報告はされてきたが、生殖系列キメラが得られる効率に問題がある等が指摘されている。実際、これまで発表されたC57BL/6由来ES細胞のうち、本発明者が入手できた細胞を調べたが、いずれも生殖系列キメラは得られなかった。しかし、Colin L. Stewartらが分与した、ES細胞Bruce株から細胞形態とカリオタイプを指標に樹立し直した垂株からは生殖系列キメラが得られた。そこで、現在行動解析などに日常的に用いられているC57BL/6NCrjのようなC57BL/6由来の生殖系列細胞への分化能を有するES細胞株の樹立が必要とされた。

10

【0006】

【特許文献1】

特開2001-61470号公報

【非特許文献1】

Experimental Cell Research 197, 254-258, 1991

【非特許文献2】

Experimental Cell Research 221, 520-525, 1995

【0007】

20

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、汎用近交系マウスC57BL/6由来の生殖系列細胞分化能を有するES細胞株、その樹立方法、及び該細胞株を用いたキメラマウス、その作製方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、汎用近交系マウスC57BL/6由来の生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立を行うべく、鋭意研究の結果、近交系マウスC57BL/6の雌雄を交配して、該雌のマウスから、例えば2.5日胚のような受精後胚盤胞形成前の胚を採取し、インピトロ、ES細胞用培地中で培養し、該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離し、そして該胚を、フィーダー細胞培地中に播種して培養し、該培養胚からES様形態で生育しているものの細胞塊を採取し、該細胞塊をトリプシンを含有するES細胞用培地を用いて分散処理、及び、フィーダー細胞培地を用いて培養し、更にはES細胞用培地を用いて継代培養し増殖するES細胞株樹立のための培養・処理を行うことにより、生殖系列細胞分化能を有する汎用近交系マウスC57BL/6由来、ES細胞株を樹立することができるを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0009】

本発明で樹立したES細胞株の具体例として、近交系マウスC57BL/6NCrjに由来し、生殖系列細胞分化能を有するES細胞RENKA株（受託番号：FERM BP-8225）が挙げられる。

40

本発明で樹立したES細胞株は、宿主胚へ導入し、仮親用雌マウスの子宮に移植することにより、宿主胚由来の細胞とで構成されるキメラ個体を得ることができる。本発明のES細胞は、キメラ個体内で生殖系列にも分化するので、ES細胞由来の配偶子を産生することができ、したがって、近交系マウスC57BL/6の適当なマウスと交配することにより、ES細胞に導入された、或いはノックアウトされた遺伝子を保持する近交系マウスC57BL/6マウスを作製することができる。

【0010】

すなわち本発明は、(a)近交系マウスC57BL/6の雌雄を交配する工程、(b)該雌のマウスから受精後胚盤胞形成前の胚を採取し、インピトロ、ES細胞用培地中で培養する工程、(c)該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離し、フィーダー細胞

50

培地中に播種して培養する工程、(d)該培養胚からES様形態で生育しているものの細胞塊を採取し、該細胞塊をトリプシンを含有するES細胞用培地を用いて分散した後、フィーダー細胞培地中に播種して培養する工程、(e)該(d)の工程を繰り返した後、周りに分化した細胞が認められないコロニーを選択する工程、及び(f)該コロニーをES細胞用培地を用いて継代培養し増殖した後、保存する工程、からなることを特徴とする近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法(請求項1)や、(b)工程における胚の発生段階及び採取時期を管理された条件で正確に行うために、(a)工程において、近交系マウスC57BL/6の雌雄を交配するに際して、雌のマウスに性腺刺激ホルモンを投与して交配することを特徴とする請求項1記載の近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法(請求項2)や、(b)工程における雌のマウスからの受精後の胚の採取を、2.5日胚の時期において行い、インピトロで培養することを特徴とする請求項1又は2記載の近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法(請求項3)や、(b)工程～(f)工程において用いるES細胞用培地として、KO-ES培地を用いることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法(請求項4)や、(f)工程において、コロニーをES細胞用培地を用いて継代培養し増殖した後、凍結保存することを特徴とする、請求項1～4のいずれか記載の近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法(請求項5)や、近交系マウスC57BL/6が、近交系マウスC57BL/6Ncrjであることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立方法(請求項6)や、請求項1～6のいずれか記載のES細胞株の樹立方法により樹立された近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株(請求項7)からなる。

10

20

【0011】

また本発明は、請求項1～6のいずれか記載のES細胞株の樹立方法により樹立された近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株(請求項7)や、近交系マウスC57BL/6Ncrjに由来し、生殖系列細胞分化能を有するES細胞RENKA株(受託番号:FERMBP-8225)(請求項8)からなる。

【0012】

さらに本発明は、(g)請求項7又は8に記載の近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株、或いは該細胞株を遺伝子工学的に形質転換したES細胞株を、ES細胞用培地及びフィーダー細胞培地を用いて培養・増殖する工程、(h)予め胚供給用雌雄のマウスを交配して採取した宿主胚を、ES細胞用培地を用いて培養する工程、(i)(g)工程で調製したES細胞株を、(h)工程で調製した宿主胚に導入する工程、及び(j)ES細胞株を導入した宿主胚を偽妊娠させた仮親用雌マウスの子宮に移植する工程、からなることを特徴とするキメラマウスの作製方法(請求項9)や、キメラマウスの作製に用いるES細胞用培地を、ES細胞株の樹立において用いたES細胞用培地と同一の培地を用いることを特徴とする請求項9記載のキメラマウスの作製方法(請求項10)や、ES細胞用培地が、KO-ES培地であることを特徴とする請求項10記載のキメラマウスの作製方法(請求項11)や、ES細胞をフィーダー細胞上で培養・増殖する工程を、ICR系統マウスの14日胚より調製したネオマイシン耐性線維芽細胞フィーダー上で、播種する細胞数と継代時期を厳密に制御して分化を抑制した状態で行うことを特徴とする請求項9～11のいずれか記載のキメラマウスの作製方法(請求項12)や、(i)工程において、ES細胞株を8細胞期の宿主胚へ注入することを特徴とする請求項9～12のいずれか記載のキメラマウスの作製方法(請求項13)や、ES細胞株を導入する宿主胚として、ICR系統のマウスの胚を用いることを特徴とする請求項9～13のいずれか記載のキメラマウスの作製方法(請求項14)や、請求項9～14のいずれか記載の方法により作製されたキメラマウス(請求項15)からなる。

30

40

【0013】

【発明の実施の形態】

50

本発明は、汎用近交系マウスC57BL/6由来の生殖系列細胞分化能を有するES細胞株を樹立し、該細胞株を用いてキメラマウスを作製することからなる。

【0014】

[ES細胞株の樹立]

本発明において、汎用近交系マウスC57BL/6由来の生殖系列細胞分化能を有するES細胞株を樹立するために、(a)近交系マウスC57BL/6の雌雄を交配する工程、(b)該雌のマウスから受精後胚盤胞形成前の胚を採取し、インビトロ、ES細胞用培地中で培養する工程、(c)該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離し、フィーダー細胞培地中に播種して培養する工程、(d)該培養胚からES様形態で生育しているものの細胞塊を採取し、該細胞塊をトリプシンを含有するES細胞用培地を用いて分散した後、フィーダー細胞培地中に播種して培養する工程、(e)該(d)の工程を繰り返した後、周りに分化した細胞が認められないコロニーを選択する工程、及び(f)該コロニーをES細胞用培地を用いて継代培養し増殖した後、保存する工程、に従って、ES細胞株の樹立を行う。

10

【0015】

本発明においては、基本的には、雌のマウスから受精後、胚盤胞形成前の胚を採取し、インビトロ、ES細胞用培地中で培養し、該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離して、フィーダー細胞培地中に播種して培養し、該培養胚からES様形態で生育しているものの細胞塊を採取することにより、近交系マウスC57BL/6由来の生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立を可能としている。本発明において使用される近交系マウスC57BL/6系統のマウスとしては、汎用近交系マウスのC57BL/6NCrj

20

【0016】

本発明において、近交系マウスC57BL/6の雌のマウスからの受精後の胚盤胞形成前の胚の採取を管理された条件で正確に行うために、予め近交系マウスC57BL/6の雌雄を交配するに際して、雌のマウスに性腺刺激ホルモンを投与して交配することにより、受精の時期を管理して、明確にしておくことが重要である。雌のマウスからの受精後の胚の採取は、例えば2.5日胚のような胚盤胞形成前の胚を採取する。該胚は、ES細胞用培地中でインビトロで培養し、該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離する。ES細胞用培地としては、例えば、KO-ES培地(Knockout-DMEM 180mlに次の溶液を添加する：非必須アミノ酸溶液2ml；β-メルカプトエタノール溶液2ml、LIF溶液0.2ml；Knockout-SR 40ml；L-グルタミン溶液200mM 1.8ml)を挙げることができる。本発明のES細胞の樹立において用いるES細胞用培地としては、ES細胞の樹立のための全工程において、同一のES細胞用培地を用いることが必要である。

30

【0017】

分離した胚は、フィーダー細胞培地中に播種して培養し、該培養胚からES様形態で生育しているものの細胞塊を採取する。胚の培養に用いるフィーダー細胞としては、ICRマウス線維芽細胞の初代培養や、STO細胞等公知の樹立細胞を用いることができる。細胞塊は、トリプシン溶液を用いて、分散させ、更に、フィーダー細胞培地上に播種して、未分化コロニーをピックアップし、該コロニーをES細胞用培地を用いて継代培養し、適当に増殖したところで凍結して保存する。

40

本発明で樹立された、近交系マウスC57BL/6NCrjに由来し、生殖系列細胞分化能を有するES細胞RENKA株は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、受託番号：FERM BP-8225として寄託されている。

【0018】

本発明の近交系マウスC57BL/6に由来する生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立に際しての要点を以下に例示的に記載する。

(採胚)

ES細胞株の樹立に用いる近交系マウスC57BL/6の雌からの受精胚を以下のように

50

して採取する。受精胚の採取に際しては、受精後の胚盤胞形成前の胚の採取を管理された条件で正確に行うために、近交系マウスC57BL/6の雌雄を交配するに際して、雌のマウスに性腺刺激ホルモンを投与して交配する。

【0019】

(1) 採胚用マウスの交配

< 要点 >

(a) セロトロピン一本(50 units / 100 μ l)を0.6% NaCl 1.9 mlで希釈する。26Gの針を付けた1mlシリンジで液を吸い取り、200 μ l / 匹(5 units / マウス)を4週齢雌C57BL/6NCrjマウスの腹腔に注射する。(1日目 17:00)

(b) 48時間後、ゴナトロピン一本(50 units / 100 μ l)を0.6% NaCl 1.9 mlで希釈する。26Gの針を付けた1mlシリンジで液を吸い取り、200 μ l / 匹(5 units / マウス)200 μ l / 匹(5 units / マウス)でセロトロピン投与雌C57BL/6NCrjマウスの腹腔に注射する。

(c) 注射後、すぐに8~9週齢雄C57BL/6NCrjマウスと交配させる(雄:雌 = 1:1)。(3日目 17:00)

(d) 翌朝交尾プラグ(Plug)を確認し、雄から離す(10時位までに確認する)。

(4日目 9:00)

【0020】

(2) 採胚用マウスからの採胚

受精した採胚用雌マウスから、2.5日胚のような胚盤胞形成前の胚を採取する。(6日目 朝)

< 要点 >

(a) 採卵前日、予めKO-ES培地とミネラルオイルで覆ったKO-ES培地滴(drop)を3.5cmディッシュに作って、37 $^{\circ}$ C CO₂ インキュベーター内に用意する。

(b) 交尾プラグを確認した雌C57BL/6NCrjマウスを頸椎脱臼する。

(c) 上皮を70% EtOHで消毒する。筋膜を切らないように腹部の毛皮をピンセットで持ち上げ、はさみで切れ目を入れ、残りは手で上皮を剥く。

(d) 筋膜を眼科用はさみで切り開く。

(e) 腸をよけると、卵巣・輸卵管・子宮が左右に対になっているのが確認できる。

【0021】

(f) 卵巣・輸卵管・子宮のうち輸卵管と子宮のみを眼科用はさみで切り出す。その際不要な筋膜は取り除く。また子宮の長さは輸卵管接合部から3~5mm程度あればよい。

(g) M2培地に輸卵管及び子宮を移し、余計な血液や組織を洗って取り除く。

(h) 時計皿に輸卵管及び子宮を移す。1mlシリンジにM2培地を満たし灌流針をつける。

(i) 輸卵管の卵管采に灌流針を差し込んで、灌流する。約200 μ lで完全に胚を輸卵管及び子宮から出すことができる。

(j) 時計皿を軽くまわし、灌流して出てきた胚を皿の中心部に集め、キャピラリーピペットで回収する。

(k) 再度M2培地で胚を洗い、37 $^{\circ}$ C CO₂ インキュベーター内に保存しておいたKO-ES培地で洗いKO-ES培地滴に移す。

(l) 37 $^{\circ}$ C CO₂ インキュベーター内で培養する。

【0022】

(3) ES細胞の採取及び細胞株の樹立

胚盤胞内部細胞塊より生育したES細胞のコロニーをガラスピペットで採取する。この時、各種の細胞コロニーの中からES細胞を認識する目が最大のポイントとなる。採取する細胞塊は、できる限り単一の組成にするために、コロニー上部のみを慎重に切り出すことが肝要である。採取したES細胞を、培養・増殖及び分離してES細胞株を樹立する。

< 要点 >

10

20

30

40

50

(a) 採胚した日に、採胚した個体数と同数の 6 c m シャーレ (フアルコン 3 0 0 4) にフィーダー細胞を準備する。(6 日目 昼 ~ 夕方)

(b) 翌日の朝フィーダー細胞培地を K O - E S 培地でに交換する。(7 日目 朝)

(c) 翌日の午前中 K O - E S 培地で培養した胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ物を選び、フィーダー細胞をまいた 6 c m シャーレに移す。この時、1 匹分の胚を 1 枚のシャーレに移す。(7 日目 午前中)

【 0 0 2 3 】

(d) 培養 4 ~ 5 日目に E S 様形態で生育している胚から細胞塊を採取する (1 1 ~ 1 2 日目)。このとき、外径 2 0 0 ミクロン、内径 1 0 0 ミクロンのガラスピペット (先端をベベラーで鋭利に研いでおく) でコロニー上部約半分を丁寧に切り取る。

(e) 細胞塊は少量の培地と共にあらかじめマイクロタイターに 5 0 マイクロリットル分注した 0 . 2 5 % トリプシン溶液に入れ、3 7 °C で 3 分おき、2 0 % 牛胎児血清を含む K O - E S 培地 1 5 0 μ l を添加し、ピペットマン P 2 0 0 のチップで 1 0 回分散させる。

(f) 細胞分散液を 2 4 穴フィーダー上に播く。培地は、K O - E S 培地 0 . 5 m l を用いる。

(g) 1 2 時間後に培地を交換する。培地は、K O - E S 培地 0 . 5 m l を用いる (1 2 ~ 1 3 日目)。

【 0 0 2 4 】

(h) 4 ~ 5 日後、出現したコロニーを 0 . 2 5 % トリプシン溶液 1 2 0 μ l、3 7 °C で 3 分間処理し、2 0 % 牛胎児血清を含む K O - E S 培地 1 m l で反応を停めた後分散させ、遠心してトリプシンを除く。(1 6 ~ 1 8 日後)

(i) 細胞を 5 m l の K O - E S 培地で再分散させ、細胞数を数える。1 0 0 0 個 / m l に希釈し、6 c m シャーレのフィーダー細胞上に播種する。

(j) 6 ~ 7 日後、円形で輪郭が鮮明であり、周りに分化した細胞が認められないコロニーを選び、ピックアップする。手法は (e) ~ (g)。(2 2 ~ 2 5 日後)

(k) 出現したコロニーは、(h) の処理をした後、細胞を 5 m l の K O - E S 培地で分散させ細胞数を数え、 1×10^5 / m l の濃度で継代し、適当に増殖したところで凍結する。

【 0 0 2 5 】

(4) 樹立した E S 細胞株の検定

樹立した E S 細胞は、生殖系列キメラマウス作製能で検定を行う。キメラマウスの作製は、「キメラマウスの作製」プロトコル (後述) にしたがって行う。ICR 系統マウス胚に注入する E S 細胞の数を、例えば、3 ~ 5 個、6 ~ 8 個、9 ~ 1 1 個の 3 グループに分け、それぞれ独立に仮親に移植する。このうち雄の 1 0 0 % キメラが多く出る細胞株とその時の細胞数を決定する。1 0 0 % キメラを雌 I C R 系統マウスと交配し、生殖系列遺伝を確認する。

【 0 0 2 6 】

[樹立した E S 細胞株を用いたキメラマウスの作製]

本発明で樹立した E S 細胞株は、宿主胚へ導入し、仮親用雌マウスの子宮に移植することにより、宿主胚由来の細胞とで構成されるキメラ個体を得ることができる。本発明の E S 細胞は、キメラ個体内で生殖系列にも分化するので、E S 細胞由来の配偶子を産生することができる。したがって、近交系マウス C 5 7 B L / 6 の適当なマウスと交配することにより、E S 細胞に導入された或いはノックアウトされた遺伝子を保持する近交系マウス C 5 7 B L / 6 マウスを作製することができる。本発明で樹立した E S 細胞株を用いてノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを作製するには、本発明で樹立した E S 細胞を、予め公知の遺伝子操作方法により、例えば、遺伝子ターゲティングなどにより遺伝子を操作して、その形質を変換することにより行うことができる。

【 0 0 2 7 】

本発明で樹立した E S 細胞株及び該細胞株を遺伝子操作により形質転換した E S 細胞株を用いて、キメラマウスを作製するには、該 E S 細胞株を宿主胚へ導入し、更に該 E S 細胞

10

20

30

40

50

株を導入した宿主胚を仮親用雌マウスの子宮に移植することにより行うことができるが、該ES細胞株を宿主胚へ導入する方法としては、ES細胞を宿主の胚盤胞期胚へ注入する方法、8細胞期胚へ注入する方法、或いは透明帯を除去した8細胞期胚と凝集させる方法などの方法を挙げることができる。

本発明において、ES細胞株を宿主胚へ導入する特に好ましい方法としては、ES細胞株を8細胞期胚へ注入する方法が挙げられる。

【0028】

本発明のキメラマウスの作製方法について、具体的例示により説明すると、本発明で樹立したES細胞からキメラマウスを作製するには、まず、保存されているES細胞は、ロットごとに増殖速度が異なっており、宿主胚への導入には対数増殖期にあるES細胞を注入することが必要であるから、予めそのロットの増殖速度を確かめ、培養・増殖して調整する。この培養で重要なことは、ES細胞を分化させないことであるから、例えば、該ES細胞をフィーダー細胞上で培養・増殖する工程を、ICR系統マウスの14日胚より調製したネオマイシン耐性線維芽細胞フィーダー上で、播種する細胞数と継代時期を厳密に制御して分化を抑制した状態で行う等の注意を払う必要がある。

10

【0029】

次に、対数増殖期にあるES細胞を、宿主胚に導入するが、該ES細胞の導入は、例えば、ICR系統のマウスの8細胞期胚にES細胞を注入することにより行う。該ES細胞の注入により、キメラ胚を作製する。この時、注入するES細胞数は2~12個であるが、細胞の増殖速度に合わせてその数を調節する。注入するES細胞の数によりキメラ寄与率が変化するので、胚の生存可能な限り多くの細胞を注入する。このことでES細胞の生殖細胞に分化する効率を上げることができる。なお、胚へのES細胞の注入操作やキメラ胚の培養の時もES細胞専用の培地を用い他の培地に曝さないことが、一定の成績を得るために極めて重要である。ES細胞専用の培地としては、例えば、DMEM high glucoseを基本にし、18%のGIBCO KNOCKOUT-SR、0.1mMのMEM非必須アミノ酸、0.1mMのβ-メルカプトエタノール、2mMのL-グルタミン、1000u/mlのLIF(ESGRO)を添加した培地(KO-ES培地)が特に好ましい。なお、GIBCO KNOCKOUT-SRのロットの選択は非常に重要で、ES細胞への毒性が低く、分化傾向が低く、細胞増殖の早いものを選ぶ必要がある。

20

【0030】

本発明において、C57BL/6系統由来ES細胞と宿主胚としてICRマウス胚を組み合わせた場合には、毛色で容易にキメラ率を判別できる利点がある。上記の方法で作製したキメラマウスのうち、毛色で80%以上のES細胞寄与率の個体からは高い効率で生殖系列遺伝がおこる。特に、遺伝子組換えマウスで行動解析を行うような場合は、C57BL/6系統のES細胞を使うことが求められると考えられ、本細胞の有用性は高い。

本発明の最も大きなポイントは、本発明によって樹立されたC57BL/6N系統由来ES細胞株が効率よく生殖系列キメラになることである。これまで報告されてきたC57BL/6由来ES細胞は、確認したほとんどのものが生殖系列キメラになり得なかった。その意味で、この樹立された細胞株そのものに価値がある。

30

【0031】

更に、本発明の方法により、ES細胞から生殖系列キメラマウスを効率的に作製することが可能となった。それは、細胞の培養条件とES細胞の注入を受けた胚の培養条件を至適化することにより、C57BL/6由来ES細胞株から生殖系列キメラマウスを効率的に作製することが可能となったことによる。以下に、本発明のキメラマウスの作製に際して、重要なポイントとなる事項を列記する。

40

1) ES細胞を樹立するときに使用した培地を、胚へ注入するES細胞の培養と胚の培養の両方に使用する。すなわち、ES細胞の培養と胚の培養を同じ条件で行うために同一の培地を用いる。胚にES細胞を注入する顕微鏡下の培地も同一のものを用いる。

2) 8細胞期の胚にES細胞を注入する。注入するES細胞は、凍結ストックからKO-ES培地の中でおこし、対数増殖期のものを用いる。培地のpHに注意し、培地交換の時

50

期を遅れさせないことと、交換するときの培地の温度を37℃にしておく。

【0032】

3) 胚にES細胞を注入するとき培地のpHが相当早く変化するので、ミネラルオイルで覆ったまま炭酸ガス培養器で平衡にさせておいたものを頻繁に取り替えるか、培地を頻繁に取り替える。また、胚をES細胞を注入するためにステージに上げておく時間は10分以内にする。

4) 注入するES細胞の数は、2~12個であるが、最初に数を振りキメラ率の高い個体が取れる細胞数を決める(一般に一定以上の細胞を注入すると発生が途中で停止し、キメラ率が高くなると産仔数が減少する)。注入数は、凍結ストックごとには変わるので各ストックごとに確認する必要がある。

5) 注入後の胚は速やかにKO-ES培地の中に入れ、炭酸ガス培養器に戻す翌日胚盤胞まで発生が進んだ胚を選択し、偽妊娠させた仮親の子宮に移植する。これらの操作はいずれもES細胞の分化を抑制し、レシピエント胚とうまく混ぜ合わせる(キメラ胚にする)ために必要な操作となる。個々の操作は、特別のことがない限り、全てを一貫してやることが重要となる。

【0033】

本発明のキメラマウスの作製方法は、基本的には、本発明で樹立された近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株、或いは該細胞株を遺伝子工学的に形質転換したES細胞株を、ES細胞用培地及びフィーダー細胞培地を用いて培養・増殖し、他方、予め胚供給用雌雄のマウスを交配して採取した宿主胚を、ES細胞用培地を用いて培養し、前記ES細胞を、予め調製した宿主胚に導入し、該ES細胞株を導入した宿主胚を偽妊娠させた仮親用雌マウスの子宮に移植することからなる。

本発明において、本発明の近交系マウスC57BL/6に由来する生殖系列細胞分化能を有するES細胞株を用いてキメラマウスを作製するに際しての要点を以下に例示的に記載する。

【0034】

(1) ES細胞の準備

保存されているES細胞の増殖速度は、凍結ロットごとに異なっている。胚へのES細胞の注入には、対数増殖期にある細胞(60~80%コンフルエント)を用いる必要があるために、あらかじめその凍結ロットの増殖速度を確かめておく。

< 要点 >

1) 凍結細胞ストックを液体窒素容器から出す。

2) 予め42℃に加温してあるインキュベーターにチューブを入れ、すばやく溶解し、温まらないうちに細胞懸濁液をパスツールピペットで15mlチューブにあらかじめ入れた5mlのKO-ES培地に懸濁する。

3) 1200rpm、室温で3分間遠心する。

4) 上清を除去し、細胞沈殿をタッピングした後、5mlのKO-ES培地に懸濁する。

【0035】

5) あらかじめ作製しておいた1本の25cm²フィーダーボトルの培地を除去し、細胞懸濁液を播種する。

6) 24時間後にKO-ES培地で培地交換をおこなう。以後培地のpHに注意し早めの培地交換を心がける(培地交換は、培地の色が朱色から黄色に変色する前に行う)。細胞が60~80%コンフルエントになるまで約2日間培養する。その間、1日1回、必要に応じて2回以上培地交換する。(培地交換は、培地の色が朱色から黄色に変色する前に行う)育てすぎてはいけない。

7) インジェクション当日朝、EDTA-PBSで洗浄し、0.25%トリプシン溶液を0.5ml加え、ボトルを傾けて液を全面に行き渡らせる。

8) CO₂インキュベーター内で3分間加温する。

9) 側面を手で叩き、細胞を満遍なく剥がす(実際に白いもの(細胞)が剥がれてくることを肉眼で確認する。)。

10

20

30

40

50

【0036】

10) 5 ml の KO - ES 培地 + 20% FCS を加え、細口ピペットで3回ピペッティングし、細胞懸濁液をコニカルチューブに移す。この時フラスコはそのまま取っておく (KO - ES 培地 + 20% FCS は、KO - ES 培地 : FCS = 4 : 1 とする。この処理で、トリプシンの活性を完全に停止する)。

11) 1200 rpm、室温で3分間遠心する。

12) 上清を除去し、細胞沈殿をタッピングした後、5 ml の KO - ES 培地に懸濁する。この懸濁液を取ってあったフラスコに播き、CO₂ インキュベーター内で30分間加温する。(フィーダー細胞を除く作業、フィーダー細胞はフラスコ表面にほとんど接着する)

13) CO₂ インキュベーターから静かにフラスコを取り出し、緩やかにフラスコを傾けながら約3 ml の細胞懸濁液をコニカルチューブに取り、堅くふたを閉めて氷中にたてておく。

14) 注入20分前になったら2.5 cm ディッシュに2.0 ml の細胞懸濁液を取り氷上に置いておく。

【0037】

(2) ES 細胞の胚への注入

対数増殖期に達した ES 細胞を、宿主胚に注入する。

< 要点 >

1) 厚さ1.2 mm のスライドガラス中央に10 mm の穴を開け、その部分をスライドガラスで覆ったマウス胚操作容器を軽くシリコナイズしておく。

2) 胚操作容器の中央に、80 ~ 100 μl の KO - ES 培地で滴をつくり、それをミネラルオイルで覆う。

3) 採取した8細胞胚を10個滴の中に入れる。

4) ES 細胞をマイクロピペットで氷冷したディッシュから、1000個程度とり、胚の近傍に拡げる。

【0038】

5) 注入針に円形で形の整った ES 細胞を50 ~ 100個吸い取る。

6) 8細胞胚を保持ピペットで吸い付け、透明帯の中に注入針を挿入する。この時、割球を傷つけないように細心の注意を払う。

7) ES 細胞を2 ~ 12個胚に注入する。細胞の数は細胞株ごとに異なるので、キメラ率の高い個体が多く出る割合を選ぶ。

8) ES 細胞が漏れないようにゆっくり針を引き抜く。

9) 10個打ち終わったら、直ちに胚を37℃で、CO₂ インキュベーターに保存しておいた KO - ES 培地でリンスし、KO - ES 培地滴の中に移す。胚の数は1滴あたり10 ~ 15個までにする。胚をインキュベーターの中から出しておける時間は最大10分間である。

【0039】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[注意点]

キメラマウスの作製に際して、ES 細胞の培養で最も大切なことは、ES 細胞を分化させないことである。そのためには、細胞の増殖状態、形態に常に注意を払うことが大切である。また、培養に用いる試薬、器具類は専用のもを用いる必要がある。

この実施例においては、ES 細胞株は、その樹立時に使用した ES 細胞専用の培地を一貫して用い、ICR マウス14日胚より調製したネオマイシン耐性線維芽細胞フィーダー上で、播種する細胞数と継代時期を厳密に制御することで ES 細胞の分化を抑制した。培地の温度や pH にも所定の値を維持するように注意を払った。

【0040】

10

20

30

40

50

[各試薬、溶液類の組成、使用法]

この実施例で使用した試薬等の組成及びその調製法は、以下のとおりである。水は、試薬調製用超純水 (Milli Q 水)、またはそれと同等の純水を用いた。濾過滅菌には孔径 $0.22\ \mu\text{m}$ の P V D F (ポリフッ化ビニリデン) フィルターを使用し、オートクレーブ滅菌は 121、20 分の条件下で行った。

D M E M 培地は、G I B C O 社製 12100 - 061 : D u l b e c c o ' s m o d i f i e d e a g l e m e d i u m (h i g h g l u c o s e) 13.37 g を D . W . 950 mL に溶解し、 NaHCO_3 3.7 g を溶解後、1 N H C l にて p H 7.3 に調整し、最終容積を 1 L としたものの、 β -メルカプトエタノール溶液は、S I G M A 社製 M7522 : β -mercaptoethanol 7 μL を D . W . 10 mL に混和したものの、L I F 溶液は、C H E M I C O N 社製 E S G 1107 : E S G R O 10⁷ Unit (1 mL) を B S A 溶液 9 mL に混和したものの、B S A 溶液は、S I G M A 社製 A7906 : A l b u m i n B o v i n e f r a c t i o n V を P B S に最終濃度 1 % (w / v) となるように溶解したもので、いずれも調製後に濾過滅菌したものを用いた。

【 0041 】

フィーダー (feeder) 培地は、D M E M 培地に最終濃度 10 % になるよう F C S (G I B C O 社製 16141 - 079 (lot . No . 1002467) F e t a l b o v i n e s e r u m , E S c e l l q u a l i f i e d) を混和したものを

を用いた。

P B S は、 NaCl 8.0 g、 KCl 0.2 g、 Na_2HPO_4 (- 12 H_2O) 2.9 g 及び KH_2PO_4 0.2 g を D . W . に溶解後、p H 7.3 に調整し、最終容量 1 L としたものの、E D T A - P B S は、E D T A - 2 N a (- 2 H_2O) 2.2 g、 NaCl 8.0 g、 KCl 0.2 g、 Na_2HPO_4 (- 12 H_2O) 2.9 g、及び KH_2PO_4 0.2 g を D . W . に溶解後、1 N N a O H にて p H 7.3 に調整し、最終容量を 1 L としたもので、いずれも調製後にオートクレーブ滅菌したものを用いた。

【 0042 】

0.25 % トリプシン溶液は、G I B C O 社製 15090 - 046 : 2.5 % T r y p s i n を融解し E D T A - P B S で 10 倍希釈したものを、0.1 % トリプシン溶液は、この溶液をさらに E D T A - P B S で 2.5 倍希釈したものを

を用いた。

0.1 % ゼラチン溶液は、S I G M A 社製 G6144 : G e l a t i n t y p e A f r o m P o r c i n e s k i n 1 g を D . W . 1 L に添加し、オートクレーブにて溶解・滅菌したものを

を用いた。

K O - E S 培地は、K n o c k o u t - D M E M (G I B C O 社製 10829 - 018) 180 mL に非必須アミノ酸溶液 (G I B C O 社製 11140 - 050 : 10 m M M E M n o n - e s s e n t i a l a m i n o a c i d s s o l u t i o n) 2 mL、 β -mercaptoethanol 溶液 2 mL、L I F 溶液 0.2 mL、K n o c k o u t - S R (G I B C O 社製 10828 - 028 : ロット間にばらつきがあるため、ロットチェックする必要がある。) 40 mL、及び L - グルタミン溶液 (G I B C O 社製 25030 - 081 : 200 m M L - g l u t a m i n e) 200 m M 1.8 mL を添加したものの、凍結培地は、各細胞種に適合した培地に最終濃度 10 % となるよう D M S O (S I G M A 社製 D2650 : D i m e t h y l S u l f o x i d e , S t e r i l e f i l t e r e d) を使用直前に調製したもので、いずれも調製後に濾過滅菌したものを用いた。

【 0043 】

マイトマイシン C 溶液は、S I G M A 社製 M0530 : M i t o m y c i n C , f r o m S t r e p t o m y c e s c a e s p i t o s u s を最終濃度 1 m g / m L になるよう D . W . に溶解したものの、G418 溶液は、G I B C O 社製 11811 - 098 : G e n e t i c i n を最終濃度 50 m g / m L (力価) となるよう D . W . に溶解し

たもので、いずれも調製後に濾過滅菌したものをを用いた。G 4 1 8 選別培地は、E S 培地に G 4 1 8 溶液を通常最終濃度 $175 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう添加したものをを用いた。また、ペニシリン - ストレプトマイシン - P B S は、使用直前に G I B C O 社製 1 5 0 7 0 - 0 6 3 : P e n i c i l l i n - S t r e p t o m y c i n を P B S で 1 0 0 倍希釈したものをを用いた。

【0044】

セロトロピン（日本薬局方注射用血清性性腺刺激ホルモン：帝国臓器製薬（株）製 1 0 0 0 単位/管）及びゴナトロピン（日本薬局方注射用胎盤性性腺刺激ホルモン：帝国臓器製薬（株）製 1 0 0 0 単位/管）は、セロトロピン・ゴナトロピン各一本を添付されている 0 . 6 % N a C l （オートクレーブ滅菌済）2 m L を用いて、アンプル中で溶かし、最終的にそれぞれ 5 0 u n i t s / 2 m L とした。アンプル中の溶液を 2 . 5 m L のシリンジで 2 m L エッペンドルフチューブに移し、さらにそれを 2 0 本の 2 m L エッペンドルフチューブに 1 0 0 m L ずつ分注し、使用時まで - 2 0 にて保存した。

10

【0045】

[フィーダー細胞ストックの作製]

（マウス初代培養細胞作製）

ネオマイシン耐性遺伝子を持つ G l u R 1 ノックアウトマウス（N a t u r e 3 7 3 , 1 5 1 - 1 5 5 , 1 9 9 5）のホモ変異雄マウスと、雌の I C R マウスを交配し、翌朝交尾プラグ（膣栓）を確認し、この時点を E 0 . 5 日（0 . 5 日目胚）とした。E 1 3 . 5 ~ 1 5 . 5 日の胎仔を妊娠した雌マウスを頸椎脱臼し、全身を 7 0 % エタノールに浸した後、クリーンベンチ内で子宮から胎仔を取り出し、膜と胎盤を取り除いて新しいディッシュに移した。肝臓や心臓など造血組織や血液を含む赤い組織部分を極力取り除いた胎仔を新しいディッシュに移し、湾曲バサミで細かく切断した組織を少量の P B S (-) で懸濁した後、組織懸濁液を 5 0 m L コニカルチューブに回収した。この組織懸濁液に、1 3 . 5 日胚 1 0 匹、1 4 . 5 日胚 6 匹、1 5 . 5 日胚 3 匹あたり、0 . 1 % トリプシンを含む P B S - E D T A 溶液を 2 0 m L を組織懸濁液に加えた後、ローテーターで室温下で 1 0 ~ 1 5 分間緩やかに回転し、口径の大きなピペットで液を数回ピペッティングし、1 分間静置した。

20

【0046】

この操作を 2 回繰り返し行った後、沈殿として残った未分離組織や大きな組織塊はとっておき、上清を新しいコニカルチューブに移して細胞数を血球計算板で測定した。得られた細胞液を、4、1 2 0 0 r p m で 3 分間遠心し、沈殿の量から収量を予測することにより播種する 1 0 c m ディッシュの枚数を決定した（ディッシュ一枚あたり 1×10^6 c e l l s 程度、1 0 m L）。この沈殿をフィーダー培地に懸濁して 1 0 c m ディッシュに播種したものを「ロット 1」とし、顕微鏡観察により予想した収量の妥当性を確認した。さらに、残しておいた未分離組織・大きな組織塊から上記と同様の方法で「ロット 2」を得た。未分離組織成分がなくなるか、又は、ゲノムの漏出により溶液の粘度が上がり細胞の分離ができなくなるまで上記と同様の操作を繰り返し、ロット 3 以降を得た。翌日顕微鏡で観察し、生存率の確認を行い、著しく生存率の低いロットはこの時点で廃棄した。なお、ディッシュに播種してから 1 2 ~ 1 6 時間後にフィーダー培地で培地交換を行い、コンフルエントに達した際に、ディッシュ 1 枚あたり 3、4 枚に継代した後、凍結した。

30

40

【0047】

（フィーダー（ボトル、ディッシュ、プレート）の作製）

フィーダー細胞凍結ストックチューブ 1 本を 4 2 の温浴に浸して融解し、4 m L のフィーダー培地で懸濁した後、4 で 1 2 0 0 r p m、3 分間遠心を行った。上清を除去し、ペレットを 1 0 c m ディッシュ 1 枚あたり 1 0 m L のフィーダー培地に懸濁した後、底面を 0 . 1 % ゼラチン溶液で 2 時間以上覆った 1 0 c m ディッシュに直接播種し、細胞がコンフルエントに達するまで培養を行った。細胞がコンフルエントに達した際に、培養上清に 1 m g / m L のマイトマイシン C 溶液を 1 0 0 μ L 加え、さらに 2 時間以上培養した後、0 . 2 5 % トリプシン処理により細胞を剥離し、フィーダー培地を加え、最終的に細胞

50

密度が約 2×10^5 cells/mL になるように細胞懸濁液を調製した。予め底面を 0.1%ゼラチン溶液で2時間以上覆った培養容器に、得られた細胞懸濁液を規定量(10cmディッシュは10mL、25cm² ボトルは5mL、3.5cmディッシュは2mL、24ウェルマルチウェルの1ウェルは0.5mLを規定量とする)入れた後、CO₂インキュベーター内で6時間以上静置し、細胞が十分生着伸展したことを確認してからES細胞を播種した。

【0048】

[ES細胞の培養と継代]

(ES細胞の前培養)

ES細胞凍結ストックチューブ1本($2.5 \sim 5.0 \times 10^5$ cells)を42の温浴に浸して融解し、細胞懸濁液をパスツールピペットで15mLチューブに予め入れた5mLのKO-ES培地に懸濁した後、4で1200rpm、3分間遠心を行った。次に、上清を除去して細胞沈殿をタッピングした後、5mLのKO-ES培地に懸濁し、上記方法で作製し培地を除去した1本の25cm²フィーダーボトルに細胞懸濁液を播種し、細胞がコンフルエントに達するまで約2日間培養した。最後の培地交換から2~4時間後に培地を除去し、5mLEDTA-PBSで洗浄し、0.25%トリプシン溶液を0.5mL加えて細胞を剥離した後、20%FCSを含むKO-ES培地を4.5mL加え、細口ピペット(5mLガラスメスピペット)で3回ピペッティングし、細胞懸濁液をコニカルチューブに移し、1200rpm、4で3分間遠心を行った。上清を除去し、細胞沈殿をタッピングした後、適量のKO-ES培地に懸濁し、最終的に細胞密度が約 0.2×10^5 cells/mLになるように、必要量のKO-ES培地を加えて調整した。得られた細胞懸濁液を、予め上記方法で作製し、培地を除去しておいた25cm²のフィーダーボトル1本あたりにつき5mLずつ播種した。

【0049】

(ES細胞の凍結ストックの作製)

凍結操作の2時間前に培地交換を行った後、培地を除去し、5mLEDTA-PBSで洗浄し、0.25%トリプシン溶液を0.5mL加えることにより、細胞を剥離した。20%FCSを含むKO-ES培地を4.5mL加えて細胞を懸濁し、細胞密度を計算した後、1200rpm、4で3分間遠心した。上清を除去し、細胞密度が 5×10^6 cells/mLになるように、必要量の凍結培地を加え、ペレットを懸濁し、細胞凍結用チューブ1本あたり0.5~1.0mLずつ分注した。予め4に冷蔵してあるバイセルにチューブを収納し、-80フリーザーに6時間以上入れ凍結した後、使用時まで液体窒素タンクに移して保存した。

【0050】

[キメラマウスの作製]

(ES細胞の準備)

ES細胞の増殖速度は、凍結ロットごとに異なっている。対数増殖期にある細胞(60~80%コンフルエント)を胚への注入に用いるために、予めその凍結ロットの増殖速度を確かめておく必要がある。

遺伝子組換えを確認し保存してある細胞ストックを、予め42に加温してあるインキュベーターに入れてすばやく溶解し、温まらないうちに細胞懸濁液をパスツールピペットで5mLのKO-ES培地に懸濁した後、1200rpm、室温で3分間遠心して上清を除去し、細胞沈殿をタッピングした後、さらに5mLのKO-ES培地に懸濁した細胞懸濁液を、予め作製し培地を除去しておいた25cm²フィーダーボトルに播種した。

【0051】

播種24時間後にKO-ES培地で培地交換を行い、培地のpHに注意しながら、細胞が60~80%コンフルエントに達するまで約2日間培養した。インジェクション当日、EDTA-PBSで洗浄し、0.25%トリプシンを加えて細胞を剥離した後、20%FCSを含む5mLのKO-ES培地を加えてトリプシン活性を停止させ、細胞懸濁液を調製した。1200rpm、室温で3分間遠心して上清を除去し、細胞沈殿をタッピングした

後、5 mLのKO-ES培地に懸濁し、この懸濁液を予め取ってあったフラスコに播き、CO₂インキュベーター内で30分間加温することによりフィーダー細胞を除いた。CO₂インキュベーターから静かにフラスコを取り出し、緩やかにフラスコを傾けながら約3 mLの細胞懸濁液をコニカルチューブに取り、堅くふたを閉めて水中に立て、注入20分前になったら2.5 cmディッシュに2.0 mLの細胞懸濁液をとり、氷上に置いた。

【0052】

(胚への注入)

厚さ1.2 mmのスライドガラス中央に10 mmの穴を開け、その部分をスライドガラスで覆ったマウス胚操作容器を軽くシリコナイズしておき、胚操作容器の中央に、80~100 µLのKO-ES培地で滴をつくり、それをミネラルオイルで覆った。採取した8細胞胚を10個滴の中に入れ、ES細胞を、マイクロピペットで氷冷したディッシュから1000個程度とり、胚の近傍に拡げた後、注入針に円形で形の整ったES細胞を50~100個吸い取った。8細胞胚を保持ピペットで吸い付け、割球を傷つけないように細心の注意を払いながら透明帯の中に注入針を挿入した。ES細胞を2~12個胚に注入した。細胞の数は細胞株ごとに異なるため、キメラ率の高い個体が多く出る割合を選び、ES細胞が漏れないようにゆっくり針を引き抜き、10個打ち終わったら、直ちに胚を37

10

CO₂インキュベーターに保存しておいたKO-ES培地でリンスし、1滴あたり10~15個の胚をKO-ES培地滴の中に移した。

【0053】

(採卵準備)

セロトロピン一本(50 units / 100 µL)を0.6% NaCl 1.9 mLで希釈する。26 Gの針を付けた1 mLシリンジで液を吸い取り、200 µL / 匹(5 units / マウス)を4週齢雌C57BL / 6 NCrjマウスの腹腔に注射した〔1日目17:00〕。48時間後、ゴナトロピン一本(50 units / 100 µL)を0.6% NaCl 1.9 mLで希釈し、26 Gの針を付けた1 mLシリンジで液を吸い取り、200 µL / 匹(5 units / マウス)でセロトロピン投与雌C57BL / 6 NCrjマウスに腹腔内投与した。注射後すぐに、8~9週齢の雄C57BL / 6 NCrjマウスと雄:雌 = 1:1の割合で交配させ〔3日目17:00〕、翌朝プラグを確認し、雄から離れた(10時位までに確認)〔4日目9:00〕。

20

【0054】

(2.5日胚の採卵:6日目朝)

採卵前日に、KO-ES培地とミネラルオイルで覆ったKO-ES培地滴を3.5 cmディッシュに作り、37 CO₂インキュベーター内に用意した。プラグを確認した雌のC57BL / 6 NCrjマウスを頸椎脱臼し、上皮を70% EtOHで消毒した。筋膜を切らないように腹部の毛皮をピンセット(INOX No.5)で持ち上げ、はさみで切れ目を入れ、残りは手で上皮を剥ぎ、筋膜を眼科用はさみで切り開いて、輸卵管及び輸卵管接合部から3~5 mm程度子宮を眼科用はさみで切り出した。M2培地(SIGMA社製 M5910)に輸卵管と子宮を移し、余計な血液や組織を洗って取り除き、時計皿に輸卵管と子宮を移した後、1 mLシリンジにM2培地を満たし灌流針をつけ、輸卵管の卵管采に27 Gの灌流針を差し込んで、約200 µL位灌流した。時計皿を軽くまわし、灌流して出てきた胚を皿の中心部に集め、キャピラリーピペットで回収した。再度M2培地で胚を洗い、37 CO₂インキュベーター内に保存しておいたKO-ES培地で洗いKO-ES培地滴に移し、37 CO₂インキュベーター内で培養した。

30

40

【0055】

(子宮への胚移植)

精管結紮し、交配してあらかじめ不妊であることを確かめた雄1匹に対し、発情期の雌ICRマウス1匹を加え交配し、翌日プラグを確認した。胚盤胞胚の移植には2.5日目の擬妊娠マウスを使用し、体重20 gあたり0.3 mLのネンブータル希釈液(50 mg / mL原液を0.6% NaCl溶液で10倍に希釈したもの)を腹腔に注射した後、毛刈りをしてから背中をアルコール綿で消毒し、最も背骨の出っ張った部分より尾側の、背骨が

50

やや窪んだところで正中に1cm程背中の皮を切除し、ハサミの背で皮膚を筋膜から十分剥離した。筋膜から透けて見える卵巣脂肪層を目安に、左右一方側について背骨に近い筋膜に0.3~0.5mm程度の切り口を体軸に垂直に入れ、切り口よりピンセットを体内に差し込んで脂肪層をつまみ、子宮に戻した。実体顕微鏡下で、培養してあったキメラ胚を10個程度胚操作用キャピラリーピペットにとり、この時目印のエアーバブルを入れた。

【0056】

なお、ICRマウス8細胞期胚にES細胞を注入したキメラ胚は、約24時間KO-ES培地滴中で培養し、胚盤胞まで発生が進んだものを子宮内移植に用いた。実体顕微鏡下にマウスを置き、子宮上端より5mm程度のところに26G針を斜めに突き差し貫通させぬように穴をあけ、胚操作用キャピラリーピペットの先端を穴に差し込み、子宮内に先端をスムーズに出し入れできることを確認した後、エアーバブルを目安として胚を注入し、脂肪層をつかんで子宮を体内に戻した。反対側についても、上記と同様の方法で胚を移植した。筋膜の切り口を1針縫った後、皮膚をオートクリッパーで閉じ、麻酔から醒めるまでパラフィン伸展機で保温し、その後ケージに戻した。

【0057】

(ES細胞RENKA株の検定)

ICRマウス胚に注入するES細胞(RENKA株)の数を、3~5個、6~8個、9~11個の3グループに分けてそれぞれを仮親に移植した。このうち、雄の100%キメラが多く出る細胞株とその時の細胞数を決定した(表1)。100%キメラを雌ICRと交配し、産まれた仔の毛色を判別することにより生殖系列遺伝の確認を行った。なお、キメラ率の判定は、全体の毛色のうち、黒色(ES細胞RENKA株由来)が何%残っているかで判定した。その結果、確認した5匹の100%キメラマウス全てにおいて、生殖系列遺伝が認められた。

【0058】

【表1】

ICR胚に注入するES細胞の数(個)	胚の数	仮親の数	結果
3-5	60	3	キメラ2匹産(雄1、雌1)
6-8	60	3	キメラ18匹(100%キメラ7匹、全て雄)
9-11	60	2	キメラ2匹(100%キメラ1匹、雄)

【0059】

【発明の効果】

本発明により、近交系マウスC57BL/6系統由来の生殖系列細胞分化能を有するES細胞株の樹立が可能になり、このES細胞株を用いてキメラマウスを作製することにより、従来、生殖系列遺伝をするキメラマウスの作製が困難とされていた近交系マウスC57BL/6系統の生殖系列キメラマウスの作製が可能となった。本発明における近交系マウスC57BL/6は、汎用の近交系マウスであり、その生殖系列遺伝をするキメラマウスの作製が可能になったことは、このマウスの遺伝子領域に変異を導入し、該マウスを戻し交配する際に、他系統のマウスの交配を回避でき、したがって、遺伝子領域が交ざることなく、導入した遺伝子領域の純系なマウスの作製が可能になる。このように遺伝子背景が問題にならない近交系マウスの生殖系列遺伝をするキメラマウスが作製できたことにより、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを作製する際に、変異遺伝子領域の導入が容易になり、また近交系マウスC57BL/6が、例えば脳の高次機能を解析する上で必要な、行動解析に向けた汎用系統のマウスであることから、これらの生体機能の分子レベルでの解析に大きな貢献が期待できる。