

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳疾患モデルマウスの生殖工学技術を用いた
系統保存・生産システムの開発

研究代表者 後藤 元人¹⁾

研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 伏島 美汐¹⁾, 竹澤 久美子¹⁾, 保田 昌彦¹⁾, 横山 峯介¹⁾, 高橋 利一¹⁾

1) 公益財団法人 実中研、2) 新潟大学 脳研究所 生命科学リソース研究センター

研究要旨

脳疾患モデルマウスの維持生産のために、我々は生殖工学技術の過剰排卵誘起処置や胚移植技術を改良し、1ペアからできるだけ多くの系統保存胚を作出し、そこから効率的に個体生産するシステムの新規技術開発を目的とする。

現状の受精卵移植は、精管結紮雄との交尾行動による物理的刺激により、膣栓を確認し、偽妊娠誘起個体を作成し、卵管胚移植をおこなっている。我々は、精管結紮雄による物理的刺激を用いずに、ホルモン投与のみでの偽妊娠誘起法の確立を目指した。

本研究で我々は、汎用性が高く、安価なhCGホルモン投与による偽妊娠誘起を検討し、受精卵の着床のみならず、低率ではあるが産子が得られることを示した。また、受精卵移植後に着床前にhCG投与によるプロゲステロン誘起により妊娠率、産子率が向上することも見出した。

今後は、受精卵移植後の最適プロゲステロン濃度をhCGにより誘導し、妊娠維持をおこない、高効率な妊娠・産子率の向上を目指す。

A. 研究目的

脳疾患モデルマウスの維持生産において、継代中にランダムに発生するゲノム変異とその蓄積により発生する遺伝的浮動(ジェネティックドリフト)への対策は重要な課題である。我々は生殖工学技術である過剰排卵誘起処置や胚移植などの技術を改良し、1ペアからできるだけ多くの系統保存胚をストックし、そこから効率的に個体生産をおこなうシステムの新規技術開発を目的とする。

ホルモン投与での偽妊娠誘起法の確立

マウスやラットなどの齧歯類は、不完全性周期動物に分類され、排卵後に形成される黄体が維持されない。黄体を維持するためには雄との交尾刺激が必要とされており、胚移植に用いる雌は精管

を結紮した雄マウスとの交尾により刺激が与えられる。これにより雌は黄体が維持され、偽妊娠状態となることが知られている。

現状の受精卵移植は、精管結紮雄との交尾行動による物理的刺激により、膣栓を確認し、偽妊娠誘起個体を作成し、卵管胚移植をおこなっている。我々は、精管結紮雄による物理的刺激を用いずに、ホルモン投与のみでの偽妊娠誘起法の確立を目指し検討をおこなった。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. PMSG-hCGによるホルモン処理と受精卵移植のタイミングの検討

性成熟したICR雌マウスに、pregnant mare serum gonadotropin(PMSG)とhuman chorionic

gonadotropin (hCG) 各 5IU を 48 時間間隔で腹腔内投与し、hCG 投与、前日 (実験区①)、当日 (実験区②)、翌日 (実験区③) に 2 細胞期受精卵を卵管移植した。また hCG 投与後、翌日に胚盤胞期胚を子宮移植 (実験区④) した。これらは各 4 匹おこない、出産予定日に産子数ならびに着床数をカウントし、産子率を算出した。

2. PMSG-hCG によるホルモン処理と hCG, プロゲステロン投与によるプロゲステロン誘導処置による産子率改善の検討

上記実験区①処理で、hCG 投与後、翌々日から、hCG:5IU (実験区④) と hCG:2.5IU (実験区⑤) とプロゲステロン 30ng (実験区⑥) を 9 日目まで、等間隔で腹腔内投与した。これらは各 4 匹おこない、出産予定日に産子数ならびに着床数をカウントし、産子率を算出した。

C. 研究結果

1. PMSG-hCG によるホルモン処理と受精卵移植のタイミングの検討

実験区①のみ、4 匹中 1 匹に 1 つの着床痕が見られたが、他は、すべて着床痕すら見られなかった。実験区①は再現性を確認するため、11 匹追加で同様におこない、11 匹中 2 腹からは産子が作成できた。結果、合計で妊娠率は 2/15 (13.3%)、着床率は 4/15 (26.7%) だった。PMSG:5IU-hCG:5IU のホルモン処置後、翌日に卵管へ 2 細胞期胚を移植することで産子が作出できた。

2. PMSG-hCG によるホルモン処理と hCG, プロゲステロン投与によるプロゲステロン誘導処置による産子率改善の検討

妊娠率は、実験区④で 1/4 (25%)、実験区⑤で 2/4 (50%)、実験区⑥でゼロだった。特に実験区⑤の 1 腹は、11 匹の産子が作出でき、産子率 11/20 (55%) とパイプカットによる偽妊娠誘起マウスでの胚移植成績と遜色ない結果だった。マウス hCG 投与によるプロゲステロン誘起により妊娠

率、産子率の向上が見られた。

D. 考察

これまでの既報では、受精卵移植に用いる偽妊娠マウス作製は、雄個体からの物理的交尾刺激を必要とすることが知られている。そのため、精管結紮雄個体を用いず、子宮頸管を電動バイブレーションで物理的刺激する偽妊娠誘起をおこなう報告がなされている。

しかし、近年、誘発された排卵動物の交尾刺激がキस्पペプチン投与によって模倣できることを示唆し、自然排卵を示すマウスは、ジャコウトガリネズミなどの排卵誘発動物が使用する交尾刺激に反応する保存システムを有しており、キस्पペプチン投与が交尾刺激を置き換えることができるという仮説を立て、マウスキस्पペプチン-10 (mKp-10) 投与による偽妊娠誘起で、2 細胞期胚移植後、妊娠率 100%、産子率 45% と高効率に偽妊娠を誘起することが報告されている。しかし、mKp-10 は、市販されておらず、入手が困難である。

また、hCG 投与が妊娠、偽妊娠と同等以上のプロゲステロンを誘起し、その培養子宮内膜へ拡張胚盤胞期胚が接着すると報告もなされている。

本研究で我々は、汎用性が高く、安価な hCG ホルモン投与による偽妊娠誘起を検討し、受精卵の着所のみならず、低率ではあるが産子が得られることを示した。また、受精卵移植後に着床前に hCG 投与によるプロゲステロン誘起により妊娠率、産子率が向上することも見出した。

今後は、妊娠、偽妊娠期の母体内プロゲステロン濃度を測定し、受精卵移植後の最適プロゲステロン濃度を hCG により誘導し、妊娠維持をおこない、産子作出する。

E. 結論

我々は hCG ホルモン投与による偽妊娠誘起を検討し、受精卵の着所のみならず、低率ではあるが産子が得られることを示した。また、受精卵移植後に着床前に hCG 投与によるプロゲステロン誘起

により妊娠率、産子率が向上することも見出した。
以上の結果から、偽妊娠誘起は物理的的刺激以外でも誘起され、かつ簡便で汎用性の高いhCGで誘起されることを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし