

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	マウスバンク機能の拡充による創薬イノベーションの迅速化
代表機関名	国立大学法人熊本大学
職名	教授
研究開発代表者名	竹尾 透
全研究開発期間	平成 28 年度～令和 2 年度

1. 研究開発成果

健康長寿社会の実現には、疾病の予見、予防、治療および診断法の開発が急務の課題であり、研究資源を効率的に活用して解決に取り組む必要がある。そこで本研究課題では、疾患および創薬研究に有用なモデルマウスを効率的に活用するために、(1)マウス大量作製システムの開発および人材育成、(2)創薬支援マウスの収集、開発、作製、保存および解析、(3)創薬支援マウスデータベースの構築および供給、(4)グローバル創薬マウスバンクの構築を目指して活動した。以下に、本事業で得られた成果および意義を記述する。

【研究課題 1. マウス大量作製システムの開発および技術者の育成】

本課題では、マウス大量作製システムに必要となる体外受精技術の開発、卵子の凍結保存技術の開発および胚移植技術の開発を実施した。本課題の成果として、研究に汎用される各種近交系(A/J, BALB/cByJ, C3HeJ, DBA/2J, and FVB/NJ)、クローズドコロニー(CD1)マウスの大量作製を目的として、過剰排卵誘起法、体外受精法、胚移植法の改良を行い、超過剰排卵誘起法を用いることで受精卵および産子の作製効率が向上した(Theriogenology, 2016)。様々な週齢の雌マウスにおける繁殖効率を向上させることを目的として、排卵数を増加させる過剰排卵誘起法を検討した結果、インヒピン抗血清とウマ柔毛性性腺刺激ホルモンの投与が排卵数の増加に有効であることを明らかにした(Theriogenology, 2019)。冷蔵精子における受精率の低下に対して、メチル-シクロデキストリンおよび還元型グルタチオンが受精率向上に有用であることを明らかにし、3 日間で輸送できる範囲で遺伝子改変マウスの冷蔵輸送が可能になった(Biology of Reproduction, 2017)。冷蔵精子の保存期間の延長を目的として保存液の開発を行い、ジメチルスルフォキシドとケルセチンを保存液に添加することで、10 日間運動能と受精能を維持することに成功し、本技術を用いて世界中に遺伝子改変マウスを冷蔵輸送できるようになった(Biology of Reproduction, 2017)。体外受精における受精率を向上させることを目的として、マイクロ流体デバイスセルソーターにより運動機能を維持した精子を選別することに成功し、受精能が高い精子を選別し体外受精する技術を開発した(Scientific Reports, 2020)。マウス凍結卵子における受精率の低下に対して、N-アセチルシステインを体外受精培地に添加することで受精率が向上することを明らかにした(PLoS One, 2019)。産子への発生率が課題であった冷蔵保存受精卵に対して、N-アセチルシステインを冷蔵

保存液に添加することによって4日間冷蔵保存した受精卵からも胚移植により産子を作出できるようになり、本技術を用いて遺伝子改変マウスの冷蔵輸送が可能になった(Cryobiology, 2016)。冷蔵輸送した受精卵を再度凍結保存する技術を開発し、冷蔵後凍結保存した受精卵から胚移植により産子を得ることに成功し、受精卵の冷蔵輸送を利用してマウスバンクに遺伝子改変マウスを保存するシステムを構築した(Experimental Animals, 2020)。上記の研究開発により、創薬研究に使用する遺伝子改変マウスの作製、保存、輸送に関する最新技術を創出し、マウス大量作製システムの基盤技術を確立した。

最先端の生殖工学技術を修得した高度技術者を育成するために、マウス生殖工学技術に関する研修会を熊本大学、実験動物中央研究所、パスツール研究所、テキサスゲノム医学研究所、ジャクソン研究所等で開催(国内:12回、海外:3回)し、国内外の大学、研究機関、企業に所属する183名の技術者を養成した。

【研究課題2.研究に有用なマウスの収集、開発、作製、解析および保存】

本課題では、創薬研究に有用な病態モデルマウスの収集、開発、作製、解析、保存を実施した。まず、遺伝子改変マウスの作製に必要となるゲノム編集技術の開発に取り組み、超過剰排卵由来の卵子を用いることで、大量作製した受精卵を用いて短期間でゲノム編集した遺伝子改変マウスを作製できるようにした(Biology Open, 2016)。次に、ゲノム編集技術に用いる前核期受精卵の培養時間がゲノム編集の導入効率に影響することを明らかにし、最適条件を用いることで遺伝子改変マウスの作製効率が向上した(Biology Open, 2017)。さらに、凍結保存した超過剰排卵由来前核期受精卵とエレクトロポレーション技術を組み合わせることによって、受精卵の作製およびゲノム編集の作業時間を短縮し、遺伝子改変マウスの作製効率を向上させた(Experimental Animals, 2018)。

遺伝子改変マウスの解析により、腎臓疾患、肺疾患、感覚器疾患、遺伝性疾患等に関する病態や治療候補薬に関する知見が得られ、特にミトコンドリア機能や臓器の保護に対するケトン体の有用性(Nature Metabolism, 2021)も明らかになった。遺伝子改変マウスの保管では、本事業期間に655系統の凍結胚や精子を保管した。

【研究課題3.創薬支援マウスデータベースの構築およびマウスの供給】

本課題では、保管している遺伝子改変マウスの情報をデータベース化し、オンラインで保管マウス系統の情報公開(CARD R-Base, <http://cardb.cc.kumamoto-u.ac.jp/transgenic/>)を行った。本マウスバンクシステムを通じて、272件の遺伝子改変マウスを国内外の研究者に供給した。保管したマウスリソースに関する情報は、マウスバンクのウェブサイトでの公開に加えて、マウスバンク利用者や日本実験動物学会の会員に向けて毎月メーリングリストで配信し、積極的に周知した。

【研究課題4.グローバル創薬マウスバンクの構築】

本課題では、マウスバンクを活用した国際研究拠点の形成を目指し、本事業で整備したマウス、

情報、材料、技術および人材を活用して海外研究者や研究機関との連携強化を行った。本事業で保管したマウスリソースに関する情報をマウスバンクの国際組織である International Mouse Strain Resource (IMSR) のデータベースで共有し、IMSR ウェブサイト (<http://www.findmice.org/>) から国内外の研究者がマウスリソースの閲覧および入手可能なリソースを拡充した。また、マウスリソースやマウス表現型解析に関する欧米アジアオセアニアの主要大学や研究所の共同研究ネットワーク (INFRAFRONTIER、MMRRC、AMMRA 等) と活発に交流し、国際連携の強化、開発技術の世界標準化を行った。世界各国の拠点となる 13 箇所の研究所 (ジャクソン研究所、パスツール研究所、英国医学研究協議会ハーウェル研究所等) と部局間交流協定を締結し、最先端の研究施設の視察、各国の研究やマウスリソースの動向に関する情報収集、技術研修会の共同開催を行った。本事業で開発した技術を活用して、マウスの作製、保存、解析、供給に関する技術支援、学外研究者もマウスを飼育できる受託飼育、熊本マウスクリニックとして整備しているマウス表現型解析装置の共用化を行った。

以上、本事業においてマウス大量作製システムの開発および人材育成、創薬支援マウスの収集、開発、作製、保存および解析、創薬支援マウスデータベースの構築および供給、グローバル創薬マウスバンクの構築を推進することで、疾患および創薬研究に有用なモデルマウスを国内外の研究者が活用できる環境を提供し、本邦におけるマウスを用いた創薬に関する研究および研究支援拠点として研究基盤を構築した。本研究拠点を産学の研究者が利用することで、創薬シーズの開発や非臨床試験が加速され、健康長寿社会の実現やアンメットメディカルニーズに応える創薬および最先端技術のイノベーション創出が期待できる。

To realize a healthy society with longevity, the development of new technology to predict, prevent, treat, and diagnose diseases is an urgent issue. To develop innovative technology, mutant mice are very useful to explore drug candidates and test the efficiency of candidate compounds as human disease model. In this project, we aimed to develop a mass-production system for mutant mice and train engineers of reproductive technology, collect, develop, produce, preserve, and analyze mutant mice, construct and supply mutant mouse database, and establish a global network of mutant mouse research and resource.

In the project of the development of a mass-production system for mice and training of technicians, we improved the superovulation technique using inhibin antiserum and gonadotropins in various inbred strains and outbred strains mice. To improve the reproductive efficiency in female mice of various ages, we investigated the superovulation technique to increase the number of ovulated oocytes and found that administration of inhibin antiserum and gonadotropins was effective in increasing the number of ovulated oocytes. To overcome the reduction of fertilization rate in refrigerated sperm, methyl- β -cyclodextrin and reduced glutathione were found to be useful in improving the fertilization rate. We developed a new preservation solution to extend the storage period of refrigerated sperm and succeeded in maintaining motility and fertilizing ability for 10 days by adding dimethyl sulfoxide and quercetin to the preservation solution. To improve the fertilization rate, we succeeded in selecting sperm that maintained their motility using a microfluidic device cell sorter and developed a technology to select sperm with high fertilization potential for in vitro fertilization. To overcome the decreased fertilization rate in cryopreserved mouse oocytes, we found that adding N-acetylcysteine to the IVF medium improved the fertilization rate. In the technique of cold storage of two-cell embryos, we found the addition of N-acetylcysteine to the cold storage solution made it possible to produce offspring by embryo transfer from fertilized eggs stored in cold storage for 4 days. For training engineers of reproductive technology, we held hands-on workshops on mouse reproductive engineering technologies at Kumamoto University, Central Institute for Experimental Animals, Pasteur Institute, Texas Genome Institute, Jackson Laboratory, etc. (12 sessions in Japan, 3 sessions overseas), and 183 technicians who mastered the reproductive technology.

In the project of collection, development, production, analysis, and preservation of mutant mice, we worked on the development of genome editing technology necessary for the production of genetically modified mice. By using oocytes derived from ultrasuperovulation, we were able to produce genome-edited genetically modified mice in a short period using the mass-produced fertilized eggs. Next, we found that the incubation time of pre-nuclear stage fertilized eggs used for genome editing technology affects the efficiency of introducing genome editing, and the efficiency of producing genetically modified mice was improved by using optimal conditions. Furthermore, by combining cryopreserved superovulation-derived pre-nuclear stage fertilized eggs with electroporation technology, the work time for fertilization and genome editing was reduced, and the

efficiency of gene-modified mouse production was improved. Analysis of the mutant mice has provided insights into the pathogenesis and potential therapeutic agents for renal, pulmonary, sensory, and genetic diseases, among others, as well as the usefulness of ketone bodies for mitochondrial function and organ protection (Nature Metabolism, 2021). In the storage of genetically modified mice, 655 strains of frozen embryos and sperm were stored during this project.

In the project of construction of a mutant mouse database and supply of the mice, we improved a database of stored mutant mice information and published the information of stored mouse strains online (CARD R-Base, <http://cardb.cc.kumamoto-u.ac.jp/transgenic/>). Through this mouse bank system, 272 strains of genetically modified mice have been supplied to domestic and overseas researchers.

In the project of construction of a global network of mouse banks, we have strengthened our collaboration with overseas researchers and research institutions by utilizing the mice, information, materials, technologies and human resources developed. Information on mouse resources stored in this project is shared in the database of the International Mouse Strain Resource (IMSR, <http://www.findmice.org/>) allows domestic and international researchers to browse and obtain mouse resources. In addition, we actively interacted with the collaborative research networks of major universities and research institutes in Europe, the U.S., Asia, and Oceania regarding mouse resources and mouse phenotyping to strengthen international collaboration. We concluded interdepartmental exchange agreements with 13 research institutes (Jackson Laboratory, Pasteur Institute, Medical Research Council Harwell, etc.) that serve as bases in various countries around the world.

In summary, we have established a research infrastructure as a research and research support center for drug discovery using mutant mice in Japan. The use of our research center by researchers from industry and academia will accelerate the development of drug seeds and non-clinical trials and is expected to create innovations in drug discovery and cutting-edge technologies that will help realize a society with a long and healthy life span and meet unmet medical needs.

2. 総合評価

優れている

【評価コメント】

疾患研究及び創薬研究に有用なモデルマウスを効率的に供給し、活用できる技術基盤を構築した。さらに、創薬支援マウスデータベースの公開、マウス大量作製システムに関わる人材育成、アウトリーチ活動など、マウスバンク機能を底上げする取り組みは評価できる。

今後も疾患研究や創薬研究において必須なマウスバンク機能を拡充させ、理研BRCや基盤研など他施設との連携を強化するとともに製薬企業との連携も強化し、創薬開発にさらに貢献することを期待する。

以上