

(S-2)

エレクトロポレーション後のマウス胚の発生率改善に向けた取り組み

井上 真理子（川崎医科大学 中央研究センター 医用生物研究ユニット）

INOUE Mariko : Improving the Development Rate of Mouse Embryos after Electroporation

Genomic editing of mouse embryo (CRISPR-Cas9 technology) has made it easy to produce genetically modified mice. The aim of this study is to improve the birth rate of mouse embryos from genome editing. The developmental status of embryos after electroporation was analyzed, and it was found that after electroporation, there is a delay in development after the second cleavage. In addition, hypoxic culture was an optimal culture environment for embryos, but did not improve the development rate after electroporation.

1. 目的

マウス受精卵のゲノム編集 (CRISPR-Cas9) 技術により、容易に遺伝子改変マウスを作出できるようになった。特に体外受精とエレクトロポレーション (EP) を組み合わせた方法は、受精卵を短時間で簡単に処理する事ができ、ゲノム編集効率も高い。しかしながら、この方法では使用する受精卵の数に対して得られる個体の数が非常に少ない。この発生率・個体還元率の低さゆえに、多くの受精卵を準備する必要がある、多数のマウスを犠牲にしなければならない。本研究では、この問題点の解決に向けて、EP 処理後の胚の発生状況を観察し、個体発生率改善の方策を検討した。

2. 方法

(1) 動物

マウスは C57BL/6J (ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社) および C57BL/6Jcl (日本クレア株式会社) を卵子採取、精子採取に用いた。これらの動物は室温 22±2℃、湿度 20~60%、照明 8 時点灯、20 時消灯の 12 時間明暗下で飼育した。川崎医科大学動物実験規程に従って、川崎医科大学動物実験委員会の審査を経て学長承認のもと実験を行った (承認番号: 24-032)。

(2) 体外受精

4 週齢の雌マウスに 0.1ml/匹の CARD HyperOva® (九動株式会社) を腹腔内投与し、その 48~53 時間後に 7.5IU/匹の human Chorionic Gonadotropin (hCG, あすかアニマルヘルス株式会社) を腹腔内投与した。hCG

投与の 17 時間後に頸椎脱臼にて安楽死させ、卵管から卵子を採取し HTF 培地 (アーク・リソース株式会社) で 37℃、5%CO₂ 条件下で 30 分間前培養した。12 週齢以上の雄マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、精巣上体尾部から採取した精子魂を HTF 培地に入れ、37℃、5% CO₂ 条件下で 90 分間前培養した。前培養後に精子を卵子のドロップに添加し媒精を行った。

(3) エレクトロポレーション (EP)

媒精の 3 時間後に、マウスピースとガラスキャピラリーを用いたピペッティングにより、卵子から精子や卵丘細胞を除去し、新しい HTF 培地で 3 回洗浄した。媒精の 6 時間後に第二極体および前核が確認できたものを受精卵とし、培地を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) へ交換した。EP (Opti-MEM) 群は、Opti-MEM を満たした 5 mm ギャップの白金プレート電極に胚を移し、スーパーエレクトロポレーター NEPA21 (ネッパジーン株式会社) で EP を行った。EP (RNP) 群は、チロシナーゼ遺伝子 (NC_000073.7) の Exon1 を二本鎖切断するように設計した 6 μM crRNA、6 μM tracrRNA、0.6 μM Cas9 Nuclease V3 (Integrated DNA Technologies 株式会社) の複合体 (RNP) を含む Opti-MEM 内で EP を実施した。EP の電気条件は TAKE 法¹⁾ を参考にし、Poring Pulse : 電圧 225 V、パルス幅 1.5 msec、パルス間隔 50 msec、4 回 (+)、Transfer Pulse : 電圧 20 V、パルス幅 50 msec、パルス間隔 50 msec、5 回 (±) で実施した。EP (-) 群は EP 操作を行わない対照実験として培地交換のみを行った。EP 後の胚は培養用培地 KSOM (アーク・リソース株式会社) で 2 回洗浄した。

(4) 胚の培養

EP 後、KSOM で 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。16、40、64、88 時間後に胚の発生状況を観察し、前核期胚、2 細胞期胚、3-4 細胞期胚、桑実胚、胚盤胞の個数をカウントした。また、16 時間後の 2 細胞期胚の発生率、40 時間後の 3-4 細胞期胚の発生率、64 時間後の桑実胚の発生率、88 時間後の胚盤胞の発生率を算出した。

(5) 低酸素培養の効果の解析

同様の条件で体外受精を行い、媒精後 3 時間の培養と EP 後の培養を酸素濃度 5% 環境下で行った。低酸素環境での培養は BIONIX 低酸素培養キット (株式会社 スギヤマゲン) を用いた。本実験に先立ち、低酸素パウチ内の酸素濃度および二酸化炭素濃度を測定した。酸素、二酸化炭素ともにほぼ 5% の環境を維持できることを確認した。

3. 結果

(1) EP 後の胚の発生状況

EP 後 16 時間の時点では、観察された胚の割合に大きな違いは見られなかった。(図 1-A)。しかし、40 時間以降から、EP (Opti-MEM) 群、EP (RNP) 群で発生の遅れが認められた (図 1-B、C、D)。また、EP 後 64 時間の時点で、前核期もしくは 2 細胞期であった胚は、その 24 時間後も大部分がそのまま発生が停止していた。

EP (-) 群、EP (Opti-MEM) 群、EP (RNP) 群で 16 時間後の 2 細胞期胚の発生率、40 時間後の 3-4 細胞期胚の発生率、64 時間後の桑実胚の発生率、88 時間後の胚盤胞の発生率を比較したところ、16 時間後では有意な差は認められなかったが (図 2-A)、40 時間以降に、EP (RNP) 群で EP (-) 群と比較して発生率が有意に下がった (図 2-B、C、D)。また、有意差は認められなかったが、EP (Opti-MEM) 群についても 40 時間以降で発生率が下がる傾向にあった。

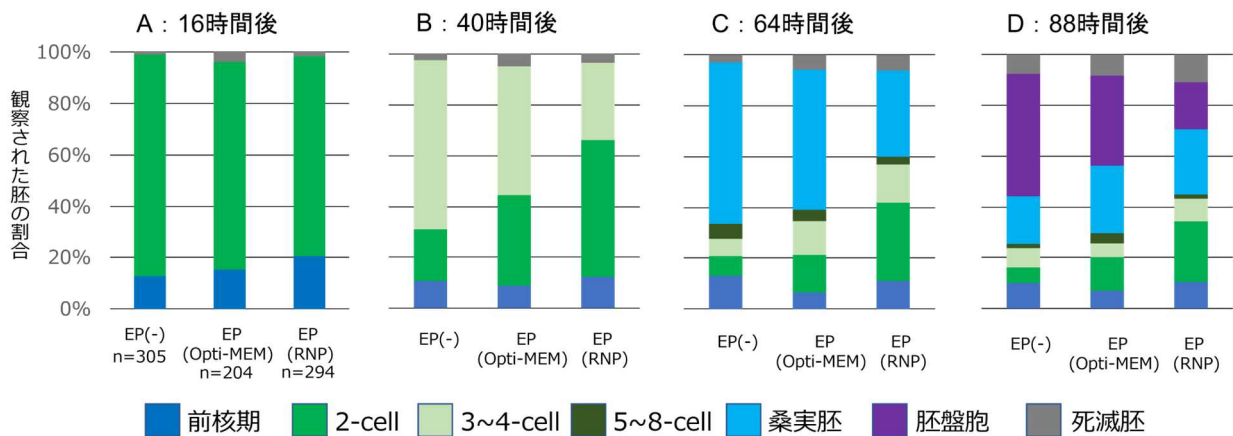


図 1. EP 後の胚の発生状況

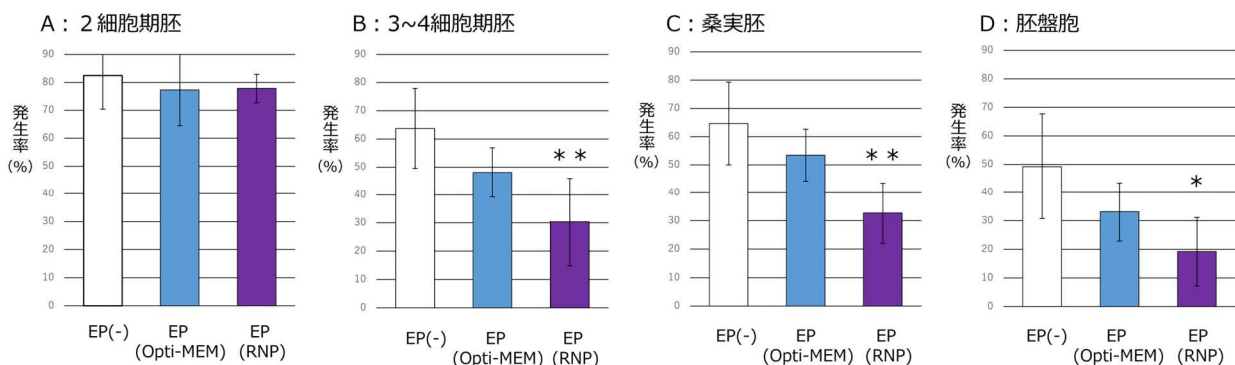


図 2. EP 後の胚の発生率の比較

(A) EP16 時間後の 2 細胞期胚の発生率 (B) EP40 時間後の 3-4 細胞期胚の発生率 (C) EP64 時間後の桑実胚の発生率 (D) EP88 時間後の胚盤胞の発生率

EP(-) : n=7, EP(Opti-MEM) : n=4, EP(RNP) : n=5 *P<0.05, **P<0.01 VS EP(-) by t-test

(2) 低酸素環境での培養の効果

EP (-) 胚では、すべてのステージにおいて、酸素濃度 5%での培養で発生率に改善傾向がみられた (図 3-A)。EP (Opti-MEM) の胚については、酸素濃度 5%での培養により 3~4 細胞期、桑実胚のステージで発生率がさらに低下した (図 3-B)。EP (RNP) の胚でも同様の傾向がみられた (図 3-C)。

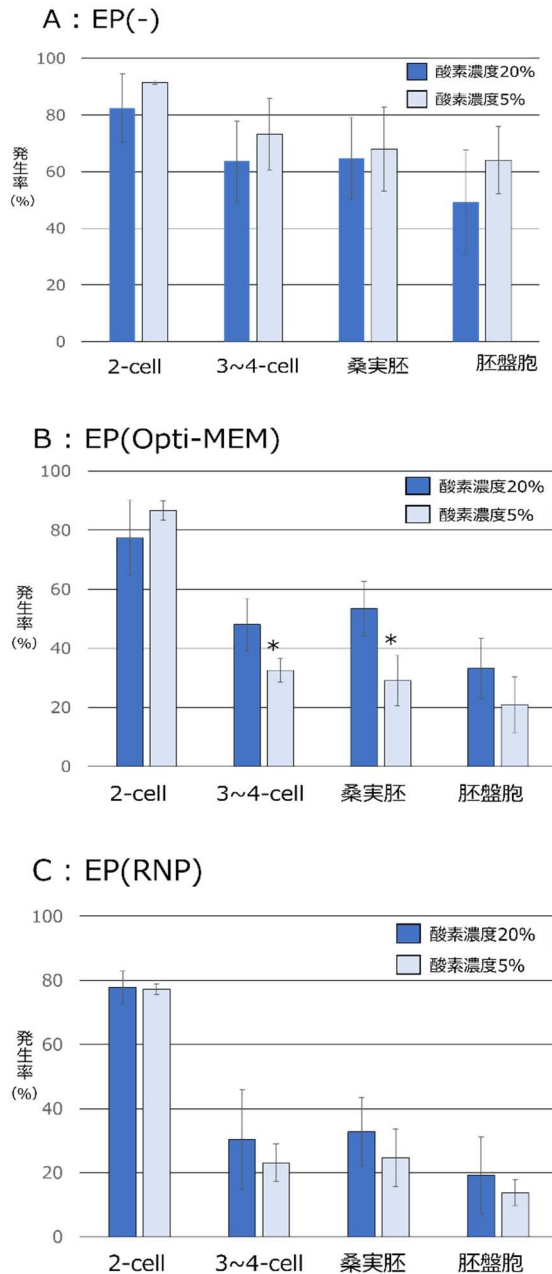


図 3. EP 後の胚発生への酸素濃度の影響

(A) EP(-) 20%O₂ n=7, 5%O₂ n=4 (B) EP(Opti-MEM) 20%O₂ n=4, 5%O₂ n=3 (C) EP(RNP) 20%O₂ n=5, 5%O₂ n=44 *P<0.05 by t-test

4. 考察

本研究により、通常の培養環境下 (37°C、5%CO₂、20%O₂) では、EP 処理によって、第二卵割以降の発生が遅れることが明らかになった。RNP 導入を行った胚ではより大幅に遅れ、胚盤胞の発生率は未処理群の 40%程度であった。電気穿孔刺激に加え、ゲノム編集によって胚発生は大きなダメージを受けると考えられる。また、発生の遅延の程度が大きかった胚の大部分が 4 細胞期までに発生停止した。この結果は、EP 後の個体復元の成否が初期発生と関連しており、この時期に EP 処理によるダメージを緩和させることが重要であることを示唆する。

自然交配による受精や着床の工程は、雌マウスの卵管~子宮内といった低酸素環境下で進行する。ところが、一般的に体外受精は酸素濃度が 20%の大気圏下で実施されるため、胚にとって適切な環境を提供できていない。母体内環境に近い低酸素環境での培養の効果は、様々な哺乳動物で確認されており、マウスにおいても ICR 系統や F1 交雑系統の胚の着床前発生に低酸素環境での培養が有効であることが報告されている^{2), 3), 4)}。本研究では、C57BL/6J 系統の胚を簡便なキットを用いて低酸素環境下での培養を試みた。体外受精後 EP 処理を行わなかった胚においては、観察した全てのステージで発生率改善傾向がみられたことから、C57BL/6J 系統の胚においても、低酸素環境の有効性が示唆される。しかしながら、本研究の実験条件では、EP およびゲノム編集による胚の発生遅延を改善させることはできなかった。EP やゲノム編集による胚のダメージを緩和するためには、低酸素環境とは別のアプローチが必要であると考えられる。

本研究では、培養下での胚盤胞までの発生について解析したが、今後は 2 細胞期胚の段階でレシピエントマウスに移植した際の着床率や産仔率についても解析を進めていきたい。

謝辞

本研究は令和 6 年度科学研究費補助金 (奨励研究: 課題番号 24H02591) を受け実施した。

本研究にあたり多くのご助言を頂きました西松伸一郎先生 (川崎医科大学自然科学教室)、仁科惣治先生 (川崎医科大学消化器内科学教室)、宮野佳先生 (川崎医科大学自然科学教室) また、胚操作や実験動物の飼育管理を通して多大なる協力を頂きました川崎医科大学中央研究センターの皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) Kaneko T. Genome Editing in Mouse and Rat by Electroporation. *Methods in Molecular Biology* 2017;1630:81-89.
- 2) PL Wale, DK Gardner. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reproductive BioMedicine Online* 2010;21(3):402-410.
- 3) Itoi F, Tokoro M, Terashita Y, Yamagata K, Fukunaga N, Asada Y, Wakayama T. Offsprings developed using a simple incubator-free culture system with a deoxidizing agent. *PLoS One* 2012;7(10):e47512.
- 4) Watanabe H, Ito H, Shintone A, Suzuki H. Effects of oxygen tension and humidity on the preimplantation development of mouse embryos produced by in vitro fertilization: analysis using a non-humidifying incubator with time-lapse cinematography. *Experimental Animals* 2022;71(3):338-346.