

学位論文抄録

Tamoxifen feeding method is suitable for efficient conditional knockout

(タモキシフェンを食べさせる方法は効率的なコンディショナルノックアウトに適している)

吉信 公美子

指導教員

中潟 直己 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻 資源開発学

紹介教授

尾池 雄一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻 分子遺伝学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: The Cre-driver system is used to generate conditional knockout mice. Tamoxifen-inducible Cre-driver mice can be used for spatiotemporal knockout by administration of the drug. A major tamoxifen administration is performed by intraperitoneal administration or oral administration using a stomach tube. However, these forced administrations may be damaging to mice. The purpose of this study is to investigate the conditions for efficiently inducing Cre recombination by feeding mice with a diet mixed with tamoxifen in order to administer tamoxifen more safely.

Methods: Andersson *et al* have proposed a method of feeding tamoxifen-supplemented food (Transgenic Res., 2010). To optimize feeding conditions, a mouse line expressing the tamoxifen-inducible *Cre* gene ubiquitously (Ayu21-B165-CAG-Cre-mER^{T2}) was established in this experiment to evaluate the efficiency of Cre recombination in the whole body. For offspring obtained by mating with ROSA26 reporter mice, we investigated how to increase the amount of food intake, the concentration of tamoxifen in the food, and the administration period. To identify the Cre recombination cells, organs were analyzed by X-gal staining. The degree of X-gal staining of various organs were scored.

Results: The feeding method achieved efficient recombination without causing injury to mice. The X-gal staining intensity of the feeding method was equivalent to that of the intraperitoneal administration method. Furthermore, this method could be used for recombination before birth, or during the fetal period.

Conclusions: The feeding method to administer tamoxifen minimizes the risk for injury to mice and is effective for a conditional knockout.

学位論文抄録

[目的] Cre ドライバーシステムは、条件付きノックアウトを行うために有用である。タモキシフェン誘導型 Cre ドライバーマウスは、薬剤投与により時間空間的ノックアウトが可能である。タモキシフェンの投与は、腹腔内投与または胃ゾンデを使った経口投与により、複数回投与する方法が一般的に行われる。しかし、これらの強制投与はマウスにダメージを与える可能性がある。本研究は、より安全にタモキシフェンを投与するため、タモキシフェンを混合した餌をマウスに与え、効率よく Cre 組換えを誘導する条件を検討することを目的として行った。

[方法] Andersson らのタモキシフェンを粉餌に混ぜて食べさせる方法 (Transgenic Res., 2010) を採用し、効率的に Cre 組換えを起こす条件の最適化を行なった。全身での Cre 組換え誘導を検討するために、すべての臓器で Cre-ER^{T2} を発現するマウス (Ayu21-B165-CAG-Cre-mER^{T2}) を作製した。レポーターマウスである ROSA26R と交配して得られたマウスに対して、摂餌量増加の工夫、餌のタモキシフェン濃度、投与期間の検討を行った。Cre 組換えによりレポーターマウスの lacZ が発現することを利用して、主要臓器の X-gal 染色を行った。各臓器の染色度合いの数値化することにより、個体ごとの組換え効率として評価した。

[結果] 摂餌量は、給餌器への馴化、絶食、個飼いすることで増加した。投与量や投与期間を検討した結果、2.0mg TAM/g feed の濃度で5日投与することで良好な結果が得られた。また、摂餌法による Cre 組換え効率は、腹腔内投与で得られたそれと同等であった。さらに妊娠マウスに摂取させることにより、出生前や胎児期のマウスの組換え誘導も可能であった。

[考察] Cre 組換え誘導は全身で起こったが、モザイクであったため、タモキシフェンの混合量を増やすことで組換え効率が上げられると予想した。しかし、タモキシフェン濃度を上げると摂餌量が減少するため、今回検討した最大の濃度である 2.0mg TAM/g feed は上限であると考えた。妊娠マウスには成体の条件を変えることで、出生前や胎児期のマウスの組換え誘導も可能となった。しかし、出生数は通常餌を与えた場合と比べ少なかったため、タモキシフェンが胎児に毒性を及ぼしたことが示唆された。

[結論] 摂餌によるタモキシフェン投与は、マウスへの傷害のリスクを最小限に抑え、実験者の負担も軽減できるため、マウスと研究者の両方にとって有用な方法である。