201110033A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト肝細胞キメララットによる新しい創薬評価モデルの開発

平成２３年度　総括研究報告書

研究代表者　真下　知士

平成24年（2012)年　5月

目　　次

Ｉ．総括研究報告

ヒト肝細胞キメララットによる新しい創薬評価モデルの開発　---------　1

真下　知士

II．研究成果の刊行に関する一覧表　------------------------------　3

III．研究成果の刊行物･別刷　------------------------------　4

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

ヒト肝細胞キメララットによる新しい創薬評価モデルの開発に関する研究

研究代表者　　真下　知士　　特定准教授

研究要旨
本研究では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）技術により重症免疫不全SCIDラットを作製し、ヒト肝細胞を移植することで、ラット体内にヒト肝臓代謝システムを構築する。開発された肝ヒト化ラットは、新規医薬品のスクリーニング、薬理薬効試験、薬物動態試験、毒性試験等を効果的に実現することができる新たな創薬モデル基盤の開発に繋がる。

研究分担者
なし

A. 研究目的

創薬候補化合物のスクリーニングおよび前臨床試験では必ず動物実験が行われるが、ヒト薬物動態を正確に予測するためには、動物ーヒト種間での肝臓代謝酵素の違いが問題になることが多い。本研究では、新しい遺伝子改変技術ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）により作製した重症免疫不全ラットに、ヒト肝細胞を移植して模擬的なヒト肝臓を構築することにより、ラット体内でヒト薬物代謝試験を行える新たな創薬モデル基盤を開発する。

B. 研究方法

平成23年度は、ZFN 技術によりSCID 、XSCID、およびダブルSCIDラットの作製および評価を行う。また、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」に寄託されたさまざまなラット系統の背景に置き換えることで、より重症な免疫不全ラットの作製を目指す。

C. 研究結果

ZFN 技術によりSCID 、XSCID、およびダブルSCID（FSG）ラットを作製した。FSGラットにおいて、血中グロブリンレベルの欠失、T細胞、B細胞、NK細胞の欠失など重度の免疫機能不全を確認した。このFSGラットを用いて、１）ヒト卵巣がん細胞を皮下で増殖させること、２）ヒトiPS細胞を精巣に移植することでテラトーマの形成に成功した。

D. 考察

平成24年度は、これまでに作製したさまざまな重症免疫不全ラットに、ヒト肝細胞を移植することで高効率にヒト肝細胞が置換されたキメララットを作製する。作製したキメララットにおいて、ヒトアルブミン生産能、ヒト薬物代謝酵素機能、ヒト肝細胞置換率を測定する。

E. 結論

ラット体内でヒト肝臓代謝機能を再構築することができれば、創薬候補化合物のスクリーニング、新規医薬品の薬物代謝、薬効・毒性試験、薬物間相互作用をヒト生体レベルで評価することができるようになる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

１．論文発表
なし

２．学会発表

真下知士「重症免疫不全SCIDラットとその応用研究について」第5回ラットリソースリサーチ研究会、京都、2012年2月3日

Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. 第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月13日

真下知士、芹川忠夫「ラット遺伝子改変技術のめざましい進歩」第47回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、札幌、2011年9月6日

真下知士「遺伝子改変動物作製技術の新しい展開」シグマアルドリッチ ライフサイエンスセミナー 2011、大阪、2011年8月25日

真下知士「ZFNによる遺伝子改変ラットの作製法」自然科学研究機構・基礎生物学研究所共同利用共同研究・研究会、岡崎、2011年7月11日

真下知士「ジンクフィンガーヌクレアーゼを利用した遺伝子改変動物の作製」第 58 回日本実験動物学会総会、東京、2011 年 5 月 27 日

Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. University of Queensland, Brisbane, Australia, May 11, 2011

Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia, May 10, 2011

Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. University of Technology Sydney, Sydney, Australia, May 9, 2011

Mashimo T: Creation of Knockout Rats Using Zinc-Finger Nucleases. Australasian Gene Therapy Society Meeting, Melbourne, Australia, May 4, 2011

Mashimo T: Zinc-finger nucleases (ZFNs) as gene-targeting technology in animals. Auckland University Medical School, Auckland, New Zealand, May 3, 2011

真下知士「ラット遺伝子改変技術の進歩：ヒト化ラットの開発に向けて」AK 拠点招聘セミナー、京都、2011 年 4 月 20 日

H. 知的財産の出願・登録状況

1．特許取得
なし

2．実用新案登録
なし

3．その他
なし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書　籍　名	出版社名	出版地	出版年	ページ
真下知士、芹川忠夫	ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）	山村研一、小倉淳郎	細胞工学	秀潤社	東京	2012	296-301
真下知士、芹川忠夫	ジンクフィンガーヌクレアーゼによる遺伝子改変動物の作製	本庶佑	MSD	ニューサイエンス社	東京	2012	10-11

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

ジンクフィンガーヌクレアーゼによる遺伝子改変ラットの作製

Generation of genetically modified rats by zinc-finger nucleases

真下　知士・芹川　忠夫

Key Words: rat, gene-targeting technology, zinc-finger nucleases (ZFNs), severe combined immunodeficiency (SCID)

Abstract

近年，ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）と呼ばれる人工ヌクレアーゼにより，シロイヌナズナ，ショウジョウバエ，ゼブラフィッシュ，ラットなどこれまで遺伝子改変技術がなかった動植物において，標的とする遺伝子を改変することが可能となった。ZFNは，マウス／ラットにおいて，簡便，短期間（約6カ月），低コストで，あらゆる系統に遺伝子改変を行うことができる優れた技術として注目されている。今後，ウサギ，ブタ，サルなどの遺伝子改変動物や，ES／iPS細胞における遺伝子治療，再生医療への応用も期待されている。

■ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）とは

ジンクフィンガーヌクレアーゼとは，DNA配列を特異的に認識するジンクフィンガー蛋白と，DNAを切断するFokIヌクレアーゼを人工的に融合した蛋白のことである（図A）。一つの「ジンクフィンガー」ユニットは3-bpのDNAに結合するため，3〜6個の異なるジンクフィンガーユニットを組み合わせることで，9〜18-bpのDNA塩基配列を特異的に認識することができる。標的とするDNA配列に5〜6-bpを挟んでジンクフィンガーを二つデザインすることで，ジンクフィンガーに結合しているFokIヌクレアーゼが，挟まれた5〜6-bp のDNA領域に二本鎖切断を導入する（図B）。切断された二本鎖DNAは，通常，Non-Homologous End-Joining（NHEJ）により修復されるが，この修復過程でしばしばDNA欠失（または挿入）変異がおこる。

また，標的DNA配列に対して相同DNA配列が存在すると，相同組換えhomologous recombination（HR）が起きて，DNA配列が改変される（図B）。この過程は，理論的にはあらゆるDNA配列（あらゆる遺伝子）に適用できることから，人工的にデザインされたジンクフィンガーヌクレアーゼを用いることで標的遺伝子を自由に破壊（ノックアウト），あるいは改変（ノックイン）することが可能となった[1]。

Tomoji Mashimo and Tadao Serikawa
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
Institute of Laboratory Animals, Kyoto University Graduate School of Medicine

■ZFN技術による遺伝子改変動物の作製法

近年，このジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFNs）技術により，培養細胞，植物，ショウジョウバエ，ゼブラフィッシュなどで相次いで遺伝子改変が報告された[2]。ラットは，マウスと並ぶ代表的な実験用哺乳動物だが，ES細胞による遺伝子改変技術がなかったため，例えば，ヒト疾患の原因遺伝子のラット相同遺伝子（オーソログ）を破壊した遺伝子改変（疾患モデル）ラットを作製することが困難であった。我々はこのZFN技術を利用して，X連鎖重症複合免疫不全症（X-SCID）の原因遺伝子であるインターロイキン2受容体γ鎖（*Il2rg*）のノックアウトラット（X-SCIDラット）を作製することに成功した[3]。ZFNsを用いたノックアウトラットの作製方法を図Cに示す。ZFNs自体は，米国Sigma-Aldrich社などから入手できる。

動物の作製方法は，ZFNs mRNAを利用する以外は，従来のトランスジェニック動物を作製する方法と同じである。これまでの報告では，ZFNs mRNAを注入して産まれてきたラットの約20〜30%の個体に遺伝子変異が導入されている[3,4]。さらに，標的とするDNA配列に対して相同DNAプローブを利用することで，標的とする1塩基のDNA配列を改変することや，GFP遺伝子カセットをDNA配列特異的に挿入したノックインラットの作製が報告された[5]。

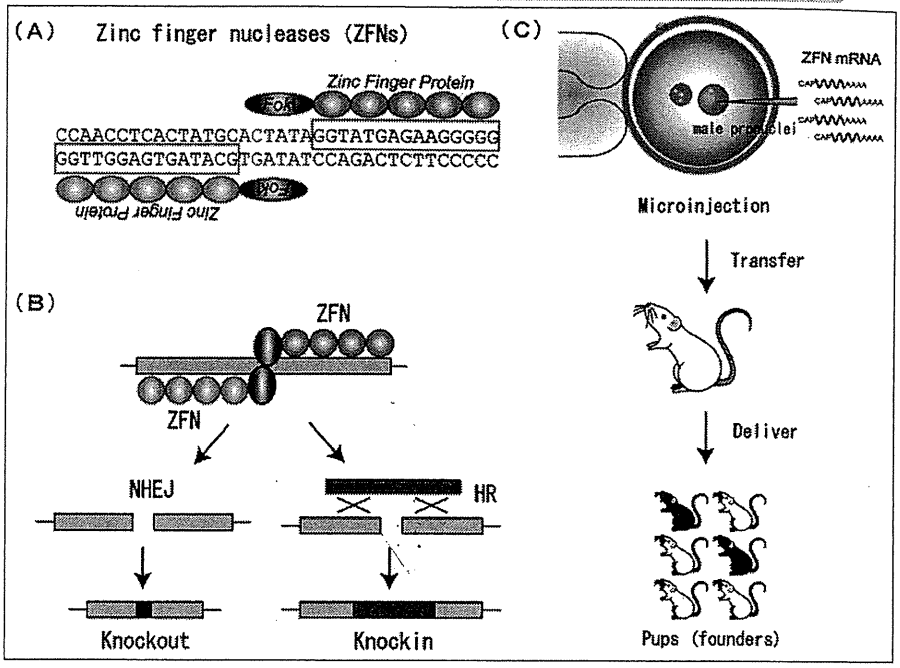


図　ジンクフィンガーズクレアーゼ（ZFN）による遺伝子改変動物の作製法
（A）ジンクフィンガーヌクレアーゼによる標的遺伝子の認識（B）ZFNによる二本鎖DNAの切断。非相同末端再結合（NHEJ）により遺伝子破壊（ノックアウト）が起こる場合と，相同組換え（HR）により遺伝子改変（ノックイン）を起こす場合がある。（C）ZFNをマイクロインジェクション法により受精卵に注入することで，遺伝子改変動物を作製することができる。

■ZFN作製された重症免疫不全 X-SCIDラット

我々が作製したX-SCIDラットは，野生型と同様に発育したが，剖検してみると胸腺が著しく萎縮していた[3)]。血漿IgGレベルは半減し，血漿IgAレベルはほとんど検出できなかった。フローサイトメトリー解析の結果，X-SCIDラットの末梢血ではT細胞が顕著に減少しており，成熟B細胞およびNK細胞がほとんど存在しなかった。ヒト卵巣癌細胞株の皮下移植による担がん試験を実施した結果，対照のF344ラットではヒト卵巣腫瘍細胞の増殖を抑制したのに対し，X-SCIDラットは全ての個体で腫瘍細胞が増殖した。SCIDマウスは，ヒト細胞や組織の移植研究，移植したヒト細胞に対する薬理試験あるいは毒性試験などに多用されている。ラットは，体の大きさがマウスの約10倍あり，生理学，薬理学，移植研究などに多用されることから，本研究により作製されたX-SCIDラットは，がん研究，幹細胞移植研究，創薬研究などに幅広く利用されるモデル動物になるであろう。

■今後の展望

最近，ラットES細胞を利用してp53遺伝子を破壊したノックアウトラットが報告された。ZFN技術はES細胞技術に比べて，以下のようなメリットがあげられる。通常，ES細胞を用いてノックアウト動物を作製する場合は，ベクターの作製から個体作製まで約12～18カ月を要する。しかし，ZFN技術の場合には，ベクター作製，マイクロインジェクション，個体作製までに約6カ月で可能である。また，ダブル（トリプル）ノックアウト動物を同時に作製することも可能である。ES細胞技術に比べて，遺伝子改変（ノックイン）動物の作製も容易に行える[5)]。ES細胞による遺伝子改変は，ES細胞が確立された系統（マウスの場合，129系統やC57BL/6系統など）でしかできないが，ZFN技術は，あらゆる系統について行うことができる。

さらに，これまではES細胞がないために遺伝子改変動物を作製できなかった中大動物（ウサギ，ブタ，牛，サルなど）にも利用することが可能である。今後，ラットにおいては，ZFN技術を利用して循環器疾患，糖尿病，がん，脳神経疾患などのモデルが多数作製されるであろう。また，個体レベルでの遺伝子改変だけではなく，ZFN技術はES細胞やiPS細胞での遺伝子改変も可能であることから，遺伝子治療や再生医療にも応用されるであろう。ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた今後の基礎および臨床研究の発展に大きな期待を寄せている。

文　献

1) Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. Nature Biotechnol., 23(8), 967-973 (2005)
2) Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet., 11(9), 636-46 (2010)
3) Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, *et al.* Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. PLoS One., 5(1), e8870 (2010)
4) Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. Science., 325(5939), 433 (2009)
5) Cui X, Ji D, Fisher DA, *et al.* Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. Nature Biotechnol., 29(1), 64-7 (2011)

ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)

Genome Editing by Zinc-finger Nucleases

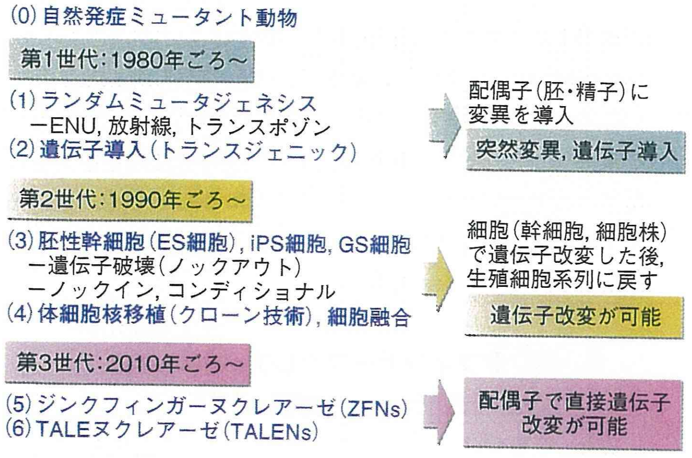
真下知士，芹川忠夫
Tomoji Mashimo, Tadao Serikawa

近年，ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)と呼ばれる人工ヌクレアーゼにより，シロイヌナズナ，ショウジョウバエ，ゼブラフィッシュ，ラットなどこれまで遺伝子改変技術が利用できなかった動植物において，標的とする遺伝子を改変することが可能となった．マウス／ラットでは，簡便，短期間(約4～6カ月)，低コストで，あらゆる系統にゲノム編集を行うことができるすぐれた技術として注目されている．本稿では，①ZFN技術を利用して開発した重症免疫不全SCIDラットについて，②SCIDラットにヒト細胞・組織などを移植したヒト化ラットについて紹介する．ZFN技術はマウス，ラットだけでなく，ウサギ，ブタ，サルなどの中・大動物におけるゲノム編集，ES／iPS細胞における遺伝子治療，再生医療への応用などにも利用価値が広がっている．

key words　ラット，ジンクフィンガーヌクレアーゼ，重症免疫不全SCID，ヒト化動物

はじめに

遺伝子改変動物は，遺伝子の機能を個体レベルで解析するための重要なツールとなる．現在のような遺伝子改変技術が開発される前は，自然発症で見つかった遺伝子変異(ミュータント)動物や，放射線，化学変異原などを投与して人為的にミュータント動物を作製し，その動物の特性・病態を解析することで，遺伝子の機能を研究していた(図1)．1980年ごろから遺伝子DNAを直接受精卵に導入することで，遺伝子を過剰に発現させたトランスジェニック動物を作製することが可能となり(第1世代)，1990年ごろからは，ノーベル医学・生理学賞を受賞したMario Capecchiらによって開発された胚性幹細胞(embryonic stem cell；ES細胞)を用いたノックアウト動物作製法により，次々とノックアウトマウスが作られるようになった(第2世代)．現在では遺伝子を破壊したノックアウトマウスだけではなく，遺伝子を改変したノックインマウスや，時期・組織特異的に遺伝子を破壊したコンディショナルノックアウトマウスが世界中で利用されている．



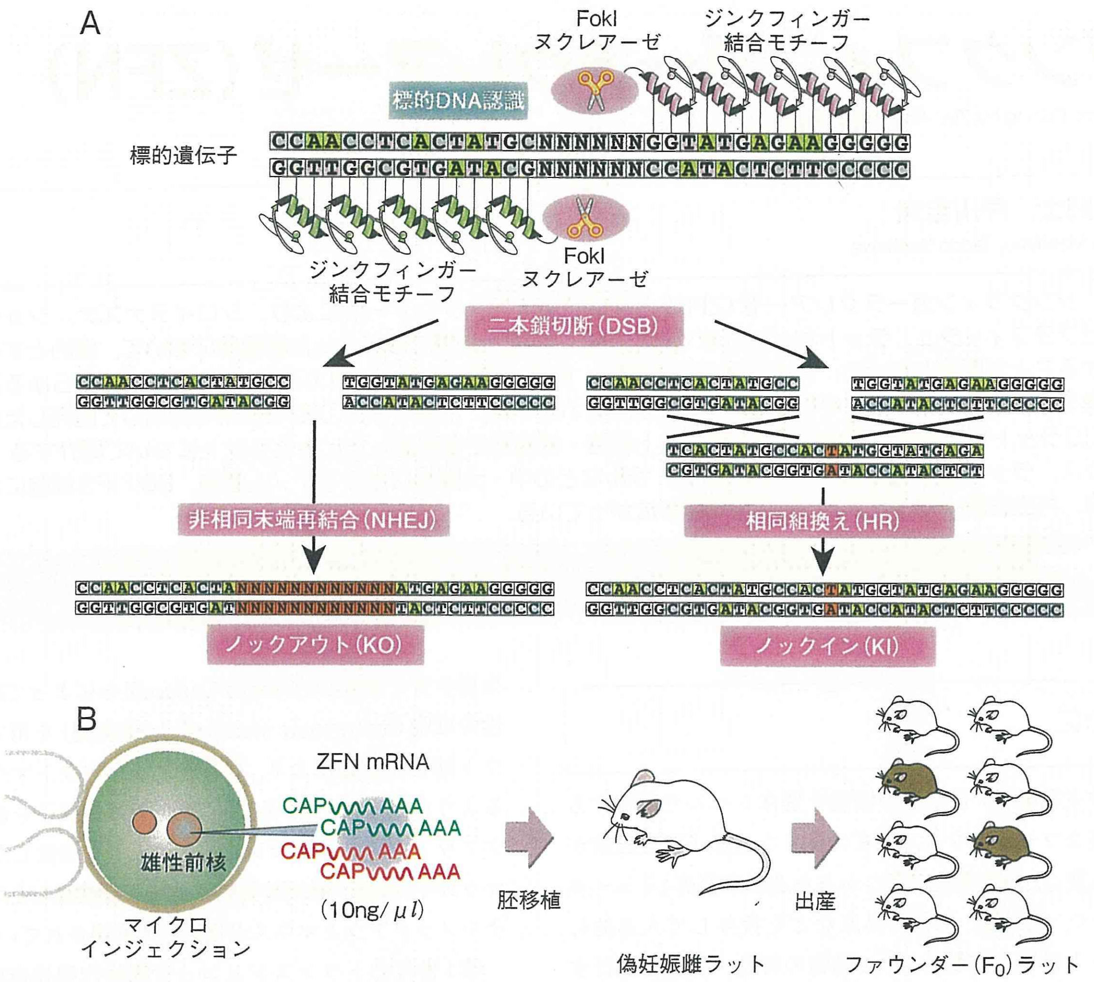
■図1　遺伝子改変動物を作製する技術の目覚ましい進歩

第1世代のトランスジェニック動物作製技術は，マウス以外の様々な動物に応用されているが，第2世代のES細胞を用いる遺伝子改変技術はマウス以外に利用できなかった．ラットは，自然発症のヒト疾患モデル動物が多数開発されており，薬効薬理試験，安全性試験などにも利用されているが，これまでES細胞がなかったためにノックアウトラットを作製することができなかった．2010年の夏，ノックアウトマウスが開発されてから21年の時を経て，初めてES細胞由来p53ノックアウトラットが報告された[1]．しかしながら，ラットES細胞の生殖細胞系列への伝達効率はマウスES細胞に比べると低く，培養条件や相同組換え技術などの改善が必要であると考えられている．

I　ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法

1．ジンクフィンガーヌクレアーゼとは

ジンクフィンガーヌクレアーゼとは，DNA配列を特異的



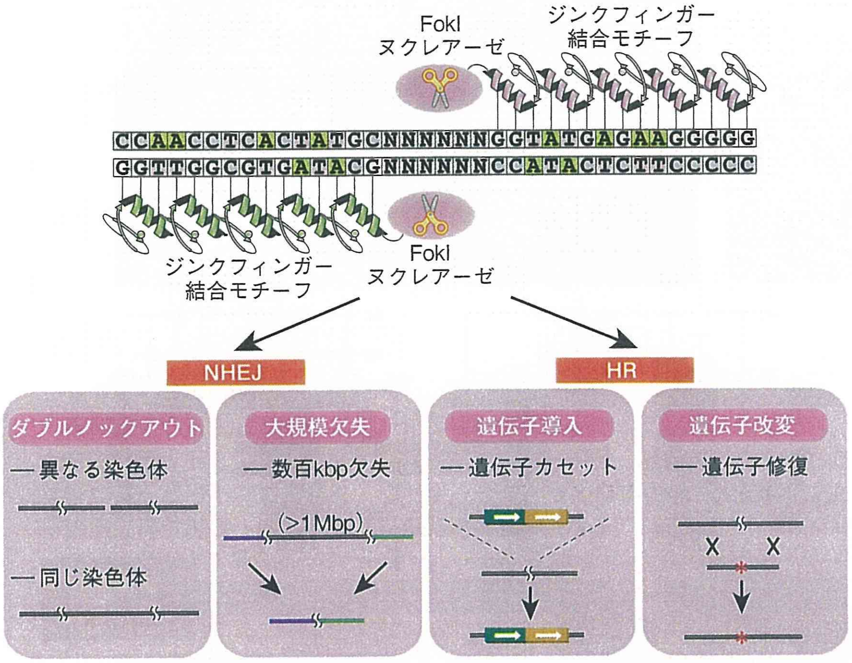
■図2 ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)による遺伝子改変動物の作製方法

A:ジンクフィンガーヌクレアーゼによる標的遺伝子の認識および二本鎖DNAの切断. 切断された二本鎖DNAは, 非相同末端再結合(NHEJ)あるいは相同組換え(HR)により修復される. NHEJの場合には, 数bpの遺伝子欠失が起こり(ノックアウト), HRの場合には遺伝子改変(ノックイン)が起こる.
B:ZFNsをマイクロインジェクション法により受精卵に注入することで, 遺伝子改変ラットを作製することができる.

に認識するジンクフィンガータンパク質と, DNAを切断するFokIヌクレアーゼを人工的に融合したタンパク質のことである(図2A). 1つの"ジンクフィンガー"ユニットは3bpのDNAに結合するため, 3~6個の異なるジンクフィンガーユニットを組み合わせることで, 9~18bpのDNA塩基配列を特異的に認識することができる. 標的とするDNA配列に5~6bpを挟んでジンクフィンガーを2つデザインすることで, ジンクフィンガーに結合しているFokIヌクレアーゼが, 挟まれた5~6bpのDNA領域に二本鎖切断を導入することができる(図2A). 切断された二本鎖DNAは, 通常, 非相同末端再結合(non-homologous endjoining;NHEJ)により修復されるが, この修復過程でしばしばDNA欠失(または挿入)変異が起こる. また, 標的DNA配列に対して相同DNA配列が存在すると, 相同組換え(homologous recombination;HR)が起きて, DNA配列が改変される(図2A). この過程は, 理論的にはあらゆるDNA配列(あらゆる遺伝子)に適用できることから, 人工的にデザインされたジンクフィンガーヌクレアーゼを用いることで標的遺伝子を自由に破壊(ノックアウト), あるいは改変(ノックイン)することが可能となった[2].

2. ジンクフィンガーヌクレアーゼによる遺伝子改変ラットの作製

近年, このジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)技術により, ヒト培養細胞, 植物, ショウジョウバエ, ゼブラフィッシュなどで相次いで遺伝子改変が報告された[3]. 筆者らは



■図3 ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたゲノム編集

ZFN技術を利用することにより，①2つの遺伝子を同時に欠損したダブルノックアウト動物，②大規模にゲノム領域を欠損したノックアウト動物，③遺伝子カセットを利用した効率的トランスジェニック動物の作製，④遺伝子改変ノックイン動物の作製を効果的に実施することができる．

このZFN技術を利用して，X連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency；X-SCID)の原因遺伝子であるインターロイキン2受容体γ鎖(*Il2rg*)のノックアウトラット(X-SCIDラット)を作製することに成功した[4]．ZFNsを用いたノックアウトラットの作製方法を図2Bに示す．ZFNs自体は，米国Sigma-Aldrich社などから入手できる．動物の作製方法は，ZFNs mRNAを利用する以外は，従来のトランスジェニック動物を作製する方法と同じである．これまでの報告では，ZFNs mRNAを注入して産まれてきたラットの約20〜30%の個体に遺伝子変異が導入されている[4, 5]．さらに，標的とするDNA配列に対して相同DNAプローブを利用することで，標的とするDNA配列の1塩基を改変することや，GFP遺伝子カセットを特異的に挿入したノックインラットの作製が報告された[6]．

3. ジンクフィンガーヌクレアーゼの利点

ZFN技術は従来のES細胞技術に比べて，以下のようなメリットが挙げられる(図3)．通常，ES細胞を用いてノックアウト動物を作製する場合は，ベクターの作製から個体作製まで約12〜18カ月を要する．しかし，ZFN技術の場合には，ベクター作製，マイクロインジェクション，個体作製までに約6カ月で可能である．また，ダブル(トリプル)ノックアウト動物を同時に作製することも可能である．ES細胞技術に比べて，遺伝子改変(ノックイン)動物の作製も容易に行える[6]．ES細胞による遺伝子改変は，ES細胞が確立された系統(マウスの場合，129系統やC57BL/6系統など)でしかできないが，ZFN技術はあらゆる系統について行うことができる．さらに，これまではES細胞がないために遺伝子改変動物を作製できなかった中・大動物(ウサギ，ブタ，ウシ，サルなど)にも利用することが可能である．

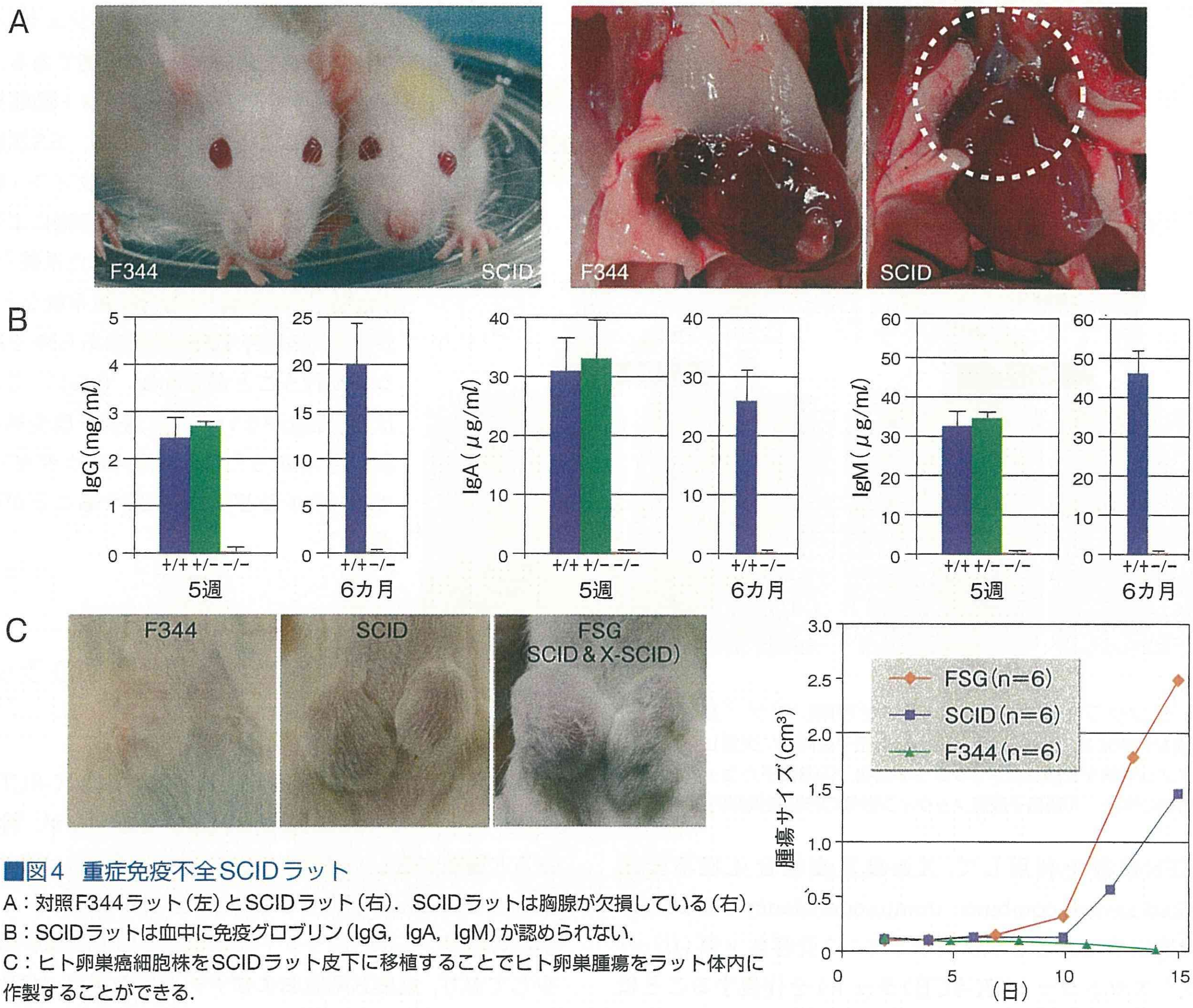
Ⅱ 重症免疫不全SCIDラット

1. X-SCIDラット

ZFN技術により作製されたX-SCIDラットは，野生型と同様に発育したが，剖検してみると胸腺が著しく萎縮していた[4]．血漿IgGは半減し，血漿IgAはほとんど検出できなかった．フローサイトメトリー解析の結果，X-SCIDラットの末梢血ではT細胞が顕著に減少しており，成熟B細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞がほとんど存在しなかった．ヒト卵巣癌細胞株の皮下移植による担癌試験を実施した結果，対照F344ラットではヒト卵巣腫瘍細胞の増殖を抑制したのに対し，X-SCIDラットはすべての個体で腫瘍細胞が増殖した．SCIDマウスは，ヒト細胞や組織の移植研究，移植したヒト細胞に対する薬理試験あるいは毒性試験などに利用されている．X-SCIDラットは，癌研究，幹細胞移植研究，創薬研究などに幅広く利用されるモデル動物になるであろう．

2. SCIDラット

マウスでは*Il2rg*遺伝子をノックアウトしたX-SCIDマウスより，*Prkdc*遺伝子を欠損したSCIDマウスのほうが広く利用されている．さらにはⅠ型糖尿病モデルNOD(non-obese diabetic)マウスに*Prkdc*遺伝子を欠損させたNOD-*scid*や，NOD背景系統に*Prkdc*遺伝子と*Il2rg*遺伝子両方を欠損させることで，T細胞，B細胞，NK細胞すべてを欠失したより重症の免疫不全動物NOG(NOD/SCID/Il2rγ^{null})



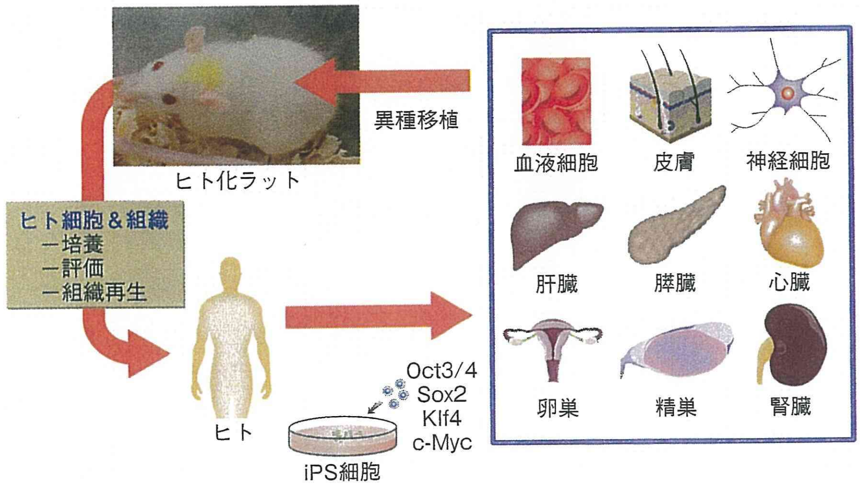
■図4　重症免疫不全SCIDラット

A：対照F344ラット（左）とSCIDラット（右）．SCIDラットは胸腺が欠損している（右）．
B：SCIDラットは血中に免疫グロブリン（IgG，IgA，IgM）が認められない．
C：ヒト卵巣癌細胞株をSCIDラット皮下に移植することでヒト卵巣腫瘍をラット体内に作製することができる．

マウスが開発されている[7]．筆者らはZFN技術を使って*Prkdc*遺伝子を欠損したSCIDラット，*Prkdc*遺伝子と*Il2rg*遺伝子両方を同時に欠損したFSG（F344-*scid Il2rg*）ラットを世界で初めて作製することに成功した（図4）（筆者ら，投稿中）．SCIDラットは，マウスと同様に胸腺の萎縮，T細胞，B細胞の欠失が認められた．SCIDマウスでは，一部の個体あるいは加齢とともに血中IgGなどの免疫グロブリンが検出される“Leaky”と呼ばれる現象が認められるが，SCIDラットは測定したすべての個体あるいは6カ月以上が経った個体でもLeaky現象が認められなかった（図4B）．さらに，SCIDマウスと異なる点として，SCIDラットは対照F344ラットと比べて，体重の減少，繊維芽細胞の増殖能力の低下などが発見された．これらマウスとラット間の特性の違いは，*Prkdc*遺伝子の生物種間における機能の差によるものと考えられている．

3．ヒト化ラット

拒絶反応の弱い重症免疫不全動物にヒト細胞や組織を移植することで，動物体内でヒト臓器・組織の再構築を行い，持続的にヒトの生理と機能を有する動物をヒト化動物と呼んでいる．ヒト化動物は，これまで不可能であった動物個体内におけるヒト生理・病理学的解析研究や非臨床研究，創薬研究などに利用することができる．筆者らは，ヒト卵巣癌細胞株を重症免疫不全ラットの皮下に移植した結果，SCIDおよびFSGラットのすべての個体で腫瘍細胞が増殖した（図3C）．また，ヒトiPS細胞を重症免疫不全ラットの精巣に移植したところ，テラトーマ（奇形腫）と呼ばれる内胚葉，中胚葉，外胚葉由来の多種類の分化した細胞を形成させることに成功した．現在，ヒト肝細胞を移植した肝臓ヒト化ラット，あるいはヒト血液幹細胞を移植した血液ヒト化ラットなどの作製を検討している（図5）．ラットはマウスに比べて体のサイズが約10倍あることから，血液や胆汁，細胞や組織をたくさん取



■図5 ヒト化ラットの有用性
iPS細胞などのヒト細胞を取り出して，様々な種類の細胞・組織に分化させ，免疫不全ラットに異種移植することにより，①ヒト細胞をラット個体内で培養すること，②培養した細胞を個体レベルで評価・解析する，③最終的には組織や器官を作ることが可能になるかもしれない．

ることができる．また，生理学，薬理学，神経行動学，移植研究などに多用されている．ヒト化ラットの作製に成功すれば，ヒト化マウスに比べて様々なメリットがあると考えられる．

おわりに：今後の展望

近年，ZFNと類似の技術として，DNA配列を認識する植物細菌*Xanthomonas*由来のTALE（transcription activator-like effectors）とヌクレアーゼ活性ドメイン（FokI）を融合させた新規の人工ヌクレアーゼTALEN（transcription activator-like effector nucleases）を使って，線虫[8]，ゼブラフィッシュ[9]，ラット[10]などで標的遺伝子の破壊が報告されている．TALENは，ZFNと異なり標的DNA配列を正確にデザインすることが可能で，短期間に作製できるという利点が挙げられている．しかしながら，配列特異性については現在複数の研究グループが解析を進めており，作製方法や設計方法についていまだ不明な点も多い．今後の開発が期待される技術である．

ラットにおいては，ZFN/TALEN技術を利用して，循環器疾患，糖尿病，癌，脳神経疾患などのモデルが多数作製されてきている．また，個体レベルでの遺伝子改変だけではなく，ZFN/TALEN技術を利用してES細胞やiPS細胞での遺伝子改変も可能であることから，遺伝子治療や再生医療にも応用されるだろう．ZFN/TALENのような人工ヌクレアーゼにより，今後の基礎および臨床研究の発展に大きな期待を寄せている．

PROFILE 真下知士
■ 京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
■ E-mail：tmashimo@anim.med.kyoto-u.ac.jp
■ 趣味：旅行，映画，水泳
1994年京都大学農学部畜産学卒業，2000年京都大学大学院人間環境学研究科博士課程修了（人間環境学博士）後，フランス，パスツール研究所免疫学講座哺乳動物遺伝学教室Jean-Louis Guenet博士のもとに留学，2003年帰国後，現所属にてナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」事業に参画．

PROFILE 芹川忠夫
■ 京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
■ E-mail：serikawa@anim.med.kyoto-u.ac.jp
■ 趣味：釣り，自転車
1972年大阪府立大学農学部獣医学科卒業，1980年大阪府立大学農学博士（論博），1973年京都大学助手（医学部（現医学研究科）附属動物実験施設），1988年同助教授，1993年より同教授，1994年より同施設長併任，2002年よりナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の課題管理者，1995年より関西実験動物研究会会長，2006～2009年度（社）日本実験動物学会理事長．

文献

1) Tong C, et al: Nature (2010) 467: 211-213
2) Porteus MH, et al: Nat Biotechnol (2005) 23: 967-973
3) Urnov FD, et al: Nat Rev Genet (2010) 11: 636-646
4) Mashimo T, et al: PLoS One (2010) 5: e8870
5) Geurts AM, et al: Science (2009) 325: 433
6) Cui X, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 64-67
7) Ito M, et al: Curr Top Microbiol Immunol (2008) 324: 53-76
8) Wood AJ, et al: Science (2011) 333: 307
9) Sander JD, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 697-698
10) Tesson L, et al: Nat Biotechnol (2011) 29: 695-696