

遺伝子改変ブタの作出に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室 教授

研究要旨：既存の $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene knockout (GalT-KO)ブタへ有性生殖を介して新しい遺伝的背景の導入を行い、より体細胞クローニングに適した homozygous GalT-KO 細胞を樹立した。樹立した細胞の体細胞クローニングによって、GalT-KO 生存産仔が得られることが確認された。

さらに、ゲノム編集技術を用いて、Hanganutziu-Deicher (H-D)抗原の合成を司る cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)遺伝子をノックアウトすることに成功した。最終的に、GalT/CMAH-ダブル homozygous KO の遺伝形質を持つ、雌雄の細胞が樹立された。

A. 研究目的

既存の $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene knockout (GalT-KO)ブタをベースとして、より体細胞クローニングに適した細胞を樹立することを目的とした。さらに、GalT-KO 細胞に対して、Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原の合成を司る cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)遺伝子ノックアウトを追加することを、第2の目的とした。

B. 研究方法

1. 遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞の樹立とクローン産仔の作出

雌の homozygous GalT-KO クローンブタ (DK3-9 系)を野生型雄ブタと交配し、heterozygous GalT-KO ブタを新たに作出した。これによって、体細胞クローニングにより無性生殖的に維持されてきた GalT-KO ブタの系統に、有性生殖を介して新しい遺伝的背景の導入を行った。得られた heterozygous GalT-KO 雌を、既存の

homozygous GalT-KO 雄個体 (DK3-1 系)の精子で人工的に受胎させ胎仔を得た。この胎仔より樹立した繊維芽細胞 (DK3-1neo)を用いて、体細胞核移植によるクローン個体作出を行った。

2. 雌の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

雌の homozygous GalT-KO クローンブタ (DK3-9)の細胞を対象に、CMAH 遺伝子を標的とする Zinc finger nuclease (ZFN) mRNA を導入した。得られた heterozygous CMAH-KO 細胞を体細胞核移植に用いて、クローン産仔の作出を行った。homozygous CMAH-KO 細胞の樹立のため、この得られたクローン産仔由来繊維芽細胞 (heterozygous CMAH-KO)へ再度 ZFN mRNA を導入した。

3. 雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞 (DK3-1neo)を用いて、

CMAH 遺伝子を標的とする Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) mRNA の導入を行った。

C. 結果

1. 遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞の樹立とクローン産仔の作出

遺伝的背景を更新した homozygous GalT-KO 細胞 (DK3-1neo) から 4 頭のクローン産仔を得た。その内 3 頭は産後虚弱のため、出生後 2 日までに試料採取に供した。残る 1 頭は出生後 33 日まで生存を確認した後、試料採取に供した。

2. 雌の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

新たに樹立した homozygous GalT-KO/heterozygous CMAH-KO 細胞から、4 頭のクローン産仔を得た。4 頭中の 1 頭は健常であったが、3 頭は死産あるいは産後虚弱であった。出生後 2 日に健常個体から次世代クローン個体作出のための初代培養細胞を樹立した。この細胞へ再度 ZFN mRNA を導入することにより、homozygous GalT-KO/homozygous CMAH-KO のダブル KO 細胞を、最終的に 2 ライン樹立した。これにより雌の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞が獲得された。

3. 雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞の獲得

遺伝的背景が更新された homozygous

GalT-KO 細胞 (DK3-1neo) に対する TALEN mRNA による遺伝子改変を行った結果、homozygous GalT-KO/homozygous CMAH-KO のダブル KO 細胞が、最終的に 2 ライン樹立された。これにより雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞が獲得された。

D. 考察

既存の homozygous GalT-KO ブタに新たな遺伝的背景を導入した細胞から、生存可能なクローンブタが得られたことから、homozygous GalT-KO 細胞において従来懸念されていた近交化の影響やエピジェネティック変異の影響が、ある程度改善されたと考えられる。

ZFN や TALEN を用いたゲノム編集は、既存の遺伝子ノックアウトブタ（すなわち GalT-KO）に新たな遺伝子ノックアウト（すなわち CMAH-KO）を追加するために有効であった。

超急性拒絶反応克服において $\alpha 1,3$ -galactose epitope に次ぐ障害である H-D 抗原の除去にも成功したことで、今後の研究の進展が大いに期待される。本研究で、ゲノム編集技術を用いて、雌雄の GalT/CMAH-ダブル KO 細胞が樹立されたので、今後はこれらの細胞が体細胞核移植に適した増殖能や染色体正常性を有しているかどうかを見極める必要がある。細胞の状態が良好であれば、それらを用いた体細胞クローニングによって、GalT/CMAH-ダブル homozygous KO 個体の作出は、十分可能であると考えられる。

E．結論

既存の homozygous GalT-KO ブタを、有性生殖のサイクルに組み入れることで、個体の正常性・生存性を改善し得た。ゲノム編集技術の利用により、既存の遺伝子ノックアウトブタへの新たな遺伝子ノックアウトの追加は、十分に実用的な効率で行い得る。

F．健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G．研究発表

<原著論文>

1. Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. J Reprod Dev 60:in press. 2014.
2. Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant- negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. PLoS One DOI: 9:e92219. DOI: 10.1371/journal.pone.0092219PONE-D-13-45932 [pii], 2014.

3. Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurome M, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwinzer R, Nagashima H, Rieben R, Ayares D, Wolf E, Klymiuk N: Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. Transplantation ,DOI: 10.1097/TP.0b013e3182a95cbc, 2013.
4. Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. PLOS ONE 8:e76478. DOI: 10.1371/journal.pone.0076478 PONE-D-13-27603 [pii], 2013.
5. Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R,

- Aartsma-Rus A, Thirion C,
Lochmuller H, Walter M.C, Wolf E:
Dystrophin-deficient pigs provide new
insights into the hierarchy of
physiological derangements of
dystrophic muscle. *Hum Mol Genet*
22:4368-82, 2013
6. Kurome M, Geistlinger L, Kessler B,
Zakhartchenko V, Klymiuk N,
Wuensch A, Richter A, Baehr A,
Kraehe K, Burkhardt K, Flisikowski
K, Flisikowska T, Merkl C,
Landmann M, Durkovic M, Tschukes
A, Kraner S, Schindelbauer D, Petri T,
Kind A, Nagashima H, Schnieke A,
Zimmer R, Wolf E: Factors
influencing the efficiency of
generating genetically engineered
pigs by nuclear transfer:
multi-factorial analysis of a large
data set. *BMC Biotechnol* 13:43. DOI:
1472-6750-13-43 [pii],
10.1186/1472-6750-13-43, 2013
7. Yamamoto A, Ikeda K, Wang D,
Nakatsu S, Takama Y, Ueno T,
Nagashima H, Kondo A, Fukuzawa M,
Miyagawa S: Trial using pig cells with
the H-D antigen knocked down. *Surg
Today* 43:782-6. DOI:
10.1007/s00595-012-0274-x, 2013
8. Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S,
Nakano K, Matsunari H, Watanabe
M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N,
Sakamoto N, Makino T, Yagi S,
Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H:
DNA methylation profiles provide a
viable index for porcine pluripotent
stem cells. *Genesis*, 51(11):763-776,
2013.
9. Maehara M, Sato M, Watanabe M,
Matsunari H, Kokubo M, Kanai T,
Sato M, Matsumura K, Hyon SH,
Yokoyama M, Mochida J, Nagashima
H: Development of a novel
vitrification method for chondrocyte
sheets. *BMC Biotechnology* , 13:58,
2013.
10. Maeda A, Ueno T, Nakatsu S, Wang
DD, Usui N, Takeishi S, Okitsu T,
Goto M, Nagashima H, Miyagawa S:
A lectin microarray study of
glycoantigens in neonatal porcine
islet-like cell clusters. *Journal of
Surgical Research* ,
183(1):412-418, DOI
10.1016/j.jss.2012.12.037, 2013.
11. Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S,
Matsuno N, Kasahara M, Matsunari
H, Umeyama K, Watanabe M,
Nagashima H: Transgenic pig
expressing the red fluorescent protein
kusabira-orange as a novel tool for
preclinical studies on hepatocyte
transplantation. *Transplantation
Proceedings*, 45:1808-1810, 2013.
12. Umeyama K, Honda K, Matsunari H,

Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. *J Reprod Dev* 59(6): 599-603, 2013.

<総説>

1. 内倉鮎子、松成ひとみ、前原美樹、長嶋比呂志：卵・組織・細胞シートのガラス化保存の現状と可能性、再生医療 13, 48-51, 2014

<著書（共著）>

1. 長嶋比呂志：哺乳動物胚および卵子の凍結保存. In: 繁殖生物学. Edited by 日本繁殖生物学会: interzoo; 2013: 278-289.
2. 松成ひとみ, 長嶋比呂志：動物個体内での臓器再生. In: 幹細胞研究と再生医療. 南山堂; 2013: 130-135.

<招待講演・国際学会>

1. Nagashima H: Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO. In: Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session: 13 Nov 2013; Osaka.

<招待講演・国内>

1. 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタ・クロー

ンブタによるトランスレーショナルリサーチの展開. In: 第4回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム: 14 Dec 2013; 伊勢原.

2. 長嶋比呂志: トランスレーショナルリサーチにおけるクローンブタ・遺伝子改変ブタの可能性. In: 第5回愛宕 Nephrology Forum: 26 Nov 2013; 東京.
3. 長嶋比呂志: クローンブタをプラットフォームとするトランスレーショナルリサーチ. In: 東京医科歯科大学大学院特別講義: 11 Oct 2013; 東京.
4. 長嶋比呂志: 生殖工学技術が拓く未来の動物生産. In: 第106回日本繁殖生物学会市民公開講座: 14 Sep 2013; 東京.
5. 長嶋比呂志: クローンブタを用いた臓器移植・再生研究の現状と将来展望. In: 第28回福島移植フォーラム: 27 Jul 2013; 福島.
6. 長嶋比呂志: クローン動物の医学・医療への利用. In: 第5回産学連携情報交換会(農林水産省主催): 18 Jun 2013; 東京.

<国際学会>

1. Uchikura A, Wakayama T, Wakayama S, Matsunari H, Maehara M, Matsumura Y, Nakano K, Sasaki E, Okahara J, Tsuchiya H, Nakauchi H, Nagashima H: Practical application of the hollow fiber vitrification method for

- cryopreservation of mammalian embryos. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
2. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo exogenic organ generation with organogenesis-disabled cloned pigs as a platform. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
 3. Kobayashi M, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Hayashida G, Matsumura Y, Kuramoto M, Sakai R, Arai Y, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagaya M, Nagashima H: Generation and characterization of transgenic-cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric plum. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
 4. Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Kanai T, Hayashida G, Matsumura K, Kobayashi M, Kuramoto M, Asano Y, Sakai R, Uchikura A, Arai Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nagashima H: Application of blastocyst complementation to development of genetically modified pigs for xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
 5. Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo generation of exogenic pancreas in apancreatic cloned pigs via blastocyst complementation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
 6. Sahara H, Nagashima H, Miura K, Waki S, Kawai A, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Shimizu A, Date H, Yamada K: Attenuation of hyperacute dysfunction and microangiopathy by the treatment of carbon monoxide in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
 7. Waki S, Sahara H, Miura K, Kawai A, Sekijima M, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Tasaki M, Shimizu A, Nagashima H, Yamada K: Porcine CMV may be the causative agent of

porcine kidney rejection in GalT-KO pig to nonhuman primate preclinical xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.

<国内学会>

1. 松成ひとみ、浅野吉則、小林美里奈、内倉鮎子、渡邊將人、梅山一大、長屋昌樹、中内啓光、長嶋比呂志、臍臓欠損ブタ胎子を用いた外来性細胞由来臍臓形成の試み. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
2. 前原美樹、佐藤正人、松成ひとみ、内倉鮎子、松村幸奈、坂井理恵子、小久保舞美、松村和明、玄丞然、長嶋比呂志、ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発：実用化に向けた改良研究-1. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
3. 松田泰輔、渡邊將人、中野和明、松成ひとみ、小林美里奈、林田豪太、倉本桃子、金井貴博、山口智之、中内啓光、長屋昌樹、長嶋比呂志: ブタ卵におけるmRNA injection法を用いたZinc Finger Nucleasesによる遺伝子ノックアウト. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
4. Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
5. 渡邊將人、中野和明、松成ひとみ、松田泰輔、金井貴博、小林美里奈、松村幸奈、坂井理恵子、倉本桃子、林田豪太、浅野吉則、高柳就子、新井良和、梅山一大、長屋昌樹、豊花、長嶋比呂志: Zinc finger nuclease発現mRNAによるIL2RG遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
6. 内倉鮎子、松村幸奈、中野和明、浅野吉則、長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚およびブタ胚のガラス化保存. In: 第58回日本生殖医学会学術講演会・総会: 15-16 Nov 2013; 神戸.
7. 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊將人、梅山一大、佐原寿史、山田和彦、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 異種移植研究における遺伝子改変ブタの作出への人工生殖技術の利用. In: 第1回日本先進医工学ブタ研究会: 12 Nov 2013; 大阪.
8. 坂井理恵子、中野和明、松成ひとみ、新井良和、渡邊將人、梅山一大、長屋昌樹、宮川周士、長嶋比呂志: 遺伝子改変クローンブタ開発における人工生殖技術を利用した遺伝的バックグラウ

- ンドの更新. In: 第16回日本異種移植研究会: 10 Nov 2013; 大阪.
9. 内倉鮎子, 松成ひとみ, 松村幸奈, 中野和明, 浅野吉則, 前原美樹, 若山清香, 若山照彦, 長嶋比呂志: 中空系ガラス化法の実用化に関する研究-1: 融解速度の胚生存性への影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
10. 牧野智宏, 東大, 内田奈緒美, 坂本望, 新井良和, 松本守雄, 長嶋比呂志, 大鐘潤: プタにおけるFbn1遺伝子のエピジェネティック制御解析. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
11. 東大, 内田奈緒美, 坂本望, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 骨格筋分化抑制遺伝子MstnのDNAメチル化による発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
12. 内田奈緒美, 東大, 坂本望, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
13. 坂本望, 東大, 内田奈緒美, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: プタHnf1a, Hnf4aの肝臓特異的発現にはDNAメチル化とアンチセンス非コードRNAが関与する. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
14. 林田豪太, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 浅野吉則, 内倉鮎子, 前原美樹, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 沢野朝子, 宮脇敦史, 長嶋比呂志: 細胞周期可視化蛍光プローブFucci を発現するブタ体細胞核移植胚の作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
15. 浅野吉則, 松成ひとみ, 小林美里奈, 内倉鮎子, 中野和明, 林田豪太, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 金井貴博, 松田泰輔, 新井良和, 渡邊将人, 長嶋比呂志: DNAメチル化阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がブタ体細胞核移植胚の発生能に及ぼす影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
16. 松村幸奈, 前原美樹, 本田香澄, 林田豪太, 倉本桃子, 中野和明, 松成ひとみ, 小林美里奈, 内倉鮎子, 浅野吉則, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ガラス化保存された体外成熟/体外受精胚を用いた糖尿病モデル遺伝子改変ブタの作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

