

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(再生医療関係研究分野))
分担研究報告書

実験用遺伝子改変ミニブタの開発に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志
明治大学農学部・教授

研究要旨

本年度は、研究分担者の長嶋が作製に成功した免疫不全(SCID)ブタの解析を行った。ブタの共通鎖遺伝子ノックアウトにより、T細胞およびNK細胞の欠損というヒトのX連鎖重症複合免疫不全症に非常に類似した表現型が現れることを確認した。また、赤色蛍光タンパク質であるクサビラ・オレンジ遺伝子を導入したミニブタ交雑種の作出に成功した。さらに、ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞の核移植において、クローン胚盤胞が得られることを確認した。

A. 研究目的

本分担課題では、ヒト化ブタ作製の基盤となる免疫不全ブタの解析と、疾病の診断・治療技術の開発や薬効評価に役立つ病態モデルブタの作出を目的とした。

B. 研究方法

(1) 免疫不全ブタの解析

共通鎖遺伝子ノックアウトを施した体細胞クローンブタの終末期胎仔を解析に用いた。帝王切開により妊娠113日の胎仔を回

収した。臍帯を結紮した後直ちに開腹し、下大静脈から採血した。血液中のリンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞)の有無はフローサイトメーターにより解析した。胸腺については肉眼解剖学的に観察を行った。脾臓組織については、組織化学的解析によりリンパ球の分布域を確認した。また、脾臓組織における共通鎖タンパク質の発現をウエスタンブロット解析により確認した。

(2) 遺伝子改変ミニブタの作出

クサビラ・オレンジ遺伝子組換えブタの凍結精巢上体精子を、発情同期化および排卵

誘起したミニブタの卵管内に注入した。分娩予定日に破水を確認後、帝王切開により胎仔を取り出し、その後人工哺育した。新生仔の蛍光発現、遺伝子解析を行い、離乳期までの成長を確認した。

ドイツ Ludwigh-Maximilians 大学 E. Wolf 教授から分与を受けたジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞をサブクローニングし、体細胞核移植を行った。

(3) 倫理面への配慮

動物実験および組換え DNA 実験は、以下のとおり機関内承認を受け実施した。

動物実験

・長嶋比呂志申請「遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの作出」

平成 22 年 5 月 21 日承認

承認番号 IACUC10-0004

・長嶋比呂志申請「緑色ならびに赤色蛍光遺伝子導入トランスジェニックブタの繁殖並びに生殖細胞の保存」

平成 23 年 4 月 6 日承認

承認番号 IACUC11-0016

・長嶋比呂志申請「ブタ体外生産胚の移植実験」

平成 24 年 5 月 10 日承認

承認番号 IACUC12-0008

組換え DNA 実験

・長嶋比呂志申請「緑色ならびに赤色蛍光蛋白遺伝子導入トランスジェニックブタの繁殖並びに生殖細胞の保存」

平成 23 年 4 月 1 日承認

農安 11 第 5 号

・長嶋比呂志申請「遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの作出」

平成 22 年 4 月 1 日承認

農安 10 第 10 号

なお、ヒト細胞等のヒトに由来する材料は扱っていない。

C. 研究結果

(1) 免疫不全ブタの解析

共通 鎖遺伝子ノックアウトブタの血液をフローサイトメトリーにより解析した結果、T 細胞および NK 細胞が欠損していることが明らかとなった。一方、B 細胞は存在した。胸腺は形成されておらず欠損していた(図 1)。脾臓組織では、白脾髄内中心動脈の動脈周囲リンパ鞘組織のリンパ細胞域において、リンパ球はほぼ観察されず、共通 鎖タンパク質の発現が完全に欠損していた。

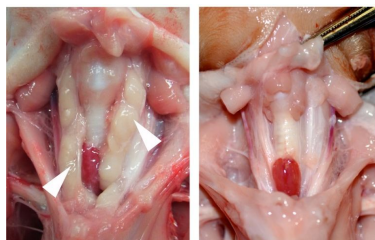


図 1 野生型ブタ(左)と共通 鎖遺伝子ノックアウトブタ(右)の上縦隔(矢頭:胸腺)

(2) 遺伝子改変ミニブタの作出

2 頭のミニブタに対し卵管内精子注入を行った結果、1 頭が妊娠した。帝王切開で 2 頭の新生仔を得た(雌)。それらは、全身性にクサビラ・オレンジの蛍光を発現することが

確認された(図 2)。尾の組織から採取した DNA の PCR 解析により、クサビラ・オレンジ遺伝子を有することが確認された。出生時体重は、0.73 kg (平均)であり、ミニブタと肉豚のほぼ中間であった。生後 4 ヶ月で、8 kg に成長した。4 ヶ月時体重は、肉豚の約 70%であった。

ジストロフィン遺伝子ノックアウト細胞は、サブクローニングにおいて一定の増殖性を示し、電気融合法による体細胞核移植で、胚盤胞が得られることが確認された。



図 2 クサビラ・オレンジ遺伝子を発現するミニブタ交雑種

D. 考察

本研究で解析した共通鎖遺伝子ノックアウトブタは、胸腺を欠損しており、また T 細胞および NK 細胞を消失した特徴を有することから、ヒトの X 連鎖重症複合免疫不全症

と非常に類似した表現型を示すものと考えられる。これら免疫不全症の表現型以外には異常な所見も観察されなかったことから、今後は適切な飼育環境下において共通鎖遺伝子ノックアウトブタの飼育・維持が可能であると予想される。

本年度、クサビラ・オレンジ遺伝子を導入したミニブタ交雑種の作出に成功した。この研究により、発情同期化・排卵誘起したミニブタへの、卵管内精子注入プロトコルが確立された。得られたミニブタ交雑種は雌であるので、性成熟後に再度ミニブタ精子による人工授精を行い、さらなる体格の小型化を図る予定である。得られる次世代産仔を用いて、クサビラ・オレンジを発現する血球や細胞を、同腹兄弟に移植し、追跡する実験系が可能になる。本研究のメインテーマである、ブタの光分子イメージングの開発に有用な、遺伝子改変ミニブタの確立に近づいている。

ジストロフィン遺伝子ノックアウトブタ等、他の遺伝子改変ブタについても、同様にミニブタ化することが可能であると考えられる。

E. 結論

ブタ利用研究の推進のためには、遺伝子改変ブタのミニブタ化が必要である。これは、技術的に十分可能であり、今後、多様な遺伝子改変形質をもつミニブタが作出される可能性がある。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入した。)

G. 研究発表

論文発表

1. 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*** 2013 Oct. 9; 8(10): e76478. (doi:10.1371/journal.pone.0076478)
2. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S.-H., 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*** 2013 Nov.; 51(11): 763–776. (doi:10.1002/dvg.22423) Epub 2013 Aug. 30.
3. 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. ***Human Molecular Genetics*** 2013 Nov.1; 22(21): 4368–4382. (doi: 10.1093/hmg/ddt287.) Epub 2013 Jun. 19.
4. Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M., Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., Arai, Y., Umeyama, K., Fujishiro, S.-H., Mizukami, Y., Nagaya, M., **Hanazono, Y., Nagashima, H.**: Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. ***PLOS ONE*** 2013 Apr. 23; 8(4): e61900. (doi:10.1371/journal.pone.0061900)

学会発表

1. 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. 第36回日本分子生物学会, 神戸, December 3–6, 2013.
2. 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, 花園豊, 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. 第36回日本分子生物学会, 神戸, December 3–6, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。