

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業
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

我が国で作られる遺伝子改変ブタや疾患モデルブタは、ほとんどが家畜ブタをベースにしている。これらのブタをミニブタ化できれば、ブタ利用研究のいっそうの推進が期待できる。平成 26 年度、赤色蛍光タンパク質であるクサビラオレンジの遺伝子を組み込んだミニブタに関して、より小型化の進んだ第 2 世代ミニブタの作出に成功した。こからは、ミニブタとほぼ同等の体格まで小型化された。さらに、糖尿病モデルブタのミニブタ化(第 1 世代)にも成功した。遺伝子改変ブタのミニブタ化は、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できるであろう。

A. 研究目的

我々は、IL2 受容体共通 γ 鎖遺伝子をノックアウトした、X 染色体性重症複合型免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID, 以下, SCID と略す)のブタを開発した。しかし、これは肉豚ベースで作られている。SCID ブタだけではなく、他の疾患モデルブタのほとんどが肉豚ベースで作出されている現状を鑑みると、ミニブタ化技術は、実験用ブタの普及を図る上で必須の技術である。そこで、既存の遺伝子改変ブタの凍結精子を用いてミニブタを受胎させる人工生殖技術の開発を行い、また、ミニブタ化した個体の人工哺育・育成

等のシステムを確立することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 実験用ブタのミニブタ化

ゲノム編集技術(Zn フィンガーヌクレアーゼ法)によって、IL2 受容体共通 γ 鎖遺伝子をノックアウトした SCID ブタを作出し得ることが確認されている。しかし、前述のとおり、SCID ブタは肉豚ベースで作出されている。平成 26 年度には SCID ブタのミニブタ化に先立ち、赤色蛍光タンパク発現ブタと糖尿病モデルブタのミニブタ化を進めた。具体的には、平成 25 年度に作製した F1 ミニブタ

(第1世代)を再度ミニブタと交配し F2(第2世代)を作出した。さらに、SCID ブタと糖尿病モデル(変異 HNF1 α 遺伝子導入)ブタの凍結精子を用いて、GIFT 法(Gamete Intra-Fallopian tube Transfer)による F1 ミニブタの作出を行った。

(2) 倫理面の配慮

本研究では動物実験が含まれる。動物愛護には最大限の配慮を払った。動物実験プロトコルは機関内承認を得た(明治大学 H26 年 6 月 6 日 IACUC14-0008, および H24 年 5 月 10 日 IACUC12-0008)。

C. 研究結果

(1) 遺伝子改変ブタの作出

糖尿病モデルブタの凍結精子を用いた

GIFT 法を実施した結果、2 例中 2 例が受胎し、既に一頭からは帝王切開により F1 産仔を得た。F1 産仔の体格は顕著に小型化した(図 1)。定常的な高血糖など、糖尿病モデルとしての特徴は F1 産仔に伝達された。SCID ブタ精子による GIFT 法実施例は、今後妊娠診断の予定である。

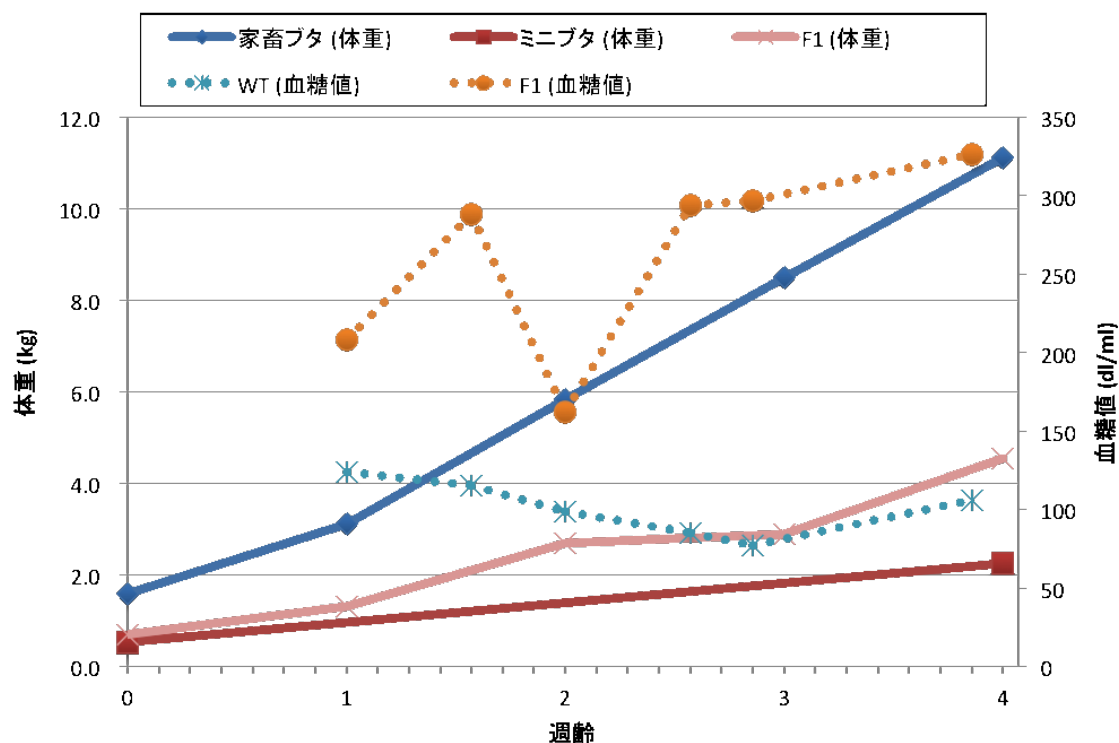
(2) ミニブタ化

図 2 に示す様に、クサビラオレンジ発現ブタの F2 産仔は、F1 個体よりさらに小型化し、ほぼミニブタの体格と同等となった。これによりミニブタ化が完成した。

D. 考察

体格の小さいミニブタを、家畜ブタと交配させることは出来ない。GIFT 法は、ミニブタを受胎させる方法として、確実であるばかりで

図 1 ミニブタ化糖尿病モデルブタ (F1)の成長と随時血糖値



なく、遺伝子改変ブタの貴重な凍結精子を有効に利用する点でも優れている。すなわち、通常の人工授精には 10~50 億の精子が必要なのに対して、GIFT 法では約 1 千万の精子で受胎可能である。

E. 結論

本年度研究により、クサビオレンジ発現ブタのミニブタ化が完成した。GIFT 法は、遺伝子改変ブタの凍結精子の有効利用に非常に効果的である。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

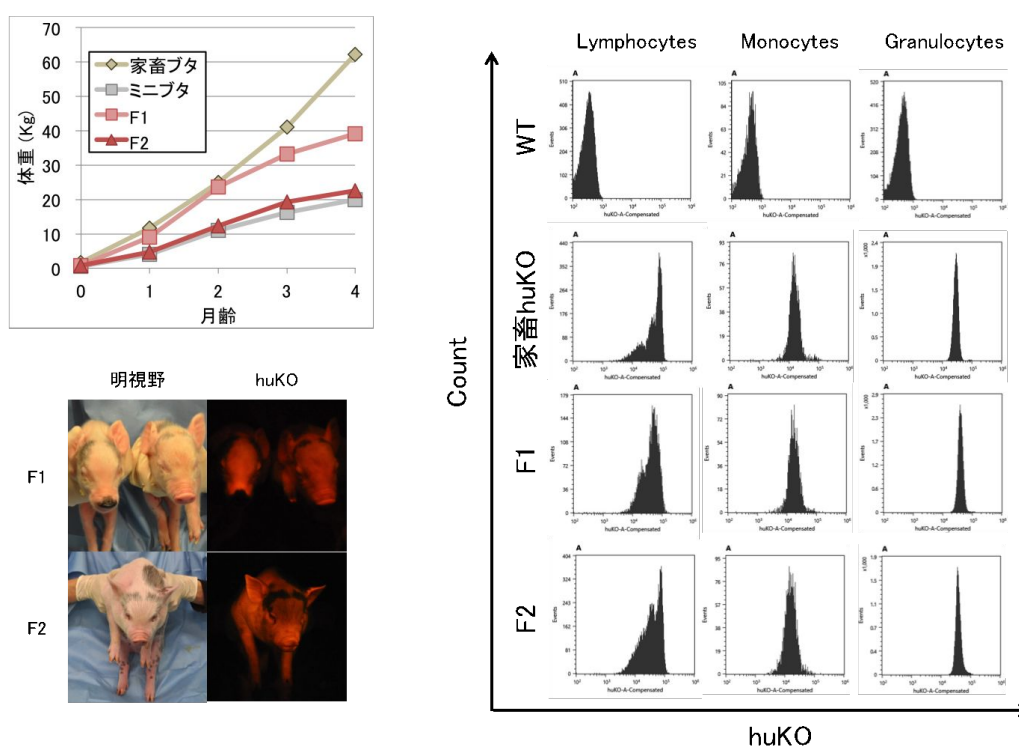
究報告書にまとめて記入した。)

G. 研究発表

論文発表

1. Matsunari, H., Kobayashi, T., Watanabe, M., Umeyama, K., Nakano, K., Kanai, T., Matsuda, T., Nagaya, M., Hara, M., Nakauchi, H., and **Nagashima, H.**: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J. Reprod. Dev.* 2014; 60(3):230–237.
2. Watanabe M, Kobayashi M, Nagaya M, Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Hayashida G, Takayanagi S, Sakai R, Umeyama

図2 ミニブタ化クサビオレンジ発現ブタ (F1/F2)の成長と蛍光発現



- K, Watanabe N, Onodera M, Nagashima H: Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum. *Journal of Reproduction and Development* 61: online Feb. 20, 2015
3. Hoang, D.-T., Matsunari, H., Nagaya, M., Nagashima, H., Millis, J.M., Witkowski, P., Periwai, V., Hara, M., and Jo, J.: A conserved rule for pancreatic islet rganization. *PLoS One* 2014; 9(10):e110384.
 4. Hara, S., Umeyama, K., Yokoo, T., Nagashima, H., and 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* 2014; 9(3):e92219.
 5. Sekijima, M., Waki, S., Sahara, H., Tasaki, M., Wilkinson, R.A., Villani, V., Shimatsu, Y., Nakano, K., Matsunari, H., Nagashima, H., and Fishman, J.A., Shimizu, A., Yamada, K.: Results of life-supporting galactosyltransferase knockout kidneys in cynomolgus monkeys using two different sources of galactosyltransferase knockout Swine. *Transplantation* 2014; 98:419–426.
 6. Miyagawa, S., Maeda, A., Kawamura, T., Ueno, T., Usui, N., Kondo, S., Matsumoto, S., Okitsu, T., Goto, M., and Nagashima, H.: A comparison of the main structures of N-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology* 2014; 24:25–38.
- 学会発表
1. 長嶋比呂志: ヒト幹細胞研究のプラットフォームとしての遺伝子改変ブタ. In: 第14回日本再生医療学会総会: 19-21 Mar 2015; 横浜.
 2. 長嶋比呂志: ヒト幹細胞研究のプラットフォームとしての遺伝子改変ブタ. In: SKIP Symposium 2014: 22 Dec 2014; 東京.
 3. 長嶋比呂志: ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ブタの作製. In: 第3回実験動物科学シンポジウム: 12 Dec 2014; 山形.
 4. 長嶋比呂志: ブタのゲノム編集と疾患モデル開発への応用. In: 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュートシンポジウム: 13 Mar 2015; 東京.
 5. 武石透輝, 中野和明, 松成ひとみ, 林田豪太, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 大海原雅人, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: 全身性にクサビラオレンジを発現するミニブタ交雑種の開発. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
 6. 中野和明, 渡邊将人, 松成ひとみ, 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, 内倉鮎子, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: ゲノム編集と体細胞クローニングによる免疫不全ブタの作出. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
7. 倉本桃子, 小林美里奈, 林田豪太, 松村幸奈, 松成ひとみ, 中野和明, 鞍本友香, 一山琴世, 浅野吉則, 内倉鮎子, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 糖尿病発症トランスジェニックブタ凍結精子の体外受精能の評価. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
8. Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Hatae S, Takeishi T, Umeyama K, Nagaya M, Miyagawa S, Hanazono Y, Nakauchi H, Nagashima H: Production efficiency of gene knockout pigs using genome editing and somatic cell cloning. In: 41th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 10-13 Jan 2015; Versailles, France.
9. Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Uchikura A, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of X-linked SCID pigs by genome editing and somatic cell cloning. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況 特許

1. 発明者: 花園豊, 渡邊將人, 長嶋比呂志
発明の名称: 遺伝子ノックアウトブタ
出願日: 平成 26 年 4 月 7 日
出願番号: 特願 2014-078986,
PCT/JP2014/076768
2. 特願 2014-027655「免疫抑制剤の評価方法、及び免疫抑制剤評価キット」
特許権者: 学校法人明治大学
発明者: 長屋昌樹, 長嶋比呂志