

ヒト代謝性肝疾患モデルブタの作出

研究代表者 絵野沢 伸 国立成育医療研究センター 研究所 先端医療開発室

研究要旨 代謝性肝疾患に対する非臨床試験における POC（概念実証）獲得に有用な、病態モデルブタの作出を目的とし、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)遺伝子欠損症モデルの確立を企図した。OTC 遺伝子に変異を有する精子を産生する遺伝子改変雄を野生型雌と交配させ、heterozygous に OTC 遺伝子を欠損する雌産仔を作出したところ、同腹子中に健常個体と哺乳期に高アンモニア血症を発症する個体とが認められた。この個体は肝内 OTC 活性が正常個体に比べ低値で、同疾患のバイオマーカーである尿中および血中オロト酸は高値で、OTC 欠損モデルであることがわかった。実験モデルとして、新生時ブタに対する細胞移植実験系を開発した。臨床において採用される肝の一部の葉に局限した移植法を確立し、同種肝細胞を移植の後、経口にて免疫抑制剤を投与して1ヶ月後の細胞生着を組織学的に調べた。免疫抑制剤を与えた個体において多くの生着細胞が検出された。本実験系は哺乳期のブタであっても施術可能で、ヒトの場合の新生児期肝細胞移植を完全に再現する実験系となりうる。また、帝王切開による自然早産回避法の有効性について検証した。具体的には、分娩予定日から3～7日前で帝王切開を行い、産仔は富士マイクラ社の保有する人工哺育法に基づいて早産産仔の育成を試みた。結果、分娩予定日5日前以内の摘出であれば、早産産仔は人工哺育により救命が可能であり、かつ後の育成にも問題がないことを確認した。以上の成果を、さらに多様な単遺伝子変異性代謝疾患のモデルブタ作出に拡大するため、糖原病 1b、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症の責任遺伝子にノックアウト変異を誘導した細胞を樹立した。これらの細胞から新規な体細胞クローン病態モデルブタの作出が可能である。

治療応答性から見た疾患モデルの適性検証 絵野沢 伸 国立成育医療研究センター 研究所 室長

疾患モデルの病理学生化学的検証 梅澤明弘 国立成育医療研究センター 研究所 副所長

遺伝子改変ブタの作出 長嶋比呂志 明治大学 農学部 教授

早期分娩・哺育技術の確立 佐竹典明 富士マイクラ株式会社 代表取締役

A. 研究目的

現状では肝移植が唯一の根治療法である代謝性肝疾患に対して、細胞医薬品をはじめ、遺伝子治療や新規薬剤を開発するための非臨床 POC（proof of concept、概念実証）を得るための病態モデルブタを作出する。

代謝性肝疾患の多くは単遺伝子変異であり、臓器移植によって全肝を置換するよりは細胞移植や遺伝子治療によることが望ましい。欧米を中心

に肝細胞移植や肝幹細胞移植の治験や臨床研究が開始されている（1,2）。国立成育医療研究センターにおいても昨年8月に尿素回路異常（オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損）児に対して肝細胞移植を行い、臨床症状の改善と肝臓移植までの橋渡しに成功した（3）。

核移植技術のもとに遺伝子改変ブタは種々作成されている。分担者長嶋は蛍光タンパク導入ブタや免疫不全ブタ、脾欠損ブタの作出に成功している（4,5）。この技術を用い、小児肝移植対象疾患である尿素回路異常症の OTC 欠損を模したブタを作出した。このブタについて分担者梅澤、絵野沢がヒト病態を表現していることを病理学的、生化学的に調べた。また、病態ブタの早産性を克服するために、分担研究者の佐竹が豊富な畜産経験をもとに哺育方法の確立を行なう。

代謝性肝疾患のひとつのウィルソン病は以前肝臓移植の適応であったが、近年有効なキレート剤が開発され移植は劇症例だけとなった。これに続き、他の代謝性肝疾患に対しても細胞移植や遺伝子治療など新規治療法の開発が行なわれている。現状での病態モデルはマウスで、十分な非臨床研究 POC 獲得ができていない。本申請で提案の病態モデルブタは代謝性肝疾患の新規治療をめ

ざす世界の企業や研究者が望む生物資源となる。また再生医療分野で肝疾患は大きなターゲットとなっている(6,7,8,9)。

本研究の目的は、1)妊娠、出産が可能となったOTC欠損ブタのキメラ個体を得て作出を容易にする、2)上記病態モデルを病理学および生化学的に検証、肝細胞移植に対する反応性から病態モデルとしての適切性を見る、3)早産性に対する対応、4)他の代謝性肝疾患モデルの作成の原材料となる核移植ドナー細胞パネルの作成、の4点である。

B. 研究方法

1) OTC 欠損ブタの作出

OTC遺伝子を欠損した精子を産生するOTCDキメラ雄を、3頭の野生型(WT)雌と交配させ、産仔を得た。この交配によって、X染色体上のOTC遺伝子がheterozygousに欠損する雌個体と、正常な雄個体が得られるので、それらの成長ならびに血中アンモニア濃度の推移を測定・記録した。

2) OTC 欠損ブタの病態評価

血液、尿、肝臓他全臓器を採取した。血液(血清)と尿はアンモニア値とオロト酸を測定した。肝については4つの肝葉から組織片を採取し、OTC活性を測定した。また肝およびその他臓器をホルマリン固定の後、病理組織学的観察を行った。

3) 新生仔ブタへの肝細胞移植モデルの確立

OTC遺伝子heterozygous欠損雌個体の同腹雄を用い、同ブタ肝中葉左領域に、クサビオレンジ遺伝子導入ブタ肝細胞 1.4×10^8 個(10mL懸濁液として)を移植した。細胞移植は、イソフルレン吸入麻酔下で腹部に小切開を加え、門脈本幹に中心静脈用カテーテル(CVカテーテルキット14G×70cm)を中葉起始部を少し越えた部位まで挿入し、インドシアニングリーンを少量注入してカテーテル先端の位置を確認してから細胞を輸注した。細胞移植を受けたブタ(レシピエントブタ)には免疫抑制剤として徐放性タクロリムス製剤であるグラセプタを0.5mg/カプセルを1日1カプセル経口投与(投与時刻は10時~12時の間)した。

4) 早産性に対する対応

分娩予定日数日前の時点で妊娠母豚に帝王切開を実施することにより自然早産を回避し、摘出した産仔は母豚と接触しない完全人工哺育により育成を試みた。OTC欠損疾患モデル作出に先行して早期分娩・哺育技術を確立しておく為、帝王切開対象は通常の個体を妊娠したマイクロミニピッグ雌を採用し、帝王切開実施タイミングを分娩予定日3日前、5日前、7日前の3パターンに

分けて産仔の生存率を検証した。

5) 他の代謝性肝疾患モデルの作成の原材料となる核移植ドナー細胞パネルの作成

ブタ胎仔線維芽細胞を用いて、グルコース6リン酸トランスロカーゼ(糖原病1b)、メチルマロニル CoA ムターゼ(メチルマロン酸血症)、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ(プロピオン酸血症)遺伝子のノックアウトを行った。上記遺伝子を標的とするTALEN mRNAを細胞に導入し、限界希釈後、PCRおよびシーケンシングにより、変異細胞コロニーを同定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変ブタの作出ならびに繁殖は、明治大学において遺伝子組換え実験および動物実験に対する承認を受けて実施された。その他の動物実験については国立成育医療研究センター倫理審査(No.395)、動物実験審査(A2000-001)の承認のもとに行った。

C. 研究結果

1) OTC 欠損ブタの作出

OTCDキメラ雄と交配した3頭のWT雌から合計12頭の雌産仔と21頭の雄産仔が得られた。産仔の遺伝子解析により、雌個体は全てheterozygous OTC-K0の遺伝子型を有することが確認された。一方、雄個体は全てWTであった。

Heterozygous OTC-K0雌個体の一部は、出生後約2週間に血中アンモニア濃度の高値(300N-μg/dL以上)を示した。高アンモニア血症を示した個体(27日齢)の肝組織を解析した結果、WT個体に比して有意に低いOTC活性であった。さらに、heterozygous OTC-K0雌個体の尿中オロト酸濃度が、WT個体より明らかに高いことも確認された。一方、高アンモニア血症を発症しない、変異遺伝子キャリアの雌個体は、同腹のWT雄個体と同様な成長を示した。現在は、離乳期以後の成長を観察中である。

2) OTC 欠損ブタの病態評価

血中アンモニア値はHeterozygous OTC欠損ブタが 148.0 ± 46.8 mg/dL(n=4, 9日齢)、対照 79.3 ± 15.13 mg/dL(n=6, 同日齢)と高値を示した。その後、Heterozygous OTC欠損ブタでアンモニア値がさらに高まった個体について、オロト酸を測定したところ、欠損ブタ血清および尿中で246、1864micro-mol/L、対照正常ブタでそれぞれ154、63micro-mol/Lであった。血液生化学分析として測定したAST、ALT、Total Bilirubin、グルコースのうち、ASTが93とやや高値を示した。それ以外は正常範囲であった。

高アンモニア血症を示したブタの肝組織は軽度脂肪肝を示したが、肝以外の組織においては特記すべき病態変化は見られなかった。肝組織の OTC 活性は、 $11.9 \pm 3.8 \mu\text{mol/mg protein/h}$ (肝内 4 部位から得た組織の平均 \pm SD) で、正常個体の $43.8 \pm 8.8 \mu\text{mol/mg protein/h}$ のおよそ 1/4 の低値を示した。

3) 新生仔ブタへの肝細胞移植モデルの確立

同種肝細胞移植では 14G という大口径のカテーテルを利用したが、止血の際に 6-0 プロリン糸で門脈壁を縫合する方法を採ることにより安全に施行することができた。また、カニューレ挿入後、少量のインドシアニンググリーンを注入することによって先端の位置確認ができた。この確認処置により細胞懸濁液を安全に目的部位に輸注することができた。

免疫抑制剤は静脈内投与と製剤のプログラフ、経口製剤のグラセプタを検討したが、前者は 1 日 2 回の投与が必要となるため、グラセプタの 1 日 1 回投与を採用した。当初体重 (4kg) に合わせ 0.5mg/カプセル を投与を続けたが、1 ヶ月後には体重が倍程度になり、血中濃度は 1.2ng/mL と、通常の臨床的目標血中濃度 $10 \sim 15\text{ng/mL}$ を大きく下回った。しかしながら、クサビラオレンジの蛍光によって検出された移植肝細胞は免疫抑制剤を与えたブタで多く観察された。

予備実験として行ったヒト肝細胞投与では、部分肝切除の有無と細胞生着の関係を調べた。1 週間後の血中ヒトアルブミン値は非部分肝切除群 $59.8 \pm 0.5\text{ng/mL}$ (平均 \pm 範囲) に対し、部分肝切除を加えた群は $284.4 \pm 41.4\text{ng/mL}$ と、およそ 4.8 倍の高値を示した。

4) 早産性に対する対応

帝王切開のタイミングとして、交配日から予測される分娩予定日の 3 日前・5 日前・7 日前の 3 通りで実施し、産仔の摘出後生存率・離乳時生存率を検証した。結果、3 日前、5 日前の施術では 24 時間看護と人工哺乳により産仔の救命が可能であった。7 日前の施術では摘出後の産仔の活力が著しく低く、24 時間看護と人工哺乳を施しても 1 週間以上の生存は成功しなかった。また、3 日前～5 日前施術の産仔は生時体重が大きいほど 1 週齢時点での生存率が高くなる傾向が見られた (相対的に、帝王切開実施：分娩予定日 3 日前 > 分娩予定日 5 日前の順で生存率が高いという結果になった)。1 週齢時点での生存個体は、富士マイクラ社の蓄積した完全人工哺育手技を適用することにより、1 週齢以降も異常なく生育した (5 か月齢現在まで、成長に異常は確認されていない)。以上の結果は、分娩予定日 5 日前を上限とした帝王切開と完全人工哺育を組み合わせ

せることで、OTC 欠損疾患モデルブタの早産リスクを回避し、同モデルの安定的な生産が可能であることを示すものである。

5) 他の代謝性肝疾患モデルの作成の原材料となる核移植ドナー細胞パネルの作成

単遺伝子変異性代謝疾患である糖原病 Ib、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症のモデルブタを、体細胞クローニングによって作出するための核ドナー細胞として、遺伝子改変細胞のパネルの確立を行った。各疾患の責任遺伝子にノックアウト変異を誘導する TALEN を、ブタ胎仔線維芽細胞に導入し、限界希釈後に PCR およびシーケンシングによって KO 細胞のコロニーを同定した。糖原病 Ib 型 (SLC37A4) では、heterozygous KO 細胞を 1 ライン、メチルマロン酸血症 (MUT) では、homozygous-KO を 2 ライン、プロピオン酸血漿 (PCCA) では、ヘテロ KO を 1 ライン樹立した。

D. 考察

ヒトの肝細胞移植は、現在、門脈経由で行われ、また梗塞が肝全体で起ることを避けるため、移植の場を左葉に限局させることが多い。この術式を再現するためにはブタ程度のサイズが必要である。本研究では、臨床術式に則した方法が可能であり、また、哺乳中の新生仔ブタでも免疫抑制剤の連日投与実験が成立することを示すことができた。さらに帝王切開個体を用いた哺育技術の改良がなされ、満期出産を待たずに細胞移植実験を行うことも可能となった。

肝細胞移植は、特に小児領域の代謝性肝疾患に対して有効性があり、また、その低侵襲性が医学的ニーズにフィットすると考えられている。しかしながら、小児が有する脆弱性やその後の成長への影響など、詳細な前臨床研究が必要となる。今回行ったブタ実験モデルは、新生児期をも再現することができ、前臨床試験としては極めて優れたものと言える。今回は病態モデルブタではなかったが、本研究事業で開発した heterozygous OTC 欠損ブタの高アンモニア血症個体を用いれば、細胞移植による治療効果、例えば血中アンモニア値、尿素値、尿中オロト酸値などを犠牲死させることなく経日的に測定することが可能である。

今回作出した OTCD キメラ雄は、OTC 遺伝子を破壊した雄のクローン胚と、健常な雌のクローン胚とを混ぜ合わせて作製した個体である。キメラ個体の肝組織は、OTC 遺伝子 KO 細胞 (雄由来) と健常細胞 (雌由来) によって構成されている。肝組織を構成する健常細胞では OTC が生産されるので、このキメラ個体自身は健常であり、正常な生殖能力を有する。このキメラ個体と WT 雌との交配で得られた heterozygous OTC ノックアウト雌個体は、

女兒の OTCD 患者と同様に、変異 OTC 遺伝子のキャリアである。本研究から、ブタにおいても heterozygous OTC ノックアウト雌個体は、女兒の OTCD 患者に見られるような、様々な表現型を示すことが明らかとなった。換言すれば、雌の heterozygous OTC ノックアウトブタは、女兒の OTCD 患者のモデルとして有用であると考えられる。我々は既に、雄の OTCD クローンブタでは、出生直後から重篤な高アンモニア血症が現れることを確認している。従って、本研究で得られた、雌の heterozygous OTC ノックアウトブタの次世代の雄個体は、確実に高アンモニア血症を発症すると予想される。以上から、OTCD キメラ雄を起点として、女兒・男児患者それぞれのモデルとなり得る、OTC 遺伝子ノックアウトブタを作出するシステムが確立されたことになる。

変異 OTC 遺伝子のキャリアである heterozygous OTC 欠損雌個体の中にも肝 OTC 活性が明らかに低く、バイオマーカーである尿中ならびに血中オロト酸が高値を示す個体が含まれることがわかった。実験動物として自然発生 OTC 欠損マウスは存在するが、遺伝子ノックアウト動物としての OTCD マウスの報告はない。我々の先行研究においても、完全に OTC 遺伝子を不活化したブタは、早産性を示し、過半は死産、まれに出生した場合も哺乳力なく、数時間で死亡した。おそらくマウスの場合もノックアウト動物は胎生致死あるいはそれに近い経過を示すため、報告に上がらないものと考えられる。実際、現在研究で使われる OTCD マウスは OTC の完全欠損ではなく、正常の 1/10 程度の OTC 活性が検出される。今回得られた heterozygous OTC 欠損個体では、同腹産仔の中に正常表現型を有するものと高アンモニア血症を示し、徐々に病態が進み衰弱するものが存在した。後者は OTC の完全欠損ではないが、高アンモニア血症を示しながら病態が亢進するという点で、自然発症変異の OTCD マウスと極めて似ており、今後、ヒト OTCD の治療戦略を考える上で極めて有用な動物モデルになると考えられる。

今回、病態個体作出が可能であったことからゲノム編集、体細胞クローニングおよびキメラ技術を用いて他の単遺伝子変異性代謝疾患についてもモデルブタの作出が可能であると考えられる。核ドナーとなるブタ胎仔線維芽細胞で、糖原病 Ib、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症の、それぞれの責任遺伝子に変異を有する細胞の樹立に成功した。今後、OTCD モデルに用いたのと同じ戦術で、これらの疾患のモデルブタを開発できるものと考えられる。

E. 結論

OTCD モデルブタの開発を進めて来た結果、OTC

遺伝子を heterozygous に欠損する雌と、OTC 遺伝子欠損雄の両方を、自在に生産できるシステムの確立に成功した。今後、様々な非臨床研究に OTCD モデルブタを供給することが可能となった。さらに、同様のシステムを、他の単遺伝子変異性代謝疾患にも適用するための基盤が構築された。

研究協力者

小林英司 慶応義塾大学医学部臓器再生医学講座

参考文献

1. 絵野沢 伸・肝臓の細胞治療確立に必要な工学的アプローチ . *Organ Biology* 20(2); 205-210, 2013
2. 絵野沢 伸・臓器移植から細胞治療へ 医薬品としての肝細胞の可能性 . *Human Science* 23(2); 31-33, 2012
3. Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Nakazawa A, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source for hepatocytes. *Liver Transpl* 20; 391-393, 2014
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*. 2013 Oct 9;8(10):e76478. doi: 10.1371/journal.pone.0076478. eCollection 2013
5. Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 19;110(12):4557-62. doi: 10.1073/pnas.1222902110. Epub 2013 Feb 19.
6. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S. An Efficient

Method for Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity. Drug Metab Pharmacokinet 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]

7. Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A, Gojo S. Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine. BMC Biotechnol. 2013 Nov 15;13(1):102. [Epub ahead of print]
8. Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. J Cell Sci. 2013 Dec 1;126(Pt 23):5391-9. doi: 10.1242/jcs.129767. Epub 2013 Oct 7.
9. 上 大介、五條理志、梅澤明弘．間葉系幹細胞を用いた細胞治療．臨床血液 54(5); 436-443, 2013

F.研究発表

1．論文発表
な し

2．学会発表

1) 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 .第3回実験動物科学シンポジウム、2014 年 12 月 12 日、山形

G.知的財産権の出願・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