

遺伝子改変ブタの作出

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

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た。本研究では第一に、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が認められた。雌の OTC 遺伝子欠損ブタのこのような表現型は、女兒の OTC 欠損症患者における病態発現動態をよく再現していると思われる。さらに、heterozygous OTC 遺伝子欠損の健常雌個体の繁殖によって、次世代の雄個体を作出することで、OTC 欠損症を確実に現すブタが得られると考えられる。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。これらの細胞から体細胞クローンブタの作出が可能である。

A. 研究目的

我々は既に、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)遺伝子を欠損した精子を産生する、特殊な遺伝子改変ブタ(OTCD キメラブタ)を作出している。本研究の目的の一つは、この OTCD キメラブタの後代産仔を作出し、非臨床試験に適した OTCD モデルを確立することである。また、他の単遺伝子変異性代謝疾患である糖原病 1b、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症のモデルブタ作出に繋がる、遺伝子改変細胞のパネルの確立を第 2 の目的とした。

B. 研究方法

オルニチントランスカルバミラーゼ(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。

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、遺伝子組換え実験および動物実験に対する学内承認を受けて実施された。

C. 研究結果

1. Heterozygous OTC-KO ブタの作出と病態発現

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-KO 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-KO 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（300 N- μ g/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-KO 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. 代謝性肝疾患の原因遺伝子変異を有する細胞パネル確立

単遺伝子変異性代謝疾患である糖原病 1b、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 1b 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

我々が作出した 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-KO 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-KO 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-KO 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-KO 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 KO ブタを作出するシステムが確立されたことになる。

以上に述べた通り、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、OTCD モデルブタを作出することが可能である。従って、これらの技術を用いて、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。本研究では、ブタ胎仔線維芽細胞を対象として、糖原病 1b、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はずである。

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。

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