

厚生労働科学研究委託費  
創薬基盤推進研究事業  
ヒト代謝性疾患モデルブタの作出  
(H26創薬-一般-006)

平成26年度 委託業務成果報告書  
業務主任者 絵野沢 伸

平成27(2015)年3月

本報告書は厚生労働省の厚生労働科学研究委託費(創薬基盤推進研究事業)による委託業務として独立行政法人 国立成育医療研究センターが実施した平成26年度「ヒト代謝性疾患モデルブタの作出」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

### I . 委託業務成果報告（総括）

ヒト代謝性肝疾患モデルブタの作出  
絵野沢 伸

### II . 委託業務成果報告（業務項目）

1. 治療応答性から見た疾患モデルの適性検証  
絵野沢 伸
2. 疾患モデルの病理学生化学的検証  
梅澤明弘
3. 遺伝子改変ブタの作出  
長嶋比呂志
4. 早期分娩・哺育技術の確立  
佐竹典明

### III . 学会等発表実績

### IV . 研究成果の刊行物・別刷

## 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限局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、腭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の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、クサビラオレンジ遺伝子導入ブタ肝細胞 $1.4 \times 10^8$ 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- $\mu$ 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-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 $148.0 \pm 46.8$ mg/dL(n=4, 9日齢)、対照 $79.3 \pm 15.13$ 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、 $11.9 \pm 3.8$  micro-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  $43.8 \pm 8.8$  micro-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 10~15ng/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  $59.8 \pm 0.5$  ng/mL (平均  $\pm$  範囲) に対し、部分肝切除を加えた群は  $284.4 \pm 41.4$  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、現在研究で使用される 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

## 治療応答性から見た疾患モデルの適性検証

研究分担者 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** 先天代謝異常のひとつである尿素回路異常に対する肝細胞移植・幹細胞分化肝細胞移植の概念実証（Proof of Concept, POC）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。今後、ES 細胞由来分化肝細胞や iPS 細胞利用肝芽の移植による POC 獲得実験に利用可能と考えられた。

### A. 研究目的

近年、再生医療研究の進展はめざましく、ES 細胞や iPS 細胞から分化させた機能細胞の臨床試験が続々と着手されている。その前臨床研究として非げっ歯目の大型実験動物による有効性、安全性の検証は極めて重要である。本研究では、前臨床研究に有用なヒトの代謝性肝障害と同様な病態を示すブタを作出し、概念立証（Proof of Concept, POC）に有益な実験系を提示することを目的とした。

### 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 heterozygous 欠損雌個体の同腹雄を用い、同ブタ肝中葉左領域に、クサビラオレンジ遺伝子導入ブタ肝細胞  $1.4 \times 10^8$  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 x 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。対照には同じく肝細胞を移植したが、グラセプタは投与しなかった。また、予備実験として、ブタ肝臓にヒト肝細胞  $1.33 \pm 0.15 \times 10^8$  個を同様に移植し、7 日後の血中ヒトアルブミンを ELISA 法にて測定した。その際、レシピエントブタ肝の左葉に部分肝切除を加えた。

（倫理面への配慮）

実験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

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 10～15ng/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  $59.8 \pm 0.5$  ng/mL（平均 ± 範囲）に対し、部分肝切除を加えた群は  $284.4 \pm 41.4$  ng/mL と、およそ 4.8 倍の高値を示した。

### 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。

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。

今回予備的に行った細胞移植と部分肝切除の併用では、切除を行った方が細胞生着が優れる感触が得られた。臨床で細胞移植とともに部分肝切除を行うことは現状では難しいが、今後、本実験系で肝切除範囲を詳細に調べることによって、将来的に臨床の術式として採用されることも考えられる。

## E. 結論

臨床で行われる部分的肝組織限局性の肝細胞移植を、哺乳が必要な新生仔ブタに対して行ない、術後免疫抑制も可能な実験系を構築できた。

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

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## 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

## 疾患モデルの病理学生化学的検証

研究分担者 梅澤明弘 国立成育医療研究センター研究所 副所長

**研究要旨** 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 heterozygous OTC 遺伝子を欠損雌産仔の中で高アンモニア血症を発症する個体について、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あることがわかった。Heterozygous 個体における OTC 欠損であることから、対立正常遺伝子が不活化されたことが原因と考察されたので、肝の複数部位の OTC 活性を測定したが、部位間の活性の差異はみられなかった。全臓器の病理組織所見では脂肪肝が観察されたが、他臓器では特記すべき変化はみられなかった。

### A. 研究目的

尿素回路異常のひとつであるオルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)遺伝子欠損症は、同遺伝子がX染色体上にあることから、疾患男児は新生児期に劇症発症することが多く、また保因女児もある程度成長してから遅延性に症状を呈することがある。典型症状は高アンモニア血症であるが、表出される病態としては低体温、呼吸低下などから発見されることが多く、初期に病因を突き止めることは難しい場合が多い。本研究では、

### B. 研究方法

明治大学長嶋分担者作出の OTC 遺伝子 heterozygous 欠損ブタの血液、尿、肝臓他全臓器を採取し、解析した。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。

（倫理面への配慮）

本研究ではヒトに由来する試料は使用しなかった。動物由来試料は明治大学で採取された血液、尿、組織片を受け入れ、研究に用いた。

### C. 研究結果

1.Heterozygous OTC 欠損ブタの血液および尿分析  
血中アンモニア値は Heterozygous OTC 欠損ブタが  $148.0 \pm 46.8 \text{ mg/dL}$  (n=4、9日齢)、対照  $79.3 \pm 15.13 \text{ mg/dL}$  (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。

### 2.Heterozygous OTC 欠損ブタの肝および他臓器の評価

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、 $11.9 \pm 3.8 \text{ micro-mol/mg protein/h}$  (肝内4部位から得た組織の平均 $\pm$ SD)で、正常個体の  $43.8 \pm 8.8 \text{ micro-mol/mg protein/h}$  のおよそ1/4の低値を示した。

### D. 考察

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、現在研究で使用される 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。

#### E. 結論

OTC 遺伝子 heterozygous 欠損雌の中に、高アンモニア血症を呈し、徐々に衰弱する個体があり、その OTC 活性は正常の 1/4 程度、バイオマーカーである尿中オロト酸は 30 倍もの高値を示した。本モデルは、細胞治療、遺伝子治療などの前臨床研究実験動物病態モデルとして極めて有用と考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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

## 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- $\mu$ 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

## 早期分娩・哺育技術の確立 (wild-type ブタを用いた早産仔の哺育プログラム確立)

研究分担者 佐竹典明 富士マイクロ株式会社

**研究要旨** OTC 欠損疾患モデルブタ特有のリスクである早産性は、当モデルを実用化し安定的に供給する上での障害となりうるものであり、回避法の確立は不可欠である。本研究では、富士マイクロ社で蓄積した、帝王切開手技と人工哺育手技による SPF 化マイクロミニピッグの作出法を応用し、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、産仔は富士マイクロ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。これは、帝王切開と人工哺育を組み合わせることで、早産リスクを回避した OTC 欠損疾患モデルブタの効率的な作出が可能であり、さらには、マイクロミニピッグとの雑種を作ることによって体格を小型化した OTC 欠損疾患モデルブタ樹立の可能性を示すものである。

### A. 研究目的

OTC 欠損疾患モデルブタの早産性に対応する産仔救命法を確立し、疾患モデルブタの生産効率を実用レベルにまで到達させる。

### B. 研究方法

富士マイクロ社の保有する専用クリーン施設と SPF 化マイクロミニピッグ作出技術を応用し、早産性への対処を試みた。具体的には、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。

### C. 研究結果

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、富士マイクロ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。

### D. 考察

帝王切開による自然早産回避法に必須な、早産産仔の救命は、5日前以内の摘出であれば成功する可能性が高いことが示唆された。一方で、7日前摘出の産仔は救命が成功しなかった。これは、7日前産仔の外貌が正常個体よりも未熟であるように見えた為、おそらく内臓の機能はそれ以上に未熟であった可能性が考えられる。また、今回救命の対象とした個体は OTC 欠損疾患モデルではない通常産仔であったが、それでも出生直後から暫くは自力での採餌が不可能なほどの虚弱状態であった為、早産性の OTC 欠損疾患ブタ産仔は帝王切開による強制的な娩出・蘇生・人工哺乳措置を行わなければ生存率は極めて低いであろうこ

とが予測された。補足となるが、これまでに富士マイクラ社ではマイクロミニピッグの雌に産業豚との交配産仔を人工授精により妊娠・出産させることに成功している。この事実は、産業豚ベースである OTC 欠損疾患モデルとマイクロミニピッグとのハイブリッド個体を帝王切開法で作出可能であることを示しており、OTC 欠損疾患モデルブタの生産効率改善とともに、体格小型化といった利便性向上も期待できるものである。

#### **E. 結論**

SPF 化マイクロミニピッグ作出手技(帝王切開、完全人工哺育)を応用することで、OTC 欠損疾患モデルブタの早産性への対処が可能である。

#### **F. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

#### **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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該 当 な し							

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該 当 な し					