

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月3日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05176

研究課題名(和文) 遺伝子改変ブタを用いた病態高再現性の次世代型アルツハイマー病モデルの開発

研究課題名(英文) Production of gene-modified pig of next-generation model for Alzheimer's disease

研究代表者

谷本 昭英 (Tanimoto, Akihide)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：10217151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病や高次脳機能に関わる疾患の理解には、ヒトと近似した病態モデルが必要である。ブタは解剖生理だけでなく、食性や脳機能がヒトに類似し、マイクロミニピッグに高脂肪食高を負荷することで、ヒトに類似した粥状動脈硬化症モデルを作成できる。一方、アルツハイマー病は近年増加しており、詳細な病態解明と創薬研究は喫緊の課題である。高次脳機能がヒトと酷似したマイクロミニブタを用いて、アルツハイマー病を忠実に再現できる遺伝子改変ブタを開発することで、本症の克服に寄与できる。本研究により、マイクロミニピッグの生殖生理、胚移植技術、クローン技術など遺伝子改変のための基盤的知識の理解と蓄積が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブタの知能はイヌ程度であり、遺伝子改変マイクロミニピッグの作製により、ヒトに近似したアルツハイマー病の病態モデルの開発が成功すれば、高次脳機能障害のモデル動物として、マウス・ラットよりもヒトに近い脳機能評価のモデルになり、機能性食品や薬剤の新規開発のため強力なツールとなる。イヌ、ブタなどの大型動物では、近親交配による近交退化が見られ、マウスやラットとは異なり近交系の作出が困難とされている。マイクロミニピッグでもその可能性は否定できないが、クローン技術を背景にして遺伝子改変動物を作製することで、ヒトの病態を再現する遺伝子の多様性を維持したままのマイクロミニピッグの利用が可能となる。

研究成果の概要(英文)： To understand the pathogenesis of lifestyle disease and disorder in higher brain function, a development of proper animal model, which is similar to human pathogenesis, is necessary. In addition to the anatomy and physiology, pig is very comparable to human in its life style, food habit and brain function. We have already established a human type atherosclerosis model using microminipigs by feeding high fat diet. On the other hand, Alzheimer's diseases are increasing in number of patients. To clarify the pathogenesis and development of a novel drug for Alzheimer's disease is urgent task in Japan. Our research that are going to produce a gene-modified microminipig having Alzheimer's pathology would contribute to overcome the disease. By the present study, the understanding and accumulation of our fundamental knowledge for reproductive physiology, embryo transfer and clone technology to prepare the Alzheimer's disease-reproducing gene-modified microminipig extensively proceeded.

研究分野：実験動物モデル

キーワード：動物モデル マイクロミニブタ 遺伝子改変 クローン動物 アルツハイマー病

Alzheimer 病モデルブタ作成

1. **研究開始当初の背景**: Alzheimer 病モデルブタの作成には、「Alzheimer 病の原因遺伝子(変異型)を有する遺伝子改変ブタ細胞の作成」、「それをドナーとする体細胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)」、「SCNT 胚の仮親ブタ卵管への移植」という3つのステップを必要である。鹿児島大学では、各ステップに熟練した技術を有する人材・部署があるため、遺伝子工学技術を用いた Alzheimer 病モデルブタ作成およびそれに付随するブタ[特に、マイクロミニブタ(以下、MMP)]での発生工学的技術開発は分担作業で行うことができる。

2. **研究の目的**: 本課題は、Alzheimer 病の原因遺伝子変異型 presenilin 1 (PSEN)と変異型 amyloid precursor protein (NL)を脳内で同時発現させることにより、Alzheimer 病モデルブタを作製することを目的とする。PSEN と NL をコードする遺伝子を導入された MMP 細胞を遺伝子工学的に作成し、これをドナーとする体細胞核移植を行い、最終的に出生仔(遺伝子改変クローンブタ)を得る。当該ブタは脳内で PSEN, NL を同時発現し、海馬領域での神経細胞死、続く Alzheimer 様の症状を呈すると予想される。一方、近年盛んに試みられている CRISPR/Cas9 などのゲノム編集を MMP にも適用するため、基礎的な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Alzheimer 病モデルブタ作成に向けたクローンマイクロミニビッグ作出技術の開発

MMP は最大で体長 1m、体重 10~20 kg のものは 60~80cm 程度の小型なブタで、帝王切開による SPF 動物をコンベンショナル環境で飼養・実験することが可能である。高脂肪食投与により短期間に動脈硬化を発症(Kawaguchi et al. 2014)する特性を持つ。ヒトとブタは解剖生理において類似性が高く、MMP は今後「ヒトへの外挿性が高い、新しい生命科学研究のための実験動物」としての活用が期待される。しかしながら、遺伝子改変による疾患モデルブタなどの系統造成は未開拓である。本研究では、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術に我々が独自に開発した技術を絡め、比較的短期間に医学研究に重要な Alzheimer 病モデルの作出を目指す。

(2) MMP 細胞をドナーとするクローン MMP 作成のための基本技術の開発 白い毛色を持つ クローン MMP 作出の試み

遺伝子改変 MMP 作製の場合、遺伝子操作の対象となる受精卵は MMP 由来の精子、卵子を用いるべきであるが、MMP から受精卵を得るには経費と手間がかかる(から非侵襲的に受精卵を採取。場合によっては、母体を殺処分することもありえる)。MMP はブリーダーから購入するが、購入経費、や MMP から受精卵を採取する労力を考えると現実的ではない。研究分担者の三好は、ブタの体細胞核移植によるクローンブタの作成を長年にわたり手掛けてきた。屠場から無償で得た産業ブタ由来の卵巣から卵母細胞を採取し、除核後、この卵子に MMP 由来細胞の核移植を行えば、クローン胚は MMP の遺伝情報で占められる。実際、MMP をドナーとする体細胞核移植を行い、クローン出生仔を得た(Miyoshi et al. 2016)。この結果から、遺伝子改変 MMP 細胞をドナーとする体細胞核移植、その移植胚の仮親雌ブタへの移植、遺伝子改変クローン MMP 作製への道筋が明確になった。得られたクローンブタが本当に MMP 核から由来するかの判定には、ゲノム DNA を用いたマーカー解析が求められる。本研究では、得られたクローンブタの由来を簡便に判別するために、毛色を決める遺伝子(*c-KIT*遺伝子)解析法を検討した。MMP の毛色には、白色、黒色、銀色の3系統がある。体細胞核移植の受け皿になる卵子は産業ブタ(有色)由来となるので、MMP の毛色は白が望ましい。また、クローンブタから次世代の子孫を作る場合、F0 クローンブタの性は雄が望ましい。

白い毛色を持つ胎児由来線維芽細胞株を樹立するために、優性白色対立遺伝子のホモ接合型を有する雄を雌と交配させた。妊娠 30 日目に7頭の胎児(個体番号: W-1~W-7)を取り出し、頭部および内臓を除去後、残りを常法に従って体外培養し、各個体に由来する細胞株7株を樹立した。一方、頭部および内臓を用いて、各個体の毛色および性を判別した。毛色の判定には、*c-KIT*遺伝子の PCR 検査、性別の判定には、amelogenin 遺伝子の PCR 検査を行った。また、control として白い毛色を持つ雄 MMP 成獣から生検によって摘出した腎臓組織片に由来する細胞株を樹立した。

樹立した7株の胎児線維芽細胞および成獣腎臓細胞を用いて作出したクローン胚の体外発生状況を比較した。その結果、融合率(54.8~65.5%)、卵割率(55.0~69.0%)、胚盤胞形成率(10.0~25.7%)および胚盤胞細胞数(33.8~40.9個)のいずれにおいても胎児個体間で有意な差はなかった。しかし、雄胎児由来線維芽細胞の中では W-2、W-3 および W-4 が比較的高い胚盤胞形成率を示した。以上の結果から、胎児個体の違いは MMP 体細胞クローン胚の体外発生状況に影響を及ぼさないことが明

らかになった。次に、白い毛色を持つ雄 MMP 由来クローン胚の体内発生状況について検討するために、胎児線維芽細胞 (W-2、W-3、W-4 および W-7) あるいは成獣腎臓細胞を用いて作出したクローン胚を 8 頭の MMP 仮親に移植した。この場合、MMP 仮親は独自に開発した「中絶処置が不要な動物福祉に適した発情同期化技術 (Noguchi et al., 2016)」にて雌に偽妊娠状態を誘導した。その結果、W-1~W-7 の全てが白い毛色を持つ胎児であり、W-1~W-4 および W-7 は雄、W-5 および W-6 は雌であった。

1 頭の仮親から、流産後に体外に排出された 1 頭の形態的に正常な胎児が回収された。また別の 1 頭からは帝王切開により 2 頭の産子が得られ、マイクロサテライトマーカー解析の結果、当該産子はいずれも成獣腎臓細胞を用いて作出されたクローン MMP であることが示された。これらの産子は娩出された数分後に死亡したが、剖検の結果、明らかな奇形は見られなかった。以上の結果から、成獣腎臓細胞を用いて作出した白い毛色を持つ雄由来 MMP クローン胚は、形態的に正常な産子にまで発生し得ることが明らかになった。

(3) 体細胞リクローン動物作出の試み

これまでに作出された 2 頭のクローン MMP ブタ (個体番号: 4 および 5) から採取した細胞は体細胞核移植のドナー細胞として有効かどうかを検討した。それぞれの個体から生検によって腎臓組織片を採取し、細胞株を樹立した。それぞれの細胞を用いて作出したクローン胚を 3 頭の MMP 仮親に移植した。その結果、1 頭の仮親から、帝王切開により 1 頭の産子が得られた。マイクロサテライトマーカー解析の結果、当該産子は個体番号 4 のリクローン動物であることが示された。当該産子は娩出された数分後に死亡したが、剖検の結果、明らかな奇形は見られなかった。以上の結果から、体細胞リクローン MMP 胚は、形態的に正常な産子にまで発生し得ることが明らかになった。

(4) 体細胞クローン胚への CRISPR/Cas9 関連成分の *in vitro* エレクトロポレーション (EP) によるノックアウトクローン MMP 作出技術の開発

前述のように、MMP では実験に必要な多数の受精卵を準備することは経済上難しい。体細胞核移植を用いれば、食肉センター由来の卵巣から回収した食用ブタ卵子から発する MMP クローン胚を多数得ることができる。この MMP クローン胚に更に *in vitro* で CRISPR/Cas9 関連成分を EP 経路で導入できれば、標的遺伝子が改変された MMP クローン胚を得ることが原理的に可能となる。我々はこの手法を GENTEP (Genome Editing via Nuclear Transfer and subsequent Electroporation) と呼ぶ。本研究ではこの方法の妥当性を検討すべく、低比重リポタンパク質受容体 (LDLR) 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 関連成分を MMP クローン胚に導入した。まず single guide (sg)RNA を LDLR の ATG (1st Exon 上に存在) 直下に定めた。これを基に、crRNA を外注し、市販の tracrRNA と annealing 後、これを Cas9 protein との間で複合体 (ribonucleoprotein, RNP) を作らせた。胚活性化後 6 h あるいは 12 h 後に、5 μ L drop (RNP in Opti-MEM を含む) に投じ、10 V, 4 times の条件で *in vitro* electroporation (EP) を施した。この場合、波形の長さを 10 あるいは 1 msec に分けて、EP を行った。EP 処理胚は直ちに培養液に投じ、7 日間の培養後、胚盤胞への発生率および胚盤胞での LDLR 遺伝子の変異の有無、LDLR 蛋白発現の有無を調べた。結果、卵割率 (61.0~74.5%) および胚盤胞形成率 (8.0~13.5%) であり、いずれにおいても異なる EP 条件間で有意な差は見られなかった。また、いずれの条件下でも得られた胚盤胞における遺伝子改変率 (67.0~100%) は高かった。さらに、得られた胚盤胞を免疫細胞化学染色した結果、一部において LDLR 発現の欠損が確認された。EP 法を用いた MMP 体細胞クローン胚への CRISPR/Cas9 関連成分の導入は、遺伝子改変 MMP 体細胞クローン胚の作製に有効であることが明らかとなった (Sato et al. InTechOpen へ投稿中)。

GENTEP で得られた遺伝子改変クローン胚 (活性化処理 12 時間後に電気パルス 7 回 EP) を 3 頭の仮親にそれぞれ 107 個、173 個および 199 個移植した。また、別の時期に GENTEP 処理胚 (活性化処理 6 時間後に電気パルス 4 回 EP) を 4 頭の仮親にそれぞれ 176 個、136 個、218 個および 175 個移植した。しかしながら、いずれの仮親においても妊娠は認められなかった。

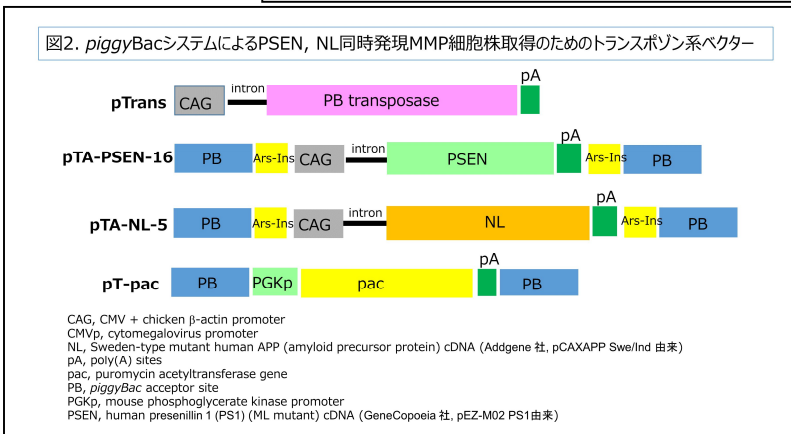
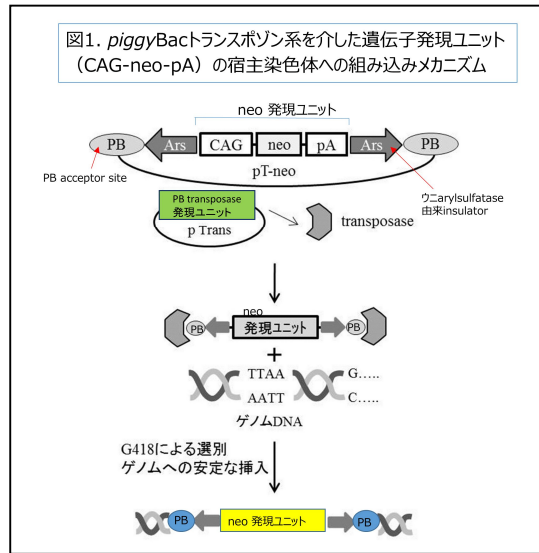
(5) MMP 受精卵への *in vitro* EP によるノックアウト MMP 作出技術の開発

3.1.3. 項の実験では、核移植胚に遺伝子改変処置を施した胚を仮親に移植しても妊娠に至らなかった。産子への発生率が極めて低い体細胞クローン胚を利用することには限界があるのかもしれない。そこで「体内から回収した MMP 受精卵」に *in vitro* EP を行うことを考えた。体内から回収した MMP 受精卵は体細胞核移植胚に比べ、発生能が極めて高いと見込まれる。偽妊娠法と短縮法変法（自然発情誘発補助療法）を用いて、複数のメス動物の排卵時期を一定にし、複数の種豚と自然交配させ、受精後 9~15 時間後に子宮・卵管・卵巣を摘出し、卵管をフラッシュし、受精卵を回収した。0.5 msec ON/99.5 msec OFF の条件下で 30V/mm の電気パルス を 7 回 EP することにより LDLR 遺伝子に対応する RNP 導入処理を行った受精卵を 2 頭の仮親に移植した。最初の実験では、4 頭の雌から 19 個の受精卵を採取し、EP 後に 1 頭の仮親に移植した。次の実験では、2 頭の雌から 5 個の受精卵を採取し、そのうち 4 個に対して EP を行った後、無処理の 1 個と共に 1 頭の仮親に移植した。しかしながら、いずれの仮親においても妊娠は認められなかった。

(6) Alzheimer 病関連遺伝子導入 MMP 細胞の作成

3.1.2. 記載のクローンブタ腎臓由来細胞株に *piggyBac* (PB) トランスポゾン系の PSEN, NL 発現ベクターを共遺伝子導入し、同じ細胞から PSEN, NL を同時発現させた。先行研究 (Sato et al. 2016) からは、PB 系は外来性遺伝子を効率よくブタ細胞の染色体に組み込ませ、それにより効率的に遺伝子導入ブタ細胞株が得られている。PB を介した目的遺伝子の宿主染色体への組み込みメカニズムを図 1 に示す。PB による遺伝子導入には、PB acceptor site を含む PB ベクター（図では neo 発現ユニット CAG-neo-pA が PB acceptor site で挟まれる pT-neo として記載）と PB transposase 発現ベクター pTrans が必要である。例えば、pT-neo + pTrans を細胞に共遺伝子導入すると pTrans から PB transposase が発現され、これが pT-neo 内の PB acceptor site に結合し、それが宿主細胞のゲノム上の TTAA 部位を介し、PB transposase の働きで PB acceptor site で挟まれた neo 発現ユニットが宿主細胞ゲノムに組み込まれる。この時、neo 発現ユニットを搭載していたベクター骨格は integration の際に外れる。

図 2 には、構築した PB 系 PSEN, NL 遺伝子発現ベクター pTA-PSEN-16, pTA-NL-5 の構造を示す。目的遺伝子の発現を駆動する promoter には、ニワトリ β -actin promoter をベースにした CAG promoter を採用した。発現ユニットは PB acceptor site (PB) に囲まれる。pT-pac は puromycin 耐性遺伝子 (pac) 発現ユニットを搭載するトランスポゾン系ベクターである。これは細胞に遺伝子導入された後、細胞内で pac が発現し、遺伝子導入細胞に対し薬剤 (puromycin) への耐性を与える。細胞への遺伝子導入には、pTA-PSEN-16, pTA-NL-5, pT-pac, pTrans を含む混合液 (各 2 μ g) を MMP 細胞 ($>5 \times 10^5$) と混ぜ (全量 90 μ L) Lonza 社 electroporator (nucleofector) にて electroporation に付した。その後、puromycin を含む培地で選別し、生じたコロニーを拾い上げ 5 株を拡大培養した。各株から genomic DNA を単離し、transgene を特異的に識別する PCR primer set を用いて PCR



を行った結果、PSEN については、4 株（#1~3, #5）に存在が認められた。しかし、NL については、どの株にも存在は認められなかった。一方、導入に用いた plasmid pTA-NL-5 は PCR にて明確なバンドが認められた。以上から、得られた 5 株には残念ながら NL 成分が含まれていないことが判明した。

今回の実験では、PSEN, NL を同時に持つ MMP 株は取得できなかった。その原因として、導入する pTA-NL-5 DNA 自体の濃度が低い、あるいは degradation を起こしていた、NL 発現ユニットがベクターに挿入されていなかった、pTA-PSEN-16 との共遺伝子導入の際に、pTA-NL-5 の挿入が抜けていた、などが考えられる。 については、DNA の quality について制限酵素解析などでチェックする、 については、既に sequencing で NL 発現ユニットのベクターへの正しい挿入を確認しており可能性は低い、 については、通常ありえない事象といえる。今後、 ~ のすべての点を点検する予定で、最終的に、PSEN, NL を同時に持つ MMP 株の取得を目指す。なお、PSEN のみを含む MMP 株の体細胞核移植胚を仮親ブタ卵管へ移植したが、出生には至らなかった。

4. 研究成果

体細胞核移植胚由来の MMP 胚は発生能が低いことが問題点である。そこに、遺伝子工学的な処置を加えると、更に発生率が落ちる。体内で受精した受精卵を *in vitro* EP などの遺伝子工学的な処置を行ったが、仮親子宮内での発生は良好ではなかった。*in vitro* EP はマウスでは有効なゲノム編集法として用いられており、ブタでも成功例の報告がある。おそらく、MMP がこのような *in vitro* EP 処置に極めて脆弱であったという可能性がある。核酸などの外来成分を胚（受精卵）に持ち込む方法は、*in vitro* EP 以外にもキャピラリーを用いた顕微注入という方法がある。この方法は、体細胞核移植と同様、高価な装置を必要とするが、*in vitro* EP に比べ、胚へのダメージが低いと見込まれる。今後は、体内から得た MMP 受精卵にこの顕微注入法を適用させ、内在性 Alzheimer 関連遺伝子に CRISPR/Cas9 法で NL や PSEN などの変異を誘導させることで、Alzheimer 病モデル MMP を作成する予定である。

5. 主な発表論文等（雑誌論文）（計 9 件）

Sato M, Miyoshi K, Kawaguchi H, Inada E, Saitoh I, Tanimoto A. Recent advance in genome editing in pigs. In: “Theriogenology” Rijeka: InTechOpen; in press 査読有

Watanabe S, Sakurai T, Nakamura S, Miyoshi K, Sato M. The combinational use of CRISPR/Cas9 and targeted toxin technology enables efficient isolation of bi-allelic knockout non-human mammalian clones. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018;19:E1075. DOI:10.3390/ijms19041075 査読有

Sato M, Kosuke M, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K. Timing of CRISPR/Cas9-related mRNA microinjection after activation as an important factor affecting genome editing efficiency in porcine oocytes. **Theriogenology**, 2018;108:29e38. DOI:10.1016/j.theriogenology.2017.11.030 査読有

Sato M, Miyoshi M, Nakamura S, Ohtsuka M, Sakurai T, Watanabe S, Kawaguchi H, Tanimoto A. Efficient generation of somatic cell nuclear transfer-competent porcine cells with mutated alleles at multiple target loci by using CRISPR/Cas9 combined with targeted toxin-based selection system. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017;18:2610. DOI:10.3390/ijms18122610 査読有

Noguchi M, Hirata M, Kawaguchi H, Tanimoto A. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F2 α in Microminipigs during the normal estrous cycle. **In Vivo**, 2017;31:1097-1101. 査読有

Sato M, Maeda K, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Miura H, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K. The piggyBac-based gene delivery system can confer successful production of cloned porcine blastocysts with multigene constructs. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016;17:1424. DOI:10.3390/ijms17091424 査読有

Miyoshi K, Maeda K, Akioka K, Sato M, Kawaguchi H, Tanimoto A. Birth of cloned microminipigs derived from somatic cell nuclear transfer embryos that have been transiently treated with valproic acid. **Cellular Reprogramming**, 2016;18:390-400. DOI:10.1089/cell.2016.0025 査読有.

Sato M, Maeda K, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Miura H, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K. The piggyBac-based gene delivery system can confer successful production of

cloned porcine blastocysts with multigene constructs. **International Journal of Molecular Sciences**, **2016**;17:E1424. DOI: 10.3390/ijms17091424 査読有

Noguchi M, Ikedo T, Kawaguchi H, Tanimoto A. Estrus synchronization in microminipig using estradiol dipropionate and prostaglandin F2 α . **Journal of Reproduction and Development**, **2016**;62:373-378. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

佐藤正宏. 体細胞核移植胚への直接 electroporation (GENTEP) は効率的なゲノム編集ブタ作製に有効である. 第41回日本分子生物学会. 2018年

三好和睦. マイクロミニピッグにおける体細胞クローニング技術の確立およびそれを用いた遺伝子ノックアウト動物作出の試み. 第20回応用薬理シンポジウム. 2018年

小沢政之. ヒトアポリポプロテイン(a)発現ミニブタの作出. 第109回日本繁殖生物学会. 2016年

佐藤正宏. piggyBac遺伝子導入系により複数遺伝子が同時導入されたブタ細胞は核移植後のクローン胚の発生を保障する. 第109回日本繁殖生物学会. 2016年

佐藤正宏. 医用ブタにおける遺伝子組換え動物作製の実際とその可能性について. 第50回日本実験動物技術者協会総会. 2016年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

小澤政之 (OZAWA, masayuki)

鹿児島大学 大学院医歯学域医学系 教授

研究者番号: 90136854

佐藤正宏 (SATO, masahiro)

鹿児島大学 大学院総合科学域総合研究学系 教授

研究者番号: 30287099

堀内正久 (HORIUCHI, masahisa)

鹿児島大学 大学院医歯学域医学系 教授

研究者番号: 50264403

川口博明 (KAWAGUCHI, hiroaki)

鹿児島大学 大学院医歯学域医学系 准教授

研究者番号: 60235777

三好和睦 (MIYOSHI, kazuchika)

鹿児島大学 農水産獣医学域農学系 教授

研究者番号: 70363611

三浦直樹 (MIURA, naoki)

鹿児島大学 農水産獣医学域獣医学系 准教授

研究者番号: 80508036

(2) 研究協力者

野口倫子 (NOGUCHI, michiko)

大竹正剛 (OHTAKE, masayoshi)