

令和元年5月23日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08085

研究課題名(和文) 疾患モデル動物として癌治療に貢献し得る遺伝子改変マイクロミニピッグの開発

研究課題名(英文) Development of genetically modified microminipigs that can contribute to cancer treatments as disease model animals

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：活性化後にバルプロ酸で処理することにより、標的遺伝子を破壊した体細胞に由来するマイクロミニピッグクローン胚の胚盤胞形成率が改善された。また、エレクトロポレーション法を用いてマイクロミニピッグ体細胞クローン胚へCRISPR/Cas9関連成分を導入することにより、標的遺伝子を破壊した胚盤胞が得られることを明らかにした。以上の結果から、標的遺伝子を破壊したマイクロミニピッグ胚を効率的に作出し得る方法が確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブタは、解剖学的・生理学的にヒトとの類似点が多いので、目的に応じて遺伝子を改変すればヒト疾患モデル動物として有用である。しかし、食用ブタやミニブタの飼育管理には広いスペースや多大な労力・コストが必要となるので、利用できる施設は限られてしまう。一方、マイクロミニピッグであれば、成体重が10kg以下なので多くの施設で利用できる。本研究の成果は、標的遺伝子を破壊したマイクロミニピッグの作出につながる。その結果、多くの施設で利用可能なヒト疾患モデル動物を作出できるようになり、それを用いて医薬品の開発や病気治療法の確立が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Treatment with valproic acid after activation enhanced the blastocyst formation rate of microminipig cloned embryos derived from somatic cells in which specific genes were disrupted. In addition, specific gene-disrupted microminipig blastocysts were obtained by electroporation of CRISPR/Cas9 genome editing components into somatic cell nuclear transfer embryos. On the basis of these results, an efficient protocol for the production of specific gene-disrupted microminipig embryos was established.

研究分野：発生工学

キーワード：体細胞核移植 疾患モデル動物 マイクロミニピッグ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブタは、解剖学的・生理学的にヒトとの類似点が多いことから、医薬品の開発や病気治療法の確立における実験動物として有用であると考えられている。しかし、これらの分野で有効活用するためには、ブタの遺伝子を目的に応じて改変する技術が不可欠となる。現時点で遺伝子改変ブタを得る最も現実的な方法は、遺伝子改変した体細胞の核を除核未受精卵に移植してクローン動物を作出することである。そこで研究代表者らは、鹿児島大学で開発・維持されているクラウン系ミニブタにおいて体細胞核移植技術を確認することを目指して研究を行った結果、近交系ミニブタの体細胞クローン作出に我が国で初めて成功した。また、確立された体細胞核移植技術を応用することにより、ヒト動脈硬化症の疾患モデル動物となり得るヒトアポリポ蛋白 (a) 遺伝子導入ミニブタを世界で初めて作出した。これらの成果は、クラウン系ミニブタの遺伝子を目的に応じて改変し、実験動物として利用し得ることを示している。しかし、クラウン系ミニブタは、比較的小型のブタではあるものの成体重が 50~80kg に達するので、その飼育管理には広いスペースや多大な労力・コストが必要となり、利用できる施設は限られてしまう。

近年、富士マイクロ社によって、成体重が 10kg 以下の世界最小サイズのブタ (商標: マイクロミニピッグ) が開発された。このサイズであれば、マウスやラット用の飼育室で飼うことも可能である。研究分担者の川口らはマイクロミニピッグの実験動物としての可能性に注目し、鹿児島大学が長年培ってきた国内屈指の畜産 (養豚) 技術をもとに、マイクロミニピッグに最適な飼育管理法を確立した。そこで、クラウン系ミニブタを用いた研究によって蓄積された知見をもとにマイクロミニピッグにおける体細胞核移植技術の確立を目指した結果、同系統の体細胞クローンを作出することに世界で初めて成功した。

一方、体細胞核移植技術を応用して遺伝子改変動物を作出するには、ドナーとして使用する体細胞の遺伝子を効率的に改変する技術が必須となる。特に標的遺伝子を破壊 (ノックアウト: KO) する操作は極めて困難であったが、最近になって次世代型 KO 系と称される CRISPR/Cas9 系が開発され、様々な細胞株において従来の gene targeting 法より簡単にホモ KO 細胞を作製できることが証明された。研究分担者の佐藤らも、CRISPR/Cas9 系を用いてクラウン系ミニブタ胎児緑線芽細胞のゲノム内における -1,3-galactosyltransferase (-GalT) 遺伝子の KO に成功し、得られたホモ KO 細胞を用いて作出したクローン胚から発生した胚盤胞が、-Gal epitope (-GalT によって合成される細胞表面糖鎖) を持たないことを確認した。

このような背景から、研究代表者および研究分担者らの技術を集約すれば、目的に応じて標的遺伝子を KO したマイクロミニピッグを作出し、実験動物として広く利用できるようになると考えられた。

2. 研究の目的

近年の日本における死因第 1 位は癌であり、死亡者全体の約 30% を占めている。よって、癌の治療法を確立することは、我が国の医学における重要な課題である。これまでに、癌抑制遺伝子である p53 や phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) を欠損させることにより、高率に癌を発症する疾患モデルマウスが作出されてきた。また、一度に複数の遺伝子を KO することも容易な CRISPR/Cas9 系の特徴を生かして、生体内の肝臓に導入したゲノム編集用の核酸で両遺伝子を KO することにより、高頻度で肝癌を発症するマウスも作出されている。これらは癌発生メカニズムの解明には有効であるが、マウスとヒトは解剖学的・生理学的に違いが大きいいため、治療法の確立を目指した研究への利用には限界がある。もしマイクロミニピッグにおいて同様の疾患モデル動物を作出することができれば、癌の発生環境、サイズ、発生時期あるいは薬剤への反応性や抵抗性がヒトに近くなることが期待される。このようなヒトにおけるものと類似した癌に対して手術、化学療法および放射線療法などを試行すれば、治療法の確立は大きく進展するだろう。そこで本研究では、p53 および PTEN 遺伝子を欠損した遺伝子改変マイクロミニピッグを作出し、それらにおける繁殖性および癌発生状況を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

食肉センター由来の食用ブタ卵巣から卵丘卵子複合体を吸引採取し、振動 (X 軸方向に $\pm 0.33G$ 、Y 軸方向に $\pm 0.11G$ の加速度および 20Hz の周波数、60 分毎に 10 秒間) を与えながら 40~41 時間成熟培養した。成熟培養後、ヒアルロニダーゼ溶液中で卵丘細胞を除去し、第 1 極体の放出が確認された形態的に正常な卵子のみを選抜した。これらの卵子を吸引除去法により除核後、囲卵腔にドナー細胞を挿入し、電気刺激による融合処理を行った。融合処理 2 時間後に、ソルビトール溶液を満たしたチャンパー内の電極間に融合胚を並べ、直流パルスを加えることによる活性化処理を行った。活性化処理後のクローン胚を各処理区の培地中に移して培養した。いずれの区においても、最初の 2 時間は 2.2 $\mu g/ml$ のサイトカラシン B を培地に添加することにより、第 2 極体様構造物の放出を抑制した。培養 2 日後に卵割状況、7 日後に胚盤胞形成状況を観察した。また一部のクローン胚は、体内発生能について調べるために、発情を同期化したマイクロミニピッグ仮親の卵管に外科的移植した。

(1) 実験 1: 科学研究費助成事業 (基盤研究 (C)) 「世界最小サイズのミニブタであるマイク

ロミニピッグにおける体細胞核移植技術の確立」(平成 25~27 年度)において、体細胞クローン作出のドナー細胞として用いた胎児線維芽細胞由来株 (FFs 1、2 および 3) における p53 および PTEN 遺伝子の KO を試みた。各細胞株に Cas9 endonuclease 発現ベクターおよび p53 あるいは PTEN guide RNA 発現ベクターをエレクトロポレーション法により共遺伝子導入した後、選択培養によって遺伝子 KO 細胞株を樹立した。得られた細胞株をドナーとしてクローン胚を作出し、0 および 8mM のバルプロ酸を添加した mPZM-3 中で 24 時間培養した。その後、バルプロ酸無添加の同培地中に移して培養を継続し、体外発生状況を比較した。また、培養 7 日後に得られた胚盤胞のゲノム DNA 内における p53 および PTEN 遺伝子の変異状況について解析した。さらに、作出したクローン胚を仮親に移植し、妊娠状況を観察した。

(2) 実験 2 : 前述した科学研究費助成事業において体細胞クローンマイクロミニピッグを作出できたが、p53 および PTEN 遺伝子 KO 株は樹立できなかった FFs 1 を用いてクローン胚を作出し、その細胞質に CRISPR/Cas9 関連成分をエレクトロポレーションで導入する遺伝子改変法の有用性について検討した。なお、p53 および PTEN 遺伝子の KO がブタ胚の胎生致死を誘発しているかもしれないので、KO ブタの作出が確認されている低比重リポタンパク質受容体 (LDLR) 遺伝子を標的とした。最初に、種々のエレクトロポレーション条件下で LDLR 遺伝子に対応する crRNA/tracrRNA complex および Cas9 protein を導入したクローン胚の体外発生および遺伝子改変状況について検討した。次に、最適条件下でエレクトロポレーションを行ったクローン胚を仮親に移植し、妊娠状況を観察した。なお、実験 1 の結果から、クローン胚にはバルプロ酸処理を施した。

(3) 実験 3 : 実験 2 の結果から、無処理の場合でも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は困難であると判断し、受精卵へのエレクトロポレーションに切り替えた。食用ブタにおいては、食肉センター由来卵巣から採取した卵子を体外成熟・体外受精することにより、エレクトロポレーションに供する受精卵を多数準備することが可能である。しかしマイクロミニピッグにおいては、卵巣が食肉センターに出荷されることはないので同法を用いることはできない。よって、自然交配させた雌から生殖器官を摘出後、卵管内を灌流することによって体内受精卵の採取を試みた。得られた受精卵にエレクトロポレーションによる LDLR 遺伝子に対応する crRNA/tracrRNA complex および Cas9 protein の導入処理を行った後、仮親に移植して妊娠状況を観察した。

4. 研究成果

(1) 実験 1 : 前述した科学研究費助成事業において体細胞クローンマイクロミニピッグを作出できた FFs 1 および 2 では細胞株が得られなかったが、体細胞クローンマイクロミニピッグを作出できなかった FFs 3 では 2 個の細胞株が得られた。そのうち 1 個の細胞株 (p53/PTEN#1) を分子生物学的に解析した結果、p53 遺伝子に関してはホモ KO であり、PTEN 遺伝子に関してはホモ KO とヘテロ KO が共存している状態であることが示された。p53/PTEN#1 を除核卵子に移植してクローン胚を作出し、体外発生に及ぼすバルプロ酸の影響について調べた結果、活性化後に 8mM の濃度で 24 時間処理することにより胚盤胞形成率を改善し得ることが明らかになった。得られた胚盤胞を分子生物学的に解析した結果、p53 および PTEN 遺伝子のいずれにおいても、p53/PTEN#1 で見られた変異がそのまま踏襲されていた。バルプロ酸処理後の p53/PTEN#1 由来クローン胚を 3 頭の仮親にそれぞれ 160 個、100 個および 162 個移植してみたが、いずれにおいても妊娠は成立しなかった。

以上の結果から、p53 および PTEN 遺伝子を欠損したマイクロミニピッグ体細胞クローン胚を効率的に作出し得る方法が確立された。しかしながら、FFs 3 をドナー細胞として用いた場合には体細胞クローンマイクロミニピッグが得られなかったため、それに由来する p53/PTEN#1 を用いて作出したクローン胚も産子にまで発生しない可能性が示唆された。よって、FFs 1 や 2 由来クローン胚を作出し、前核形成期の細胞質に CRISPR/Cas9 関連成分を導入する遺伝子改変法の検討も必要であると考えられた。

(2) 実験 2 : 活性化処理 6 あるいは 12 時間後に 0.5msec ON/99.5msec OFF (0.5msec の間印加した後に 99.5msec の印加しない時間を設ける) あるいは 1.0 msec ON/99.0msec OFF の条件下で 30V/mm の電気パルスを 7 回印加することにより、LDLR 遺伝子 KO 胚盤胞を効率的に作出することが明らかとなった。次に、CRISPR/Cas9 関連成分を導入したクローン胚の体内発生状況について検討した。活性化処理 12 時間後のクローン胚に 0.5msec ON/99.5msec OFF の条件下で 30V/mm の電気パルスを 7 回印加した後、3 頭の仮親にそれぞれ 107 個、173 個および 199 個移植した。その結果、いずれの仮親においても妊娠は認められなかった。そこで、活性化処理 6 時間後に 0.5msec ON/99.5msec OFF の条件下で 30V/mm の電気パルスを 4 回印加したクローン胚を 4 頭の仮親にそれぞれ 176 個、136 個、218 個および 175 個移植してみたが、やはりいずれも妊娠しなかった。

以上の結果から、エレクトロポレーション法を用いて体細胞クローン胚へ CRISPR/Cas9 関連成分を導入することにより、効率的に遺伝子 KO 胚盤胞を得られることが明らかとなった。しかし、仮親に移植しても妊娠が成立しなかったため、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。よって、コストは掛かるが、体内受精卵を採取してエレクトロポレーションに供する必要があると考えられた。

(3) 実験3：最初に4頭の雌から19個の受精卵を採取し、0.5msec ON/99.5msec OFFの条件下で30V/mmの電気パルスを7回印加した後に1頭の仮親に移植した。次に2頭の雌から5個の受精卵を採取し、そのうち4個に対して同条件下でエレクトロポレーションを行った後、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。

本研究では、当初の目的であった遺伝子KOマイクロミニピッグを作出することはできなかったが、標的遺伝子を破壊したマイクロミニピッグ胚を効率的に作出し得る方法が確立された。今後、マイクロミニピッグの体内受精卵が安定的に得られるようになれば、それらの遺伝子を本研究で確立された方法を用いて改変することにより、遺伝子KOマイクロミニピッグを作出できるようになるとと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

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*. 査読有. 19巻. 2018年. E1075

DOI: 10.3390/ijms19041075

Sato M, Maeda K, 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*. 査読有. 108巻. 2018年. 29-38ページ

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.030

Sato M, Miyoshi K, 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*. 査読有. 18巻. 2017年. E2610

DOI: 10.3390/ijms18122610

Mizobe Y, Ezono Y, Tokunaga M, Oya N, Iwakiri R, Yoshida N, Sato Y, Onoue N, Miyoshi K. Selection of human blastocysts with a high implantation potential based on timely compaction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 査読有. 34巻. 2017年. 991-997ページ

DOI: 10.1007/s10815-017-0962-y

Mizobe Y, Oya N, Iwakiri R, Yoshida N, Sato Y, Onoue N, Miyoshi K, Tokunaga M, Ezono Y. Developmental ability of embryos produced from oocytes with fragile oolemma by intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 査読有. 33巻. 2016年. 1685-1690ページ

DOI: 10.1007/s10815-016-0811-4

Miyoshi K, Kawaguchi H, Maeda K, Sato M, Akioka K, Noguchi M, Horiuchi M, Tanimoto A. Birth of cloned microminipigs derived from somatic cell nuclear transfer embryos that have been transiently treated with valproic acid. *Cellular Reprogramming*. 査読有. 18巻. 2016年. 390-400ページ

DOI: 10.1089/cell.2016.0025

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*. 査読有. 17巻. 2016年. E1424

DOI: 10.3390/ijms17091424

Mizobe Y, Oya N, Iwakiri R, Yoshida N, Sato Y, Miyoshi K, Tokunaga M, Ezono Y. Effects of early cleavage patterns of human embryos on subsequent in vitro development and implantation. *Fertility and Sterility*. 査読有. 106巻. 2016年. 348-353ページ

DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.04.020

Miyoshi K. Development of a culture medium for rat 1-cell embryos. *Journal of Mammalian Ova Research*. 査読有. 33巻. 2016年. 11-16ページ

DOI: 10.1274/jmor.33.11

[学会発表](計4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證する。第109回日本繁殖生物学会。2016年

〔その他〕

ホームページ等

<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0015/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 正宏

ローマ字氏名：(SATO, Masahiro)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医用ミニブタ・先端医療開発研究センター

職名：教授

研究者番号(8桁)：30287099

研究分担者氏名：川口 博明

ローマ字氏名：(KAWAGUCHI, Hiroaki)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60325777

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。