

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21580350

研究課題名（和文）：ホモKOブタ個体作成のためのdouble KO細胞の標準的取得法の開発

研究課題名（英文）：Development of a general method for obtaining double KO swine cells which will be used as donors for production of cloned homozygous piglets

研究代表者：佐藤 正宏 (SATO MASAHIRO)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授

研究者番号：30287099

研究成果の概要（和文）：本研究ではどんなタイプの遺伝子でもその遺伝子発現をノックアウトできるブタ細胞における汎用性の高い double KO 細胞を作成する方法を開発することを目指した。具体的には、ヘテロ KO 細胞 targeting vector (TV) を再度導入し、薬剤濃度を数倍高めた条件で選別する方法 (repeated delivery of TV, RDTV) を用い、特定の遺伝子の発現を抑えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a general method for obtaining double KO swine cells in which the target gene expression is completely blocked. This was successfully performed by selection of heterogenous KO cells under higher concentrations of selective drugs after repeated delivery of a targeting vector (RDTV). These resulting double KO cells will be used for somatic cell nuclear transfer-mediated production of cloned pigs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：KOブタ ホモ gene targeting 薬剤耐性 体細胞核移植 胎仔性繊維芽細胞
遺伝子導入 double KO

1. 研究開始当初の背景

本研究は、ブタ細胞における特定遺伝子の機能が完全に破壊された汎用性の高い遺伝子標的破壊法 (gene targeting, GT) の開発を目的としたものである。

GTは特定の遺伝子の一部（多くはintron

やexonを含む）と薬剤選択マーカー遺伝子を含み、それを内蔵するベクター (targeting vector, TV) をES細胞に遺伝子導入することにより、TVが内在性の特定遺伝子と相同する箇所を組み換えを起こす（これを相同組換えと呼ぶ）ことにより達成される。その率はTVの

タイプや細胞により異なるが、 10^5 - 10^7 の1の頻度で起こり、多くは片方の対立遺伝子 (allele) がGTされたいわゆる'ヘテロKO細胞となる。ヘテロKO細胞はマウスの場合、胚盤胞注入法によるキメラマウス作製過程で生殖系の細胞に変貌し、最終的にヘテロKOマウス、それらの交配によって生じる'ホモKOマウス (両方のalleleがtargetingされたマウス; double KO [DKO]マウスとも呼ばれる) が得られる。

ブタでGTを行おうとする場合、マウスの系と異なり、ブタのES細胞は現在確立されていないので、ヘテロあるいはホモKO細胞の体細胞核移植 (SCNT) を経由した個体作製が主流を占める (Lai et al., Science 295, 1089-1092, 2002; Dai et al., Nat Biotechnol 20, 251-255, 2002; Phelps et al., Science 299, 411-414, 2003; Sharma et al., Transplantation 75, 430-436, 2003; Ramsoondar et al., Biol Reprod 69, 437-445, 2003; Harrison et al., Cloning Stem Cells 6, 327-331, 2004; Baumann et al., J Immunol 172, 6460-6467, 2004; Kolber-Simonds et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 7335-7340, 2004)。DKO細胞を起点にした場合、生まれる個体は全てDKO細胞で占められるので (従って、特定の遺伝子機能破壊による生理的影響の結果を探索出来る)、望む解析を短期間で済ませられる大きな利点がある (因みにヘテロKO細胞のSCNTから発した場合、ホモKO個体を得るには2年ほどかかるという試算がある)。

DKO細胞はマウスの場合、ヘテロKO細胞にTVを再度導入し、薬剤濃度を数倍高めた条件で選別するという方法 (repeated delivery of TV, RDTV) が採用されている [te Riele et al., Methods Mol Biol 158, 251-262, 2001. (review)]。この方法では、TVを繰り返し細胞に遺伝子導入し、細胞を高濃度の薬剤で選別するだけなので、手法としては簡単である。しかし、ブタの場合、RDTVは何故か採用されず、loss of heterozygosity (LOH) 原理に基づいた方法 (LOH) が採用されている (Lai et al., Science 295, 1089-1092, 2002; Sharma et al., Transplantation 75, 430-436, 2003; Baumann et al., J Immunol 172, 6460-6467, 2004; Kolber-Simonds et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 7335-7340, 2004)。LOHは片方のalleleに導入された外来性遺伝子の存在によりもう一つのalleleに乗る遺伝子が欠損するという現象 (メカニズムは未だ不明) で、 10^4 - 10^5 に1個の割合で起こる (Shao et al., Proc Natl Acad Sci USA 96, 9230-9235, 1999)。LOHは偶然に起こる現象であり (故に、不確定要素が常につきまとう)、DKO細胞をどのような指標、手段に

より選別するかが課題で、LHOを起こした細胞をどのように検索するか、遺伝子の種類によっては適用が難しい場合もある。

今回、ブタを対象としたGTに関する研究を行なうにあたり、標的とする遺伝子を α -Gal epitopeを合成する酵素 α -1,3-GalTをコードする遺伝子に定めた。 α -1,3-GalTはブタ臓器のヒトへの異種移植の際に重要な機能をする遺伝子で、その遺伝子から作られる α -Gal epitopeがブタ細胞表面に発現されると、超急性移植拒絶が起こり、移植片が数10分以内に脱落するからである。このような産業上重要な遺伝子でもある他、 α -Gal epitopeが完全に消失したDKO細胞を識別するマーカー (α -Gal epitopeを特異的に認識するレクチンBS-I-B₄)があることもこの系の強みとなっている。加えて、我々はすでにBS-I-B₄をうまく利用し、BS-I-B₄と反応しない細胞=DKO細胞のみを濃縮する新規な方法を編み出した (Akasaka et al., Xenotransplantation 17, 81-89, 2010)。従って、我々独自の方法でブタのDKO細胞を樹立するに当たり、その周辺の基盤技術は良好に整備されていると言える。更に、先行実験として、我々は α -1,3-GalTに対するTV (neomycin耐性遺伝子発現ユニット=neoを内蔵) を構築し、幾つかヘテロKO細胞を得た。だが、この細胞を用いてRDTVを行なったが、DKO細胞取得に失敗した。即ち、ヘテロKO細胞に10倍以上の濃度でneomycinのアナログであるG418を処理させても細胞は死ななかつた (未公表)。この点は、マウスの場合と大いに異なる点である。おそらく、このような背景がブタDKO細胞をLOHで取得するという方向に皆が走った理由かもしれない。

こうした動向に対し、本研究はどんなタイプの遺伝子 (細胞内に蛋白発現が局在するものや繊維芽細胞では発現しないものなど) に対しても対応できる、いわゆる汎用性の高い系を開発することを目指した。具体的には、基本的にどの系よりも簡便と目されるRDTVを改良する方向を選んだ。ブタにおけるGT系ではDKO細胞を得るためのどんなタイプの遺伝子にも対応出来るような基本的・標準的な系はまだ確立されておらず、その意味で本研究はブタGT系の基盤整備と位置付けられるかもしれない。

2. 研究の目的

- (1) どのタイプの遺伝子に対してもGTが可能な汎用性の高いブタにおけるDKO細胞作製法を開発する。具体的には、アプローチが単純なRDTV法をベースにしたブタDKO細胞作製の可能性を追求する。
- (2) 得られたDKO細胞からSCNT経由で、妊娠中期DKO胎仔、最終的にはブタDKO個体が作

製出来ることを示す。

3. 研究の方法

(1) 各種の薬剤耐性遺伝子のブタ細胞への導入と薬剤感受性についての検討

先にも述べたように、neo 内蔵の TV をブタ細胞に導入し、得られたヘテロ KO 細胞は、高濃度の G418 下でも死ぬことはなかった。ヘテロ KO 細胞のゲノムには、導入された TV は片方の allele に存在する。neo と言えば、1 copy 分の neo が存在することになる。RDTV によりヘテロ KO 細胞に再度 TV を投じて得られたホモ KO (DKO) 細胞の場合、両方の allele に TV が存在するので、neo については 2 copies 分存在することになる。従って、理論的には、DKO 細胞を G418 で死滅させるには、ヘテロ KO 細胞で死滅させる濃度の最低 2 倍以上の濃度が必要となる。しかしながら、ブタ細胞の場合、何故か判らないが、微量な neo の発現でも高濃度の G418 存在下で生存出来るようである。

ブタの TV 系では、これまで報告される TV は全て neo 内蔵のもので、それ以外の薬剤耐性遺伝子の使用は報告されていない。そこで、本研究では、neo 以外の薬剤耐性遺伝子 (zeo, hyg, bsr, puro) をブタ細胞内で発現させた場合の薬剤耐性を検討した。具体的には、zeo, hyg, bsr, puro を各々内蔵する発現プラスミドを作製した。遺伝子導入後、通常の薬剤濃度 (主にマウスの系で確立された濃度) で選別し、得られた形質転換体に対し薬剤の濃度を上げて、どの濃度まで耐えうるかを検討した。この結果、zeo, hyg, bsr, puro に対応する薬剤 (各 zeocin, hygromycin B, blasticidin S, puromycin) の至適濃度が得られた (Sato et al., *Reprod Dom Anim*, in press)。更に、薬剤感受性を検討すべく、各発現プラスミドを導入された形質転換体に対し、順次濃度を高めた薬剤濃度で細胞を培養し、細胞毒性程度を検討した。その結果、zeo の場合を除き、hygromycin B, blasticidin S, puromycin 処理群では、比較的低い濃度 (例えば、通常濃度の 2-4 倍程度の濃度) でも形質転換体を死に至らしめることが分かった (未公表)。これは、neo の場合と異なり、hyg, bsr, puro などの遺伝子を TV に内蔵させれば、RDTV 後、通常の 2-4 倍程度の濃度でヘテロ細胞を処理すれば、DKO 細胞を得ることが出来ることを示唆する。

(2) TV の構築

1. 項で判明した RDTV に適用出来る薬剤耐性遺伝子を用い、それを内蔵する TV を構築する。

TV の構造としては、標準的なもので、 α -1, 3-GalT 遺伝子の 5' arm, 3' arm の中に puro あるいは bsr 発現ユニットを挿入したも

のを作成した (puro を挿入された TV は、pGalT、bsr を挿入された TV は、pGalT と名付けた)。TV のブタ細胞 (胎仔性繊維芽細胞) への遺伝子導入は、Amara 社の nucleofection 法を用いた。この系では、50-70%の比較的高い遺伝子導入効率が達成されることを我々の手で既に報じている (Nakayama et al., *Cloning Stem Cells* 9, 523-534, 2007)。通常の薬剤濃度で安定的な形質転換体を得、そのゲノム DNA に対し PCR 法によりヘテロ KO 細胞の有無を検索した。その結果、 10^7 個の細胞の内、5-10 個がヘテロ KO 細胞であったので、ブタ細胞では比較的 gene targeting の効率は良いと思われる。

(3) ヘテロ KO 細胞からの RDTV による DKO 細胞の取得

得られたヘテロ KO 細胞に対し、薬剤の濃度を上げることにより、細胞の死滅が観察されるかどうかを先ず検討した。高濃度の薬剤で細胞が死滅することが確認された場合、直ちに TV を再度前述の方法にて遺伝子導入する。遺伝子導入後、細胞を高濃度の薬剤で選別し、生存する細胞クローンを得た後、ゲノム DNA に対する PCR 解析、細胞の BS-I-B4 レクチンによる染色で DKO 細胞の有無を決定した。

(4) DKO 細胞の SCNT

DKO 細胞を産業ブタ卵巣から採取した卵母細胞 (予め、除核) に SCNT を施す。SCNT の方法は共同研究者の吉田、三好らが確立した方法 (Miyoshi et al. *J Reprod Dev* 51, 699-707, 2005; Sato et al., *Mol Reprod Dev* 72, 396-403, 2005) で行う。SCNT 由来 2-cell 胚あるいは胚盤胞を仮親メスブタ生殖道へ移植する。移植後、そのまま生ませないで、1ヶ月ほどで胎仔を摘出する。

ブタ DKO 細胞を得るには数ヶ月間も in vitro で培養されており、その細胞内では SCNT によって個体に還元されるまでのポテンシャル (科学的には未だ説明がつかないが) がかなり低下しているからと思われるからである。摘出された胎仔から繊維芽細胞を初代培養し、それを再 SCNT に付す。この細胞は一方で PCR 解析による DKO 状態の確認、レクチンへの非反応性についての確認にも付される。

(5) 再 SCNT

4 項で試行された実験を繰り返す。この時点は最終的に個体まで発生させる。うまく出生した場合、その個体の一部 (皮膚組織) を採取し、前述の分子生物学的、生化学的、組織化学的解析を行い、細胞が DKO であることを確認する。また、異種移植関連の解析も行う。出生個体は成長度、繁殖性等、クローン動物に付随する様々な生理的解析に付される。

4. 研究成果

特定の遺伝子機能が破壊されたいわゆる

KO ブタ個体を作成するには、マウスの場合と異なり、in vitro でのホモ KO 体細胞の作成、その体細胞核移植という経路を辿る。ブタの場合、ホモ KO 細胞の作成は、その後の実験のスピードを左右する重要な問題である。ヘテロ KO 細胞由来の個体に比べ、2 年ほど実験時間が短縮されるからである。ホモ KO 体細胞の作成に至る種々の条件（薬剤耐性等）が不明故、基本的な問題を検討した。その結果、ミニブタ胎仔性繊維芽細胞（PEF）は、blasticidine S, hygromycin B, zeocin 等の様々な薬剤に感受性があった（Sato et al., *Reprod Dom Anim*, in press）。なお、予備的な検討では、puromycin 等の薬剤では、濃度を高めることで、組換え細胞の死滅が誘導された。

通常の KO システムでは、内在性の標的遺伝子を破壊するために、いわゆる TV の構築が必要となる。今回細胞表面糖鎖である α -Gal epitope を合成する酵素 α -1, 3-GalT をコードする遺伝子を標的とした。GT vector として puromycin 耐性遺伝子 (puro) を有する vector pPGalT を構築した。これを腎臓上皮由来細胞に遺伝子導入した（以前は、胎仔性繊維芽細胞をドナー細胞に用いていたが、重複の遺伝子導入には耐えられず、不適と判断）。得られたヘテロ KO 細胞に更に pPGalT を導入し、細胞を高濃度の puromycin で選別することで、ホモ KO 細胞を得た（論文作成中）。この場合、ホモ KO 細胞は、 α -Gal epitope を無くすので、それを識別する BS-I-B₄ レクチンに毒素 (saporin) を結合させた IB4-SAP で遺伝子導入後の細胞を処理すると、簡単にホモ KO (DKO) 細胞を濃縮出来るが、今回、この方法を用い、効率的にホモ KO (DKO) 細胞を得ることが出来た。後は、体細胞核移植経由でブタ個体を作成するのみであるが、与えられた補助金の期限内ではまだ時間が足らなかった。現在、更なる実験を継続中である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 21 件）

- ① Chi H, Shinohara M, Yokomine T, Sato M, Takao S, Yoshida M, Miyoshi K: Successful suppression of endogenous α -1, 3-galactosyltransferase expression by RNA interference in pig embryos generated in vitro, *Journal of Reproduction and Development/Society for Reproduction and Development*, *J Reprod Dev.* 2012;58(1):69-76. Epub 2011 Oct 14. (査読有)
- ② Sato M, Ohtsuka M, Miura H, Miyoshi K,

Watanabe S: Determination of the Optimal Concentration of Several Selective Drugs Useful for Generating Multi-Transgenic Porcine Embryonic Fibroblasts. *Reproduction in Domestic Animals/John Wiley & Sons, Inc.*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01964.x (査読有)

- ③ Sato M, Chi H, Miyoshi K: Targeted Toxin as a Useful Reagent for Enrichment of α -Gal Epitope-Negative Cells Used for Somatic Cell Nuclear Transfer in Pigs. *Xenotransplantation (InTech Open Access Book)*, ISBN: 978-953-307-997-4 (2011). (査読有)
- ④ Sato M, Yoshida M, Miyoshi K, Ohtsuka M, Watanabe S: Cultivation with untransfected fibroblasts can stimulate proliferation of a single gene-modified fibroblast derived from a Clawn miniature swine fetus. *Reproduction in Domestic Animals/John Wiley & Sons, Inc.*, Vol. 46, No. 5, pp.911-916 (2011). October 2011. (査読有)
- ⑤ Akasaka E, Ozawa A, Mori H, Mizobe Y, Yoshida M, Miyoshi K, Sato M: Whole-genome amplification-based GenomiPhi for multiple genomic analysis of individual early porcine embryos. *Theriogenology/Elsevier B. V.*, Vol. 75, No. 8, pp.1543-1549 (2011). 2011 May;75(8):1543-9. (査読有)
- ⑥ Himaki T, Watanabe S, Chi H, Yoshida M, Miyoshi K, Sato M: Production of genetically modified porcine blastocysts by somatic cell nuclear transfer: preliminary results toward production of xenograft-competent miniature pigs. *Journal of Reproduction and Development*, 56 巻 630-638 (2010). (査読有)
- ⑦ Himaki T, Yokomine T, Sato M, Miyoshi K, Takao S, Yoshida M: Effects of trichostatin A on in vitro development and transgene function in somatic cell nuclear transfer embryos derived from transgenic Clawn miniature pig cells. *Animal Science Journal* 81 巻 558-563 (2010). (査読有)
- ⑧ Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Himaki T, Yoshida M, Sato M: Beneficial effects of reversine on in vitro development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 56 巻 291-296 (2010). (査読有)
- ⑨ Himaki T, Mori H, Mizobe Y, Miyoshi K,

Sato M, Takao S, Yoshida M: Latrunculin A dramatically improves the developmental capacity of nuclear transfer embryos derived from gene-modified Clawn miniature pig cells. Cellular Reprogramming, 12巻 127-131 (2010). (査読有)

- ⑩ Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Akasaka E, Ozawa A, Yoshida M, Sato M: Valproic acid enhances in vitro development and Oct-3/4 expression of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. Cellular Reprogramming, 12巻 67-74 (2010). (査読有)
- ⑪ Ozawa A, Akasaka E, Watanabe S, Yoshida M, Miyoshi K, Sato M: Usefulness of a non-invasive reporter system for monitoring reprogramming state in pig cells: Results of a cell fusion experiment. Journal of Reproduction and Development, 56巻 363-369 (2010). (査読有)
- ⑫ Akasaka E, Watanabe S, Himaki T, Ohtsuka M, Yoshida M, Miyoshi K, Sato M: Enrichment of xenograft-competent genetically modified pig cells using a targeted toxin, isolectin BS-I-B4 conjugate. Xenotransplantation, 17巻 81-89 (2010). (査読有)
- ⑬ Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Akasaka E, Ozawa A, Yoshida M, Sato M: Development of a noninvasive monitoring system for evaluation of Oct-3/4 promoter status in miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. Journal of Reproduction and Development, 55巻 661-669 (2009). (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① 池海英、三好和睦、佐藤正宏、異種移植関連抗原 α -Gal エピトープ陰性ブタ体細胞の選択的濃縮のための targeted toxin の有効性、第104回日本繁殖生物学会、2011年9月15日~17日、いわて県民情報交流センター・アイーナ (岩手県)
- ② 池海英、吉田光敏、三好和睦、佐藤正宏、全ゲノム増幅法による核移植ブタ胚での gene-targeted allele 検出の有効性、第58回日本実験動物学会総会、2011年5月25日-27日、タワーホール船堀 (東京都)
- ③ 渡部 聡、三澤雅子、松崎貴、桜井敬之、村松喬、佐藤正宏、A novel glycosylation signal regulates transforming growth factor-beta receptors as evidenced by endo-beta-galactosidase C expression in rodent cells、第33回日本分子生物学会

年会/第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日~10日、神戸ポートアイランド (神戸市)

- ④ 谷河麻耶、荒木喜美、仙波圭、佐藤正宏、檜山明彦、酒井大輔、持田譲治、山村研一、阿部幸一郎、Skt^{Cre} 系統を用いたコンディショナルノックアウト法による椎間板形成の解析、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日~10日、神戸ポートアイランド (神戸市)
- ⑤ 赤坂恵理、佐藤正宏、全ゲノム増幅法を用いた核移植由来ブタ胚細胞における外来性遺伝子検出の試み、第56回日本実験動物学会総会、2009年5月14日~16日、大宮ビックシティ (埼玉県)
- ⑥ 佐藤正宏、赤坂恵理、小澤明央、ミニブタ体細胞の in vitro 脱分化誘導の試み、第56回日本実験動物学会総会、2009年5月14日~16日、大宮ビックシティ (埼玉県)

[その他]

ホームページ等

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/>

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~mdio/list/e/e3-3/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 正宏 (SATO MASAHIRO)

鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・教授

研究者番号：30287099

(2) 研究分担者

吉田 光敏 (YOSHIDA MITSUTOSHI)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：00174954

三好 和睦 (MIYOSHI KAZUCHIKA)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：70363611