

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 4 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659078

研究課題名（和文） 核移植によるノックアウトウサギ病態モデルの作製及び動脈硬化研究への応用

研究課題名（英文） Generation and application of gene knock-out rabbits for the study of atherosclerosis

研究代表者

範 江林 (FAN JIANGLIN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：60272192

研究成果の概要（和文）：

疾患関連遺伝子の解析や治療標的候補蛋白の同定には、遺伝子導入動物（特に遺伝子改変マウス）の使用は医学分野において不可欠な研究手法である。しかし、汎用されているマウスの脂質代謝系と心臓血管系がヒトとは大いに異なっているため、高脂血症や動脈硬化といった脂質代謝異常、心臓血管疾患の研究に不適當であることが指摘されてきた。本研究ではウサギ CETP 遺伝子をターゲットし、核移植により CETP・ノックアウトウサギを作製することを試みた。

研究成果の概要（英文）：

It is essential to use genetically modified animals for the elucidation of disease-related gene functions and therapeutic candidate proteins in vivo. In this field, transgenic mice are widely used in the medical research. However, due to the differences between mouse and human in lipid metabolism and cardiovascular system, it is considered that mice are not suitable for the research of lipid metabolism and cardiovascular disease of humans. In the current study, we attempted to establish a somatic cell line with cholesteryl ester transfer protein deficiency and then, using nuclear transfer technology, to make cholesteryl ester transfer protein knock-out rabbits.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	0	1,200,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：CETP、核移植、クローン、HDL、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂質代謝異常、心臓血管疾患の研究にマウス以外の遺伝子改変ウサギモ

デルの開発が必要である。

(2) 遺伝子改変ウサギでは外来遺伝子の過剰発現はできるものの、マウスのような内因性遺伝子を欠損させるいわゆ

る KO の作製が不可能である。

(3) ウサギ ES 細胞が確立されておらず、ウサギゲノム情報の欠如があり、マウス ES 細胞のようなターゲティングベクターによる相同組み換え法が適用できなかったことがある。

2. 研究の目的

ウサギ CETP 欠損体細胞株の確立と核移植による CETP・ノックアウトウサギの開発。

3. 研究の方法

- (1) ウサギ CETP 遺伝子のターゲットベクターの作製。
- (2) CETP^{+/-}ベクターを導入された胎児ウサギ線維芽細胞株の樹立。
- (3) CETP^{+/-}線維芽細胞株を核供与体とする核移植による CETP・ノックアウトウサギの作製。
- (4) WHHL ウサギ線維芽細胞を用いた核移植によるクローンウサギの作製。
- (5) ZFN による CETP・ノックアウトウサギの作製。
- (6) CETP アンチセンス投与実験。

4. 研究成果

(1) ウサギ胎児線維芽細胞株の確立

妊娠2週間の雌ウサギから、帝王切開により胎児の皮膚線維芽細胞を採取し、組織培養を行った。初代培養から継代培養した41代目までの線維芽細胞を使って、継代培養によって核型変化や低温保存の条件などの影響を調べた。その結果、分裂中期の細胞染色体の多倍数性の変化が認められなかったので(表1)、Gene targetingとして胎児の線維芽細胞の使用は可能であると判断した。

表1：継代培養によりウサギ胎児線維芽細胞の核型への影響

	継代培養数	分裂中期解析数	正常多倍数性 (%)
胎児線維芽細胞	初代	35	35 (100%)
胎児線維芽細胞	継代9	35	35 (100%)
胎児線維芽細胞	継代20	20	19 (95%)
胎児線維芽細胞	継代41	25	18 (97%)

(2) CETP Gene targetベクターの構築および CETP^{+/-}ベクターを導入された胎児ウサギ線維芽細胞株の樹立

ウサギのゲノム(BAC: LB1-238P7 from BACPAC resources center)からエクソン3～6をターゲットとして、遺伝子導入ベクターを設計した。ベクターには二つの選択マーカー(negative and positive selection markers: PGK-Neo and DTA)が含まれている(図1)。

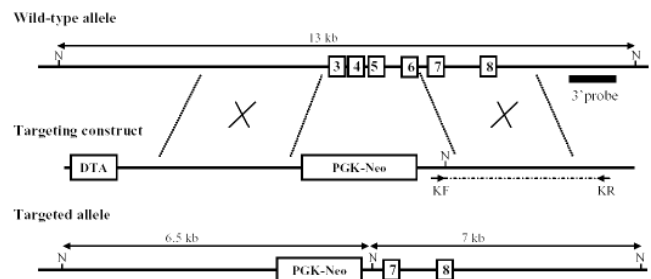


図1：ウサギCETPターゲットベクター

このベクターを使って、500回以上電気穿孔処理された胎児線維芽細胞への遺伝子導入を行ったが、ポジ細胞株は得られなかった。予備実験でGFPやCRPなどの遺伝子を有する同じベクターを使っても、導入率はわずか0.4%以下であったため、さらに継続して導入する必要があると思われる。

(3) WHHL ウサギ線維芽細胞を用いた核移植によるクローンウサギの作製

クローンウサギ作製技術をさらに成熟させ、実用化に向けての一環として、家族性高脂血症モデルウサギである WHHL ウサギの胎児から分離させた皮膚線維芽細胞を用いて、核移植によるクローン WHHL ウサギの作製を行った。150 個クローン胚を構築し、5羽の仮親ウサギへの移植を行った。しかし、出産したのは1羽のみで、子ウサギはすぐ死亡した。したがって、クローン技術自体は実現可能といえるが、応用に至るまではまだ道半ばである。WHHL ウサギの線維芽細胞は増殖能が非常に遅いこともあるので、現在、我々は、作製したヒトアポ蛋白 AII 遺伝子導入 JW ウサギの胎児ウサギ線維芽細胞を用いたクロー

ーンの作製も試みている。

(4) ZFN によるノックアウトウサギの作製

上述のごとく、体細胞への遺伝子導入確率が非常に低いことと、核移植によるクローンの成功率が極めて困難なことを鑑み、より効率の良い方法を探索する必要があると思われる。そこで、2年前から、注目を浴びている ZFN によるノックアウト動物の作製に着目した。すでに、マウス、ラット、ゼブラフィッシュの成功例が報告されており、我々は直ちにこの ZFN 技術を採用し、以下のようにノックアウトウサギの作製を試みた (図 2)。



図 2 : Knockout animal model can be created via fertilized single cell embryo microinjection of ZFN plasmid DNA or mRNA

The ZFN, in mRNA or plasmid form, is microinjected into the nucleus, cytoplasm, or yolk where it locates the target sequence and creates a double strand break and then stimulates the cellular process of NHEJ and results in the mis-repair of the DNA sequence. The resulting mutation usually gives rise to a knockout genotype and phenotype. Biallelic knockouts are achievable in the founder generation.

我々はまず、シグマ社に依頼して Zinc Finger Nuclease rabbit CETP gene ベクターを設計してもらった。以下のように、全部で三セットの ZFN ベクターが作製された (図 3)。

Three Zinc Finger Nuclease (ZFN) pairs were designed for generating CETP knock out rabbits

Set 1: CTGTCCATCGCCAGCAGCCaggtgGAGCTGGTGGACGCCAAG
GACAGGTAGCGGTCTGCGgtccacCTCGACCACCTGCGGTTTC Exon 3

Set 2: CCGGCAGCCAGCATCCTCtcagatGGAGACATCGGGGTGGAC
GGCCGTCGGTCTAGGAGagtctaCCTCTGTAGCCCCACCTG Exon 8

Set 3: CGTGATGCTCCTCGGCCGGgtcaaGTACGGGCTGCACAAGTG
GCACTAcGAGGAGCCGGCCcagttCATGCCCGACGTGTTTAC Exon 2

ZFN binding sites were underlined. The designed cutting sites were shown in lowercase.

ZFN Pair	Specification*	ZFN Activity
PZFN1/PZFN2 -set 1	>50% 6 hr Mel-1	103%
PZFN1/PZFN2 -set 2	>50% 6 hr Mel-1	101%
PZFN1/PZFN2 -set 3	>50% 6 hr Mel-1	78%

*Note: ZFNs that show >50% signal relative to a CCR5 standard ZFN at 6h post-induction are regarded as useful for genome editing experiments.

図 3 : CETP ノックアウトウサギのための三つの ZFN 塩基配列

マイクロインジェクションを行い、PCR により CETP 遺伝子を欠損させる効率を比較し、効率のよい 2 セットを選択した。第 1 段階では、Set 1 ベクターを用いてマイクロインジェクションを行っている (表 2)。

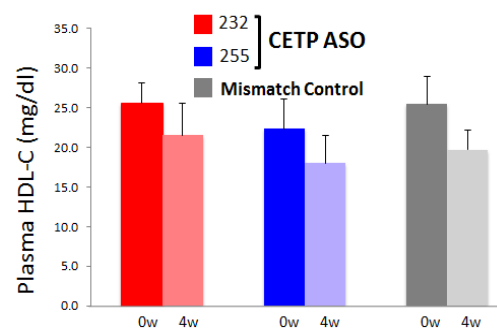
表 2 : 二つのベクターの導入効率の比較

	Embryos injected		#Sequenced	#Double peaks	Mutation Rate
	Concentration	Count			
ZFN-Set1	0 ng/ul	3	3	0	0%
	1 ng/ul	13	1	1	100%
	2.5 ng/ul	17	9	3	33.3%
	5 ng/ul	30	25	14	56%
ZFN-Set2	0 ng/ul	2	2	0	0%
	1 ng/ul	38	36	20	55.5%
	2.5 ng/ul	4	4	2	50%
	5 ng/ul	25	7	7	100%

(5) CETP アンチセンス投与実験

アメリカ ISIS 会社と共同で 50 以上のウサギ CETP のアンチセンスの設計と合成を行った。その中で一番抑制効果のある CETP アンチセンスは培養ウサギ肝細胞の CETP mRNA の発現を約 70% 抑制できた。しかし、JW ウサギに静注し、血中 HDL-C の変化を調べたところ、体内での CETP アンチセンスにより HDL-C を上昇させる効果は認められなかった (図 4)。

図 4 : CETP アンチセンス投与後の血漿 HDL-C の変化



結語 :

ウサギ胎児線維芽体細胞への遺伝子導入と核移植によるクローンを合体した技術を駆使して世界初のノックアウトウサギの作製に挑戦した。当初の予測より技術的な難関が多かったものの、ZFN といった新しい技術の誕生によってノックアウトウサギ作製の成功に新たな道を開いてくれるものと期待

される。

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 16 件)

- ①. Zhang J, Yu Y, Nakamura K, Koike T, Waqar AB, Zhang X, Liu E, Nishijima K, Kitajima S, Shiomi M, Qi Z, Yu J, Graham MJ, Crooke RM, Ishida T, Hirata K, Hurt-Camejo E, Chen YE, Fan J. Endothelial lipase mediates hdl levels in normal and hyperlipidemic rabbits. *J Atheroscler Thromb*. 査読有 2012;19:213-226
- ②. Yu Q, Lin Y, Yang P, Wang Y, Zhao S, Yang P, Fan J, Liu E. C-reactive protein is associated with the progression of acute embolic stroke in rabbit model. *J Thromb Thrombolysis*. 査読有 2012;33:301-307
- ③. Yu Q, Li Y, Wang Y, Zhao S, Yang P, Chen Y, Fan J, Liu E. C-reactive protein levels are associated with the progression of atherosclerotic lesions in rabbits. *Histol Histopathol*. 査読有 2012;27:529-535
- ④. Wang Y, Cheng F, Chen Y, S. Z, Yu Q, Fan J, Liu E. High-dose rosiglitazone is pro-atherogenic in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 査読有 2012:Epub ahead of print, in press
- ⑤. Pravenec M, Kajiya T, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Simakova M, Silhavy J, Malinska H, Oliyarnyk O, Kazdova L, Fan J, Wang J, Kurtz TW. Effects of human c-reactive protein on pathogenesis of features of the metabolic syndrome. *Hypertension*. 査読有 2011;57:731-737
- ⑥. Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, Kitajima S, Koike T, Sugita C, Moriguchi-Goto S, Hatakeyama K, Takahashi M, Koshimoto C, Matsuura Y, Iwakiri T, Chen YE, Fan J, Asada Y. Human c-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J Thromb Haemost*. 査読有 2011;9:201-208
- ⑦. Kitajima S, Maeda T, Nishijima K, Morimoto M, Watanabe T, Fan J. Factors influencing the number of eggs recovered from rabbits superovulated with fsh or pmsg: Analysis of five years of data from 509 rabbits. *Scand. J. Lab. Anim. Sci*. 査読有 2011;38:169-174
- ⑧. Huang Q, Fang C, Wu X, Fan J, Dong S. Perfluorooctane sulfonate impairs the cardiac development of a marine medaka (*oryzias melastigma*). *Aquat Toxicol*. 査読有 2011;105:71-77
- ⑨. Ding Y, Wang Y, Zhu H, Fan J, Yu L, Liu G, Liu E. Hypertriglyceridemia and delayed clearance of fat load in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein ciii. *Transgenic Res*. 査読有 2011;20:867-875
- ⑩. Zhang C, Zheng H, Yu Q, Yang P, Li Y, Cheng F, Fan J, Liu E. A practical method for quantifying atherosclerotic lesions in rabbits. *J Comp Pathol*. 査読有 2010;142:122-128
- ⑪. Waqar AB, Koike T, Yu Y, Inoue T, Aoki T, Liu E, Fan J. High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances

atherosclerosis in rabbits.

Atherosclerosis. 査読有

2010;213:148-155

- ⑫. Nakajima K, Saito M, Fan J, Chen CY. Letter by nakajima and saito regarding article, "human c-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits". *Circulation*. 査読有 2010;122:e406; author reply e407
- ⑬. Zheng H, Zhang C, Yang W, Wang Y, Lin Y, Yang P, Yu Q, Fan J, Liu E. Fat and cholesterol diet induced lipid metabolic disorders and insulin resistance in rabbit. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 査読有 2009;117:400-405
- ⑭. Reifenberg K, Lehr HA, Fan J, Koike T, Wiese E, Kupper I, Sagban TA, Schaefer SC, Zahringer U, Torzewski M, Lackner KJ, Bhakdi S. Endotoxin accelerates atherosclerosis independent of complement activation. *Thromb Res*. 査読有 2009;123:653-658
- ⑮. Koike T, Kitajima S, Yu Y, Nishijima K, Zhang J, Ozaki Y, Morimoto M, Watanabe T, Bhakdi S, Asada Y, Chen YE, Fan J. Human c-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation*. 査読有 2009;120:2088-2094
- ⑯. Koike T, Kitajima S, Yu Y, Li Y, Nishijima K, Liu E, Sun H, Waqar AB, Shibata N, Inoue T, Wang Y, Zhang B, Kobayashi J, Morimoto M, Saku K, Watanabe T, Fan J. Expression of human apoAII in transgenic rabbits leads to dyslipidemia: A new model for combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有 2009;29:2047-2053

[学会発表] (計6件)

- ①. Fan J. Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. ISTH2011 (第23回国際血栓止血学会), 2011年7月23日, 国立京都国際会館
- ②. Zhang J. Nitro-oleic acid attenuates angiotensin II signaling pathway in vascular wall through inhibiting AT1 receptor and G-protein coupling. 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2010年7月15日, 長良川国際会議場
- ③. 範江林. 分子病理学研究所の最前線: 動脈硬化の分子病態の解明及びトランスレーショナルリサーチへの挑戦. 第99回日本病理学会総会, 2010年4月27日, 京王プラザホテル
- ④. Waqar AB. High-Fat-Diet-induced metabolic disorders enhances atherosclerosis. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2009年7月17日, 海峡メッセ下関
- ⑤. 北嶋 修司. ウサギ採卵成績に影響を及ぼす要因の検討: 過去5年間の採卵成績の解析. 第56回日本実験動物学会総会, 2009年5月15日, 大宮ソニックシティ
- ⑥. Koike T. Transgenic rabbits expressing human c-reactive protein. ATVB Annual Conference 2009, 2009年4月30日, Omni Shoreham Hotel

[図書] (計1件)

- ①. Houdebine L, Fan J. (etd). Springer. Rabbit biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models. 2009, 136

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ヒト C 反応性蛋白遺伝子導入ウサギ

発明者：範 江林 他

権利者：国立大学法人佐賀大学、国立大学法人山梨大学、モアハウス スクール
オブ メディシン

種類：特許

番号：特開 2010-284125

出願年月日：2009 年 6 月 15 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical
_basic/pathol01/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

範 江林 (FAN JIANGLIN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
教授

研究者番号：60272192

(2) 研究分担者

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
助教

研究者番号：40432158

柴田 信光 (SHIBATA NOBUMITSU)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
医学研究員

研究者番号：40452130

(平成 21 年度のみ)

(3) 連携研究者

手塚 英夫 (TEZUKA HIDEO)

山梨大学・総合分析実験センター・准教授
研究者番号：70155456