

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292171

研究課題名(和文) 幼若期精巢を利用した組換え血友病モデルブタの系統樹立

研究課題名(英文) Establishment of a strain of F8 gene-targeted pigs (hemophilia-A pigs) by xenografting of fetal testicular tissue from neonatally moribund cloned pigs

研究代表者

金子 浩之 (KANEKO, Hiroyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 動物機能利用研究領域・ユニット長

研究者番号：60343993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：当農研機構では遺伝子組換えとクローン技術によって、血液凝固第 因子(F8)遺伝子をノックアウトした血友病モデルブタを開発した。しかし、初代のクローン雌がヘテロ欠損型(F8+/-)でありながら、ヘミ型(F8-/Y)のクローン雄と同様に幼若期に失血死したために、成体を用いる従来の繁殖法では後代を得ることができない。そこで、クローン胎子精巢をヌードマウスに移植し、発生した精子を用いて顕微授精卵を作製した。その結果、2頭のヘテロ欠損型雌ブタの作出に成功した。これらのブタは血友病症状を示さず、交配によって後代を継続的に生産できるため、血友病の治療法開発のモデル動物としてヘミ雄ブタの供給が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Our institute has developed a porcine model of hemophilia-A (hemophilia-A pig) by nuclear transfer cloning of fetal fibroblasts after disruption of the X-linked coagulation factor VIII (F8) gene. As a recessive disease, heterozygous female clones were expected to be asymptomatic, but died of severe bleeding as well as hemizygous male clones, thus making it impossible to obtain progeny of the hemophilia-A pigs. In this study, we tried to establish a strain of hemophilia-A pigs utilizing sperm recovered from testicular tissue of fetal hemizygous clones that had been grafted into nude mice. Two heterozygous pigs were generated: the pigs were asymptomatic and then delivered 5 hemizygous and 4 heterozygous piglets. Thus, testicular xenografting provides an opportunity to generate offspring from fetal hemizygous clones. Such heterozygous pigs avoid the discrepancy between genotype and phenotype in terms of F8, and will distribute progeny for the development of new therapeutics.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：血友病モデルブタ 精巢異種間移植 超低温保存 系統樹立

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 雄の最も未成熟な生殖細胞である精祖細胞(前精祖細胞を含む)は、あらゆる年齢の精巣に存在し自己増殖能を持つが、反面、減数分裂を経ておらず個体へと発生する能力は有してはいない。精祖細胞を長期保存し精子にまで発生させることができれば、生殖活動期にない動物からも遺伝情報を保存し、さらに精子を用いた個体の再生が可能となる。精巣の異種間移植は、他種の動物の精巣組織をヌードマウスなどの免疫不全マウスに移植しマウス体内で他種動物の精子を発生させる手法である[1]。これまで、我々のグループは幼若ブタの精巣組織を採取後直ちにヌードマウスに移植し、精祖細胞からブタ精子を発生させた。次いでこの精子を用いて作製した顕微授精卵をレシピエントブタに移植することで、正常な繁殖能を持つブタを誕生させた[2, 3]。さらに次のステップとして、ガラス化冷却によって超低温保存した幼若ブタの精巣をヌードマウスに移植し精子を発生させ、これを用いて顕微授精卵を作製することで、超低温保存した幼若期精巣から正常な繁殖能を持った産子を生産することに初めて成功した[4, 5]。これらの知見は、超低温保存、異種間移植および顕微授精を組み合わせた新しいシステムによって、本来精子を作れない幼若動物からでも、長期保存した精巣から成体を経ずに次世代を生産できることを示している。

(2) 血友病はX染色体上の凝固第 因子遺伝子(F8 と略)の変異によって起こる血液の凝固不全である。劣性伴性遺伝病であるため、男性( $F8^{-Y}$ )において出血症状が現れ、女性( $F8^{+/-}$ )は一般に無症状である。これまで、血友病モデルマウスで得られた知見をヒトの治療に外挿してきたが、マウスの血液凝固系がヒトとの類似性が低いため、有効性には限界がある。一方、ブタは血液凝固系がヒトに類似しており、かつ寿命が長く長期にわたり治療法の評価が可能であるため、モデル動物としての重要性が高い。当研究グループでは、X染色体上のF8をノックアウトした雄胎子の線維芽細胞から体細胞クローンブタを作製することで、血友病モデルブタの開発に世界で初めて成功した[6]。この雄クローンブタ( $F8^{-Y}$ )はF8生産能を欠くため出生後短期間で死亡した。一方、雌胎子の線維芽細胞から作製した雌のノックアウトクローンブタは、ヘテロ( $F8^{+/-}$ )でありながら、予想に反して血友病と同様に早期に死亡した。このように、血友病モデルブタでは、初代のクローンブタが雌雄いずれも性成熟に達する前に死亡するため、成熟した精子および卵を使用する従来の繁殖法では後代を生産できず、モデル動物として供給できないという重大な問題が生じていた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、血友病の初代クローンブタ胎子の精巣組織を超低温保存した後にヌードマウスに移植し、発生した精子を用いて後代を作出する。次いでこれらの後代を用いて血友病モデルブタの系統樹立が可能であるかを検証することとした。初代雌クローンブタ( $F8^{+/-}$ )における遺伝子型と表現型の不一致がエピジェネティックな不具合の結果であれば、受精を経て生産されたヘテロ雌( $F8^{+/-}$ )はこのような不一致を回避できると期待された。

## 3. 研究の方法

(1) 血友病雄クローン胎子( $F8^{-Y}$ 胎子、 $F_0$ 世代)の作製

野生型の雄胎子(胎齢 60 日前後)から線維芽細胞を採取し、ブタF8遺伝子の第16エクソンを標的とするノックアウトベクター[6]を電気穿孔法によって導入した。ノックアウトベクターにはポジティブセレクション用にネオマイシン耐性遺伝子を組み込み、G418添加培地により、ノックアウト細胞を選択した。PCR解析によってベクターの導入が確認された細胞の核を除核した体外成熟卵に注入した。電気パルスによる活性化刺激の後、発生した核移植胚を、発情を同期化したレシピエントブタの卵管に移植した。

(2)  $F8^{-Y}$ 胎子からのサンプル採取と精巣の超低温保存

胚移植後 69 から 83 日後に胎子から精巣、肝臓および耳介を採取した。精巣は約 1mm 角に細切した後、エチレングリコール、ポリビニルピロリドンおよびトレハロースを含んだガラス化液に 10 分間浸漬させた[4]。精巣小片を液体窒素上に浮かべたアルミホイルの上で超急速に冷却し、固化(ガラス化)した精巣小片を液体窒素内に保存した。耳介および肝臓はそれぞれPCRによる遺伝子型解析およびF8mRNAの定量に用いた。

(3)  $F8^{-Y}$ 胎子精巣の異種間移植

PCRによって遺伝子型が $F8^{-Y}$ であることを確認した後、超低温保存した精巣小片を加温した後、小片を 15 個ずつ去勢したヌードマウスの背部皮下に移植した。

(4) 顕微授精卵の作製

移植後 300 日以降に精巣を採取した。一部を組織学的検索用に Bouin 氏液で固定した後、残りの部分を細切して精子を採取した。形態に異常のない精子を吸引し、別途体外成熟させた野生型の卵に精子全体をピエゾマイクロマニピュレータを用いて顕微注入した(顕微授精)。ついで、電気パルスによる卵の活性化刺激を加え、発生を促した[2, 4]。

(5)  $F8^{-Y}$ 胎子由来の産子( $F_1$ 世代)の生産  
発情を同期化したレシピエントブタの卵管に顕微授精卵を 50 から 70 個移植した。受胎

率を上げるために、30 個前後の単為発生させた卵を顕微授精卵と同時に移植した。受精卵の移植後 113 日前後にプロスタグランジン F<sub>2</sub> アナログを投与して分娩を誘起した。産子は通常の飼育条件下で皮下血腫等の出血症状の有無を観察しつつ、生後 2 ヶ月で採血 (F8 活性測定) と耳介小片採取 (遺伝子型解析) を行った。

#### (6) F<sub>2</sub> 世代の生産

顕微授精卵の移植の結果、誕生したヘテロ雌ブタ (F8<sup>+/-</sup>) を、通常の飼育条件下で飼育し、性成熟に達した後、野生型の雄 (F8<sup>+/+</sup>) の精液を用いた人工授精を行った。生産された子ブタ (F<sub>2</sub> 世代) のうち、雄は F8<sup>-/-</sup> または F8<sup>+/-</sup> であることから、失血死を避けるため、生後当日または翌日に安楽死させ、肝臓、耳介小片および血液を採取した。雌は F8<sup>+/-</sup> または F8<sup>+/+</sup> であることから、生後 30 日前後で、採血と耳介小片の採取を行った。

#### (7) PCR 解析

ノックアウトベクターを導入した細胞、および F<sub>0</sub> 世代 (F8<sup>-/-</sup> 胎子) F<sub>1</sub> 世代および F<sub>2</sub> 世代のブタから採取した耳介組織からゲノム DNA を抽出した。下記のプライマーを用いてノックアウトベクターに含まれる配列を増幅した。増幅産物の想定されるサイズは 6.0kb である。プライマー: Neo sF (5' -CGCCTTCTTGACGAGTTCTCTG-3' および Exon 22 sR (5' -TAAGGTGCCCGTGGGAATTCCTC-3' )) [6]。

#### (8) サザンブロッティング

F<sub>0</sub> 世代 (F8<sup>-/-</sup> 胎子) F<sub>1</sub> 世代および F<sub>2</sub> 世代のブタからゲノム DNA を抽出した。制限酵素 SacI で処理したゲノム DNA を後電気泳動後メンブレンに転写した。ジゴキシゲニンで標識した 5' プローブ [6] を反応させた。

#### (9) F8mRNA の定量

全 RNA を F<sub>0</sub> 世代 (F8<sup>-/-</sup> 胎子) および F<sub>2</sub> 世代のブタの肝臓から抽出し、F8mRNA の発現量を以下のプライマーを用いて測定した。F8mRNA の発現量は -actin の mRNA 発現で補正した。F8 プライマー: Exon 19F (5' -TCAGAGCGGAAGTTGAAGAC-3' ) および Exon 20R (5' -ACGAAGTTGTGTCGAGGTTTC-3' )。-actin プライマー: ACTB F (5' -AGGTCATCACCATCGGCAAC-3' ) および ACTB R (5' -ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3' )。

#### (10) 組織学的検索

マウスから回収し固定した F8<sup>-/-</sup> 胎子の移植精巣片をパラフィンに包埋した後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。精細管または精索の断面を、断面に含まれる最も成熟の進んだ生殖細胞の種類によって分類した [4]。

#### (11) マウス末梢血中のインヒピンおよびテストステロン濃度の測定

去勢した雄マウスの血中インヒピンは、移植したブタ精巣小片の Sertoli 細胞に由来し、テストステロンは Leydig 細胞に由来する。移植組織の機能的な発育を推定する目的で、インヒピンおよびテストステロン濃度を蛍光免疫測定法 [7] によって定量した。

#### (12) 末梢血中の F8 活性の測定

ブタの末梢血中の F8 の凝固活性をヒト第因子測定キットを用いて測定した。活性値は、標準品として用いたヒトの正常血漿に対する割合で表示した。

### 4. 研究成果

#### (1) F8<sup>-/-</sup> 胎子精巣のマウス体内での発育と精子発生

クローン胚を 25 頭のレシピエントブタに移植した結果、2 頭のブタに受胎が確認された。胚移植後 69 日に 1 頭の胎子、および 83 日に 2 頭の胎子を取り出し、それぞれ精巣を取り出し細切した。これらの 3 頭には、PCR の結果ノックアウトアレルが検出され、また F8 の主要な産生源である肝臓では mRNA の発現は検出されなかったことから、F8 遺伝子が間違いなくノックアウトされていることが確認された。

超低温保存後にこれらの移植小片を 7 匹の去勢したヌードマウスに移植したが、そのうち 4 匹のマウスが生存した。移植後 300 日以降でブタ移植精巣組織を採取した結果、4 匹のマウスの移植小片から精子が回収された (図 1)。移植前のブタ精巣では精索に最も未分化な生殖細胞: 前精祖細胞のみが存在した。回収した精巣組織では精細管の形成が認められ、17% の精細管に精子および 30% の精細管に伸長期精子細胞が存在した (図 2)。マウスの血中インヒピンおよびテストステロン濃度は、移植前 (インヒピン: 0.3 ng/ml およびテストステロン 0.1 ng/ml) に比べて、高値 (インヒピン: 4 ng/ml およびテストステロン: 0.6 ng/ml) を示した。

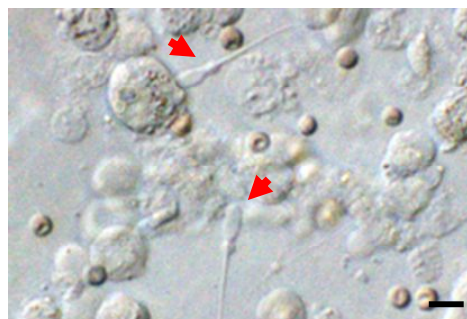


図 1. 移植精巣から採取されたブタ精子 (矢印)。

スケールバー: 10 μm

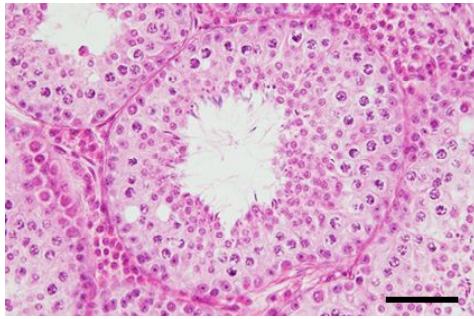


図2 . 移植後 300 日でマウスから回収したブタ精巣小片の組織像。精細管（中央）には精子形成が認められる。スケールバー：100  $\mu$ m

これらの結果から、血友病モデルブタの胎子精巣は、野生型の胎子精巣[8]と同様に、ヌードマウス体内で精子生産能と内分泌機能を獲得し得ることが明らかとなった。

(2)  $F8^{-/Y}$  胎子 ( $F_0$  世代) 由来の  $F_1$  世代の生産 4 匹のマウスから採取した精子を野生型雌ブタ ( $F8^{+/+}$ ) の成熟卵に顕微注入して受精卵を作製し、それぞれ 4 頭のレシピエントブタの卵管に移植した。約 120 日経過後、2 頭のレシピエントブタがそれぞれ、雌 1 頭と雄 1 頭、および雌 1 頭を分娩した(図 3)。PCR の結果、雌 2 頭はノックアウトアリルを持ち(図 4)、さらにサザンブロッティングの結果(図 5)から野生型の  $F8$  遺伝子とノックアウトされた  $F8$  遺伝子の双方を持つヘテロ( $F8^{+/-}$ )であることが明らかとなった。一方、雄はノックアウトアリルが検出されず、野生型 ( $F8^{+/Y}$ ) であることが判明した(図 4 および 5)。2 頭のヘテロ雌の末梢血中の  $F8$  活性はそれぞれ 387% および 354% であり、野生型の雄ブタの活性値の 50% 程度であった。臨床的には、血腫などの出血を示唆する症状はヘテロ雌には認められなかった。



図3 . 顕微授精により生まれた  $F_1$  世代(雌)。

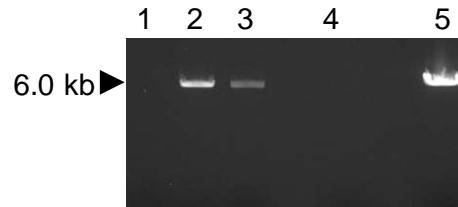


図4 . 顕微授精により生まれた  $F_1$  世代の PCR 解析。

レーン 1:雄子ブタ、レーン 2 および 3 : 雌子ブタ。レーン 4: ネガティブコントロール(野生型ブタ、 $F8^{+/Y}$ ) およびレーン 5 : ポジティブコントロール: 既報[6]で作出した初代雄クローンブタ ( $F8^{-/Y}$ )。

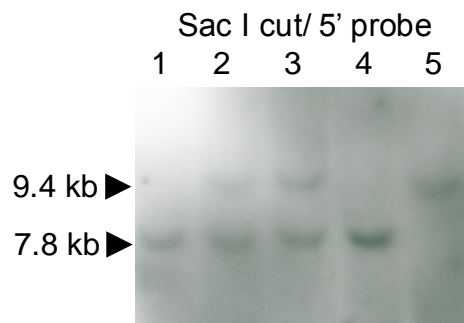


図5 . 顕微授精により生まれた  $F_1$  世代のサザンブロッティング解析

レーン 1:雄子ブタ、レーン 2 および 3 : 雌子ブタ。レーン 4: ネガティブコントロール(野生型ブタ、 $F8^{+/Y}$ ) およびレーン 5 : ポジティブコントロール: 既報[6]で作出した初代雄クローンブタ ( $F8^{-/Y}$ )。

以上の結果から、胎子精巣からも、新生子精巣と同じく、異種間移植を利用して後代を得ることが可能であること、受精によって得られたヘテロ雌は、一定レベル以上の  $F8$  を生産し出血症状を示さないことが明らかとなった。

### (3) $F_2$ 世代の生産

別途準備した野生型雄ブタの精液を用いた人工授精によって、2 頭のヘテロ雌ブタは 3 回の分娩で合計 17 頭(雄 9 頭および雌 8 頭)の子ブタを分娩した。PCR の結果、雄 9 頭のうち 5 頭が、 $F8$  遺伝子がノックアウトされた X 染色体を持つヘミ個体 ( $F8^{-/Y}$ )、4 頭が野生型 ( $F8^{+/Y}$ ) であることが判明した。一方、雌では、4 頭が、 $F8$  遺伝子がノックアウトされた X 染色体を一つ持つヘテロ個体 ( $F8^{+/-}$ ) であり、4 頭が野生型 ( $F8^{+/+}$ ) であった。ヘミ個体には分娩後翌日までに後肢および臀部の皮下に血腫が出現したが(図 6)、ヘテロ個体には異常が認められなかった。

ヘミ雄ブタ ( $F8^{-/Y}$ ) の肝臓では  $F8$  mRNA は検出されず、また血中の  $F8$  活性は 3% 以下であった。一方、野生型の雄ブタ ( $F8^{+/Y}$ ) の肝臓では、ヘミ雄ブタよりも著しく高い  $F8$  mRNA

が検出され(0.5~1.2) 血中の F8 活性も 820 ~ 1810% の高値を示した。野生型の雌ブタ (F8<sup>+/+</sup>) も高い血中 F8 活性 (1220 ~ 2230%) を示した。ヘテロ雌ブタ (F8<sup>+/-</sup>) の F8 活性は 521 ~ 1370% であり、雌雄の野生型ブタの値と有意な差は示さなかった: この結果は、ヒトにおいて、無症状なヘテロ個体の F8 濃度は個体差が大きく、野生型個体と同等のレベルを示す個体が存在する既報[9]と一致する。



図6 . 生後0日のヘミ雄ブタ (F8<sup>-/-</sup>)  
矢印: 後肢の血腫

以上の結果から、F<sub>2</sub> 世代においても F8 遺伝子の破壊は保存されており、ヘテロ雌と野生雄との交配によって、継続的にヘミ個体とヘテロ個体が生産できることから、血友病モデルの系統が樹立できたものと判断された。

#### (4) まとめ

本研究の最も重要な知見は、異種間移植によって発生させた精子を用いることによって、胎子からも次世代を生産できること、および F8<sup>-/-</sup> 胎子精巣由来の精子を用いて、受精を経て生まれたヘテロ雌は、おそらくエピジェネティックな不具合を回避することによって、初代クローン雌ブタとは異なり、血友病の症状を示さなかったことである。本実験で生産されたヘテロ雌ブタを基礎ブタとして用いることによって、継続的にヘミ雄ブタを供給し、同時に後継のヘテロブタを生産することが可能となった。

#### <引用文献>

Honaramooz et al. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 2002; 48: 778-781.

Nakai et al. Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reprod* 2010; 139: 331-335.

Kaneko et al. Normal reproductive development of offspring derived by intracytoplasmic injection of porcine sperm grown in host mice. *Theriogenology* 2012; 78: 898-906.

Kaneko et al. Generation of live

piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *PLoS One* 2013; 8: e70989

Kaneko et al. Normal reproductive development of pigs produced using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *Theriogenology* 2014; 82: 325-31.

Kashiwakura et al. Porcine Model of Hemophilia A. *PLoS One* 2012; 7: e49450.

Ohnuma et al. Production of inhibin A and inhibin B in boars: changes in testicular and circulating levels of dimeric inhibins and characterization of inhibin forms during testis growth. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 33: 410-421.

Kaneko et al. Production of sperm from porcine fetal testicular tissue after cryopreservation and grafting into nude mice. *Theriogenology* 2017; 91: 154-162.

Radic et al. Phenotype-genotype correlations in hemophilia A carriers are consistent with the binary role of the phase between F8 and X-chromosome inactivation. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 530-539.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Kaneko H, Kikuchi K, Men NT, Nakai M, Noguchi J, Kashiwazaki N, Ito J. Production of sperm from porcine fetal testicular tissue after cryopreservation and grafting into nude mice. *Theriogenology* 2017; 91: 154-162. (査読有) doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.12.036.

Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J. Growth and fertilization of porcine fetal oocytes grafted under the renal capsules of nude mice. *Theriogenology*. 2016; 86:1740-1748. (査読有) doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.031.

Kikuchi K, Kaneko H, Nakai M, Somfai T, Kashiwazaki N, Nagai T. Contribution of in vitro systems to preservation and utilization of porcine genetic resources. *Theriogenology*. 2016 Jul 1;86(1):170-5. (査読有) doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.029.

[学会発表](計2件)

金子浩之、菊地和弘、Nguyen Thi Men、  
中井美智子、野口純子、伊藤潤哉、柏崎直巳。  
超低温保存したブタ胎子精巢の異種間移植  
による精子の発生。日本繁殖生物学会  
2016.9.13 麻布大学（神奈川県・相模原市）

Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Fuchimoto  
D, Suzuki Sembon S, Onishi A. Production  
of piglets using sperm retrieved from host  
mice harboring fetal testicular tissue of  
F8 gene-targeted hemophilia A pigs.  
Society of Study of Reproduction. 2016.7  
18 San Diego (America).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子浩之 (KANEKO, Hiroyuki)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・生物機能利用研究部門 動物機  
能利用研究領域・ユニット長  
研究者番号：6 0 3 4 3 9 9 3

### (2) 研究分担者

菊地和弘 (KIKUCHI, Kazuhiro)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・生物機能利用研究部門 動物機  
能利用研究領域・主席研究員  
研究者番号：2 0 3 6 0 4 5 6

中井美智子 (NAKAI Michiko)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・生物機能利用研究部門 動物機  
能利用研究領域・主任研究員  
研究者番号：3 0 4 4 2 8 2 5

大西彰 (ONISHI Akira)  
日本大学・生物資源学部・教授  
研究者番号 3 0 4 1 4 8 9 0  
(平成 26 年度)