

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500490

研究課題名(和文) 免疫不全ラットにおける移植および遺伝子治療モデル作製

研究課題名(英文) Generation of transplantable and gene therapy model rats using IL2 receptor gamma K0 rat derived from rat pluripotent stem cell

研究代表者

濱仲 早苗 (HAMANAKA, SANAE)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：40511415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの多能性幹細胞を用いてIL2レセプター 遺伝子を相同組み換えにより変異を加えX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)のモデルラットを作成した。作成したX-SCIDラットは、血液中のT細胞、B細胞、NK細胞が著しく減少し、胸腺も著しく萎縮した重症免疫不全症であった。X-SCIDラットはヒトの造血幹細胞の移植生着は認められなかったが、ヒトの腫瘍細胞やマウスの造血幹細胞の細胞移植のモデル動物として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated a model rat of the X-linked serious case combined immunodeficiency disease (X-SCID) by homologous recombination with IL2 receptor gamma gene using rat pluripotent stem cells. T cells, B cells and natural killer cells and the thymus were decreased in the X-SCID rat and it showed the serious case immune deficiency disorder. It was suggested that the X-SCID rat was useful as a model of the cell transplantation of a neoplastic cell of human and mouse hematopoietic stem cells, even though the human hematopoietic stem cells were not able to reconstitution.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：X-SCID 移植 ラットES細胞 ラットiPS細胞 IL2レセプター 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

実験動物として容易に扱いやすく数量が十分に確保しやすい動物としては、マウスに次いでマウスより大型のげっ歯類ラットが一般に用いられている。ラットは胚性幹細胞 (Embryonic stem cells : ES 細胞) が存在しなかったことから遺伝子改変ラット作出が困難であり、マウスのように多種類の疾患モデルはこれまで作製されていないのが現状であった。近年、ラット ES 細胞の樹立が報告され、このラット ES 細胞はキメララットさらにはマーカー遺伝子として GFP 遺伝子が germline transmission することも確認されている (Qi-Long Ying ら Cell, 2008)。また、マウスにおいて体細胞に遺伝子を導入することで初期化し ES 細胞とほぼ同様に個体発生に寄与する多能性幹細胞 (iPS 細胞, Takahashi, Yamanaka ら Cell, 2006) が発表されたことを受け、同様の遺伝子導入方法とラット ES 細胞の培養方法を組み合わせキメラ形成能のあるラット iPS 細胞の樹立が報告された (Sheng Ding ら Cell Stem Cell, 2008)。2010 年ラット ES 細胞に Zinc-Finger Nuclease (ZFN) 法を用いて、ラット IL2rg 遺伝子のエキソン 2 を target-region とした X-SCID ラットの作成が報告された (Mashimo ら PLoS One, 2010)。この ZFN 法では target-gene 以外の off-target gene までも切断し、変異が起きる可能性がある。ラット iPS 細胞についてはキメララット作製が報告されているが、germline transmission については現在のところ報告がない。このラット iPS 細胞も germline transmission が確認されれば遺伝子改変ラット作製に有用なツールとなることが期待される。そこで、申請者は、これらラット ES/iPS 細胞を利用し、ヒト疾患モデルラットを作製することで今後の創薬研究、再生医療、遺伝子治療などの研究に有用・必要不可欠となると考える。

2. 研究の目的

(1) これまでは樹立が困難であったラットの胚性幹細胞 (ES 細胞) あるいは ES 細胞と同等の能力を持つ induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を用いて X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) のモデルラットを作成し、その発現解析を行う。

(2) ラットはマウスの約 10 倍の大きさであることから、免疫不全ラットはヒト化ラットとしての有用性、さらにヒトあるいは異種動物の腫瘍細胞、幹細胞、臓器等の移植、遺伝子治療モデルに応用できることが期待される。そこで、作成した免疫不全ラットの有用性についても実証する。

3. 研究の方法

germline transmission を可能とするラット ES/iPS 細胞を樹立し、ラット IL2 レセプター 遺伝子 (IL2rg 遺伝子) に相同組み換え (homologous recombination) を用いて変異をおこし、X-SCID ラットを作製する。X-SCID ラットの造血系細胞を用いて表面マーカー、細胞の活性について解析し表現型を決定する。また、これらトランスジェニックラットに異種動物の細胞を移植し、移植モデルとしての有用性を検討する。さらに、レトロウイルスベクター等を用いた遺伝子治療モデルを作成する。

4. 研究成果

1) germline transmission を可能とするラット ES/iPS 細胞ラインの確定

ラット ES 細胞 (Hirabayashi ら、Mol. Reprod. Dev. 2009) および新規に樹立したラット iPS 細胞からキメララットを作成 germline transmission を確認した (図 1)。コートカラーあるいは蛍光観察から EGFP を発現しているキメララットを野生型ラットと交配し founder を作成し EGFP 発現の有無により germline transmission を確認した。germline transmission 可能なラット ES/iPS

細胞ラインを確定し、X-SCID ラット作製の細胞とした。



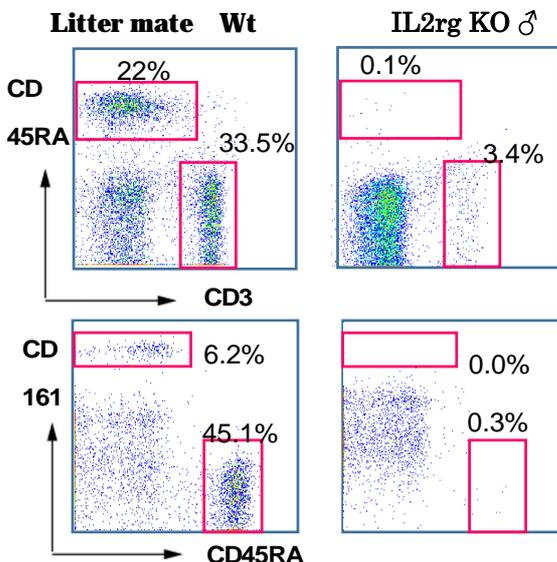
(図1)ラット iPS 細胞由来キメララットと Founder

2)ラット X-SCID コンストラクト作製および相同組み換え細胞樹立

ラット IL2rg 遺伝子のエキソン 7-8 の領域にターゲティングベクター/ネオマイシン耐性遺伝子を組み込み、変異を加えた pDNA を作製し、ラット ES/iPS 細胞にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子組み換えを行い、ネオマイシンセレクション、PCR により IL2rg 遺伝子ノックアウト細胞を樹立した。

3) X-SCID トランスジェニックラットの作製ならびに表現型および発現解析

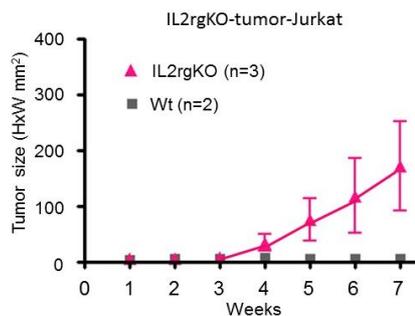
ラット IL2rg 遺伝子に変異を加えた ES/iPS 細胞を Wild type ラットの Blastocyst に injection し、キメララットを作成し、さらに Wild type ラットと交配し、X-SCID ラットを得た。SPF 環境で成体まで正常に生育し、繁殖も可能であった。表現型を末梢血で調べた結果、T cell, B cell が著しく減少し、NK cell は認められず、胸腺も著しく萎縮し低形成であったことから、免疫不全であることが確認でした(図2)。



(図2)末梢血中 T,B,NK 細胞分画

4) 腫瘍細胞皮移植

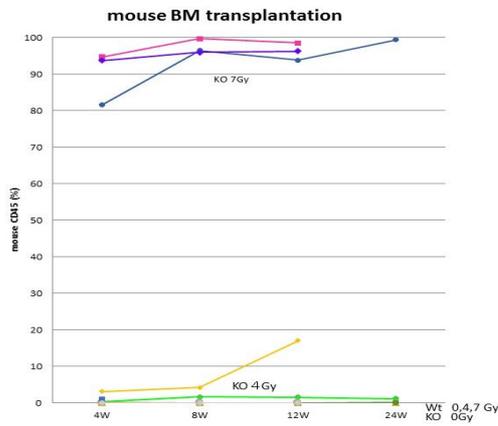
T 細胞、NK 細胞が欠損することで、移植における免疫拒絶が起きにくいことから X-SCID ラットの皮下にヒト由来腫瘍細胞を移植した結果、移植 4 週目から腫瘍形成が認められた。一方、野生型ラットでは腫瘍細胞の生着は認められなかった(図3)。



(図3)腫瘍細胞移植実験

5) 同種・異種動物の骨髄移植

アロジェニックなラットの骨髄移植を行った結果、7 Gy 放射線照射した X-SCID ラットでは、90%以上の生着が認められたが、未放射線照射群(0 Gy)では生着は認められなかった。また、野生型ラットでは、放射線照射量に関係なく生着は認められなかった。次に異種である C57BL/6 マウスの骨髄を移植した結果、7 Gy 照射群の X-SCID (KO) ラットでは、マウス移植後 20 週以降まで生着が認められ、80%以上のキメリズムであった。一方、野生型ラットでは、放射線照射量にかかわらず全く生着しなかった(図4)。



(図4)ラットへのマウス骨髄移植と放射線照射量の関係

放射線に対する感受性は、野生型と同様に 10 Gy 以下では生存に支障は認められなかった。

ヒト化ラットを作成するために、7 Gy 放射線照射した X-SCID ラットにヒト臍帯血の造血幹前駆細胞を尾静脈移植した結果、移植 4 週間後ではヒト造血細胞は生着しなかった。また、新生仔に薬剤投与しヒト臍帯血を移植したが同様に生着しなかった。X-SCID ラットにヒト臍帯血 MNC 細胞を移植した結果、24 時間後のラット末梢血で 1 - 4 % のヒト CD45 細胞を検出した。また、ヒト赤血球を大量に含む臍帯血を移植した群では移植後 3 時間では 1 % のヒト赤血球を検出したが、24 時間後には確認できなかった。ヒト造血細胞が生着するためには放射線照射だけでなくさらに処置を加える必要があると思われる。

6) X-SCID ラットを用いた遺伝子治療モデルの確立

レシピエントである X-SCID ラットに放射線照射をせずに IL2rg 遺伝子を発現させた造血細胞を移植し遺伝子治療を行うことを計画していたが、IL2rgKO の X-SCID ラットでは放射線照射しなければ同種の骨髄細胞も生着しなかったことから、一般的なレシピエ

ントに放射線照射によりニッチを空ける必要があることが確認された。

IL2rg 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを作製し、ウイルスベクターを過剰発現した X-SCID ラットの骨髄細胞を作成し放射線照射を行わずに移植できる系を確立することは今後の課題である。

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5件)

Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H, Nakauchi H., Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells.

Cell. 2013, 査読有, 154(5):1112-26.

Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y, Ema H, Takahashi S, Miyawaki A, Otsu M, Yamaguchi T, Onodera M, Nakauchi H., Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 査読有, 435(4):586-91.

Yamaguchi T, Hamanaka S, Kamiya A, Okabe M, Kawarai M, Wakiyama Y, Umino A, Hayama T, Sato H, Lee YS, Kato-Itoh M, Masaki H, Kobayashi T, Yamazaki S, Nakauchi H., Development of an all-in-one inducible lentiviral vector for gene specific analysis of reprogramming. PLoS One. 2012 査読有 7(7):e41007.

Ghosn EE, Yamamoto R, Hamanaka S, Yang Y, Herzenberg LA, Nakauchi H, Herzenberg LA. Distinct B-cell lineage commitment distinguishes adult bone marrow hematopoietic stem cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 査読有,
109(14):5394-8. Epub 2012 Mar 19.

Hamanaka S, Yamaguchi T, Kobayashi T,
Kato-Itoh M, Yamazaki S, Sato H, Umino A,
Wakiyama Y, Arai M, Sanbo M, Hirabayashi
M, Nakauchi H. Generation of
germline-competent rat induced
pluripotent stem cells. PLoS One. 2011, 査
読有 6(7):e22008.

[学会発表](計1件)

Sanae Hamanaka,

GENERATION OF GERMLINE COMPITENT RAT
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL,
ISSCR 9th Annual Meeting, June 15 - 18,
2011, Toronto, Ontario Canada

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱仲早苗 (HAMANAKA SANAЕ)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：40511415

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：