



## ブタのゲノム編集

明治大学 バイオリソース研究国際インスティテュート

渡邊 将人

### はじめに

ブタは食用家畜としての重要性に加え、様々な医学・生物学研究において必要不可欠な大型実験動物として利用が進んでいる。ブタが医学研究に適している主な理由は表1の通りである。遺伝子改変技術や発生工学技術の向上によって、ブタの利用範囲はさらに拡大しており、とりわけ医学・生物学における基礎研究の成果を臨床応用に橋渡しする研究（トランスレーショナルリサーチ）の必要性からもブタの重要性が認識されている<sup>1)</sup>。

人工ヌクレアーゼの登場により、ゲノム編集技術の利用は多くの生物種で急速に拡大している。ブタにおいてもその利用が進み、ここ数年における遺伝子改変ブタの作出に関する報告が増加してい

る。本稿では、ブタにおける遺伝子改変、人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子ノックアウトブタに関する我々の研究成果、さらにゲノム編集技術の利用・動向について紹介する。

### ブタにおける遺伝子改変

ブタにおける遺伝子改変は、1985年のDNAマイクロインジェクションによるトランスジェニックブタの作出を皮切りに、ICSI-mediated gene transfer法、ウイルスを用いた方法など多くの遺伝子導入技術が開発されてきた<sup>2)</sup>。これに対して、遺伝子ノックアウト個体の作出には、マウスでは胚性幹（ES）細胞を用いた相同組換えが利用されてきたが、ブタではES細胞がなくマウスと同様のアプローチは使えなかった。ブタに

表1 実験動物としてのブタの有用性

- 1) ヒトの臓器の大きさと類似している
- 2) 血液生化学値や電解質など生理学的にヒトに似ている
- 3) 雑食性であり、多産である（1回の分娩で10頭程度）
- 4) ヒトと同じ外科的処置・術具が利用可能である
- 5) 多くの採血が可能である

における遺伝子改変技術の大きなブレイクスルーは2000年の体細胞核移植技術(体細胞クローニング)の確立と言える<sup>3)</sup>。体細胞核移植は、直接的な遺伝子改変技術ではないが、核ドナー細胞へあらかじめ遺伝子改変(遺伝子導入やノックアウト)をすることで、目的の遺伝子型を有する個体を確実に作出することができる技術である(図1)。しかしながら、体細胞での相同組換えを利用した遺伝子ノックアウトは効率が極めて低く、ノックアウトブタの作出はゲノム編集が登場するまで極めて少なかった。こうした状況の中、2009年人工ヌクレアーゼであるZFN(Zinc finger nuclease)を用いたノックアウトラットの作出が報告された<sup>4)</sup>。その後、我々はブタ細胞においてZFNによる遺伝子ノックアウトが可能であることを世界にさきがけて報告し<sup>5)</sup>、ZFNを用いて免疫不全(SCID)ブタの作出に成功した<sup>6)</sup>。ZFNに続き、TALEN(Transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9)が第二、第三のゲノム編集ツールとして登場し、さらに効率的なノックアウトブタ作出の道が開けた。現在では、ゲノム編集技術はヒトの病態を模倣した疾患モデルブタ<sup>7)</sup>、異種移植ドナーブタ<sup>8)</sup>、そして臓器再生に利用する臓器欠損ブタ<sup>9)</sup>など多くの医学研究用ブタの開発に利用され、さらに農業(畜産)への応用を視野に入れたブタの作出にも利用されている<sup>10)</sup>。

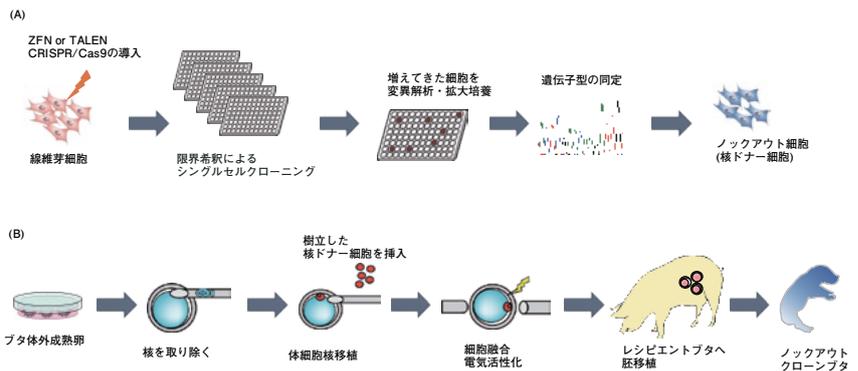


図1 体細胞核移植によるノックアウトブタの作出過程  
(A) 核ドナー細胞の樹立。(B) 体細胞核移植によるクローンブタの作出。(日動協ホームページ、LABIO21 カラーの資料の欄を参照)

### ゲノム編集によるノックアウトブタの作出方法

これまでノックアウトブタの作出には、体細胞核移植による方法がとられてきた。最近では、齧歯類と同様に Cytoplasmic injection 法、さらに受精卵へのエレクトロポレーション法なども報告され<sup>11)</sup>、ブタにおいても作出方法の選択肢が増えている。cytoplasmic injection 法は非常に簡便であるが、目的の遺伝子型が得られるかは、実際に個体を作成して初めて明らかになる。また、モザイク(複数の異なる遺伝子型をもつ細胞が一個体内で混在する状態)個体が発生することもノックアウト動物の利用上の問題となる。特に、変異が導入された細胞とされていない細胞が混在するモザイク個体の場合は、表現型(病態)の発現が不安定となる可能性がある。さらに、複数の変異タイプの生殖細胞が作られる場合があり、その様な個体を繁殖に用いた場合、望んだ遺伝子型をもつ個体を次世代で選択する作業は、非常に多くの時間・労力・費用を要する。このことは妊娠期間の長い大型動物の生産において特に問題となる。これに対し体細胞核移植法は、核ドナー細胞へあらかじめ望んだ遺伝子改変

を施しておくため、目的の遺伝子型をもつ個体のみを確実に作出でき、モザイク個体の発生もない。こうした背景から、我々をはじめ多くの研究グループが体細胞核移植によりノックアウトブタを作成してきた。近年登場したCRISPR/Cas9は、ZFNやTALENに比べ簡便だけでなく、変異導入効率は著しく改善されたこともあり、ノックアウトブタの作出に大きな変革をもたらす可能性がある。CRISPR/Cas9の登場後、cytoplasmic injection法はワンステップでノックアウトブタを作成する有望な方法として期待される。しかしながら、CRISPR/Cas9においてもモザイクの問題は依然として解決しておらず、体細胞核移植による遺伝子改変ブタの作出は現在も堅実な方法と考えられる。

### 遺伝子ノックアウトによる医学研究用ブタの作出

#### 1) 疾患モデルブタの開発

我々は種々の疾患モデルブタの作出に取り組んでいる。本稿では常染色体優性遺伝病であるマルファン症候群のモデルブタを紹介する。マルファン症候群は結合組織の異常により、骨格系・心臓血管

系に病変が認められ、我が国では約2万人の患者がいると言われていいる。我々はFBN1遺伝子に対するZFNを用いて、体細胞核移植によりFBN1ノックアウトブタの作出を行った<sup>7)</sup>。核ドナー細胞の樹立では、ブタ線維芽細胞へZFNをコードするmRNAをエレクトロポレーションにより導入した(図1)。人工ヌクレアーゼを導入後、細胞を低温で培養することにより、変異誘導効率が上がることが報告されており<sup>12)</sup>、この低温処理(Transient cold shock)はブタ細胞においても有効である。得られたFBN1ノックアウトブタでは、脊椎側湾、漏斗胸、骨の石灰化遅延といった骨格系の異常、そして近位胸部大動脈血管壁における弾性板の断裂といったマルファン症候群患者と同様の病態が確認された(図2)。

## 2) 異種移植ドナーブタの開発

臓器移植医療における臓器ドナー不足の解決策として、ブタの臓器を利用する異種移植が挙げられる。異種移植の実現において、第一にブタが持つ異種抗原の除去が必要となる。ブタにおける体細胞核移植技術の確立後、初めて作出された遺伝子改変クローンブタが、超急性拒絶反応の原因となる異種抗原(*a* Gal)を除去したGalTノックアウトブタであったことは異種移植研究への期待の高さを示している<sup>13)</sup>。我々はGalTノックアウトに加えて、第二の異種抗原として知られるH-D(Hanganutziu-Deicher)抗原を除去するため、その合成に関わるCMAH遺伝子をTALENによりノックアウトしたブタを作出した<sup>8)</sup>。CMAHノックアウトブタの臓器

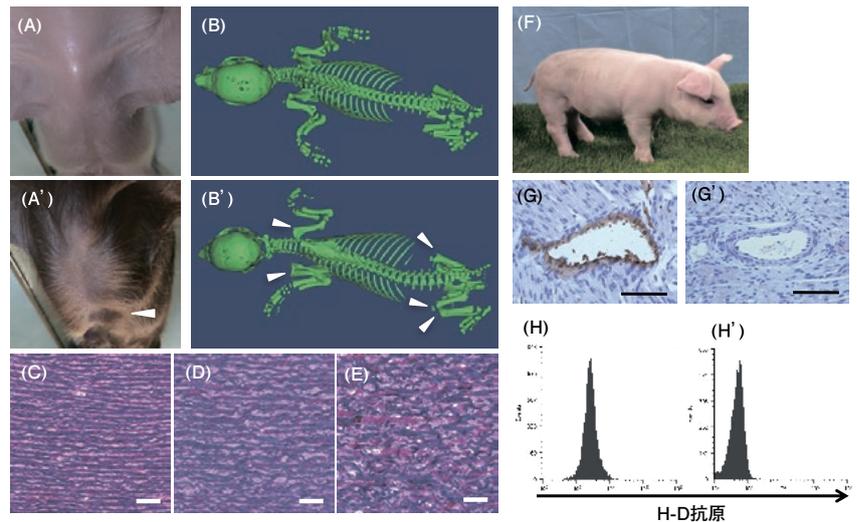


図2 ゲノム編集技術により作出した医学研究用ブタの表現型  
WTブタ(A)とFBN1ヘテロノックアウトブタ(A')の胸部写真。A'では漏斗胸が観察された(白矢頭)。WTブタ(B)とFBN1ヘテロノックアウトブタ(B')のCTイメージ像。B'では骨端の石灰化遅延が起きている(白矢頭)。上行大動脈血管壁のエラスチカワングーソン染色像(C: WT、D: FBN1ヘテロノックアウト、E: FBN1ホモノックアウト)。D、Eでは、上行大動脈血管壁の弾性線維の断絶および不連続性が見られ、特にEではより重篤な症状を呈している。Bar: 40  $\mu$ m。(F) 作出したCMAHノックアウトブタ。心臓におけるH-D抗原の免疫染色(G: Control、G': CMAHノックアウト)。Bar: 100  $\mu$ m。リンパ球のFACS解析(H: Control、H': CMAHノックアウト)。CMAHノックアウトブタではH-D抗原の発現は観察されない。文献7、8より転載。(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

では、H-D抗原が検出されないことを確認した(図2)。異種移植ドナーブタの開発では、拒絶反応の問題に加え、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)による感染症も懸念されている。PERV遺伝子はブタゲノムに数十コピー散在するため、そのノックアウトは困難と思われてきたが、CRISPR/Cas9により全てノックアウトしたという驚くべき報告がScience誌に掲載された<sup>14)</sup>。異種移植に関する指針が2016年に見直され、我が国でもいよいよブタ臍島をヒトへ移植する医療が現実になろうとしており、ゲノム編集技術は異種移植研究を大きく前進させるだろう。

## ブタ細胞への遺伝子ノックイン

上述のノックアウトブタはNHEJ(非相同末端結合)によるDNA修復に伴う偶然の挿入・欠失変異に依存したノックアウト

である。より忠実な病態を模倣する疾患モデルとして、ヒトの変異遺伝子をノックインしたブタやssODN(一本鎖オリゴ)のノックインによるヒトと同じ遺伝子変異(特に点変異)を有するブタの作出が今後重要となる。そこで、先ず我々はブタROSA locusにEGFP遺伝子と薬剤耐性遺伝子を有するCAG-EGFPpuro(約3.6kb)のノックインを試みた。これに約900bpのホモロジーアームを連結したドナーベクターとgRNA/Cas9をブタ線維芽細胞へ導入した。得られた12の細胞クローンのうち、junction PCRにより11クローンでノックインが確認され、CAG-EGFPpuroが正確に挿入されていることを確認した(図3)。

次に、遺伝性疾患の多くは遺伝子の点変異(一塩基置換)によるものが多いことから、点変異

により非蛍光化したタンパクを発現するブタ線維芽細胞を利用し、CRISPR/Cas9により ssODN のノックインを試みた。ssODN がノックインされた細胞では蛍光が回復し、ssODN のノックインによる点変異の置換 (修復) が確認された (図3)。ブタ細胞においても容易にノックインが可能となり、今後、効率的にノックインブタの作出も可能となるだろう。ノックイン技術の進歩も目覚ましく、より長鎖の配列を導入する lssODN 法や 2H2OP 法が開発され<sup>15)</sup>、改変できる遺伝子サイズの拡大や効率化が進んでいる。

おわりに

本稿では、疾患モデルブタや異種移植研究用ブタを紹介したが、ゲノム編集技術は臓器再生研究にも大きく貢献することが期待される。我々はブタ体内環境を利用して、胚盤胞補完法によるヒトの臓器の再生にも取り組んでいる<sup>16)</sup>。実際、臍臓形成のマスター遺伝子である PDX1 遺伝子を TALEN によりノックアウトすることにより、臍臓が形成されないブタの作出に成功している<sup>9)</sup>。人工ヌクレアーゼが登場する前は、こうしたノックアウトブタの作出に数年の歳月を必要とした。現在ではゲノム編集技術により半年足らずで遺伝子ノックアウトブタの作出が可能となり、今後さらに様々なゲノム編集ブタ (Genome-edited pig) の作出・利用が加速することは想像に難くない。

ゲノム編集ツールの開発により、多くの生物種で遺伝子改変が簡便で効率的に可能となり、遺伝

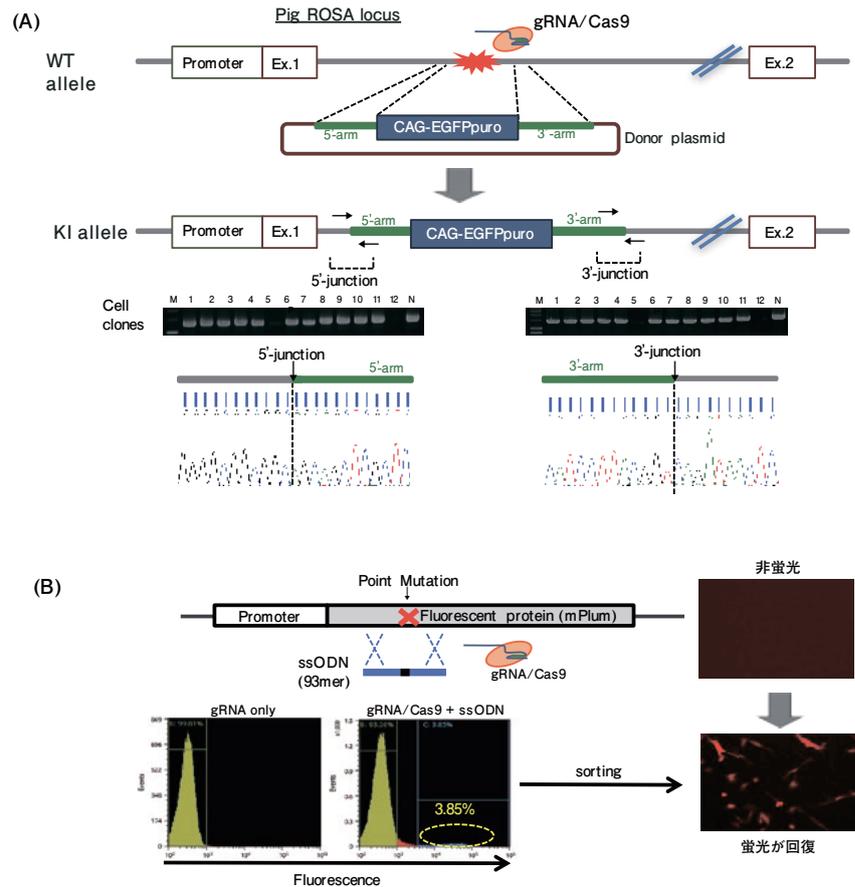


図3 ブタ細胞への遺伝子ノックイン (A) ブタ ROSA locus へのターゲティングベクター (CAG-EGFPpuro) のノックイン。DNA シークエンス解析により、標的部位にドナー DNA が正確にノックインされていることが確認された。(B) ssODN を用いたノックイン。ノックイン前の細胞では点変異により蛍光は観察されないが、KI された細胞は点変異が ssODN のノックインにより蛍光が回復している。FACS 解析により約 4% の細胞で蛍光が確認された。(日動協ホームページ、LABIO21 カラーの資料の欄を参照)

子改変の新時代に突入したことは間違いない。これに付随して生じる恐れのある安全上そして倫理上の問題に対し、多くの議論により慎重な取り扱いが必要となることは言うまでもないが、ゲノム編集技術はあらゆる生物を対象とした研究分野の発展に大きく貢献する革新的技術と言えるだろう。

引用文献

- 1) Matsunari H & Nagashima H: J Reprod Dev, 55: 225-230, 2009
- 2) Dmochewitz M & Wolf E: Animal Frontiers, 5: 50-56, 2015
- 3) Polejaeva IA, et al: Nature, 407: 86-90, 2000
- 4) Geurts AM, et al: Science, 325: 433, 2009
- 5) Watanabe M, et al: Biochem Biophys Res Commun, 402: 14-18, 2010
- 6) Watanabe M, et al: PLoS One, 8: e76478, 2013
- 7) Umeyama K, et al: Sci Rep, 6: 24413, 2016
- 8) Miyagawa S, et al: J Reprod Dev, 61: 449-457, 2015
- 9) Nagashima H & Matsunari H: Theriogenology, 86: 422-426, 2016
- 10) Rao S, et al: Mol Reprod Dev, 83: 61-70, 2016
- 11) Tanihara F, et al: Sci Adv, 2:e1600803, 2016
- 12) Doyon Y, et al: Nat Methods, 7: 459-460, 2010
- 13) Lai L, et al: Science, 295: 1089-1092, 2002
- 14) Yang L, et al: Science, 350: 1101-1104, 2015
- 15) Yoshimi K, et al: Nat Commun, 7, 10431, 2016
- 16) Matsunari H, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 110: 4557-4562, 2013