



慶應義塾大学

明治大学

TEL: 03-3296-4330

(経営企画部広報課)

慶應義塾大学医学部

TEL: 03-5363-3611

(信濃町キャンパス総務課)

報道関係各社 各位

遺伝性疾患・マルファン症候群の原因となる

FBN1 遺伝子変異を有するブタの作出に成功

研究成果のポイント

- 人工酵素・ジンクフィンガーヌクレアーゼ^{注1}と体細胞核移植法^{注2}を組み合わせた効率的な方法で、フィブリリン1 (FBN1) 遺伝子を破壊したブタを作ることに成功。
- 解剖学的、生理学的にヒトと類似しているブタを用いてヒトのマルファン症候群に類似した病態モデルができた事で、新たな治療法開発、特に外科的手技を伴う治療法開発に大きく寄与することが期待される。

明治大学の梅山一大特任准教授と長嶋比呂志教授、慶應義塾大学医学部の松本守雄准教授の研究グループは、人工酵素と体細胞核移植を組み合わせた方法により、マルファン症候群の原因となる FBN1 遺伝子変異を有するブタを作ることに成功しました。

本研究成果は、2014年5月15日から札幌市で開催される、第61回日本実験動物学会総会で発表されます。

＜研究の背景と経緯＞

マルファン症候群は約 5,000 人～10,000 人に 1 人の確率で発症する常染色体優性遺伝の疾患で、日本には約 2 万人の患者がいると言われています。身体の結合組織に影響を与え、多岐にわたる臓器で病変が現れます。特に心臓血管系では、大動脈の基部にあるバルサルバ洞で主に起こる進行性の大動脈拡張は、大動脈解離や大動脈破裂に至るマルファン症候群患者の主要死亡原因となっています。さらに骨格系では、長身、痩身、長い手足、クモ状指症、胸郭変形(鳩胸、漏斗胸)、脊柱側弯、高口蓋、慢性の関節弛緩等の症状が確認されています。その他に、水晶体脱臼や近視などの視覚系の病変、皮膚の伸展線条、再発性のヘルニア、気胸等の病変が現れます。

この病気を起こす原因として、結合組織の構成要素の1つである fibrillin-1 タンパク質をコードする FBN1 遺伝子の変異が報告されています。fibrillin-1 は 2871 アミノ酸から構成される分子量 350 kDa の糖タンパク質であり、細胞外微小繊維の主要な構成成分です。この糖タンパク質は皮膚、肺、腎、血管、軟骨、腱、筋肉、角膜、毛様体小帯などの多くの組織において細胞外基質の1つとして分布しています。

これまでも FBN1 遺伝子を破壊した遺伝子改変マウスが作出され、マルファン症候群の病因解明や治療法の開発に役立ってきました。しかし、心臓・血管組織や骨格に現れたマルファン症候群の病変に対する外科的手技を伴う治療法の開発では、マウスのようなげっ歯類などの小動物はモデル動物として不十分でした。ヒトのマルファン症候群の心臓・血管病変や骨格病変と類似した表現型をもつ大動物モデルが作出できれば、その大型モデル動物はマルファン症候群に対する新たな治療法開発に大きく寄与できると考えられてきました。

ブタは解剖学的、生理学的、血液学的にヒトへの類似性が高いことから、ヒトに近い知見を得られる実験動物として用いられています。これまでも糖尿病や重症複合型免疫不全症など、ヒトの病気を再現する病態モデルブタが遺伝子組換え技術と発生工学技術により作出されてきました。そこで今回、人工酵素・ジンクフィンガーヌクレアーゼと体細胞核移植法を用いてブタ *FBN1* 遺伝子をノックアウト^{注3)}したクローンブタを作出し、マルファン症候群の病態と同じ症状が現れるのかを調べました。

< 研究の内容 >

FBN1 遺伝子を切断するジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする mRNA を合成し、これを体細胞であるブタ皮膚由来の線維芽細胞へ導入しました。線維芽細胞に入った mRNA は *FBN1* 遺伝子に対するジンクフィンガーヌクレアーゼに翻訳され、*FBN1* 遺伝子を切断します。*FBN1* 遺伝子がノックアウトされた細胞からクローニングによりクローン細胞株を樹立し、さらにそこから個体作出に適した *FBN1* ヘテロノックアウト核ドナー細胞株を選択します。最後に体細胞核移植法を実施し、*FBN1* ヘテロノックアウトクローンブタが8頭誕生しました(右図)。

作出した *FBN1* ヘテロノックアウトクローンブタの表現型(形質)として、骨格系については口蓋形成異常、漏斗胸、骨の石灰化の遅延を示す個体が確認されました。心臓血管系については、近位胸部大動脈血管壁において、中膜組織の弾性板が断裂した不連続な構造をしている個体が確認されました。これらは、ヒトのマルファン症候群で確認される病態です。一方で、特段の病理学的・生理学的異常を示さなく性成熟期以後にまで成長する個体も確認されました。

作出した *FBN1* ヘテロノックアウトクローンブタはクローン集団であるので、同一の遺伝子変異を持っています。しかし、これらのブタの病態は均一でなく、様々な部位で様々な重症度の病態を示しました。この現象は、同一の遺伝子変異を有している家族性のマルファン症候群で確認される病態の個体間差と一致しています。おそらく、エピジェネティック因子^{注4)}の影響により正常 fibrillin-1 タンパク質の発現量に違いが出てきていると考えられます。

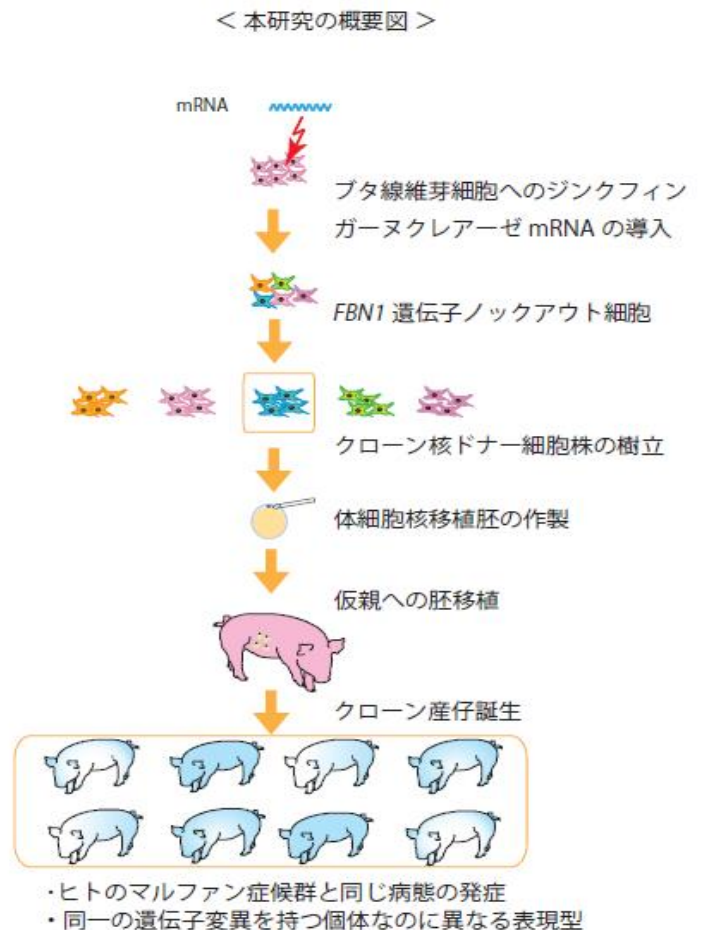
以上の結果から、本研究グループが作出した *FBN1* ヘテロノックアウトクローンブタはヒトのマルファン症候群の病態に類似した表現型を引き起こす事が明らかとなりました。

< 今後の展開 >

本研究で作出された *FBN1* ヘテロノックアウトクローンブタはヒトのマルファン症候群の病態に類似した表現型を引き起こした事から、マルファン症候群の病因解明や治療法の開発、特に心臓・血管組織や骨格に現れる側弯症などの病変に対する外科的手技を伴う治療法の開発に大きく貢献すると考えられます。

今後は解析頭数を増やし、どのような病態を現す個体が誕生するのかを調べ、さらに、病態の発現部位、

< 本研究の概要図 >



病態の重症度をコントロールする因子の解析を進めていく予定です。病態をコントロールする因子の研究はマルファン症候群の治療法開発、病態発症を抑制する方法の開発にも貢献すると期待されます。

<用語解説>

注1)ジンクフィンガーヌクレアーゼ

ジンクフィンガーと呼ばれるDNAに結合する性質を持つたんぱく質のドメインと、ヌクレアーゼと呼ばれるDNAを切断するハサミの役割を果たすたんぱく質のドメインから成る人工酵素。ジンクフィンガードメインは任意のDNA配列を認識するように改変が可能であり、これによってジンクフィンガーヌクレアーゼが複雑なゲノム中の特定の遺伝子を標的とし、DNAを切断することができる。DNA切断後は、生体が持つDNA修復機構を利用して再度つなぐことで、ゲノムDNAを自在に切り繋ぎし編集することができる。2009年、世界で初めてジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた遺伝子ノックアウトラットが作製されて以降、マウス、ブタ、ウサギなど、様々な動物種において遺伝子ノックアウト動物が作出されている。

注2)体細胞核移植法

核を除いた未受精卵へ体細胞の核を移植(融合)することによって初期胚(体細胞核移植胚)を作製する技術。この初期胚を代理母の子宮に移植すると妊娠が成立し、クローン個体が誕生する。誕生した子は、元の体細胞の核と同一の遺伝情報を持つ。1996年に世界で初めて体細胞クローンヒツジの「ドリー」が誕生。

注3)ノックアウト

遺伝子の機能を欠損させる遺伝子工学技術の1つ。遺伝子ノックアウトは相同組み換えによる方法、最近ではジンクフィンガーヌクレアーゼなどの遺伝子編集ツールを用いて行うことにより可能である。特定の遺伝子を不活性化させ、正常個体と比較することで、その遺伝子の機能を推定することができる。遺伝子ノックアウト動物は、遺伝子ノックアウトの技法によって1個以上の遺伝子が無効化された動物であり、疾患原因の解明、治療法の開発などに大きく貢献している。

注4)エピジェネティック因子

ゲノムの遺伝情報を変化させずに、個体発生や細胞分化の過程における遺伝子発現を制御する因子。遺伝子発現を調整するDNAのメチル化因子やヒストンの科学的修飾等に関わる因子が該当する。

<研究に関するお問い合わせ先>

明治大学

梅山 一大(ウメヤマ カズヒロ)
バイオリソース研究国際インスティテュート 特任准教授
〒214-8571 川崎市多摩区東三田 1-1-1
Tel:044-934-7165(直)
Tel/Fax:044-934-7824
Email:umeyama@isc.meiji.ac.jp

慶應義塾大学

松本 守雄(マツモト モリオ)
医学部 整形外科学教室 准教授
〒160-8582 新宿区信濃町 35
Tel:03-5363-3812(直)
Fax:03-3353-6597
Email:morio@a5.keio.jp