

### <研究の背景と経緯>

マルファン症候群は約 5,000 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。この病気を起こす原因として、結合組織の構成要素の1つであるフィブリリン1遺伝子 (*FBN1*) の変異が報告されています。本疾患は結合組織の強度が弱くなる疾患で、その臨床症状(病状の現れる臓器とその重症度)は患者によって異なります。心臓血管系では、胸部大動脈の基部にあるバルサルバ洞で起こる進行性の大動脈拡張は、大動脈解離や大動脈破裂を起こす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、胸郭変形(鳩胸、漏斗胸)、脊柱側弯症、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、水晶体転位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。

これまでも *FBN1* に変異を有する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。ブタは解剖学的、生理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注目されています。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。

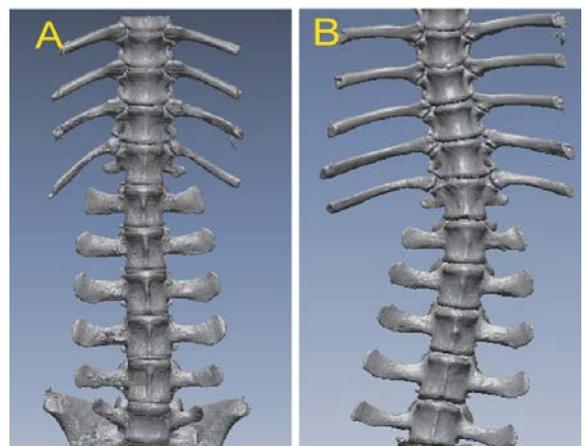
### <研究の内容>

ジンクフィンガーヌクレアーゼを使って雄性ブタ胎仔線維芽細胞の *FBN1* に変異を加え、ヘテロ変異 *FBN1* クローン細胞株を樹立しました。この細胞株を用いて体細胞核移植法によりヘテロ変異 *FBN1* クローンブタを作出しました。

作出したヘテロ変異 *FBN1* クローンブタの表現型(形質)として、骨格系については脊椎側弯症、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、上行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、マルファン症候群の症状を示すことなく、性成熟期以後にまで成長する個体も確認されました。

マルファン症候群は、家系内においても臨床症状が異なる事が知られています。本研究で作出したヘテロ変異 *FBN1* クローンブタはクローン集団であるので、同一の遺伝子変異と同一の遺伝的背景を持っています。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。本研究から、遺伝子の変異だけでなく、エピジェネティック因子がマルファン症候群の臨床症状に影響を与える可能性が示されました。

続いて、性成熟期迄成長したヘテロ変異 *FBN1* クローンブタを種豚として、後代産仔を作出しました。変異 *FBN1* はメンデルの法則に従って後代産仔に伝達され、マルファン症候群の病態(脊椎側弯症、動脈壁弾性板の断裂)を発



ブタ脊椎の CT 画像

(A)正常ブタの脊椎。(B)脊椎側弯症を発症したブタの脊椎。

症する個体が確認されました。さらに、ホモ変異 *FBNI* ブタを作出した結果、重篤な動脈弾性板の断裂、上行大動脈の拡張、動脈解離、水晶体転位、リポジストロフィー等のマルファン症候群で確認される病変が確認されました。

以上の結果から、本研究で作出した変異 *FBNI* を有するブタの系統はヒトのマルファン症候群の病態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変異 *FBNI* を有するブタの系統は、マルファン症候群の治療法の開発、特に骨格に現れる脊椎側弯症や心臓・血管組織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。

今後は病態の発現部位、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>

##### ジンクフィンガーヌクレアーゼ

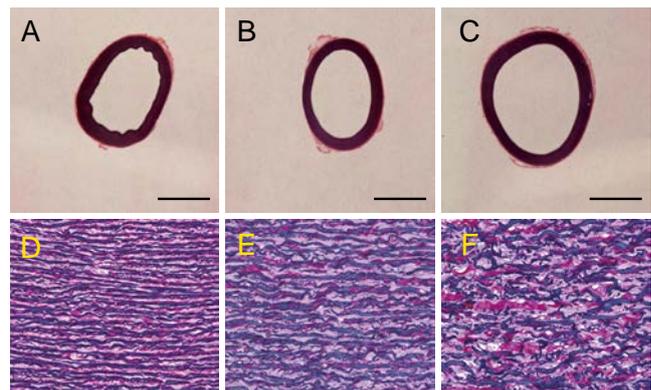
ジンクフィンガーと呼ばれるDNAに結合する性質を持つたんぱく質のドメインと、ヌクレアーゼと呼ばれるDNAを切断するハサミの役割を果たすたんぱく質のドメインから成る人工酵素。ジンクフィンガードメインは任意のDNA配列を認識するように改変が可能であり、これによってジンクフィンガーヌクレアーゼが複雑なゲノム中の特定の遺伝子を標的とし、DNAを切断することができる。DNA切断後は、生体が持つDNA修復機構を利用して再度つなぐことで、ゲノムDNAを自在に切り繋ぎし、編集することができる。現在、ジンクフィンガーヌクレアーゼに続いて TALEN、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術が開発され、様々な動物種において遺伝子編集動物が作出されている。

##### 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。

##### 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。



ブタ上行大動脈の断面図と病理組織像

同日齢の(A)正常ブタ(体重 8.8kg)、(B)ヘテロ変異ブタ(体重 7.1kg)、(C)ホモ変異ブタ(体重 4.4kg)の上行大動脈の断面図。(D)正常ブタ、(E)ヘテロ変異ブタ、(F)ホモ変異ブタの上行大動脈中膜の病理組織像。スケールバー: 5 mm (A-C), 40  $\mu$ m (D-F)。

<原著論文情報>

K. Umeyama, K. Watanabe, M. Watanabe, K. Horiuchi, K. Nakano, M. Kitashiro, H. Matsunari, T. Kimura, Y. Arima, O. Sampetean, M. Nagaya, M. Saito, H. Saya, K. Kosaki, H. Nagashima, M. Matsumoto. "Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts". Scientific Reports, 2016, doi: 10.1038/srep24413.

<謝辞>

本研究は JSPS 科研費 15H02480、24390357 の助成を受けて実施されました。

<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@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 教授  
〒160-8582 新宿区信濃町 35  
Tel: 03-5363-3811(直)  
Fax: 03-3353-6597  
Email: morio@a5.keio.jp

<取材・リリースに関するお問い合わせ>

**明治大学**

経営企画部 広報課: 國井  
〒101-8301 東京都千代田区神田駿河台 1-1  
Tel: 03-3296-4330 FAX: 03-3296-4087  
Email: koho@mics.meiji.ac.jp

**慶應義塾大学**

信濃町キャンパス総務課: 谷口・吉岡  
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35  
Tel: 03-5363-3611 FAX: 03-5363-3612  
Email: med-koho@adst.keio.ac.jp