

バイオテクノロジー利用による新しいモデル動物の開発

東 條 英 昭

富山医科薬科大学動物実験センター

はじめに

これまでのモデルマウス、取り分け、自然発症疾患モデルのほとんどは、偶然に発見された自然変異個体や、ある特定の形質、たとえば、高血糖を表現するもの同士を系代交配し、その特定形質を遺伝的に固定する手段で開発されてきた。このようなモデルは、これまでに、ヒト疾患の病因や病態を解析する上で多大な貢献をしてきた。しかしながら、疾患モデルの解析から得られた知見がどれだけヒトに適用できるかどうか、また、ヒトと同じ分子レベルの異常に基づいているかどうかについては、依然として残された課題であった。ところが、この十数年間におけるいわゆるバイオテクノロジーの目ざましい進展によって、従来の生殖生理学的な手段では決して得ることのできない新しいモデルマウスを作り出すことが可能となった。その第一のモデルが、以前から利用されているキメラマウスであり、第二のモデルが、外来性遺伝子を導入した Tg マウスである。これらのモデルは、近年、発生・分化、免疫、癌、遺伝病、老化などの研究課題を分子レベルで解明してゆくためには、不可欠のものとなってきている。

1. キメラマウス

Tarkowski (1960年) や Mintz ら (1961年) が、胚集合法によってキメラマウスをはじめて作出して以来、すでに30年近くになる。その間、キメラマウスによる研究が精力的に行なわれ、発生・分化、癌、遺伝病、免疫、性の決定などの分野で数多くの重要な知見が得られた。そのため、キメラマウスによる主な研究は、ほとんどやり尽くされたと語る研究者もいるくらいである。しかし、その間、単為発生の誘発、胚への細胞注入、遺伝子の導入、核移植などの胚を操作する新しい技術が、つぎつぎと開発されてきた。したがって、今後、これらの技術をキメラ作製に取り入れた新たな研究の展開が期待されている。その一例として、Surain ら (1987年) は、胚の単為発生や核移植の技術を組み合わせて作製したキメラ胚の解析から、哺乳類の個体発生には、同一細胞内に雌雄両方のゲノムの存在が不可欠であるという染色体の imprinting 現象を証明した。また、Garduer (1968年) によって開発された胚盤胞へ細胞を注入するキメラ作製法は、その後、Evans and Kaufman, Martin (1981年) によって樹立された胚性幹細胞における相同組換え現象を利用した遺伝子欠損マウスの作製法へと発展した。

2. トランスジェニックマウス

Gordon ら (1980年) が開発した DNA を受精卵の前核に直接注入する遺伝子導入技術によって、ある特定の遺伝的形質を個体レベルで発現させることが可能となった。この遺伝子導入技術の利用によって、医学上重要な研究課題である癌、遺伝病、自己免疫疾患、各種成人病などの発症機構を分子レベルで探ることが可能となった。以下では、Tgマウスによる幾つかの研究を概観し、今後の展

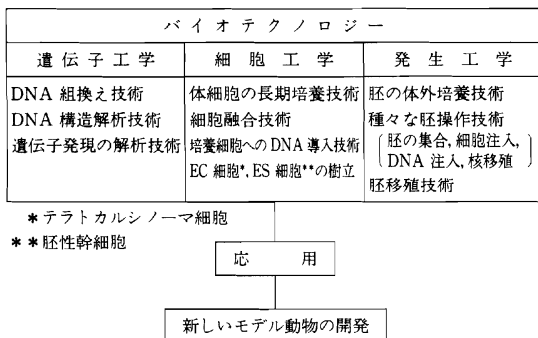


図1 バイオテクノロジー利用による新しいモデル動物の開発

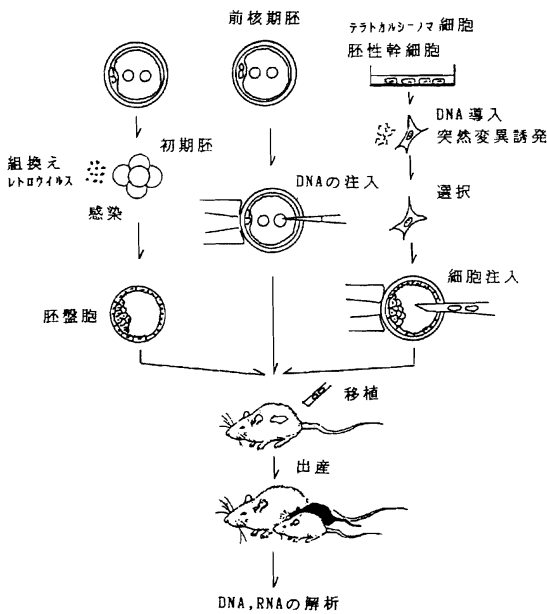


図2 トランスジェニックマウスの各種作業法

開について考えてみたい。

1) 癌

1979年に、ヒト癌細胞から、はじめて活性癌遺伝子が検出されて以来、これまで50近いウイルス性や細胞性の癌遺伝子(オンコジーン)が分離されている。その後の研究から、これらの癌遺伝子は、正常細胞で正常に機能している遺伝子、すなわち、癌原遺伝子(プロトオンコジーン)の突然変異によるものであることが判明した。さらに、このような癌遺伝子の多くは、細胞の増殖・分化に関与する遺伝子に由来することも判ってきた。一方、最近になって、発癌に対し抑制的な機能を持つ癌抑制遺伝子の存在が明らかにされ、ショウジョウバエの神経芽細胞腫の原因遺伝子(*l(2)gl*)とヒト網膜芽細胞腫の遺伝子(*Rb*)が癌抑制遺伝子として単離されている。ところで、これらの癌遺伝子や癌原遺伝子の上流に、他の遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域を連結してマウスに導入すれば、ほぼ、特定の組織で癌を高い頻度で誘発させることができる。このような遺伝子を導入したTgマウスの解析から、当初、疑問視されていた単一の癌遺伝子の導入だけでも、充分癌を誘発させることが判った。これまでの研究から、

癌遺伝子の産物が細胞の癌化を誘発することは、ほぼ一般に受け入れられている事実であるが、導入した癌遺伝子(*myc*, 活性*ras*)が発現していても、細胞が癌化しない場合や、初代Tgマウスでは発癌がみられなかったのに、次世代で癌が発生する結果が得られ、癌遺伝子の種類により癌化に関与する様相が異なることが明らかとなった。一方、癌遺伝子産物の産生に続いてどのような過程を経て細胞が癌化してゆくかはまったく不明である。したがって、今後の課題は、癌化に関与する癌遺伝子以外の要因(癌抑制遺伝子を含む)を探査することであり、そのためには、さらに多くの癌関連遺伝子を導入したTgマウスによる解析が必要であろう。なお、このような癌遺伝子を導入したTgマウス(*onco mouse*)は発癌物質に対し極めて鋭敏であるため、これまでの発癌試験において使用される被験物質の量が、通常、ヒトが暴露される量をはるかに上まわるという欠点を軽減する上でも優れたモデルであり、その利用が大いに期待される。

2) 遺伝病及び遺伝子治療

突然変異遺伝子の産物が発症の原因となるヒト遺伝病のモデルとして、変異遺伝子を導入したTgマウスが作製されている。たとえば、家族性アミロイドニューロパチーは、全身の細胞外組織にアミロイドタンパク(不溶性繊維物質)が沈着し、末梢神経や自律神経の障害を呈するヒト常染色体優性遺伝病の一つであるが、この原因物質をコードしている変異トランスサイレチレン(*TTC*)遺伝子を導入したTgマウスが作製されている。このTgマウスの解析から、末梢神経や脳以外の組織でアミロイドの沈着があった個体では、発症がみられないという結果が得られている。したがって、当疾患とアミロイド沈着とのより直接的な因果関係を探るためには、*TTC*遺伝子が脳組織で高い発現を示すTgマウスの作出とその解析が必要である。

また、ヒトのダウン症は、第21番染色体のトリソミーによってもたらされる疾患であるが、その病因の一つとして、この染色体上にあるスーパーオキシドジムスターゼ(*SOD*)遺伝子の関与が(*SOD*の過剰生産)が示唆されている。しかし、この*SOD*

遺伝子を導入した Tg マウスの解析から、脳組織中の SOD 活性が正常マウスの最高 6 倍にまで達した Tg マウスでも、とくに異常が観察されなかったため、他の要因の関与が示唆されている。一方、遺伝子導入によって劣性遺伝病のモデルを作製するためには、病因遺伝子の機能を欠損した個体を得なければならない。それには、アンチセンス DNA を導入する手段と胚性幹細胞における相同組換え現象を利用してキメラマウスを作る手段とがある。

アンチセンス DNA を導入する方法は、内在する標的遺伝子（センス DNA）の転写物（センス RNA）と、導入されたアンチセンス DNA からの転写物（アンチセンス RNA）とが結合し、センス RNA (mRNA) の翻訳を阻害し、標的遺伝子の欠損に相当する表現型を期待するものである。その例として、シバラーマウス (shi/shi) における震戦の発症原因を探る目的で、マウス塩基性ミエリンタンパク (MBP) 遺伝子に対するアンチセンス MBP を導入した Tg マウスが作製された。得られた Tg マウスの中に震戦を呈する個体が出現し、それらの個体では、内在 MBP 遺伝子からの mRNA および MBP が、正常マウスに比べ著しく低いことが認められ、震戦の発症原因が MBP 遺伝子の突然変異によるものであることが証明された。

もう一つの手段は、標的遺伝子と構造が相同な遺伝子を胚性幹細胞に導入し、導入遺伝子と宿主遺伝子との間で相同的遺伝子組換えを起こさせ、ついで、この細胞を胚盤胞に注入しいったんキメラマウスを作製する方法である。もし、注入した細胞が生殖細胞へ分化していれば、つぎに、通常

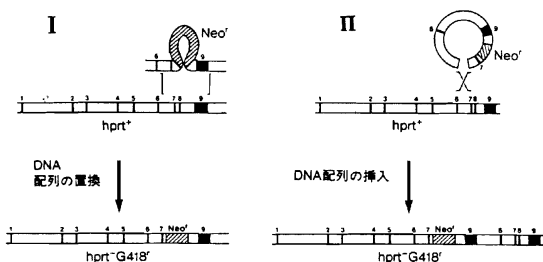


図 3 相同組換えによる hprt 遺伝子の破壊
(I) 置換型遺伝子, (II) 挿入型遺伝子

のマウスと交配することによって、次世代で遺伝子欠損マウスが得られることになる。この相同組換え現象を受精卵で起こさせるのが理想であるが、今のところ、その確率が 10^{-6} 程度であるため、受精卵には適用できない。しかし、最近、相同組換え現象に関与する酵素の存在が明らかになってきており、近い将来、精製された組換え酵素を DNA とともに胚に注入し、胚で直接、高頻度に相同組換えを起こさせることも夢ではない。

これらに対し、既存の遺伝性疾患モデルマウスに正常な遺伝子を導入し、生体における正常遺伝子の機能を探る試みや、ヒト遺伝病に対する遺伝子治療を目的とした研究が行なわれている。この種の研究には、直接受精卵に遺伝子を導入する方法の他に、ヒトへ適用する際に、より実際的な手

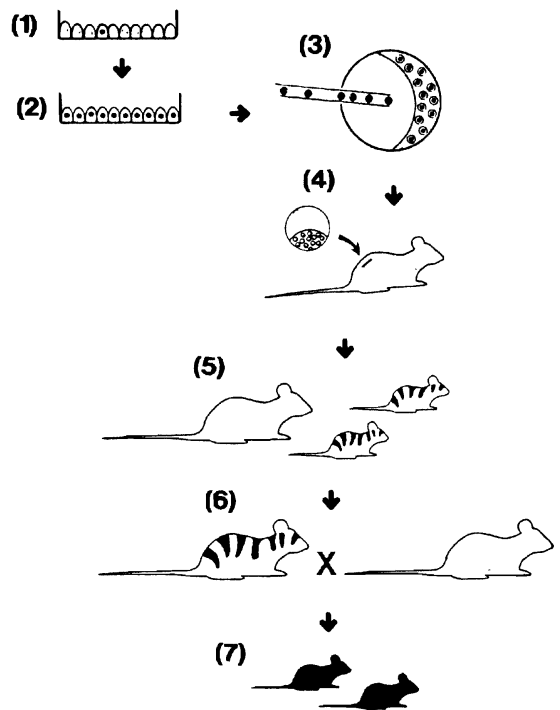


図 4 相同組換え ES 細胞による遺伝子欠損マウスの作製

- (1) 相同組換え ES 細胞の作製
- (2) 変異 ES 細胞の選択と増殖
- (3) ES 細胞の胚盤胞への注入
- (4) キメラ胚の移植
- (5) 生殖細胞系に ES 細胞を含むキメラマウスの誕生
- (6) キメラマウスと正常マウスとの交配
- (7) 遺伝子欠損マウスの誕生

段となる造血幹細胞や肝細胞にレトロウイルスをベクターとして目的の遺伝子を導入し移植（あるいは戻す）する実験が主としてマウスを用いて行なわれている。受精卵に正常遺伝子を注入する手段では、遺伝子治療の効果がほぼ得られているのに対し、細胞移植による方法では、移植後、増殖分化した細胞における導入遺伝子の発現量や発現の持続が大きな課題であった。しかし、最近のマウスによる研究で、ようやく、比較的長期間（最高6カ月）、高い発現が維持された結果も得られているようである。さらに、細胞の増殖・分化を促進する各種の造血因子（CSF）が明らかにされており、そのいくつかの物質や遺伝子が単離されている。近い将来、標的遺伝子だけでなく、造血因子をも利用した手段によって、移植した細胞が宿主で速やかに増殖し、しかもそれらの細胞で、標的遺伝子が持続して高い発現を示すような、より理想的な遺伝子治療法が開発されるかも知れない。

3) 臓器移植

臓器移植の際に最終的な障壁となるのは、拒絶反応であり、その免疫応答に重要な役割を果たしている主要組織適合抗原（MHC）遺伝子の構造解析が急速に進んでいる。最近、遺伝子工学の技術を応用して、移植臓器に対する拒絶反応を人工的に操作しうる可能性が検討されている。これは、マウスやラットを用いた移植実験で、以前から報告されていたドナーの細胞をあらかじめレシピエントに投与しておく、移植片の生着率が改善するという現象で、しかも、この効果は、免疫する抗原分子の量や質によって差がみられるというものである。その機構の一つとして、拒絶反応を起こす細胞の働きを阻止する抑制細胞が出現すると考えられている。このような抑制細胞の出現は、一部のアロ抗原（同一種内の個体間で異なる抗原性）の免疫によって、移植片のすべてのアロ抗原に対し免疫学的寛容が成立することを示唆している。これを一歩進め、ドナーの骨髄幹細胞を取り出し、これらに MHC 遺伝子を導入し、臓器移植の前に移植して、拒絶反応を抑制する試みがダタを用いて行なわれている。

ところで、拒絶反応や自己免疫疾患の機構を探ることは、すなわち、抗原に対する免疫寛容の成

立機構を解明することでもある。近年、免疫応答に関連する種々な細胞の同定や分類が進み、一方では、MHC、T 細胞レセプター、細胞間接着分子（CD₄, CD₈）などの遺伝子が単離されてきており、これらの遺伝子を導入した Tg マウスが多数作製され、免疫応答の機構を探る研究が精力的に行なわれている。幸い、マウスでは、近交系、コンジュニック系、リコンビナント系、アイソジェニック系などの各種系統が確立されており、また、自己免疫疾患マウスなども見つけ出されているので、これらの系統を利用した Tg マウスによる研究の展開が大いに期待される。

4) ウイルス性疾患

ヒトの重大なウイルス性疾患である免疫不全症（AIDS）やB型肝炎の病因ウイルスは、ヒト以外では、一部の霊長類にしか感染が成立しないため、動物実験による研究が極めて困難である。このようなウイルス感染の動物種特異性は、ウイルスに対する宿主側のレセプターによって決定されている。しかし、ウイルスゲノムをマウスに導入することにより、本来ヒトや一部の霊長類にしか感染しないウイルス性疾患の研究が、取扱いの容易なマウスで可能となった。今のところ、DNA の導入によって、実際に起こっている感染を忠実に再現することは困難であるが、将来、ウイルスレセプター遺伝子を導入することによって、ヒトと同様な感染系を再現させることも可能となろう。ところで、このような Tg マウスは、ヒトウイルス性疾患の発症機構を解明するためのモデルだけでなく、それらの予防や治療薬を開発するためのモデルとしても極めて有用である。

おわりに

医学医術の目ざましい進歩によって、わが国は、今や世界の最長寿国となった。しかし、反面、人口の高齢化に伴い、各種の老年性疾患が増大し、一方では、社会の重要な担い手である中高年齢者の成人病による犠牲は依然として少なくない。このような状況が続くかぎり、来たる21世紀には、極めて厳しい社会を迎えることになる。このような事態を克服するためには、各種疾患の病因や病態を解明し、それらの予防法や治療法を早急に確

立しなければならない。そのためには、基礎的研究としての動物実験は、より一層重要不可欠である。しかし、一方では、国内外で、動物福祉活動や動物実験反対運動が一層高まってきており、動物実験を実施する側にとって益々厳しい状況になりつつある。

したがって、今後は、これまで以上に、動物実験に関する制度や組織の整備に努め、動物実験の重要性に対する認識を広く社会に定着させてゆく努力が必要である。

文 献

1. Evans, M. J. and Kaufman, M. H.: Nature, 292, 154, 1981.
2. Martin, G.: Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 7634, 1981.
3. 角永武夫: 実験医学, Vol. 4, No. 4, 1986.
4. Surani, M. A. H., et al.: Nature, 326, 395, 1987.
5. Cory, S. and Adams, J. M.: Ann. Rev. Immunol., 6, 25, 1988.
6. 角永武夫: 実験医学, Vol. 6, No. 5, 1988.
7. Karlsson, S., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 606, 1988.
8. Peng, H., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 8146, 1988.
9. Costantini, F., et al.: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 36, 159, 1989.
10. Lin, B., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 8892, 1989.
11. 勝木元也: 細胞工学, Vol. 8, No. 4, 1989.
12. 井川洋二: 細胞工学, Vol. 8, No. 9, 1989.
13. 笹月健彦: 細胞工学, Vol. 8, No. 11, 1989.
14. 香川靖雄: 細胞工学, 臨時増刊, Vol. 8, szpl. 1, 1989.
15. 三品裕司: バイオトレンド, Vol. 1, No. 2, 53, 1989.
16. 清水不二雄: バイオトレンド, Vol. 1, No. 2, 108, 1989.
17. 小野寺一清, 海老原充: バイオトレンド, Vol. 1, No. 2, 128, 1989.
18. 左々木正夫: 科学, Vol. 59, No. 7, 464, 1989.