

第60回 名古屋市立大学医学会総会

特 別 講 演 II

モデル動物の開発とその応用

三 好 一 郎

名古屋市立大学大学院医学研究科 病態モデル医学分野

Development of animal models and their applications

ICHIRO MIYOSHI

*Department of Comparative and Experimental Medicine,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences*

は じ め に

医療技術の開発, あるいは, その基本となる生物の仕組みを理解するためには, 今のところ個体を対象とする実験を回避することはできない. 相当数の種ではゲノム DNA の塩基配列の解読が終了したが, モデル動物はますます医学生命科学研究に欠かせないツールと考えられている. 順遺伝学的方法論および逆遺伝学的方法論に基づく様々な方法で樹立されたモデル動物を用い, 疾患の原因遺伝子を同定し, その機能や変異, 発症機構が解析されている. 特に, 遺伝子組換え動物は, 新たなモデルとして日常的に作出されるに留まらず, 連鎖解析やポジショナルキャンディデートクローニングによって同定された自然発症モデルの疾患原因遺伝子の理論的証明や機能解析にも頻用される. 本講演では, 我々の研究を中心にモデル動物の開発とその応用について現状を紹介する.

1. 疾患モデル動物

実験的発症モデル動物は, 古くから正常な動物に様々な処置を施すことでヒトに類似する疾患を発症させ, 研究の対象とされてきた. モデルの作製法は, 病原微生物の感染, および, 薬物・化合物の投与, 切除や結紮などの外科的処置, 異種タンパクや自己抗原投与による免疫学的方法, 以上の組合せなど多岐に及ぶが, 確立

されたものは再現性や誘発率が高い. 発がん実験などを除外すれば処置から発症までの期間が短く有用なモデルと考えられる.

特定の疾患を自然発症する動物を選択交配して系統化した動物が自然発症モデル動物である. 突然変異に因るものが多く, 様々な種の動物で発見・系統化され, 増え続けている. マウスでは1000以上の系統が樹立され原因遺伝子や発症機構が明らかにされたものも多い. 近年, 医学研究の関心は, がんや高血圧, 糖尿病, 高脂血症, 脳卒中, 動脈硬化, 心筋梗塞などの一般的な疾患や生活習慣病に移行してきた. これらの疾患は, 遺伝的背景と多くの因子が複合的に原因になることから, 容易に実験的発症モデルを作製できない. むしろ, ヒト疾患と同様の遺伝的背景を持ち, 類似した症状を自然発症するモデルを利用する方が有効な場合も多い. しかしながら, 原因や機構と疾患の類似性(症状)は必ずしも一致しないことから, ヒトと多くのモデル動物の症状を比較生物学的見地から解析することにより, 疾患の特性や原因を理解することが肝要である.

人為的突然変異モデル動物は, 処置によりランダムに遺伝子に変異を導入して作出され, 特定の表現型を示す動物である. 以前は放射線が利用されたが, 現在では *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) などの化学的変異原物質が使用され

る。多数の新規突然変異体を作製し、その中から興味の対象となる表現型を示す系統を選抜・樹立する順遺伝学的方法であり phenotype-driven 法とよばれ、その簡便さから様々な ENU ミュータジェネシスプロジェクトが実施されている。

トランスジェニック (Tg) および標的遺伝子組換え動物に代表される、何らかの遺伝子組換え操作を施した動物を遺伝子組換え動物と総称する。1980年代半ばから、逆遺伝学的方法により、異種由来あるいは変異遺伝子をゲノムに組込ませる遺伝子導入 (狭義の Tg) マウスあるいは標的遺伝子組換え [特定の遺伝子を欠失させるノックアウト (KO) あるいは特定の遺伝子に付加置換するノックイン (KI)] マウスなどの作製・応用が急激に普及した。さらに、ジーントラップやトランスポゾンなどを用いた多様な遺伝子組換え法が開発され、個体レベルでの機能解析には不可欠の道具となった。内在性遺伝子をヒト型や変異型に置換することで有用なヒト疾患モデルになる例も示されている。

2. ミュータントマウスの疾患原因遺伝子の同定

1) 先天性白内障モデルマウス¹⁾

東北大学医学部で樹立された、ヘテロ個体で白内障に、ホモ個体では小眼白内障を発症するミュータントマウス (Mip^{Cat-Tohm}) は、胎仔期から水晶体線維細胞の不整列および水晶体深部の壊死などを示すことから、疾患の原因は水晶体形成に関与する遺伝子と推測された。まず、このマウスと亜種 *M. m. molossinus* 由来近交系 MSM マウスとの間の戻し交雑群114匹を作製し、連鎖解析により第10染色体 D10MIT103近傍に候補遺伝子座をマップした。

染色体上の位置情報および表現型からデータベースを検索し、この領域に水晶体線維細胞に特異的に発現する膜タンパク質 major intrinsic protein [Mip, aquaporin0 (AQP0)] の存在したことから、その転写産物およびゲノムの塩基配列を決定した。AQP0の第2膜貫通部位に4アミノ酸 (12塩基) の欠損が検出されたため、 α



図1. 先天性白内障モデルマウス (Mip^{Cat-Tohm})

MGI データベースによる Mip^{Cat-Tohm} の病態と同定された疾患原因遺伝子の説明。

クリスチンプロモータを用いてこの変異タンパク (AQP0^{del}) を水晶体特異的に発現する Tg マウスを作製した。この Tg マウスが、導入遺伝子の発現量に依存して先天性白内障マウスと同じ病態を示すことから、この変異が疾患の原因であることを証明した (図1)。多量体を形成するタンパクの異常に見られる dominant negative 変異の典型例で、その結果 AQP0 (4量体) が小胞体周辺に異常局在・蓄積したため細胞変性に陥ったと考えられた。この研究の最中、変異した AQP0が原因の白内障はヒトにも発見された²⁾。

2) Menkes 病モデルマウス³⁾

同様に、東北大学農学部で樹立された、メスのみで斑模様の毛色を呈し、その20%は成長遅延や歩行失調を発症して生後2週齢で死亡するミュータントマウス (Atp7a^{Mo-Tohm}) の疾患原因遺伝子を決定した。オス (ヘミ接合体) は卵黄囊中胚葉に異常を呈し胎生10.5~11.5日に死亡する。このマウスでは、ヒト X 染色体劣性遺伝の先天性銅代謝異常症 Menkes 病の原因遺伝子である銅輸送 ATPase のひとつ Atp7a 遺伝子のイントロン22からエクソン23にかけて1440塩基が欠損しており、第8膜貫通ドメイン直後の C 末端91アミノ酸を欠損すると推測された。後述する CAG プロモーターの下流に野生型 Atp7a 遺伝子を配置した遺伝子を導入する Tg

ンサーを網羅し、染色体位置効果を軽減させる導入遺伝子が考案された。このゲノムクローンには、発現制御領域配列に加えて、エクソン／イントロン配列、未同定の制御配列が全て含まれており、内在性同様の遺伝子構造を持つことから、再現性の高い発現制御が可能になる。また、ヒトの相同遺伝子および Cre、蛍光タンパク質等のレポーター遺伝子、エピトープタグ等の外来遺伝子をあたかもノックインした導入遺伝子として構築できる。ヒト及びマウス、ラットなどで、全ゲノム DNA 配列を網羅した BAC クローンライブラリーが作製され、あらゆる遺伝子を含む 200kbp のゲノムクローンが入手できること、また、Red/ET Recombination system などにより大腸菌内で長鎖 DNA の特異的組換えが可能になったことが、新たな導入遺伝子や組換えベクターの開発に寄与している。

4. 雌性生殖器腫瘍モデル？

卵管特異的糖タンパク質 (oviduct-specific glycoprotein : OGP) は、エストロゲンに依存して卵管上皮細胞特異的に分泌され、排卵された卵子の周囲・透明帯および卵卵腔に存在する主要な糖タンパク質で、卵管に到達した精子の膜表面にも付着している。精子の受精能の獲得、およびその卵子との結合・受精に関与すると推測されたが¹⁰⁾、KO マウスの繁殖能力は正常であった¹¹⁾。我々は、マウス OGP 遺伝子のプロモーター領域 5' 上流域 (2.4kb) の機能を解析し、腫瘍モデルを樹立するために SV40 ラージ T 抗原遺伝子 (SVT) との融合遺伝子を導入し Tg マウスを作製した¹²⁾。Tg マウスのメスは、卵管および子宮や陰部までもエストロゲン依存性に SVT 遺伝子を発現し腫瘍を発生したが、オスは予想しなかった甲状腺腫瘍を発生した (図 4)。遺伝子発現の組織特異性及びエストロゲン依存性などについて検証する目的で、卵巣を切除した野生型マウスにエストロゲンを投与し、転写レベルで OGP 遺伝子の発現を解析したが、残念ながら甲状腺での発現は顕著でなく、Tg マウスの結果は染色体位置効果の可能性が高い。

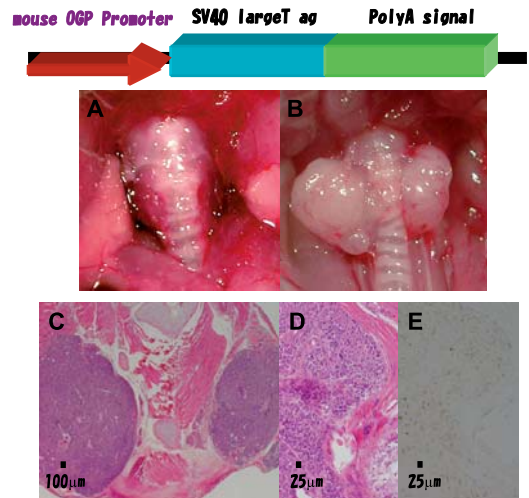


図 4. 雌性生殖器腫瘍モデル Tg マウスに発生した甲状腺腫瘍

マウス OGP 遺伝子のプロモーター領域 5' 上流域 (2.4kb) と SVT との融合遺伝子を導入して Tg マウスを作製した。

A, C : 野生型マウス, C, D, E: Tg マウス, E は、抗 SV40 ラージ T 抗原抗体による染色。

5. 個体レベルでのスフィンゴ脂質の機能解析

1) スフィンゴ脂質の構造および細胞レベルでの機能

スフィンゴ脂質は、糖鎖が結合したスフィンゴ糖脂質およびホスホコリンが結合したスフィンゴミエリンを含み、主に形質膜においてコレステロールなどと共にマイクロドメインと総称される膜構造を形成する。スフィンゴ脂質の合成には、共通骨格のセラミドに (図 5)、ガラクトースやグルコース、ホスホコリンが結合する経路があり、特にグルコースが付加される経路は、更に様々な糖が付加され数百種以上にも及ぶスフィンゴ糖脂質分子に至る。この糖鎖の多様性は、血液型活性、あるいは腫瘍関連抗原、細菌や毒素タンパクの特異的受容体として機能する。また、スフィンゴ糖脂質は、細胞間相互作用の介在因子や細胞膜におけるシグナル伝達系の調整因子、細胞内セラミド量の調節機構としての機能も示唆されている。

セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) 活性 (図 5) を欠損する培養細胞が、スフィンゴ脂質供

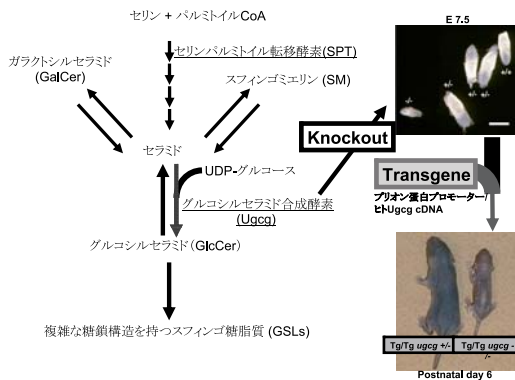


図5. スフィンゴ脂質の合成経路およびグルコシルセラミド合成酵素ノックアウトマウスの作製とそのレスキュー

給源（血清）のない培養液では数日で死滅することから、スフィンゴ脂質が細胞の生存に欠かせないことが証明された¹³⁾。ところが、セラミドにグルコースを転移させるグルコシルセラミド合成酵素 (Ugcg) を欠損する培養細胞は、完全合成培地でも異常を示さず¹⁴⁾、全く逆の結果を導いた。しかしながら、Ugcg は殆どの生物にそのホモログが存在し、スフィンゴ糖脂質の合成経路で最初に糖転移する重要な酵素であること、培養細胞系と比較して個体は著しく複雑なことから、個体レベルでの機能解析が不可避と考えられた。

2) Ugcg KO マウス¹⁵⁾

常法に従いエクソン6-8を欠損する Ugcg KO マウスを作製した。前述のように、この酵素を欠損すると殆どの主要なスフィンゴ糖脂質は合成されない（図5）。Ugcg KO マウスヘテロ接合体に異常は見られないが、ホモ接合体は原腸陥入の直前である7.5日目から成長遅延を示し、9.5日目には相当数が痕跡程度に変性・吸収される胎生致死であった。胎齢7.5日目のホモ接合体は、ライヘルト膜や明確な三葉構造などを始め胚外腔および胚外体腔、羊膜腔を保持し、調べた限り分化マーカーの発現に異常が無いものの、野生型に比較して発達の程度が悪く、胚性外胚葉の内層で広範なアポトーシスを示した。

3) ヒト由来 Ugcg cDNA 導入による Ugcg KO マウスホモ接合体のレスキュー¹⁵⁾

胎生期以降で Ugcg の機能を調べるために、ヒト由来 Ugcg cDNA を組み込んだ遺伝子導入による表現型回復実験を試みた。胚発生初期から広汎な組織、特に神経堤由来細胞をはじめ神経系の細胞で強く発現するマウスプリオンタンパク遺伝子プロモータ¹⁶⁾を用いた場合は、Ugcg KO マウスの胎生致死は回避されホモ接合体の新生仔が得られた（図5）。しかしながら、新生仔では分娩直後から小腸陰窩の細胞数の増加に伴い、配列が乱れ重層化した腸上皮細胞が観察された。さらに、PCNA 陽性の細胞増殖による陰窩の肥厚、および、配列が乱れた短い腸上皮細胞で構成された絨毛の内腔拡大等の症状により、生後数日から二週間で衰弱死した。免疫染色では、Ugcg およびマイクロドメインのマーカー GM1ガングリオシドの双方が陰窩に検出されなかった。Ugcg およびスフィンゴ糖脂質は、初期発生の一時期だけでなく小腸上皮細胞など秩序正しく急激な細胞分裂・増殖を繰り返す組織に不可欠であり、個体の維持に重要な機能を有す可能性がある。

4) Ugcg 高発現マウス

Ugcg は、高発現させてもその影響がスフィンゴ糖脂質合成経路の多くの分子へ拡散するため個体レベルでの表現型は期待されなかった。しかし、CAG プロモータの下流でヒト Ugcg cDNA を高発現する CAG-hUgcg Tg マウスのうち、腎臓で野生型の15倍程度の Ugcg 活性を示す系統は顕著な症状を呈した。この系統は、生後16日から成長が停滞し19日までに約半数が、42日までには殆どの個体が衰弱した。17日目の尿細管上皮細胞に出現した少数のアポトーシス様細胞が、20日目には皮質で広範囲に拡がり、多くの管腔内に細胞の脱落像が観察された。短く疎な微絨毛を持つ丈の低い近位尿細管細胞内にガングリオシドーシスに見られるリソゾームの層板構造が認められ、脂肪変性を示した。通常は、基底膜に分布する GM1ガングリオシドが管腔側にも強く検出され、Ugcg の高発現に

よりスフィンゴ糖脂質構成や局在性が変化したことから細胞の極性が破綻して機能不全・アポトーシスに至った可能性がある。Ugcg の発現は、想像よりも精密に制御されているのかもしれない。

5) スフィンゴ糖脂質が血糖調節に関与する新たなモデル？

CAG-hUgcg Tg マウスのうち特に症状を示さない系統は、加齢と共に耐糖能が悪化すること、逆に UgcgKO マウスヘテロ接合体は耐糖能が亢進する傾向を示したことから、血糖調節機能を検討した。CAG-hUgcg Tg マウスは耐糖能の悪化にも関わらず、血中インスリン濃度が低い傾向があり、インスリン感受性が低下していた。一方、UgcgKO マウスヘテロ接合体はインスリン感受性が亢進していた。

高脂肪食投与により、UgcgKO マウスヘテロ接合体は野生型マウスよりも体重の増加が顕著であったが、対照的に CAG-hUgcg Tg マウスは体重増加が抑制された。また、CAG-hUgcg Tg マウスは、高脂肪食給餌下でもインスリン分泌が促進されないのに対し、UgcgKO マウスヘテロ接合体はインスリン分泌亢進により高インスリン血漿を示すと同時にインスリン感受性が低下した。肝臓中の脂肪・グリコーゲンの蓄積は CAG-hUgcg Tg < 野生型 < UgcgKO マウスヘテロ接合体の順で、特に UgcgKO マウスヘテロ接合体では臍島の肥大・過形成が顕著であった(図6)。以上のことから、UgcgKO マウスヘテロ接合体は脂肪肝を伴う肥満型糖尿病、CAG-hUgcg Tg マウスは脂肪肝を伴わないやせ型の糖尿病モデルの可能性を示し、スフィンゴ糖脂質が血糖調節に関与することを示唆した。

おわりに

疾患モデル動物として、一般には主にヒトと同じ哺乳動物を用いるが、普遍的な生命現象を解明する動物としては、進化的に下等なモデル動物も重要である。今回は触れないが、染色体の組換えや突然変異体の分離などの基礎遺伝学や種を越えて保存される遺伝子カスケードは

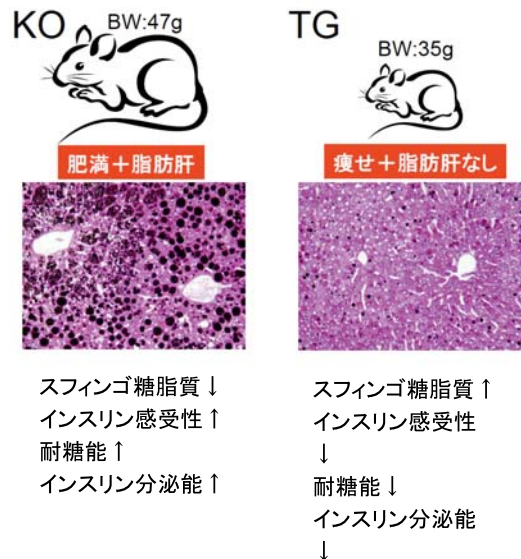


図6. スフィンゴ糖脂質が血糖調節に関与する新たなモデルか？

高脂肪食投与時の CAG-hUgcg Tg マウス (TG) および UgcgKO マウスヘテロ接合体 (KO) の体重、および、血糖調節に関する機能、肝臓の組織像を示した。

ショウジョウバエで確立された。また細胞の運命を決定する遺伝子や RNA 干渉による遺伝子発現制御機構の研究は線虫により大きく発展した。その他にもアフリカツメガエルやゼブラフィッシュ¹⁷⁾など哺乳類以外の動物を用いた多くの研究が様々な生命現象の解明に貢献している。

以上の研究は、名古屋市立大学・宮本智美、東北大学・笠井憲雪、岡村匡史、本谷安正、孟雁、北本哲之、永井真貴子、青木正志、糸山泰人、北海道大学・昆泰寛、山下匡、佐々木宣哉、新潟薬科大・市川進一、理研脳化学総合研究センター・平林義雄、高橋英機、順天堂大学・荒木慶彦、日本獣医生命科学大学・袴田陽二、フェニックスバイオ・上田正次、生理学研究所・平林真澄、の各博士との共同研究により得られたものである。

文 献

- 1) Okamura T, Miyoshi I, Takahashi K, et al.: Bilateral congenital cataracts result from a gain-of-

- function mutation in the gene for aquaporin-0 in mice. *Genomics*, 81: 361-368, 2003.
- 2) Berry V, Francis P, Kaushal S, et al.: Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nat. Genet.*, 25: 15-17, 2000.
 - 3) Mototani Y, Miyoshi I, Okamura T, et al.: Phenotypic and genetic characterization of the Atp7aMo-Tohm mottled mouse: A new murine model of Menkes disease. *Genomics*, 87: 191-199, 2006.
 - 4) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, et al.: Rats expressing human cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.*, 21: 9246-9254, 2001.
 - 5) Sasaki N, Hosoda Y, Nagata A, et al.: A mutation in *tpst2* encoding tyrosylprotein sulfotransferase causes dwarfism associated with hypothyroidism. *Mol Endocrinol.*, 21: 1713-1721, 2007.
 - 6) Meng Y, Miyoshi I, Hirabayashi M, et al.: Restoration of copper metabolism and rescue of hepatic abnormalities in LEC rats, an animal model of Wilson's disease, by expression of human ATP7B gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1690: 208-219, 2004.
 - 7) Niwa H, Yamamura K and Miyazaki J: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 15; 108: 193-199, 1991.
 - 8) Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, et al.: Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 779-785, 2001.
 - 9) Takahashi RI, Kuramochi T, Aoyagi K, et al.: Establishment and Characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. *Transgenic Res.*, 16: 115-120, 2007
 - 10) Araki Y and Yoshida-Komiya H: Mammalian oviduct-specific glycoprotein: Characterization and potential role in fertilization process. *J. Reprod. Develop.*, 44: 215-228, 1998.
 - 11) Araki Y, Nohara M, Yoshida-Komiya H: Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization. *Biochem J.*, 374: 551-557, 2003.
 - 12) Miyoshi I, Takahashi K, Kon Y, et al.: A mouse transgenic for murine oviduct-specific glycoprotein promoter-driven simian virus 40 large T-antigen: Tumor formation and its hormonal regulation. *Mol. Reprod. Dev.*, 63: 168-176, 2002.
 - 13) Hanada K, Nishijima M, Kiso M, et al.: Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster ovary cells. Restoration of the growth of a mutant defective in sphingoid base biosynthesis by exogenous sphingolipids. *J. Biol. Chem.*, 267: 23527-23533, 1992.
 - 14) Ichikawa S, Sakiyama H, Suzuki G, et al.: Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4638-4643, 1996.
 - 15) Miyoshi I, Okamura T, Kasai N, et al.: Conventional/Conditional Knockout Mice. In: Hirabayashi Y, Igarashi Y, Merrill AH Jr. (ed): *Sphingolipid Biology*. Pp. 443-452, Springer-Verlag, Tokyo, 2006
 - 16) Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, et al.: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294: 280-286, 2002.
 - 17) Ohte N, Miyoshi I, Sane DC, et al.: Zebrafish with Antisense-knockdown of Cardiac Troponin C as a Model of Hereditary Dilated Cardiomyopathy. *Circ J.*, 73(9), 1595-1596, 2009.

