

動物分野におけるバイオテクノロジー

既に応用されている技術

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 人工授精 (Artificial Insemination) 2. 胚移植 (Embryo Transfer) 3. 胚の凍結保存 (Embryo Freezing) 4. 体外受精 (In Vitro Fertilization) 5. 顕微授精 (Microinsemination) 6. クローニング (Cloning)
割球の分離, 胚の分断
核移植 | <ol style="list-style-type: none"> 8. 性別判別 (Sexing) <ol style="list-style-type: none"> ①精子による性別判別 <ul style="list-style-type: none"> ・フローサイトメトリー ・蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション ・密度勾配遠心法 ②卵子による性別判別 <ul style="list-style-type: none"> ・細胞組織学的検査 (性染色体) ・PCR法 |
|--|--|

研究段階または将来の可能性を有する新しい技術

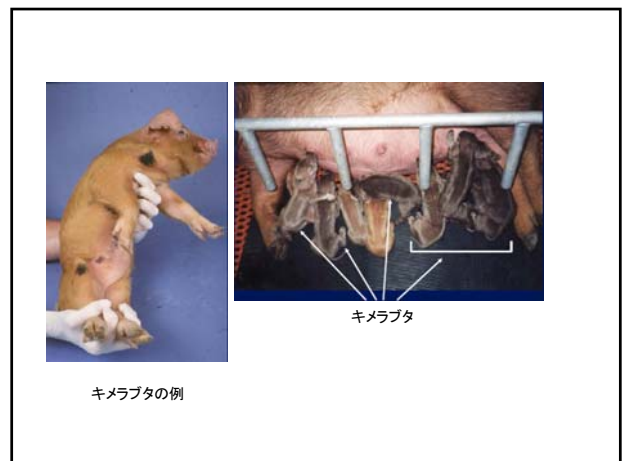
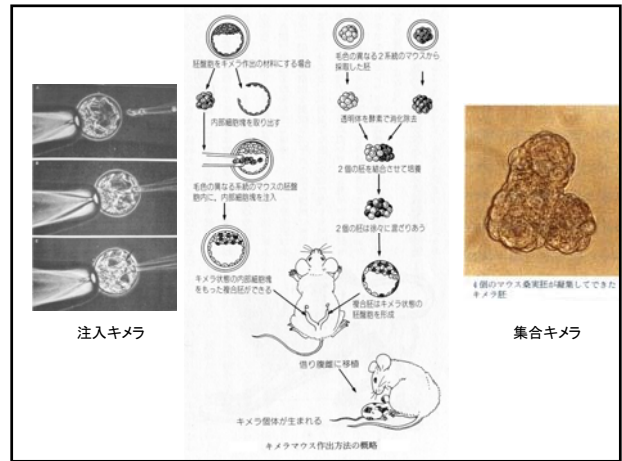
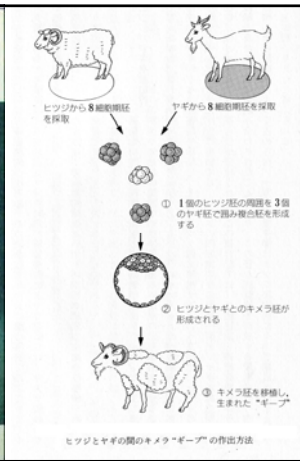
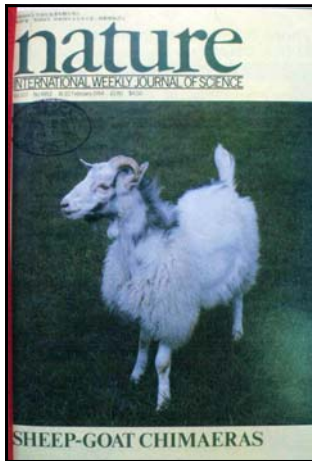
- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 9. 遺伝子移植 (Gene Transfer)
形質転換動物 10. ゲノム解析 (Genomics) 11. 遺伝子マーカー (Genetic Marker) | <ol style="list-style-type: none"> 12. 再生医学 (Regenerative Medicine) 13. 遺伝子診断 (Gene Diagnosis) 14. 遺伝子治療 (Gene Therapy) |
|---|--|

キメラ動物



ギリシャ神話のキメラ像

キメラは生物学、遺伝子工学において2個以上の胚に由来する細胞集団から形成された個体のこと。有名なものにニワトリとウズラのキメラがある。



SCIENCE
AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE

キメラマウス
右：明らかにモザイク模様を示すキメラ個体
左：キメラ個体であっても見かけ上特異のない場合もある

白マウスに黒マウスの胚をミックスしてキメラマウスを作れば、それは灰色になるのではなく、白黒まだら模様の個体になる。

(A) 透明帯除去
割球集合
胚細胞
代理母へ移植
キメラマウス誕生

(B)

黒色、白色、茶色の毛色をもつ両親由来の3個の4細胞期胚から集合法によって作成したキメラマウス（下）
白マウスと交配した結果、黒色、白色、茶色の毛色の子マウス（上）が誕生した。

遺伝子導入マウスの作出

胚性幹細胞
受精卵細胞
受精卵細胞の培養
遺伝子導入
ベクターを利用
遺伝子導入されたES細胞を選別する
遺伝子導入されたES細胞が内臓胚盤に組み込まれる
代理母へ移植
キメラの子マウス
キメラマウスと正常マウスを交配する
キメラマウス
正常マウス

遺伝子導入ヘテロ接合体
遺伝子導入ヘテロ接合体
遺伝子導入ヘテロ接合体
正常ホモ接合体
遺伝子導入ヘテロ接合体
遺伝子導入ヘテロ接合体

ウズラの組織をニワトリの胚に移植してできたキメラヒヨコ。羽の黒い部分がウズラ由来。この技術が脳の研究にも生かされている。

図④ ニワトリ・ウズラキメラの発生
ニワトリ
ウズラ
図⑤ ニワトリ・ウズラキメラの発生（横切りの観察）
ウズラ
ニワトリ
図⑥ 黒い部分で覆われたヒヨコ、黒いヒヨコ

接木でできるキメラ植物

接木をした植物は体の部分によって違った遺伝子セットを持つ細胞が一緒になった個体であるため、キメラである。

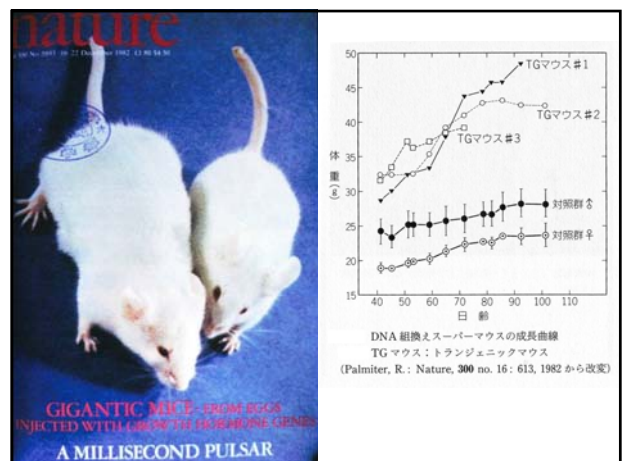
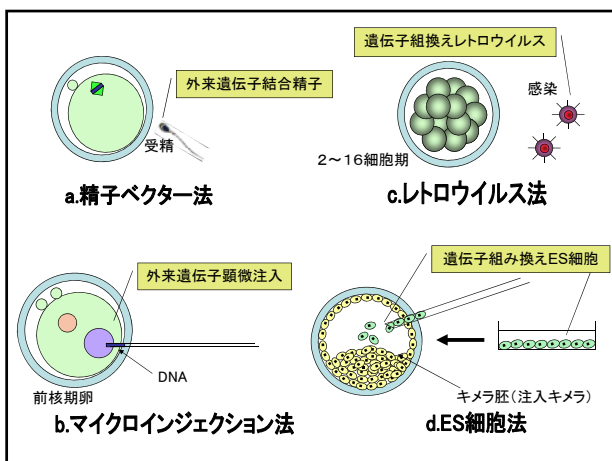
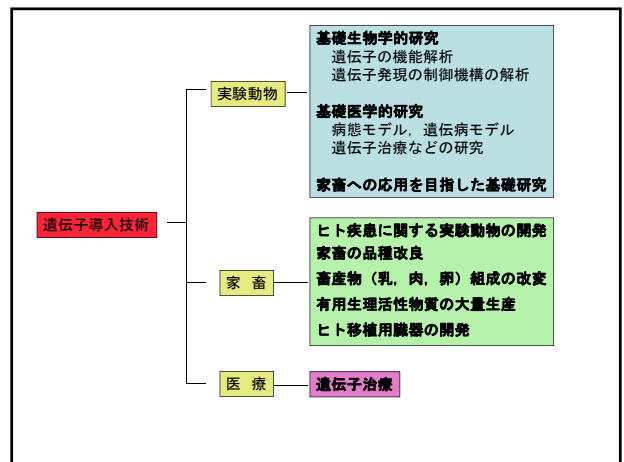
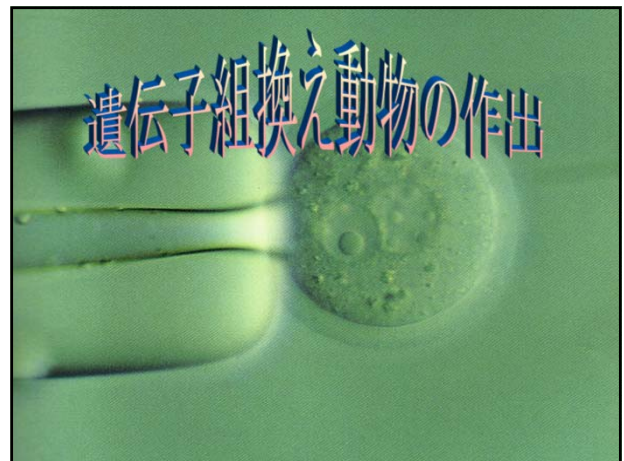
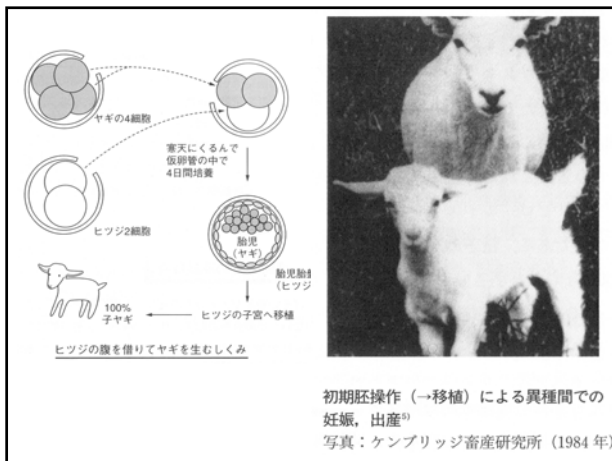
(a) 接木によるキメラ植物
キメラ

(b) 細胞融合によるキメラ鳥
ウズラ胚
ニワトリ胚
融合
キメラ

(c) 集合法と注入法によるキメラマウス
集合法
ES細胞
注入法
胚盤への胚移植
キメラ

図4-3 キメラ

ヒツジ8細胞期胚の割球分離によって生産された一卵性5つ子



外来遺伝子 DNA の導入操作

上: DNA 注入に用いる受精直後のマウス卵。a は雄性前核 (精子核)、b は雌性前核 (卵の核)

中: 極細ガラス針中に吸引した DNA 液を雌性前核中に注入する

下: 卵から注入針を抜き取り、操作完了

スーパーマウス作出に用いられた組換えラット成長ホルモン遺伝子 pMGH (環状 DNA)

pBR 322 は遺伝子の運び屋に用いたプラスミド。卵に注入されたのは *Bgl* I と *Bam* HI という部位で切断された DNA の断片 (矢印の領域)

導入遺伝子 (ヒト血液凝固因子: 血友病の治療タンパク質)

胎児の体細胞

細胞核を移植

電気刺激

核を除いた卵子の細胞

分割

複製に移植

100細胞

遺伝子の組み込まれた動物 (ホリ)

クローン技術を使った遺伝子組換え家畜の生産

マウス受精卵の核内への遺伝子DNAの注入 (顕微鏡写真×200)

受精卵への発癌遺伝子の注入によって得られた発癌マウス

PPL社が乳汁中発現を目標にしてマウスを使って開発を進めている生理活性物質

タンパク質	発現量(マウス)	目的
α_1 -アンチトリプシン	40 g/l	嚢胞性線維症
フィブリノーゲン	5 g/l	外傷・外科手術における組織接着
プロテインC	>0.3 g/l	血栓症
栄養添加剤	—	嚢胞性線維症
乳汁組成改善	>15 g/l	栄養価向上
第VII因子	2 g/l	血友病
第IX因子	0.5 g/l	血友病B

(PPL社)

体外受精胚を利用した形質転換ウシの作出

調査項目	数(%)
遺伝子注入用前核期胚数	70,797
遺伝子注入胚数(%)	36,530 (52)
発育胚数(%)	2,293 (6)
受胎雌数	1,324
妊娠雌数(30日NR)	378 (28)
産子数	226 (17)
形質転換産子数	18 (8)*

* 発育胚数 2,293個当たりで0.8% (Eyestone, 1999改変)
注入胚数70,797個当たり0.0003%

遺伝子組換え動物の生産効率(初期胚前核注入法)*

動物	注入胚移植	産子数	組換え動物率(%)	
			産子当たり	胚当たり
マウス	13,300	1,800	17	2.6
ウサギ	1,900	200	13	1.5
ラット	1,400	350	18	4.4
ウシ	1,020	200	4	0.7
ブタ	19,400	1,900	9	0.9
ヒツジ	5,400	560	8	0.9

* マウス、ウサギ、ラットなどでは、胚当たりの形質転換動物の生産効率は2~3%であって、ウシ、ブタ、ヒツジなどではさらに低率で1%ないしそれ以下である。

クローン技術と産業

薬をつくる動物

ヒトの遺伝子
アルファ1-アンチトリプシン

ベータラクトグロブリン
プロモーター

ヒトの遺伝子をヒツジ卵の細胞に注入

ヒツジ受精卵

ホルモンプラグ
ゴベット

代理母へ移植

遺伝子移植された
子ヒツジのDNA検査

ヒト遺伝子が乳腺でのみ発現し、
異なるタンパク質がミルク中へ
分泌される

ミルクをしぼって
そのタンパク質をとりだす

まじりけのない薬とする

ポリー

アルファ1-アンチトリプシン 肺の病気
第Ⅱ因子 血友病

これまでのDNA組換え技術による医薬品製造の例には、ヒトのインスリンや成長ホルモン、インターフェロンなどがある。

動物製薬工場に適した家畜

動物	妊娠期間 (月)	性成熟 (月)	乳量 (リットル)	遺伝子注入から産乳 までの期間
マウス	0.75	1	0.0015	3-6
ウサギ	1	5-6	1-1.5	7-8
ブタ	4	7-8	200-400	15-16
ヒツジ	5	6-8	200-400	16-18
ヤギ	5	6-8	600-800	16-18
ウシ	9	15	約8,000	30-33

(Ziomek, 1998)

薬をつくるニワトリ

遺伝子操作をしたニワトリ

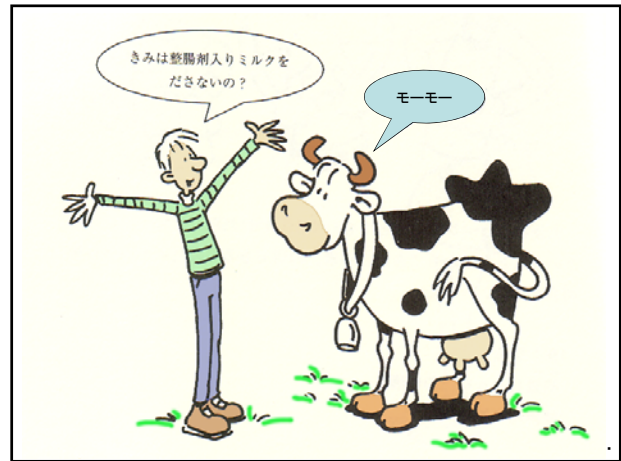
- ・抗がん剤
- ・ヒトの成長因子
- ・抗体

ニワトリは1年に300個も卵を産む

バイオ医薬品

組換え植物に医薬品を生産させる
「食べるワクチン」

下痢症に対するワクチン入りジャガイモを食べる治験



クローン技術と医療

治療のためのクローン技術

臓器移植

いしよく ぞうき
移植用臓器の不足

いしよく ぞうき ふうそく
移植用臓器の不足

きまげつはんのう
拒絶反応

移植を待っている人

臓器の提供者の数

臓器移植をまつ患者を助ける クローン技術

- 動物から臓器を提供してもらう いしよく いしよく
異種移植
- 研究室で新しい心臓や腎臓、肝臓などをつくる しんぞう じんぞう かんぞう
- 幹細胞を利用する かんさいぼう
じんこう ぞうき
人工臓器

■ブタからの臓器移植「5年以内」に

「ブタのDNAを、ほんのちよつと人間に近づけるだけで激しい拒絶反応は防げる」

「ブタからサルへの心臓や腎臓の移植に成功している。拒絶反応を抑えても、ブタがもつウイルスの心配など、安全性の問題がある。すでにおこなわれているブタの皮膚移植などの患者を追跡調査中だ。」

「それはたくさんある。だが、5年以内には、ブタから人間への移植が実現すると信じている」



デービッド・ホワイトさん(53) 英イムトラン社研究開発責任者

進む異種移植研究に警鐘

豚に潜む内在性ウイルス 種を超え感染 米グループが実験

動物の臓器を人に移植する「異種移植」の研究が進んでいる。重い病気や移植を待ちながら臓器提供者が現れずに死に絶える患者は世界的に多い。そんな問題を解消する方法として期待されるが、対象に、臓器の大きさが人間に近い豚が注目されている。しかし、拒絶反応とともに心配なのが「未知のウイルス」だ。十七日に英科学誌「ネイチャー」がインターネットで公表した米グループの研究は、種を超えたウイルス感染の危険性を改めて示した。

動物の臓器を人に移植する「異種移植」の研究が進んでいる。重い病気や移植を待ちながら臓器提供者が現れずに死に絶える患者は世界的に多い。そんな問題を解消する方法として期待されるが、対象に、臓器の大きさが人間に近い豚が注目されている。しかし、拒絶反応とともに心配なのが「未知のウイルス」だ。十七日に英科学誌「ネイチャー」がインターネットで公表した米グループの研究は、種を超えたウイルス感染の危険性を改めて示した。

内在性ウイルスはふだん、遺伝子のかたちで細胞の中にひそみ、時及ぶと悪さをする。豚に特有の内在性ウイルスのうち数種類は、実験室で培養した人の細胞に感染する可能性が指摘されていた。しかし、実際に生きた動物を使った実験で感染が

動物の臓器を人に移植する「異種移植」の研究が進んでいる。重い病気や移植を待ちながら臓器提供者が現れずに死に絶える患者は世界的に多い。そんな問題を解消する方法として期待されるが、対象に、臓器の大きさが人間に近い豚が注目されている。しかし、拒絶反応とともに心配なのが「未知のウイルス」だ。十七日に英科学誌「ネイチャー」がインターネットで公表した米グループの研究は、種を超えたウイルス感染の危険性を改めて示した。

人獣共通感染症連続講座 第81回

異種移植とブタ内在性レトロウイルス 異種移植の経験のある人での追跡研究の報告

異種移植の臨床試験に向けて欧米では活発な議論が行われています。その中でもっとも大きな問題としてとりあげられているのはブタ内在性レトロウイルスがブタの臓器の移植を受けた患者に感染し、患者に癌、免疫不全など思いがけない病気を起こすことはないか、さらにそのウイルスが患者の家族や医療従事者に感染を広げることはないか、また最悪の場合には社会に広げることはないかといった議論です。

ブタ内在性レトロウイルスはおそらく数百万年前にブタの染色体に組み込まれたもので、ほとんどはウイルスの遺伝子の一部でいわばウイルスの化石のようなものですが、中には完全なウイルス遺伝子を保有して感染性ウイルスを放出するものがあります。そのようなブタ内在性レトロウイルスとしてこれまで7株が分離されており、エンベロープ遺伝子の構造から3つのタイプに分けられています。

そのうちのあるものは試験管内で培養した人の細胞に感染を起こすことから人の身体の中でも増殖する可能性があるという問題が提起されています。しかし、試験管内の細胞での増殖が人の身体での増殖性を必ずしも証明するものではありません。あるウイルスが人に感染するかどうかを知ることは、人で確かめるしか方法はありません。いって人への接種実験をするわけにはいきません。

<http://www.primate.or.jp/PF/yamanouchi/81.html>

農業生物資源研・クローンの豚とヤギを国内で初めて作成

ヒト型DAFを導入した豚(農業生物資源研究所提供)



農業生物資源研究所(茨城県つくば市)は24日、臓器を人間に移植しても拒絶反応が起きにくいクローン豚と人間に有用な物質を乳汁中に分泌するクローンヤギを、国内で初めて作り出すことに成功したと発表した。

同研究所の居在家(いざいけ)義昭・発生分化研究グループ長らは、遺伝子組み換え技術を使って皮膚などの体細胞の核に特定の遺伝子を入れ、うまくいったことが確認できた細胞を基にクローン動物を作った。

拒絶反応を起こしにくいクローン豚は、この手法でヒト型DAFと呼ばれるたんぱく質を作る遺伝子を組み込んだ。ヒト型DAFは、人間の拒絶反応を抑える働きがあり、この豚の細胞を使った実験でも効果が確認された。これとは別に、3種類の遺伝子組み換えクローン豚も作成した。

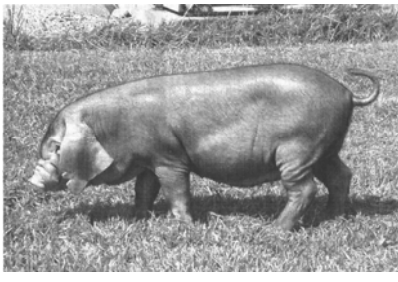
同様の手法でクローンヤギも作成した。ただし、乳汁中に出る物質は、共同研究先との関係で公表できないという。

【後略】

毎日新聞 2005年6月24日 19時57分

4月に安楽死「せり」

クローン豚応用に道筋



東奥日報2010年7月14日

4月に安楽死「セナ」

移植用臓器、病気モデル… クローン豚応用に道筋



東奥日報 2010年7月14日

2009年に国内初となる遺伝子組換え豚（体細胞核移植）のセナが今年4月に国内初の一生を終った。体細胞核移植は、まだ動物は通常よりも長生きする傾向があるが、インシリン病は10年ほど生きられない。セナはインシリン病のモデル豚として、移植用臓器の提供や、糖尿病やがんなどの病気の研究に役立つと期待されている。

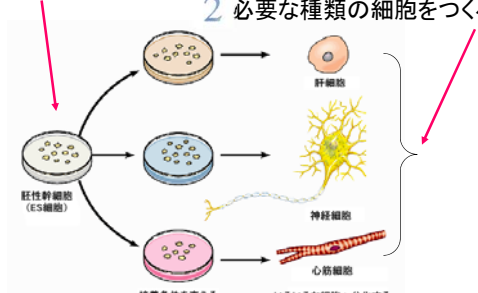
セナは、糖尿病やがんなどの病気の研究に役立つと期待されている。また、移植用臓器の提供にも役立つと期待されている。

セナは、糖尿病やがんなどの病気の研究に役立つと期待されている。また、移植用臓器の提供にも役立つと期待されている。

かんさいぼう 幹細胞の利用

1 分裂させて細胞を増やす

2 必要な種類の細胞をつくる



胚性幹細胞 (ES細胞) → 肝細胞, 神経細胞, 心筋細胞

培養条件を変える → いろいろな細胞へ分化する

asahi.com サイエンス

女兒の血液幹細胞へ遺伝子治療 北大医学部が国内初実施

生まれつきアデノシンデアミナーゼ(ADA)という酵素が作れないため、重症の免疫不全症になっている女兒(4)に対し、北大医学部は22日、血液をつくる幹細胞に正常な遺伝子を導入する国内初の遺伝子治療を実施したと発表した。治療の効果の判定には3カ月程度かかるが、成功すればこの治療で完治が見込めるといふ。

同大医学部の遺伝子治療講座の崎山幸雄教授によると、患者は関西の女兒。これまでADAそのものを注射する酵素補充療法などを続けてきたが、効果が上がらなかった。今年10月に厚生省から治療の実施計画の承認を得て、今年17日に骨髓から血液幹細胞を採取、これにADA遺伝子を導入し、22日に静脈に点滴投与したという。

導入した遺伝子が正常に機能しない可能性も捨てきれないため、異常が出た場合は学内で対処法を検討する態勢もついているという。

同様の治療法は、米国とタイアでの症例が数例あるだけという。北大は、治療の安全面を考慮して、発がんなどを抑える化学療法を併用しない方法を採用した。崎山教授は「補充療法や化学療法をせず、幹細胞への遺伝子治療で治癒を目指すのは世界的に初の試み」と話している。

先天性重症免疫不全の新生児は5万~10万人に1人の割合で発症する。(2003年12月22日)

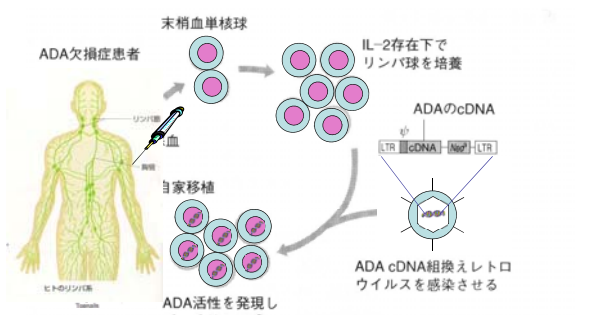
遺伝子治療の女兒が退院 症状が改善、北大病院

遺伝子異常で重症の免疫不全になるアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症で北海道大病院(札幌市)入院し、国内初の造血幹細胞への遺伝子治療を受けた女兒(5つ)＝神奈川県鎌倉市＝が2日、退院した。症状が改善したため、免疫力の正常化が期待される。

治療は昨年12月に実施。多様な細胞に分化する前の造血幹細胞を女兒の骨髓から取り出し、正常なADA遺伝子を導入、点滴で体内に戻した。それまではADA酵素を週1回注射していたが、同11月に停止。その影響で、今年1月ごろまで肝機能障害が続いたが、遺伝子治療の効果で徐々に改善し、5月ごろ正常化した。免疫力も遺伝子治療前より向上、家庭生活が可能になった。

ただ、リンパ球数はまだ正常値の4分の1程度で、自分で抗体を作ることにはできない。今後、免疫力が正常値まで向上することが期待され、月1度の通院で、リンパ球数などを経過観察する。

2004/07/02 09:32 【共同通信】



ADA欠損症の遺伝子治療

[大塚吉兵衛・安孫子宜光(1997): 医歯薬系学生のためのビジュアル生化学・分子生物学, 日本医事新報社より改変]

生まれつきアデノシンデアミナーゼ(ADA)という酵素が作れないため重症の免疫不全症

万能細胞 丹念な研究結果

人工多能性幹細胞 (iPS細胞)

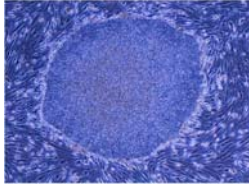
山中 伸弥さん(45)

induced Pluripotent Stem Cells

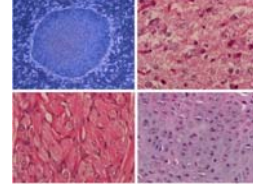


山中伸弥(Shinya Yamanaka)は、京都大学で博士号を取得し、大阪大学で助教授を務めた後、京都大学で教授を務めている。彼は、2006年にiPS細胞の発見に貢献し、その功績でノーベル生理学・医学賞を受賞した。彼の研究は、再生医療や疾患モデルの作成に大きな影響を与えている。

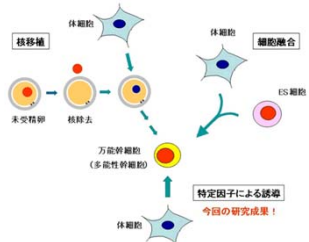
人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem, **IPS**)



山中伸弥 (Shinya Yamanaka) 京都大教授が作製に成功した人工多能性幹細胞 (2007年11月27日、山中教授提供)。(c)AFP/SHINYA YAMANAKA / KYOTO UNIVERSITY



山中伸弥 (Shinya Yamanaka) 京都大教授が作製に成功した人工多能性幹細胞 (左上)。人工多能性幹細胞から作り出した、筋肉細胞 (左下)、神経細胞 (右下)、軟骨細胞 (右上)。(2007年11月27日、山中教授提供) (c)AFP/SHINYA YAMANAKA / KYOTO UNIVERSITY



体細胞を初期化し、万能性(分化多能性)を誘導する方法としては、これまで体細胞の核を未受精卵に移植する核移植法と、ES細胞と融合する方法が知られています。しかしいずれの場合も、ヒト胚や、胚に由来するES細胞を利用することになり、倫理的な課題があります。今回私達は、体細胞に少数の因子を導入することにより、卵子や胚を用いず、直接的に万能幹細胞を誘導することに成功しました。

Induction of Pluripotent Stem Cells

多能性幹細胞の誘導

皮膚線維芽細胞に **Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc**の4種類の遺伝子

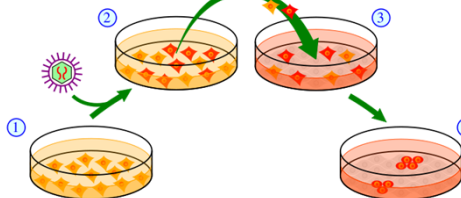
less famous
Specifically expressed in ES cells and/or important roles in ES cells

ES cell-specific transcription factors
Essential for pluripotency in ES cells and early embryos

(proto)oncogenes
Important for proliferation of ES cells, but not in early embryos

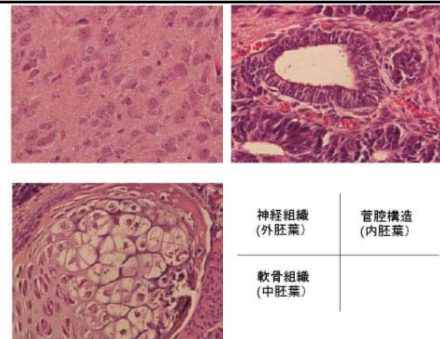
Pluripotency-inducing factors (PIF) 多能性誘導因子

②レトロウイルスベクターを利用してiPS因子を導入する ③外来遺伝子が導入された細胞を赤色で示した



①ヒト皮膚線維芽細胞 (ホスト細胞) ④ES細胞様の細胞コロニーが形成される。これがiPS細胞

iPS細胞作成の手順



iPS細胞をマウスの皮下に移植すると腫瘍が形成され、組織的に解析すると神経組織 (外胚葉)、消化管様の管腔構造 (内胚葉)、軟骨組織 (中胚葉) など三胚葉に由来する各種分化組織、細胞が認められます。