

金沢大学サテライト・プラザ ミニ講演

日時：平成20年1月12日（土）午後2時～3時30分

会場：金沢大学サテライト・プラザ 集会室

演題：「マウスの遺伝子进行操作してヒトの病気を解明

—2007年ノーベル生理学・医学賞からの発展—

講師：浅野 雅秀（金沢大学学際科学実験センター教授）

はじめに

今日は、たまたま昨年10月のノーベル生理学・医学賞が私のやっている分野と非常に近い分野で受賞がありましたので、そのご紹介と、今この学際科学実験センターでどういうことをやっているかについてお話しします。学会ではよくしゃべるのですが、一般の方に対してうまくしゃべれるかどうかよく分かりませんが、1時間半ほどお付き合いいただければ幸いです。

金沢大学の動物実験全般を行っている実験動物研究施設という建物がこれです。見ていただいたら分かるように、窓がほとんどないのです。その理由はありまして、実験として動物を使う場合は、やはり温度や湿度、光（明暗）までもちゃんとコントロールした状態で私たちは実験をしたいからです。中でタイマーでコントロールしているため、ほとんど窓がない建物に我々はおります。

それから、金沢大学に学際科学実験センターというものがあることをご存じの方は、ほとんどおられないと思います。例えば、医学系研究科であるとか、自然科学研究科というのは聞かれたことがあると思いますが、私たちがいる学際科学実験センターというのは、いわゆる研究科や学部とは違った、独立したセンターです。

この学際科学実験センターは二つの使命を持っています。一つは、それぞれが非常に特化した技術を持っている集団ですので、その技術を用いた先端研究と、それから大学の他の部局の先生方がいろいろ研究するための研究支援で、その両方を学際的、つまりこれまでの学問分野を越えて一緒にやろうというセンターです。

具体的には、四つの分野があります。私がおりますのが遺伝子改変動物分野、簡単にいえば動物実験をやっているところです。特に私の専門が遺伝子进行操作した動物というものを使っている関係上、そういう動物がたくさんいます。次に、ゲノム機能解析分野。昔は

遺伝子実験施設と言っていました。今はゲノムという概念でとらえて研究をされているグループです。それから、トレーサー情報解析分野というのはラジオアイソトープ（放射性同位元素）を使った研究をされているグループです。それから、機器分析分野というのは、大型の高度な解析装置には非常に高価なものがありますので、そういうものをここに集めてみんなで使います。そういうものを合体したセンターです。

当然のことながら理系が主ですが、医学系研究科、自然科学研究科と綿密にタイアップしてやります。例えば今日の活動は、地域貢献として市民公開講座などもやっていこうというもので、ほかの分野の先生方もいろいろと活動されています。

1. マウスの遺伝子进行操作する

① 遺伝子操作の歴史

今日のお話の本題、「マウスの遺伝子进行操作する」です。まず、外から遺伝子を入れるという研究が、1970年代ぐらいから始まりました。最初は、私も大学院生のときには大腸菌を対象に実験していたのですが、実験用の大腸菌などの細菌に遺伝子の本体であるDNAを導入するというのが、1970年代ぐらいに行われました。その後、動物から採った培養細胞、例えば心臓や皮膚の細胞をシャーレの中で培養することができるのですが、そういう細胞にDNA遺伝子を入れるという技術が、1970年、80年代に盛んに行われました。

そういう時代があったのですが、特に医学系としては、動物、生き物全体で遺伝子进行操作して研究をしたいという要望が非常に強く、マウスというのが実験に使いやすいので、最初にマウスの受精卵に遺伝子を入れてみました。大腸菌や培養細胞ではなくて受精卵です。受精卵に遺伝子を入れるというのは何を意味するのかというと、この受精卵から生まれた個体、マウスは、すべての細胞にその遺伝子が入っているということになります。ですから受精卵に遺伝子を入れたらいいだろうということで、受精卵の、特に遺伝子がある核の中に、非常に乱暴なのですが、細いガラスピペットでぶすっと穴を開けて遺伝子を直接注入しました。そういうことを1980年にやった人がいます。

そういう技術を基にできてきた、外から遺伝子が導入されたマウスのことをトランスジェニックマウスといいます。それが80年代にできたのですが、1990年になると、外から新たに遺伝子を入れるのではなくて、もともと動物が持っている遺伝子自体を破壊することができないかということを考える人たちが出てきて、それが去年のノーベル賞の受賞につながったわけです。細かいことは後できちんと説明しますが、もともと動物が持っている

る遺伝子をつぶすということもできるようになりました。今日のタイトルは、さらにそこからの発展ということで、私たちはマウスが持っている遺伝子を本当に思うがままいろいろと改変できるということに、21世紀はなってきました。

遺伝子を受精卵に入れる方法には三つぐらいあるのですが、一番よく使われているのがDNA微量注入法で、受精したばかりの1個の受精卵では、卵子由来の核と精子由来の核、要するにお父さんの核とお母さんの核が、融合する前に二つ見ることができます。その片方の核にピペットを突っ込んでDNAを入れるというものです。

これが実際の顕微鏡写真ですが、ここに受精卵がいて、左側のガラスピペットは受精卵が動かないように単に保持しているだけです。大体この受精卵の直径が0.1mmなので、核は0.02mmぐらいだと考えてください。この部分とこの部分が核で、こっちの方がちょっと小さいのでお母さん由来、こちらがお父さん由来です。お父さん由来の核に注入するのは、核が大きいからという、それだけの理由です。ちょっとピントがずれていますが、ここに細いガラスピペットを持ってきて、ぶすっと刺します。このガラスピペットの中にDNAの液体が入っていますので、それを注入すると、上と見比べていただきますと、核が膨れたように見えるのが分かると思います。これで、DNAが中に入ったということが確認できます。

こういう方法によって、マウスの染色体の中に注入した遺伝子が組み込まれるということが、かなりの頻度で起きます。きちんとやっていたら、10~20%組み込まれます。1980年にトランスジェニックマウスを世界で初めて作ったというのが、今の方法です。

それから、こういう胚操作の技術を発生工学技術というのですが、いろいろな技術が進歩しました。万能細胞がヒトからもできたというのが、つい12月に大きく新聞等で報道されたと思いますが、現在はこういうところに来ております。

ここ30年ぐらいの歴史を簡単に振り返りますと、1980年の次の年には今日のお話のポイントとなるES細胞というものが、マウスで早くも樹立されました。ES細胞というのは胚性幹細胞というもののなのですが、それは後でもう一度出てきますので説明します。ES細胞というのが樹立されたのが1981年、このES細胞を使って、先ほどちょっとご紹介があったノックアウトマウスというものができたのが1988年ぐらいです。

ES細胞はいろいろな細胞になることができる万能細胞の一つですが、その後、それとよく似たものが生殖細胞のもととなる細胞から採られて、EG細胞と名付けられたのが1992年です。マウスでは、このころから研究ができるようになったのですが、ESとかE

Gというのが、ヒトで初めて採られたのが1998年です。ヒトで採られたことから、再生医学の分野でES細胞を使えばどんな臓器でも作れるのではないかという話になってきました。

もう一つ遺伝子操作という意味では、このES細胞などを使わずとも大きな動物の遺伝子操作ができるということで、クローンという技術も、その間の1997年に開発されています。今日は時間の関係でこの話はいたしません。

その後2004年になりましてから、京都大学のグループが精子のもととなる細胞からGSとかmGSと名付けた細胞を樹立しました。2年後には、完全に分化したマウスの細胞から、四つの遺伝子を入れるという遺伝子操作をする必要はあるのですが、胚や精子という細胞ではなくて、一般的には万能細胞、iPS細胞と呼ばれている細胞が、京都大学で樹立されました。マウスでできればヒトでも多分できると思うのですが、実際にヒトから採られたということについてこの間非常に大きく報道されたところです。以前は、マウスでできてからヒトでできるまで10年以上ギャップがあったのですが、今やものすごく競争が激しく、マウスができれば半年から1年でヒトでもできるという時代になっているのだと思います。

②発生過程での細胞系譜

アルファベット2文字でGSやESなど、どれがどれだかよく分からないと思います。胚発生の中で、今出てきたものは多能性幹細胞というのですが、それがどういう位置にあるかというのを示した図です。最初に、受精卵があって、この受精卵から細胞が分化して行って、最終的にはいろいろな臓器ができます。こちらの栄養外胚葉は、胚の周りにある胎盤の組織です。体にはならないけれども、胚が発生するために必要な組織も受精卵からできてきます。

一番元になるES細胞というのは、胚盤胞の内部細胞塊からできたものです。内部細胞塊というものは、体のすべての臓器の大本になる、体づくりの基本となる細胞ですので、そこから採った細胞をES細胞と呼んでいます。ですから、ES細胞からいろいろな臓器を作ることができるのは、もともとが内部細胞塊であることからご理解いただけると思います。

それから一段進んだ始原生殖細胞は次の世代を作る特殊な細胞ですが、生殖細胞のもととなる始原生殖細胞から採ったものが、EG細胞という名前と呼ばれています。それから、さらに分化した精子のもととなる細胞から採られたのがGS細胞です。これらはすべて発

生過程の中で、それなりに幹となる細胞から樹立されているのですが、今回非常に我々が驚いたのは、表皮、皮膚というもう完全に分化した細胞から、もう一度幹の細胞に人為的に戻ることができたということです。昨年12月に報道された万能細胞と呼ばれるものがそれです。

③遺伝子改変動物

遺伝子改変動物の方に話を戻して、その定義を説明します。受精卵とか、今出てきたES細胞、ESもEGもGSもiPSも、みんな同じ一群と考えていいのですが、もう一度体を全部作ることができる細胞に対して遺伝子进行操作し、個体として発生させます。その個体の次の世代を担う生殖細胞を含む体のすべての細胞、指の先から脳の中も、心臓の中も、肝臓の細胞も、全部の細胞が、最初のこの遺伝子操作の影響を受けていきます。そういうものが遺伝子改変動物です。

最近、クローン技術を用いて、例えば大きな豚や牛といった動物でも遺伝子改変動物を作れます。誰もやりませんが、可能性としてはヒトでも可能な時代になっています。

その遺伝子改変動物を大きく2種類に分けることができます。トランスジェニック動物と、遺伝子ノックアウト動物がありますが、これはどういうふうに遺伝子操作をしているのかという点が根本的に違います。

トランスジェニックは、ガラスピペットで外から新たに遺伝子を入れ機能を獲得する、動物がもともと持っていなかったものを獲得するタイプの遺伝子操作です。それに対してボクシングで出てくる用語と同じ、ノックアウトという遺伝子操作は、名前のおり遺伝子をつぶします。もともとその動物が持っている遺伝子の中で、特定の狙った遺伝子を破壊します。そういう方法で作製されるのが、トランスジェニックと反対で機能を失ってしまうタイプの遺伝子改変動物です。

ただ、完全に壊すだけではなくて、例えば量を減らすとか、ほかのものと入れ替えるということで、ノックアウト、ノックダウン、ノックインなど、ノック何とかというのが、今いろいろ出てきております。ただ、基本的には持っている遺伝子を改変するノックアウトと、新たに遺伝子を導入するトランスジェニックの2種類がございます。

今のような機能を獲得するもしくは機能を失うタイプの遺伝子操作を動物にするのですが、それは別に面白いからやっているだけではありません。どういうことに役立つのかということを簡単に言うと、3種類ぐらいあると思います。

一つは別に医学部だけではなくて、薬学部とか理学部の分野にも関係することですが、要するに一個一個の遺伝子の体の中での機能を調べたいという場合です。培養細胞で遺伝子操作をしても、ある程度のことが分かりますが、やはり体づくりなど体の中での出来事をきちんと見るためには、やはり個体で遺伝子操作をしないと分かりません。

例えば、どのように受精卵が発生してくるのだろうかとか、神経系のネットワークがどのように構築されているのだろうか、免疫系の反応は体全体でどう動いているのか、そういうことを知るのに、一種類の培養細胞で遺伝子操作をしても何も見えてきません。こういうことを見るためには、関係する遺伝子を先ほどのように機能獲得型、もしくは機能喪失型の改変をやって、調べていこうということです。

今、ヒトゲノム解析が終わって、人間は大体2万3000個ぐらい遺伝子を持っているといわれています。極端なことをいえばその一個一個について遺伝子改変をやれば、その2万3000個の遺伝子のネットワークが分かるだろうというプロジェクトになります。

後でちょっとヒトの病気と遺伝子というお話をいたしますが、もう一つはもっと医学的な興味です。かなりの病気がやはり遺伝子の異常から起きていますので、遺伝子改変、遺伝子操作をすることによって、ヒトの病気と同じような病気の動物を作ることができます。それを疾患モデルといい、そのような動物を作り研究すれば、その病気が分かるし、どうやって治療すればいいかも分かるということです。病気のモデルを作るという発想で、この遺伝子改変動物を使っている人たちもたくさんいます。

今日はあまりお話をする機会がないのですが、例えば感染症のモデルなども、こういう技術で研究することができます。それから遺伝子改変そのものではありませんが、このテクノロジーを進歩させる上でいろいろな幹細胞が出てきました。こういうものは、再生医学という分野で今非常に注目されています。ヒトに応用するときには、遺伝子改変はしませんが、私たちの技術が医学領域でも非常に貢献できると考えています。

もう一つ、日本ではあまりされていませんが、農学分野でもこの技術は応用されています。特に動物の場合、やはり遺伝子改変をすることによって、家畜の生産性が向上するということがあります。それから、欧米ではもう盛んにやられていますが、有用物質、特に医薬品の生産に動物を使います。動物には非常にかわいそうな話ですが、もともと動物細胞から作る医薬品であれば、遺伝子改変した牛とかヤギの乳汁中にその医薬品をたくさん出させて、お乳を搾って、そこからすぐ薬を作ってしまう、動物を工場として使うという発想の研究もされていて、実際に幾つかの医薬品はこういう形で作られています。動物に

作らせることによって、大腸菌に作らせるよりも、よりヒトに近い形のものができるので、副作用が少ない医薬品ができます。

2. 遺伝子の異常と病気

①遺伝子の異常によって起こるヒトの遺伝病

今回は「病気の解明」というタイトルをつけさせていただいたので、「遺伝子を操作する」と「遺伝子の異常と病気」ということを簡単にまとめさせていただきました。遺伝子の異常によって起こる病気として、まずは遺伝病があります。

大きく分けると、優性遺伝と劣性遺伝と伴性遺伝に分けることができます。優性遺伝というのは、両親のどちらかに遺伝子異常があれば、残念ながら約半分の確率で、子供さんにもその遺伝子が伝わって発症します。ハンチントン舞踏病とか、脊髄小脳変性症という病気が、これに該当します。それよりも多いのは両親の両方が保因者である劣性遺伝です。すべての人はお父さんとお母さんからワンペアの遺伝子を受け継ぎますので、両方から病気の遺伝子を受け継ぐ確率は4分の1になります。これはもう挙げれば幾らでもあります。例えば筋ジストロフィーなどもこれに当たります。もう一つ、伴性遺伝はXやYという性染色体に異常がある場合で、例えば男性だけに発症する血友病などが知られています。

こういう遺伝病というのは、原因がこの遺伝子のここということが分かっている、どういうふうの子孫に伝わるかというのも、分かっているものです。けれども、それ以外に例えば、原因遺伝子はよく分からないけれども、染色体全体がおかしくなっている病気があります。例えば、ダウン症候群は21番染色体が普通は2本なのに3本あります。ターナー症候群というのは、女性の場合二つあるX染色体が片方しかないという染色体異常で、こういうのも遺伝病の中に入ると思います。

②優性遺伝と劣性遺伝

遺伝子の異常によって、病気になる、ならないというのは、優性遺伝のタイプと劣性遺伝のタイプで違います。皆さんそれぞれの人に両親がいて、お父さんからとお母さんからの二つのペア遺伝子を持っているのですが、片方に異常があればそれで病気になってしまうのが、優性遺伝のタイプです。お父さんがその病気を持っていて、お母さんは関係なくても、子供さんが生まれた場合、両親からそれぞれ一個ずつの組み合わせで4通りできま

す。異常のある染色体を取ってしまった場合に発症しますので、50%が発症してしまいます。

それに対して劣性遺伝というのは、遺伝子が二つありますので、片親から来たものがおかしくても病気にはなりません。でも、片方はおかしくなっているという人同士から子供が生まれた場合は、組み合わせとして両方おかしくなるというのが4分の1で出てしまっ

③遺伝病以外の遺伝子の異常によるヒトの病気

今の話は遺伝病として割と誰にでも理解できることなのですが、遺伝病というのはそんなにたくさん患者さんがいるわけではないのです。それに対して、がんとか、成人病、精神疾患、感染症というのは、われわれがいつなるか分からない病気なので、人ごとではありません。こういう疾患にも、やはり何らかの遺伝子の異常がかかわっていることがだんだん分かってきています。

例えば、がんを起こさせる、がん遺伝子（発がん遺伝子）というものと、逆に、がんを抑える、がん抑制遺伝子というものを、われわれ人間はもともと持っています。私も持っているはずです。

がん遺伝子というのは、普通は細胞が増殖するのに必要な遺伝子であることが多く、量的に異常をきたすというのは、普通よりもたくさん出てしまうことです。質的に異常をきたすというのは、その活性がすごく上がってしまうことです。そういう遺伝子変異を生じた場合、がんになります。ただ、1個のがん遺伝子が異常を起こしただけですぐにがんになるわけではなく、そういうがん遺伝子の異常が複数、同じ細胞で起こった場合に、がん化すると、今は一般にいられています。

もう一つ、がん抑制遺伝子というものをわれわれは幾つか持っています。これは先ほどの劣性遺伝と同じことになるのですが、お父さんとお母さんから頂いた遺伝子の両方がおかしくないと、がん抑制遺伝子としての機能はなくなりません。だから、両方が偶然おかしくなるということはほとんど起きません。実際起きるのは、片方の遺伝子がもともと先天的におかしくなっていて、もう片方はちゃんとしているのだけれども、これがその後何らかの理由でおかしくなったときです。両方なくなるから、がん抑制ができなくなって、がん化するというメカニズムで、これも遺伝子の異常です。

それから、例えば、糖尿病や高血圧などの成人病も関係します。これはまだこの遺伝子

がおかしくなれば、絶対に糖尿病になるとか高血圧になるという1対1の関係はありません。しかし、そういう遺伝的要因と、私のように太っていると非常によくはないという生活習慣の複合的な原因で、発症することが分かっています。

それから、統合失調症とか自閉症と呼ばれるような精神疾患も、遺伝的要因の影響が大きいいわれています。その一つの例として、一卵性双生児での研究があります。一卵性双生児というのは、先ほどの受精卵が一回分裂して二つの卵になったときに、それが何かの理由でばらばらになって別々に個体になった場合で、それはもともと同じ受精卵ですから遺伝的には全く同じです。そういう一卵性双生児の片方の方が発症したら、もう片方が発症するというのが一致率ですが、例えば統合失調症の場合は30~50%、自閉症の場合は60~95%という数字が挙がっています。同じ双子でも二卵性、つまり別々の卵から発生した場合は、こんな高い数字が絶対に挙がってこないことから、やはり遺伝的な要因は大きいと考えられています。

最後に、感染症も実は遺伝的要因を受けることがあります。例えばHIVというウイルスに感染することによって起きる、エイズという病気があります。このエイズウイルスが細胞に結合する時に働く受容体遺伝子というのを、われわれは持っていて、その補助受容体遺伝子にはCXCR4とかCCR5という名前がついています。こういう遺伝子のタンパク質を利用してウイルスは中に入ってくるのですが、これが人によっていろいろと型があって、同じように感染しても、エイズウイルスが簡単に入り、すぐに増えて発症する人と、なかなか入っていかないで発症しない人がいます。これも遺伝子という言葉で語ることができることから、いわゆる遺伝病以外にも、いろいろな病気において遺伝子が関係しているといえます。

3. モデル動物を作ってヒトの病気を研究

①病気のモデルを作る

従って、遺伝子を操作した動物を使って研究することには大きな意味があると思って、私たちは研究をしているのです。病気のモデルの動物を作るという話に移りますが、幾つかタイプがあります。

一つは自然に起こる突然変異です。普通に飼育していて、交配して次の世代、次の世代とやっているうちに、病気の遺伝子にたまたま、変異が入って病気になってしまうということが起きます。特に私たちのところのようにマウスを何万匹と飼っていると、たまにこ

うということが起きます。偶然なのですが、こういうところから新しいモデル動物を見つけるてくるという仕事があります。

ただ、これはそういうことが起きるのを待っているしかありません。しかも、どういう病気になるかも分かりません。それから、遺伝性の病気であると分かっても、その原因の遺伝子を見つけるのは、簡単ではありません。これを最初から狙ってやる人はいませんが、ただ偶然いろいろ見つかって来るわけです。

それから遺伝子の操作ではないのですが、実験操作、薬物を投与するとか、外科的手術といったことで、例えば糖尿病、関節リウマチ、虚血のモデルが作られています。ただ、この場合は無理やり人為的なことをしているので、実際の病気の原因とかなりかけ離れていることが多いです。

それに対して、今日の本題の遺伝子改変モデル動物というのは、受精卵やES細胞、胚の段階で遺伝子操作を行って、全身で遺伝子を改変した動物のことです。今、患者さんと全く同じ遺伝子変異を導入するということが、技術的に可能ですので、そういう方法で作ったモデルというのは、原因は患者さんと一緒です。症状も、ヒトと動物という違いがあるので必ずしも一緒になりませんが、非常に近いものができます。そのことから、やはり今はこの方法が、モデル動物を作るという意味で、非常に有意義であるといえます。

②ヒトと動物の遺伝子はどれくらい違うのか

ただ、例えば私たちはマウスという動物を使っているのですが、マウスでそんなことをしても本当にヒトのことが分かるのかということです。最近ゲノムが幾つか決まりましたので、非常に簡単な比較をやってみました。チンパンジーはわれわれに一番近いわけですが、まずチンパンジーを用いてのこういう実験は、絶対に許されていません。現実的にも霊長類の遺伝子操作というのは、大学レベルの実験室ではかなりしんどいことです。

それでマウスを使っているのですが、全ゲノムの配列は、例えば人間の場合だと、 3×10^9 だから30億塩基対、DNAの配列があるのですが、それが全体でどれくらい似ているか。さすがにヒトとチンパンジーは非常に似ていて98~99%です。これは逆に考えるとかなりショッキングなことで、彼らと私はたかだか1%しか違いません。私はこいつとは違うと思っているのですが、それは1%だけなのです。この結果が出たときには、非常にショッキングでした。10%ぐらいは違うだろうと思っていたら1.5%とか2%、人によってちょっと違いますが、それぐらいです。恐らく隣にいる人と私とも0.1%ぐらいは違うと

思うのですが、それぐらいの違いです。

ただ、もう一つ重要なことは、私とマウスはもう全然違うものに見えるのですが、全ゲノムの配列を比較すると70%一緒です。かなり似ています。さすがにフグになると、ちょっと大きさが違うので、比較できないのですけれども。

もう一つの比較方法は、遺伝子の塩基配列はちょっと違うけれども、同じ遺伝子を持っているか、いないかで比較をします。そうするとチンパンジーとヒトというのは、持っている遺伝子の種類はほぼ100%一致します。ただ、配列はちょっと違ったりします。マウスと比較しても、90%は同じ遺伝子を持っています。要するに、あと10%、ヒトらしきを出す遺伝子、マウスらしきを出す遺伝子をそれぞれ持っているみたいなのですが、90%は一緒なのです。

ということを考えて、チンパンジーは100%だからより近いのですけれども、マウスで遺伝子操作をしても90%の遺伝子は同じ種類なわけですから、十分研究ができます。塩基配列自体を全体で見ても、70%という高い相同性がありますので、これは十分実験ができるということが分かっていただけたと思います。

③マウスの遺伝子を操作して病気のモデルを作成

ミッキーマウスもマウスなのですが、一般にはハツカネズミのことです。もう一つネズミといわれるものにラットという種類があります。一般的にはドブネズミと世間でいわれている、もっと大きいものです。その両方があるのですが、このハツカネズミの方が体が小さいということで、大学では今これが盛んに使われています。また遺伝子操作を、今のところマウスでしかできないという理由があります。

マウスとヒトは共通の遺伝子が90%あることから、マウスで遺伝子操作をしてもヒトのことがかなり分かります。それから、やはり同じような環境で暮らしてきたというか、人類と同じ家の中で暮らしてきたという歴史があります。

さらに、私たちにとって一番重要なのは、実験動物の中では最も小さくて、しかも遺伝子操作をするときの次の世代、次の世代という世代サイクルが短い点です。20分で倍に増える大腸菌に比べればけた違いに長いのですが、霊長類の場合は10年ぐらいかかるので、とてもやっつけられません。マウスは3カ月で次の世代にいきます。

マウスにはいろいろな系統というのがあるのですが、遺伝子を操作するためには、遺伝的に均一な実験用動物が必要です。その点マウスの場合もう50年以上の歴史があって、確

立しています。

それから、もう一つ非常に重要なのは、最初に言いました発生工学とか生殖工学、ES細胞を用いた技術が、今のところマウスでしかできない、ラットはできないということです。だから今は、マウスが圧倒的に使われています。

④2007年ノーベル生理学・医学賞

そのマウスの遺伝子組換えをやって、去年ノーベル賞が授与されたのですが、ポイントが三つぐらいあります。

まずは、1981年、マウスの体を再生できる胚性幹細胞であるES細胞が樹立されました。これが大きなことでした。一番最初に言いましたように、核にDNAを打ち込むという方法では細かい遺伝子操作が不可能です。思ったように遺伝子操作をするためには、どうしてもES細胞が必要なのです。それが1981年に作られたということです。

それから、マウスもヒトと同じように二万三千幾らかの遺伝子を持っているのですが、どれでもいいから改変してしまったのでは実験の目的がはっきりしません。そこで狙った遺伝子だけを、2万3000個のうちピンポイントで改変できる技術が開発されました。

この二つの技術を合体して遺伝子改変マウスができるということで、2007年のノーベル生理学・医学賞が、この3人の方々に与えられています。その受賞の研究課題は、「胚性幹細胞（ES細胞）を用いてマウスの特定の遺伝子を改変する原理の発見」ということで、マリオ・カペッキ博士と、マーチン・エバンス博士と、オリバー・スミシーズ博士の3氏がもらわれています。この人たちは、お互いにいろいろ情報交換をしながら共同研究などをやっていたのですが、それぞれ全然違うところで独立に研究をされていました。

まず、マウスの受精卵からES細胞を樹立したという大きな仕事をしたのが、マーチン・エバンス博士です。ES細胞は、すべての臓器に分化する大本の内部細胞塊という細胞から採っています。ES細胞をまたもとに戻せば、すべての体ができるという細胞なので、これを樹立したというのは非常に大きな仕事になっています。

それから、あとの2人は独立にやったのですが、マリオ・カペッキ博士と、オリバー・スミシーズ博士です。ES細胞で二万幾つかある遺伝子の中の、これ1個というのをピンポイントで改変する技術を、お互い競争しながら、それぞれ確立しました。ES細胞ができ、ピンポイントで遺伝子を改変することを合わせて、ノックアウトマウスというものができるようになりました。

これが私たちの研究室で使っているES細胞の顕微鏡の写真です。培養細胞の写真はあまり見られたことがないと思うのですが、ES細胞というのは、普通の培養細胞に比べると非常に変わった細胞です。これはES細胞ではなく、ES細胞を培養するために、その下に敷いてあるフィーダー細胞というものなのですが、核があって細胞質があって突起を出している。こういうのが一般的な培養細胞かと思いますが、ES細胞は違うのです。

ES細胞はこれですが、1個の細胞ではなくて、この中に、数えることができないのですが数十個の細胞が塊で入っている。こういうのを細胞塊といいます。細胞と細胞の境目がどこかよく分からない形で、コロニーを作って増えていきます。これはまさに受精卵の形です。受精卵の内部細胞塊をシャーレの中で再現している細胞です。これは放っておくとどんどん大きくなります。トリプシンというプロテアーゼで処理するとばらばらになるので、もう一回ばらして、また小さくして増やします。大体2日に1回、植え継がないといけないのですが、これがES細胞の塊です。

⑤相同組換え法によるES細胞での遺伝子破壊

ピンポイントで1個だけ遺伝子をつぶすというのが、相同組換え法という方法です。これは二人の博士たちが見つけた方法ではなくて、もともと酵母などでよく知られていた方法です。それをES細胞でやったのが、あの博士たちです。

遺伝子というのは、タンパク質をコードしている部分がいくつかに分断されて存在しているのですが、例えば、二万幾つかあるうちのある遺伝子をつぶしたいと思ったときには、その遺伝子の領域全体を採ってきて、試験管の中で細工をする必要があります。研究者が試験の中で相同組換え用に細工をした遺伝子を、ターゲッティングベクターといいます。

重要なことは、もとの遺伝子のかなりの部分を残しておいて、一部だけちょっと改変することです。標的遺伝子の一部を、ネオマイシン耐性遺伝子に入れ替えます。効率よく採るために、いろいろな薬剤や毒素の遺伝子を入れる工夫がありますが、基本的には、狙った遺伝子の一部分を置き換えて周り是一緒という人為的な遺伝子を作って、これをES細胞に入れるということです。ES細胞が分裂するときに、同じ部分がうまくのりのようにくっついて、DNAが複製するときに標的遺伝子のところにターゲッティングベクターが挿入されます。ここが遺伝子にとって非常に重要な部分であれば、これでもう遺伝子がつぶれてしまいます。

要するに、狙った遺伝子と同じ部分を採ってきて、そこにちょっと改変するように手を

入れてやったベクターをぼんとE S細胞に入れます。非常に頻度は低いのですが、それが遺伝子の中に相同組換えで入ってしまうということが起こります。

⑥キメラマウスの作製法

遺伝子を改変したE S細胞をシャーレの中で幾ら培養していても、ある日ふたを開けてみたら突然そこにネズミがいたということ、私は経験したことがありませんし、それはちょっとあり得ません。確かに、そこから心筋細胞を作ったり、皮膚の細胞を作ったりということはできますが、ネズミ本体を作ることは今のところできません。

ですので、どういうことをするかというと、もう一回E S細胞のもととなった内部細胞塊のところに、遺伝子改変したE S細胞を戻してやります。これは普通のマウスの卵なので、その力を借りて、その中に入り込むような形で、もう一回ネズミにするということをやります。E S細胞を胚盤胞に注入する方法と、これより一つ前の8細胞とくっつける方法の2種類があるのですが、そういうことでネズミにしていきます。

これが、E S細胞を胚盤胞の胚盤腔に入れている実際の写真です。この場合の細いガラスピペットは、細胞を入れなければいけないので、先ほどのDNAを入れたガラスピペットよりはちょっと太めです。E S細胞を吸ってやり、卵に注入します。この胚盤胞は、1細胞だったものより発生が進んでいて、細胞が全部で64個ぐらいあります。細胞の境界は見えませんが、E S細胞が由来した内部細胞塊という部分です。この部分は、実は水がたまっている空間で、細胞がない部分です。胚盤胞というのですが、発生の過程でそういう時期があります。そこの空間にE S細胞を入れていきます。この内部細胞塊とE S細胞はもともと同じ兄弟みたいなものですから、E S細胞は取り込まれて、交じり合ってネズミになります。

もしくは、先ほどの胚盤胞よりも一つ前の日だと8個ぐらいの細胞の塊ですが、この中には空間はなく、卵の塊とE S細胞の塊を単にくっつけます。シャーレにちよっとくぼみを作ってくっつけるだけで、一晚培養すると全部一緒になった胚盤胞ができ、当然ここは内部細胞塊なので、E S細胞は中に入ってきます。

E S細胞を取り込んだ卵を子宮に戻してやると、新しいネズミが生まれてきます。例えばE S細胞のもともとのネズミの毛色が白だとして、胚盤胞のネズミの毛色が茶色だとしたら、キメラという白と茶色のまだらの動物が生まれてきます。キメラは正常な卵由来の細胞と、遺伝子を操作したE S細胞が交じっているのです。体全体で遺伝子がつぶれたとい

うことにはなりません。

そこから2世代すれば、いわゆるノックアウトができるのですが、先ほどのキメラのマウスというのは、精子もキメラ状態なのです。普通の卵由来の精子と、ES細胞由来の精子が交じた状態で存在しますので、ES由来の精子と、野生型の卵子が、もしうまく受精すれば、片方の遺伝子がつぶれたマウスが生まれます。先ほどの劣性遺伝と一緒に、お母さんもそういうマウスを持ってくれば、4分の1の確率で両方遺伝子がつぶれたノックアウトができるという仕組みになっています。

以上が、ちょっと難しかったかもしれないのですが、ヒトの病気、遺伝子、そして遺伝子操作をして動物を作るというお話でした。ここでちょっと話が切れるのですが、何かご質問はございませんか。

(質問者1) 成人病で脳卒中の方、手足片方まひの方、その神経細胞が動かないのをなんとか治療できないか。

(浅野) そうですね。だから、そういう患者さんの場合は、遺伝子操作という発想ではなくて、機能を失ってしまった部分の幹細胞を移植するという事で治療ができるかもしれません。例えば神経に問題があるのであれば、神経の幹細胞を移植する。それから、ほかの細胞が必要なら、そういう細胞を移植するという事を今目指しています。

ただ、一番の問題は拒絶反応がありますので、やはりご本人由来の細胞を戻したいということなのです。そこで今非常に注目されているiPS細胞、万能細胞というのは、ご本人の皮膚細胞からiPS細胞を採って、もう一回必要な細胞の幹細胞に戻すことができるのではないかということです。まだ全然成功はしていませんが、考え方はそういうことです。

(質問者1) 5～6年でできるのですか。

(浅野) それは分かりません(笑)。でも、京都大学に大きなお金が入りましたので、それを目指しているのだと思います。

(質問者1) ありがとうございます。

(浅野) ほか、よろしいですか。では、実はまだ半分ぐらいあるので、続きにいかせていただきたいと思います。

4. 学際科学実験センターでの病気のモデル

①遺伝子から糖タンパク質ができるまで

今までは一般的なお話をさせていただいたのですが、ここからは私たちがやっている病気のモデルのお話をさせていただきたいと思います。これは多分中学校の教科書にも出ているものだと思いますが、二重らせんのDNAがあって、そこからmRNAというものが合成されて、タンパク質ができます。DNAからmRNAへの部分を転写、mRNAからタンパク質ができる過程を翻訳といいます。このタンパク質が、最終的には私たちの体の中で酵素として働いたり、細胞の骨格を作ったり、転写因子となったりして、機能します。

ところが、このタンパク質の約半分ぐらいはさらに糖鎖という修飾を受けます。団子みたいに見えますが、この団子みたいなものがくっつくのです。つくところは決まっています。実は糖鎖修飾というのは、タンパク質全体の機能を決めるのに非常に重要な役割をしているということが最近分かってきました。糖鎖をつけるというのは、一個一個、糖という団子をつけていく操作をしなければいけないのですが、そういう酵素が存在します。私たちの体の中に大体200種類ぐらいあるといわれています。

アスパラギンとか、ある特定のアミノ酸にしか糖はつかないのですが、1個酵素が働くと、黒団子が1個つきます。つけるだけではなくて、白い団子を二つ切ったり、また代わりに黒をつけたりと、それから赤いひし形をつけるといったことが、細かく私たちの体の中で起きて、タンパク質に非常に大きな糖鎖という分子が結合します。そういう1個つけるとか、1個切るというのは、糖転移酵素や糖分解酵素がやっているのですが、その一個一個が遺伝子なのです。だから、一個一個こういう遺伝子が働いて、最終的に糖鎖というものができてきます。

②糖鎖異常とヒトの疾患

そういう糖鎖は、タンパク質の機能に重要な役割を果たしているのです。糖鎖がおかしくなると、病気も起きます。糖鎖が関係する、もしくは関係しそうかなというのも表に入っ

ているので、関節リウマチのようにクエスチョンが入っているのは怪しいかもしれませんが、糖鎖はいろいろな病気に関係します。

表のうち二つは、もう遺伝的にはっきりしています。そのうち筋ジストロフィーには、いろいろなタイプがありますので、必ずしも糖鎖異常だけではないのですが、MEB病とかWWS症候群と呼ばれている筋ジストロフィーは糖鎖異常であると、ごく最近、日本人のグループによって明らかにされました。

それからこの筋肉の遺伝病は、糖鎖の一つであるシアル酸の合成を行う酵素の異常であるということが、最近分かりました。もう一つの話題として、IgA腎症という腎臓の病気があります。われわれはこうではないかと言っているだけでまだ確定していませんが、糖鎖の異常というのが大きく関係します。それ以外にもいろいろな病気、リウマチや糖尿病でも糖鎖の異常がいられています。

感染症などでも遺伝子は重要な働きをしています。例えば、今話題のトリインフルエンザです。先ほどエイズウイルスが何か受容体にくっついてという話をしましたが、インフルエンザウイルスはシアル酸という糖を認識して細胞の中に入ってきます。トリとヒトでは認識されるシアル酸の型が違いますから、トリのインフルエンザはすぐにはヒトには感染しないはずですが、しかし、この高病原性のトリインフルエンザがヒト型、すなわちヒトのシアル酸タイプを認識するように、実は今、東南アジアで変化しているのではないかということがいられていて、もしヒト型にスイッチしてしまったら大変なことになるということで、世間を騒がせています。

また例えば、胃がんの大きな原因であるピロリ菌というのを、聞いたことがあると思います。これも糖鎖が増殖・運動能の抑制に、非常に重要であるということが知られています。

それから、がんの浸潤とか転移です。先ほど述べた、がん遺伝子とか、がん抑制遺伝子ではありません。だから、がんができるところにはあまり関係しないのですが、できたがんが浸潤したり、転移したりするときに、糖鎖は非常に重要です。そういうことがいろいろいられているので、糖鎖とヒトの病気というのは徐々に注目されつつあります。

③筋ジストロフィー

筋ジストロフィーの話題もタイムリーです。つい1～2週間前、元旦の朝日新聞に朝日賞というのが発表されたと思うのですが、何人かの方が受賞されています。この中で遠藤

先生、戸田先生、福山先生のチームが、筋ジストロフィーの一部が糖鎖異常であることを見つけたということで、受賞されていました。これは私たちとは直接は関係しないのですが、ご紹介しておきます。

筋ジストロフィーというのは、ジストロフィン・タンパク質の異常が一番のメジャーなものです。それではなく、糖鎖異常が関係するタイプは非常に患者さんが少ないのですが、細胞膜から突き出たタンパク質と、基底膜のラミニンというタンパク質の間をつなぐものが糖鎖です。この糖鎖を先ほど言いましたように、1個つけ、2個つけ、3個つけ、4個つけるのに、糖転移酵素がそれぞれに関係します。例えば、マンノースという糖鎖をセリン、スレオニンにつけるPOMT1という転移酵素がおかしくなったのがWWS症候群です。

次に、このマンノースにGlcNAcという糖をつける転移酵素、POMGnT1がおかしくなったのがMEBです。このように糖転移酵素の異常と病気が1対1で対応します。特に遠藤さん、戸田さんたちは、POMT1の異常を世界で初めて見つけました。糖鎖がつながらなければ、この間がつながらなくて筋ジストロフィーになることが分かりました。

実は、彼らと私はちょっと一緒に研究をやっていて、3番目にガラクトースがつきます。私は今注目されているガラクトースのところをやっていて、彼らと一緒に調べています。ただ、どうも1個ではないみたいなので、ちょっと話が複雑になりつつありますが、前の話は1個の転移酵素の異常で1種類の筋ジストロフィーが発症するということがはっきりしたという例です。

④糖鎖異常によるIgA腎症の発症

また別の病気なのですが、私たちのところではIgA腎症と糖鎖異常について現在研究をやっております。ヒトIgA腎症は結構患者さんが多いので、今日来られている方のお知り合いにもIgA腎症で悩まれている方がおられるかもしれません。慢性糸球体腎炎の約半分がIgA腎症と言われており、ゆっくり進行する病気です。発症して15年、20年かかって悪くなります。当初は大した病気ではないといわれていたのですが、発見されてからずっと追跡していると、3～4割の方が末期腎不全までいってしまいます。末期腎不全というのは、結局、人工透析もしくは腎移植となります。ただ日本の場合、腎移植はいろいろ問題が生じたりしてあまり進んでいませんので、現実的には人工透析にいつてしまうということなのです。

I g A腎症による新規の人工透析導入患者さんというのは大体年間 5000 人ぐらいと推定されています。なぜ、こういうことになるのかというのはまだよく分かっていません。腎臓の病気といえば、健康診断で「血尿が出ましたよ」「タンパク尿が出ましたよ」というのですぐ分かります。血尿やタンパク尿も重要なのですが、それだといろいろな腎臓の病気があります。I g Aというのは免疫グロブリンの一種なのですが、そいつが腎臓にくっつくというのが病気の本体なので、やはりI g Aがくっついているというのを見ないといいけません。そうすると、患者さんの腎臓の細胞をちょっと取ってきて、そういうことが起きているということを見ないといけないので、診断するためには腎生検をやらないといけません。腎臓の細胞を採ってこないといけないので、すべての患者さんを確定診断できないという点があります。

ヒトI g A腎症の原因には、今もいろいろな議論があります。まずは、免疫グロブリンというものですから抗体です。抗体ができているということなので、その抗体産生の引き金となった抗原がどこかにあるだろうと考えられます。細菌やウイルス、それから食べ物、最近では自己抗原など、いろいろ疑われたのですが、確定的なものはありませんでした。

腎臓の中の血液をろ過して尿を作る働きをする糸球体というところに、I g Aがべたべたとくっつきます。糸球体にI g Aがくっつくような何か受容体があるのではないかと、いろいろ調べられましたが、よく分かりません。

それから、I g A腎症ではI g Aという免疫グロブリンが血液中を流れています。例えばI g Gのような免疫グロブリンと違って、I g Aは本来小腸とかの粘膜免疫に関係するやつなので、腸炎が関係するだろうと言われました。確かに大腸炎が関係することはあるのですが、それはI g A腎症のごく一部に過ぎません。

どの仮説も行き詰っている状態で、10年ぐらい前から、I g Aの分子自体の糖鎖がおかしいのではないかといわれています。特に、そのヒンジ領域というところにあるO型糖鎖がおかしいという報告が相次ぎました。

⑤ I g A腎症のマウスモデル

そういう背景がありますが、私はこのネズミを作ったときにI g A腎症のモデルを作ろうと思っていたわけではなく、作ってみたらそうってしまったというわけです。ガラクトースを転移する遺伝子のノックアウトマウスがI g A腎症になったのですが、I g A腎症だということを示している一つの図がこれです。

バーが小さいのは普通のマウスなのですけれど、尿中のタンパク質、特に血清タンパクであるアルブミンが、このモデル動物では非常たくさんあり、血尿が一部に見られます。それから、腎臓の糸球体という部分だけを拡大していますが、上が普通のマウスだと思ってください。下が、この病気のマウスです。いろいろな染色をしていますが、上と下を比較していただいたらいいのです。例えば、これはいっぱい血管があつて、血液が流れているのですが、この I g A腎症のネズミの糸球体は、もう血管がふさがるぐらい、ここの細胞と基質が増えてしまっているということが分かります。また別の染色をすると、異常な細胞外基質とか免疫複合体が糸球体にくっついているということが見てとれます。

糸球体の異常な様子を、全体がやられている、一部がやられている、ほとんど問題がないという分け方で、赤、青、黒で示しています。横軸にネズミの月齢、だんだん年を取っていくとどうなるかを示しています。普通のネズミでも、だんだん年を取ると、ちょっとおかしい部分が増えます。同じ目で見えた場合、このモデル動物は、もう8週とか13週で、ほとんどの糸球体が一部おかしくて、だんだん全体がやられている赤い部分が増えてきます。ヒトだと10年、20年かかって起きることが、このマウスだと1年、半年ぐらいで、その状態が再現できているということが分かります。

あと一番のポイントは、I g Aというものがちゃんとくっついてないといけないのですが、上がコントロールで、これは蛍光顕微鏡で見えています。これが糸球体ですが、典型的なI g Aの沈着のパターンが見られます。I g GとかI g Mという、別のタイプの免疫グロブリンもくっついたりするところがあり、これも患者さんと一致します。

確定診断の電子顕微鏡で見たときにどうか。多分このくらいが1個の糸球体で、マークをつけたところ、ここに電子密度の高い免疫複合体がくっついているということが、このスライドから見てとれます。私は臨床の医者ではないのでよく分からないのですが、腎臓内科の先生に見せると「これ、ヒトと一緒にだね」と言われました。

⑥ヒトとマウスの I g A に結合する糖鎖の比較

それで、I g A という分子の糖鎖がおかしくなったことが原因ではないかと考えています。ただ、ヒトとマウスはちょっと事情が違います。この I g A というのはこういう形をしているのですが、比較するために右側をヒト、左側をマウス、そしてヒトのところは赤で、マウスは青で書いています。ヒトは、ここのヒンジと書いた領域に、T h r とか、S e r というアミノ酸に、O型糖鎖がくっつくということが知られています。O型糖鎖がガ

ラクトースのところで切れていて短い変な I g A が、I g A 腎症の患者さんで見つかっています。

実は、マウスとヒトで大きな違いがありまして、マウスの I g A にもヒンジ領域というのはあるのですが、アミノ酸配列がヒトと全然違って糖鎖はつかないということが、既に分かっています。そういう意味では同じではないのですが、マウスの I g A では糖鎖が別のアスパラギンにもくっつくことができます。ヒトの場合とマウスの場合場所は異なるのですが、どちらもアスパラギンに N 型糖鎖がくっつきます。このモデルマウスはガラクトース転移酵素を破壊しているのです、その I g A の糖鎖を調べましたが、ガラクトースとシアル酸がついていないことが確認されています。

ヒトとマウスで糖鎖の種類が違うのですが、どちらもガラクトースとシアル酸がつかないということが一緒です。しかも、今日はデータを出しませんが、糖鎖異常の I g A 分子が、例えば多量体を作りやすいとか、腎臓に沈着しやすいといった性質が非常によく似ていたのです、今、私たちはこういうふうを考えて、さらに研究を進めています。

⑦ I g A 腎症の発症メカニズム（仮説）

私たちの開発したこの I g A 腎症モデルは、ガラクトース転移酵素遺伝子がなくなっています。アスパラギンを N というのですが、そのことによって I g A の N 型、アスパラギン結合型の糖鎖がなくなっているということが起きています。けれども、ヒトの場合は、I g A 腎症の患者さんでガラクトースの転移酵素がおかしいという報告はありません。恐らく、これは遺伝子の異常ではないと思っています。

もう一つ、ちょっと話が飛びますが、扁桃腺が腫れると I g A 腎症が悪くなって、扁桃腺を取ってしまうと、I g A 腎症が治るということが臨床の現場で分かっています。扁桃腺で I g A がかなり作られるためです。今のところ遺伝子の変異ではないけれども、扁桃腺で何かが起きているのではないかと考えて臨床の先生方はやっています。ここで何か起きて、結局、N 型と O 型という違いはあるのですが、I g A の糖鎖がおかしくなります。ヒトとマウスのどちらもガラクトース、シアル酸がなくなってしまうので、結局、I g A が凝集体を形成し、免疫複合体を形成して、沈着して I g A 腎症が起こります。I g A の凝集体形成からは一緒だろうと思ひ、今、研究を進めています。だから、最初のところはどうも違うと思うのですが、I g A の凝集体形成からは一緒ではないかというモデル動物ができたのではないかと考えています。ということで、シンポジウムや論文で発表すると、

去年の3月に北國新聞さんとか、中日新聞さんが来て、取材をしていただきました。

⑧縁取り空胞型遠位型ミオパチー

それから、もう一つ別の筋肉の遺伝病のモデル動物の話をしていただきます。先ほどは、正直なところ最初から I g A腎症のモデル動物を作ろうと思ったわけではありません。一方、こちらの話は患者さんと全く同じ遺伝子の、しかもその遺伝子のアミノ酸の1個だけをピンポイントで変えるということ、最初から狙って作りました。

縁取り空胞型遠位型ミオパチー（DMRV）は明らかな遺伝病です。海外では封入体が顕著なので、遺伝性封入体ミオパチーとも呼ばれています。どういう病気かという、遠位型だから、中心部ではなくて手足の末端部の骨格筋に筋萎縮、筋力低下が起きて、これがゆっくり進行し、10代から30代で発症して、10年ぐらいで歩けなくなり車いすになって、最終的に寝たきりになってしまいます。

これはヒトの9番染色体の劣性遺伝の遺伝病であるということが分かっています。ごく最近、海外のグループと、それから私と一緒に研究をしている七尾病院の浅賀先生のグループが、シアル酸合成酵素であるGNEの遺伝子が完全に壊れているのではなくて、アミノ酸が1個違うということが原因だということを見つけました。

これが実際の患者さんの大腿骨と前頸骨筋のMRIの像です。左側も患者さんなのですが、右側の若齢発症例では、大腿四頭筋がこんな形で萎縮してしまい歩行が困難になります。筋肉がどんどん萎縮していくのです。ただ、骨格筋には異常が出るのですが、心筋には異常が出ないので命にかかわる病気ではありません。ですが結局は本当に不自由な生活になってしまいます。

このDMRVの患者さんの骨格筋の病理像というのを教科書からコピーしてきたのですが、縁取り空胞という変な名前がついていました。ゴモリトリクロームという、ちょっと特殊な染色をすると、真ん中が白く抜けて周りがピンク色に染まるという変な染色を示します。これも封入体ですが、これが筋肉の中にいっぱい出てくるという点が、特徴的です。普通に染色すると、このように封入体が見られます。

⑨GNE遺伝子の点変異とDMRV

この図はシアル酸の合成経路を表しています。いろいろなステップを経て最終的にシアル酸ができてくるのですが、GNEはその中心にあります。しかも二つの酵素活性を1個

の酵素が担っているという、ちょっと珍しいものです。この長ったらしい名前をGNEと略しますが、この遺伝子のいろいろな場所にアミノ酸の変異が起きて、この病気になります。それぞれの患者さんでどういうところに変異が入っているかというのを、このタンパク質の端から端をマップしてみたら、いろいろなところに見つかっています。

アミノ酸が1番から並んでいて、572番目のバリンというアミノ酸がありますが、そこがロイシンに変わった患者さんが日本人にはたくさん見られます。アミノ酸が1個替わっただけです。アミノ酸は全部で七百幾つあるのですが、1個替わっただけで、こういう病気が起きます。

このあとV572Lと呼びますが、GNEはエピメラーゼとキナーゼという二つの活性を持っていますが、V572Lはこのキナーゼのところ、point mutation（ポイントミューテーション：点変異）が入っていることが知られています。

私の共同研究者の七尾病院の浅賀先生が見ておられる家系があります。能登半島の方に、結構そういう家系が集積しています。すべての家系がそうではないのですが、どのアミノ酸の変異かという、V572Lがこれだけいるのです。約半分の家系で、このミューテーションが入っていることが分かっています。実は、その七尾病院のグループとアメリカのグループはすごく競ったのですが、V572Lは日本人でしかない特異的なミューテーションなので、これをネズミで作ったらどうだろうということでやってみました。

GNE遺伝子というのはタンパク質をコードする部分がゲノム中にばらばらに存在します。先ほどのV572Lというのは、この10番目のエクソンの中にあります。GNE遺伝子のここの1個のGがCに替わることでアミノ酸が替わるのですが、実はマウスでも、このGNEの遺伝子の塩基配列はほとんど同じで、しかもこの部分というのはヒトと全く一緒でした。

ですから、マウスでヒトと同じような変異を入れることができます。こういうターゲティングベクターを作って、これをES細胞に入れると、同じ部分がのりしろになってくっついて、染色体上のGNE遺伝子と入れ替わるということが起きます。実際にES細胞で、この10番の部分でミューテーションタイプの色を変えた部分に替わるということが、ある頻度で起きます。

こういうのを選ぶために薬剤耐性マーカーを入れています。これは邪魔なので後でのぞいたりします。どうしてもちょっとここに傷が残るのですが、基本的にもとの遺伝子に比べて、10番の572番目のアミノ酸が1個違うだけだという改変をすることに成功しました。

それで、先ほどのようにキメラマウスを作って、両方の遺伝子にミューテーションが入っているマウスを作ってみました。

実は、なかなか異常が見つからなかったのです。というのは、ヒトの場合も10年、20年して、発症してきます。逆にマウスは10年も生きません。マウスはせいぜい3年が寿命なので、何とか早く発症しないか、一生懸命探していました。すると10カ月齢で影みtainなものが見えてきました。15カ月齢になると、場所によるのですが、筋繊維の中にヒトと同じような封入体の像が見られました。

以上のことから、このGNEという遺伝子の572番目のアミノ酸をバリンからロイシンに1個だけ変えるという患者さんと同じことをマウスでやると、患者さんによく似たことが起きたというわけです。海外のグループから、この遺伝子を完全につぶしたら生まれてこないという論文が出ていました。これをつぶすとどうなるかということ、シアル酸が全くできなくなるので、多分死んでしまうのです。ですから、単純につぶしたのでは駄目で、やはり1個変えることが重要だろうというのは、始める前から分かっていました。

ヒトもそうですが、外見的には何の異常もないし、繁殖能力も正常でした。実は、1年たったところで筋力測定をいろいろやってみたのですが、あまり顕著な低下は認められませんでした。例えば、回転棒の上を走らせてみたのですが、顕著な低下がなく、ちょっとがっかりしていたのです。けれども、ずっと切片を追っていくと、先ほど見せましたように、封入体があり、縁取り空胞があり、ユビキチンが染まり、オートファゴソームが見られました。DMRVの患者さんのように歩けなくなるという状態にはならないのですが、今のところ私たちは、その初期の状態を再現しているのではないかと考えています。このマウスが10年生きれば歩けなくなるかもしれないけれども、それはちょっと無理かなと思います。

⑩DMRVの発症メカニズム（仮説）と治療の可能性

先ほどのIgA腎症と比較した発症メカニズムです。先ほどのIgA腎症は、マウスとヒトは、導入部分は違って、途中から一緒になっていました。しかし、この場合は最初からGNE遺伝子のキナーゼ領域にV572L変異を入れるというのは、ヒトもマウスも同じです。全く同じ原因で多分同じことが起きて発症するのでしょうか。

GNEのキナーゼ活性は、ミューテーションが入ったら落ちるだろうと考えています。そうすると、シアル酸があまりできないのではないかと。でも、完全になくなると死んでし

まうので適度にできているのだと思います。そうすると一つの可能性は、いろいろなタンパク質のシアル酸が減少して、糖鎖がおかしくなって凝集体を作るのではないか。それで封入体ができ、筋肉の機能がおかしくなって発症するのではないかと考え、この辺をきちんと証明しようとしています。

この酵素がおかしくなって起きていることというのは、最終的にシアル酸ができないことです。まだ見ていないのですが、患者さんでは、この酵素が働いてできる ManNAc-6-P という物質がすごく枯渇しているのではないか。ですから、これを例えば、筋肉もしくは全身に投与することによって患者さんを治療できるのではないかと。ただ、患者さんに突然するわけにはいきません。患者さんと全く同じ変異、全く同じ症状を示すこのマウスを用いて基礎の治療実験をやり、こうやればうまく治療できますよという方法を見つけてから、患者さんに応用するべきということで、今、病院の先生と一緒に始めています。ということで、最近の私たちの研究の紹介を二つぐらいさせていただきました。

5. 謝辞

最後に2～3枚で謝辞です。研究者も重要ですが、私たちはこの研究をするに当たってたくさんの動物を最終的には殺します。病気のモデルを作るという目的はありますが、マウスにとっては迷惑もいいところです。筋疾患の場合にどれくらい不自由を感じているのか分からないのですが、少なくとも I g A 腎症は動物に大きな苦痛を与えています。私たちが動物実験をしている建物の横に、実験動物の碑があります。9月の動物愛護週間のときに、年に1回、動物慰霊祭を行っております。この周りに学生や研究者がいっぱいいて、毎年大体200人ぐらいが参加します。

こちらは人の方への謝辞です。I g A 腎症のモデルマウスの研究は、特に大学院の博士課程までいき卒業した西江君という院生が、5年間かけて本当に一生懸命やってくれた仕事です。あと、病理の解析は中部労災病院の宮石先生です。ただ、残念ながら、去年の8月、がんで亡くなられてしまいました。

それから私たちは今、マウスで腎臓移植にもトライしています。大阪医科大の泌尿器科の東先生、それから本学では腎臓内科の和田先生、それから、始めたときは和田先生と同じで本学におられて、今、金沢医大に移られました横山先生との共同研究です。それから、糖鎖の構造解析は産総研の成松先生との共同研究です。

それから筋肉の方は、七尾病院の浅賀先生が最初に持ってこられたプロジェクトで、私

の研究室では、特に杉原君、吉原君の2人が一生懸命やっています。電子顕微鏡は、長浜バイオの山本先生です。それから腎臓にも異常がありまして、和田先生とこの部分でも一緒にやらせていただいています。これが現在、小さいグループですが、私の研究室のメンバーです。

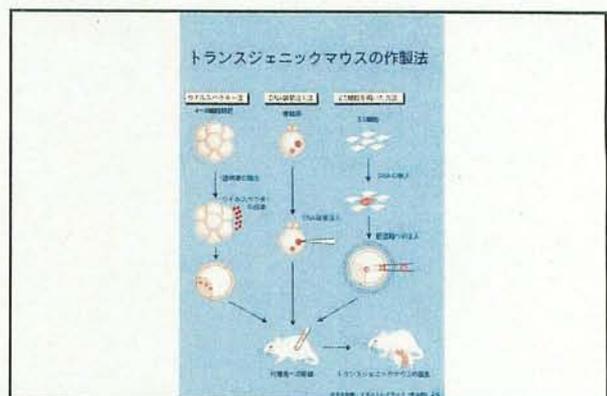
最初に、金沢大学でこういう特殊な技術を持った、それぞれの専門分野の集団が集まった学際科学実験センターというのをご紹介させていただきました。特にその中で、やはり私たちの技術を学内だけではなくて学外の研究者にも知ってもらい、使ってもらおうということで、年に1回3日間ですが、生命工学トレーニングコースというのをやっています。胚操作を10人ぐらいの人に教えています。発生工学・基礎技術コースということで、そのときは、うちのスタッフは全部これにかかりきりです。ちょっと狭いのですが、受精卵を採ったり、操作したり、講義をやったりしています。学外の方は、それなりにお金が掛かっていますので有料になっていますが、興味のある方は、大体11月ぐらいにやっていますので、ホームページを見て申し込んでいただければと思います。

以上で終わりです。大変長い間ご清聴ありがとうございました（拍手）。

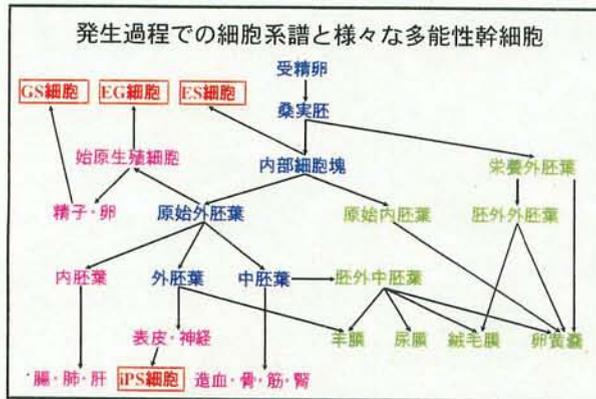


マウスの遺伝子を操作する

- 細胞に遺伝子を導入する
実験用大腸菌に薬剤耐性マーカーを持ったプラスミドDNAを導入する
哺乳類の培養細胞に遺伝子 (DNA) を導入する
プラスミドDNAを導入して短期の遺伝子発現を起こさせる
薬剤耐性マーカーと共に導入し、染色体に組み込ませる (長期発現)
- マウスの受精卵に遺伝子を導入する
受精卵の核にガラスピペットを用いて遺伝子を直接微量注入する
薬剤耐性マーカーなしでも、高率に染色体に組み込まれる
マウスの体のすべての細胞に遺伝子が組み込まれる
- マウスが持っている遺伝子を破壊する
相同相換え法により、ES細胞のねらった遺伝子を破壊する
遺伝子が破壊されたES細胞からマウス個体を作成する
マウスの体のすべての細胞でねらった遺伝子が破壊されている
- マウスが持っている遺伝子を思うがままに改変する



- ### 発生工学技術の進歩
- 1980年 トランスジェニックマウスの作成
 - 1981年 胚盤胞よりマウスES細胞の樹立
 - 1988年 遺伝子ノックアウトマウスの作成
 - 1992年 始原生殖細胞よりマウスEG細胞の樹立
 - 1997年 体細胞クローンヒツジの作成
 - 1997年 クローン技術を用いた遺伝子改変ヒツジの作成
 - 1998年 ヒトのES、EG細胞の樹立
 - 2004年 精子幹細胞よりマウスGS、mGS細胞の樹立
 - 2006年 分化したマウス細胞からES細胞様iPS細胞を樹立
 - 2007年 ヒトの皮膚細胞からiPS細胞を樹立



遺伝子改変動物

遺伝子改変動物とは
 受精卵やES細胞のような個体を再生できる細胞に対して、遺伝子を操作したのち、個体として発生させて生殖細胞を含む体のすべての細胞で特定の遺伝子が改変された動物。最近ではクローン技術を用いた作成も可能。

トランスジェニック (Tg) 動物 (狭義) : 機能獲得型
 DNAを核に微量注入した受精卵から個体を作成
 外来性の遺伝子を標的とする組織で大量に発現可能

遺伝子ノックアウト (KO) 動物 : 機能喪失型
 相同相換えで特定の遺伝子を改変したES細胞から個体を作成
 内在性の特定の遺伝子の機能を破壊あるいは改変することが可能
 発現量の減少 (ノックダウン)、他の遺伝子と置換 (ノックイン)

遺伝子改変動物の利用

基礎研究
 個々の遺伝子の生体内での機能解析 (発生・神経・免疫等の高次機能解析)
 発癌遺伝子、形態形成遺伝子、免疫機能調節遺伝子、神経伝達物質、生理活性物質などいろいろ
 遺伝子の発現調節機能の解析 (lacZやGFPの利用)

医学領域
 疾患モデル動物
 生理活性物質の異所性、過剰発現による疾患モデル
 遺伝病の疾患モデル
 宿主域を超えた感染症のモデル (エイズや肝炎ウイルス)
 再生医学への応用
 異種移植での拒絶反応の回避
 ヒトES細胞からの各種幹細胞の樹立と臓器再生
 mES細胞やiPS細胞は、受精卵や胎児を犠牲にしないので注目

農学領域
 家畜の生産性の向上
 有用物質の生産 (動物工場: 大動物の乳汁中に大量に産生させる)

遺伝子の異常によって起こるヒトの遺伝病

○ **遺伝病は遺伝子の異常が原因で、その異常は子孫に伝わる**

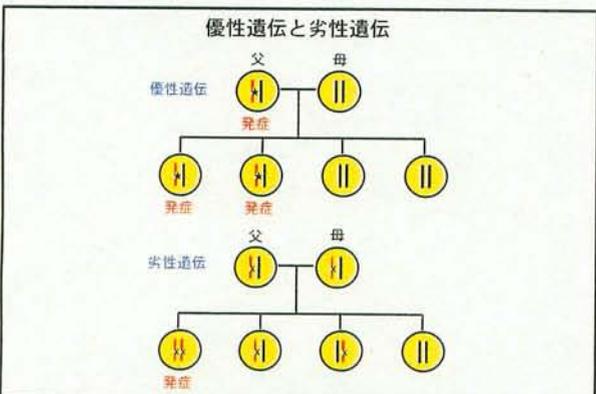
優性遺伝: 両親のどちらかに異常があれば50%の確率で子供に発症
 ハンチントン舞踏病、脊髄小脳変性症、家族性大腸ポリポーシスなど

劣性遺伝: 両親の両方が保因者であれば25%の確率で子供に発症
 筋ジストロフィー、フェニルケトン尿症など

伴性遺伝: 男性 (あるいは女性) にだけ発症
 血友病 (男)、無ガンマグロブリン血症 (男) など

○ **特定の遺伝子ではなく、染色体に異常がある**

ダウン症候群: 21番染色体のトリソミー
 ターナー症候群: X染色体のモノソミー (女)



遺伝病以外の遺伝子の異常によるヒトの病気

○ **遺伝病以外にも遺伝子の異常で起こる病気はたくさんある**

がん: がん遺伝子またはがん抑制遺伝子の異常によって発症
がん遺伝子: 通常は細胞増殖などに働く遺伝子が量的質的に異常をきたす複数のがん遺伝子に異常を起こした細胞が異常増殖を開始
がん抑制遺伝子: 片側の遺伝子を先天的に欠損し、後天的にもう一方に変異が入った時に細胞のがん化する

成人病: 糖尿病、高血圧などは遺伝的要因と生活習慣の複合的な原因で発症

精神疾患: 統合失調症、自閉症などは遺伝的要因の影響が大きい
 一卵性双生児の一致率: 30-50% (統合失調症)、60-95% (自閉症)

感染症: 同じように感染しても発症する人としない人がいる
 エイズ: HIVウイルスの補助受容体遺伝子 (CXCR4やCCR5) の多型により、発症時期が遅くなる

モデル動物を作ってヒトの病気を研究

○病気のモデル動物の種類

自然突然変異のモデル動物

偶然に病気の遺伝子に突然変異が入ると病気のモデルとなる
変異が入った遺伝子を見つけることが難しい

人為的な実験操作によるモデル動物

薬物投与や外科的手術で病気を起こさせる
糖尿病、関節リウマチ、虚血
実際の病気の原因とはかけ離れている

遺伝子改変モデル動物

受精卵や胚の段階で遺伝子操作を行い全身で遺伝子を改変
患者とまったく同じ遺伝子変異を導入することが可能
原因も症状もヒトと同じ病気の再現が可能

ヒトと動物の遺伝子はどれくらい違うのか



チンパンジー マウス 魚類 (フグ)

全ゲノム配列の相同性

98~99%

~70%

~50%

同じ遺伝子を持つ割合

~100%

~90%

~50%

マウスの遺伝子を操作して病気のモデルを作成

○なぜマウス (ハツカネズミ) が使われるのか

マウスとヒトは共通の遺伝子 (90%) を持つ
昔から人類と同じ環境で暮らしてきた
哺乳類の実験動物では最も小さく、世代サイクルが短い
遺伝的に均一な実験用マウスが確立している
発生工学や生体工学の技術が飛躍的に進歩

○マウスの遺伝子組換えはどのように行うのか

マウスの体を再生できる胚性幹 (ES) 細胞の樹立
2万個以上ある遺伝子の中から狙った遺伝子だけを改変できる技術の開発
遺伝子改変マウス作成技術の開発

↓
2007年ノーベル生理学・医学賞

今年のノーベル生理学・医学賞

胚性幹細胞を用いてマウスの特定の遺伝子を改変する原理の発見



マリオ・カベッキ博士 (70歳)
米国コロンビア大教授



マーティン・エバンス博士 (66歳)
英国カーディフ大教授



オリバー・スミシース博士 (82歳)
米国ノースカロライナ大教授

受賞理由と受賞者の功績

・マーティン・エバンス博士

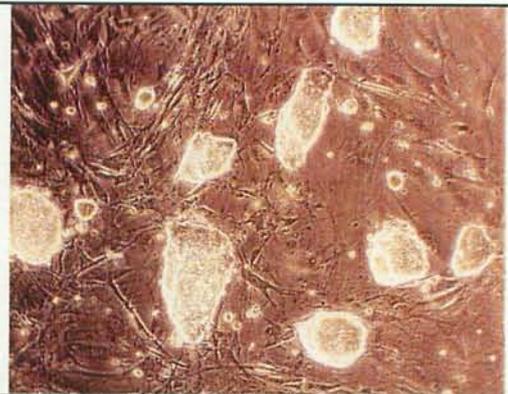
マウスの受精卵より胚性幹 (ES) 細胞の樹立に成功
ES細胞はあらゆる種類の細胞や臓器に分化することが可能
ES細胞からマウスの体全体を作り出すことに成功

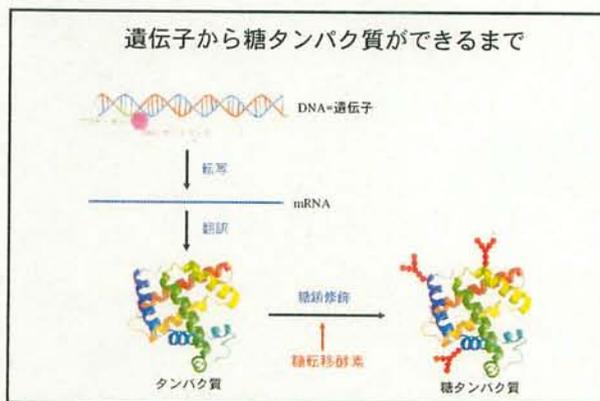
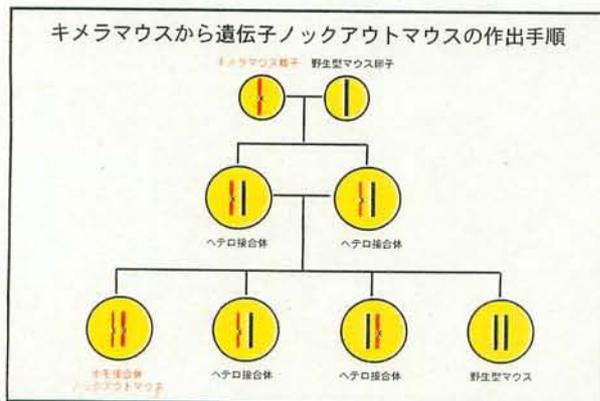
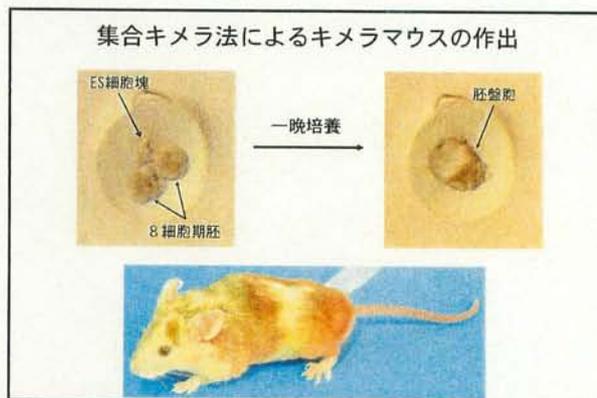
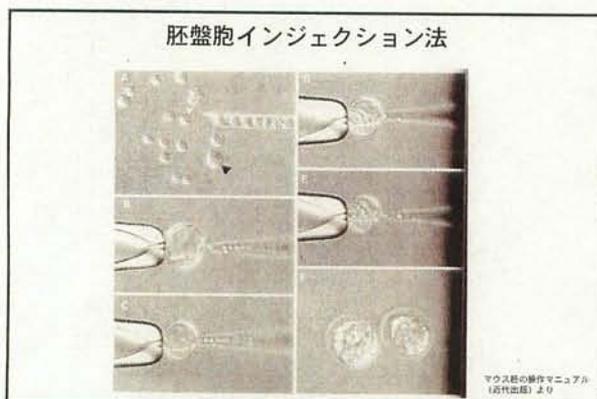
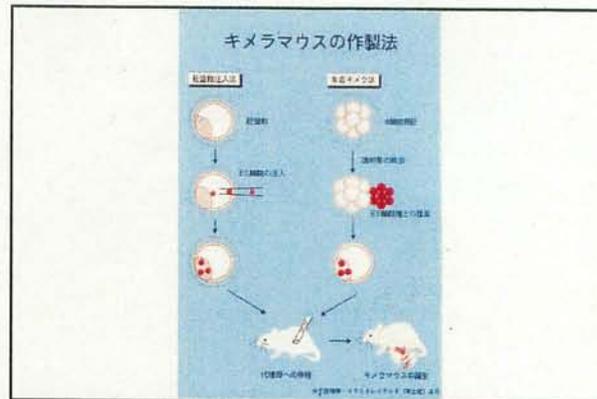
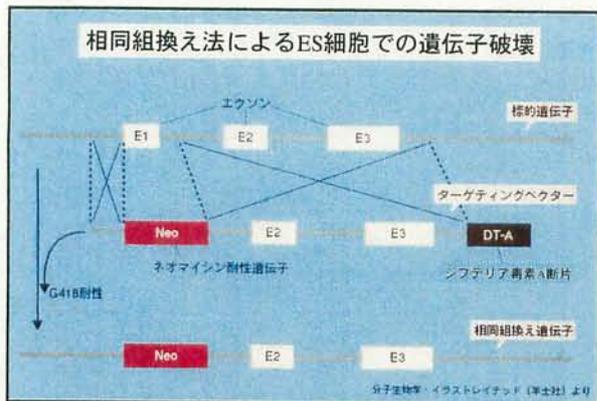
・マリオ・カベッキ博士とオリバー・スミシース博士

相同組換え法を用いて哺乳類細胞で標的とした遺伝子を改変
する技術を確立
ES細胞で標的遺伝子を改変することに成功

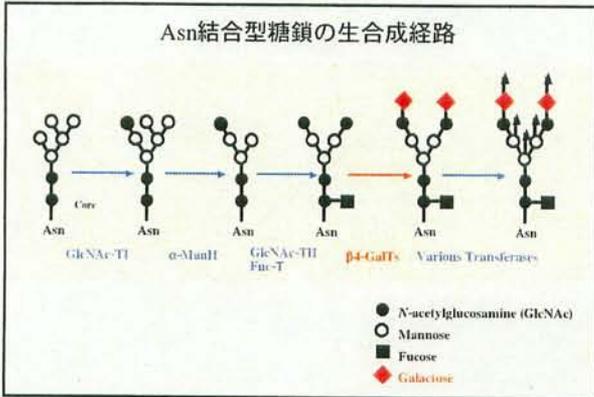
↓
1988年に世界初の遺伝子ノックアウトマウスが誕生

一つ一つの遺伝子の生体内での働きの解明
病気のモデルマウスの開発
病気の原因解明と治療法の開発





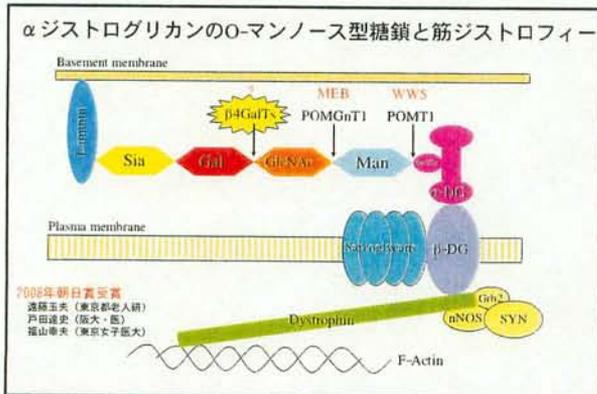
Asn結合型糖鎖の生合成経路



糖鎖異常とヒト疾患

- 筋ジストロフィー
MEB病・WWS症候群：αジストログリカンのO-マンノース型糖鎖合成不全
- 線取り空胞型遠位型ミオパチー (DMRV)
シアル酸生成のキラー酵素であるGNE遺伝子の点変異
- IgA腎症
IgA1ヒンジ領域のO型糖鎖の合成不全が発症に関与(？)
- ループス腎炎
α-マンノシターゼ4HのKOマウスがループス腎炎様病態を発症
- 関節リウマチ
ガラクトース糖鎖を欠損したIgGがリウマチ因子の原因(？)
- 糖尿病
GlcNAc-T-VI KOマウスは2型の糖尿病を発症 (Glcトランスポーターの発現低下)
- 感染症
トリ型インフルエンザはα2-3シアル酸、ヒト型はα2-6シアル酸を認識
UDP-フコーストランスポーター遺伝子欠損は易感染性
胃粘液中のαGlcNAc含有O型糖鎖はヒロリ菌の増殖・運動能を抑制
- 癌細胞の浸潤・転移
N-アセチルグルコサミン転移酵素-VのKOマウスは癌の転移を抑制
セレクチンのリガンド糖鎖 (シアリルLe^x, シアリルLe^y) は癌転移を促進

αジストログリカンのO-マンノース型糖鎖と筋ジストロフィー



糖鎖異常によるIgA腎症の発症

β4ガラクトース転移酵素 (β4GalT-1)
遺伝子ノックアウトマウスの解析

ヒトIgA腎症

特徴

- 慢性糸球体腎炎の約半数を占める
- 発症15~20年で約3~4割が末期腎不全まで移行
- IgA腎症による透析導入患者は年間推定4,000-5,000人
- 発症機構はまだ解明されていない

確定診断

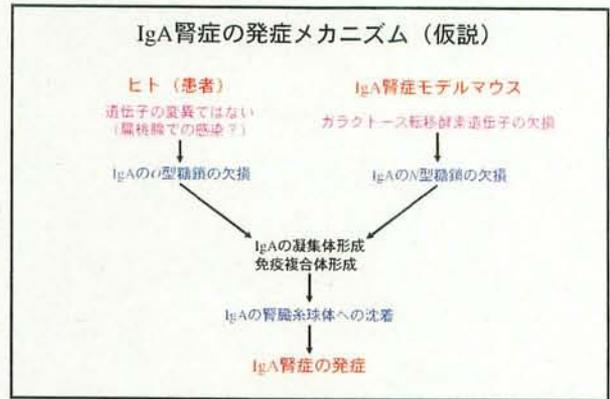
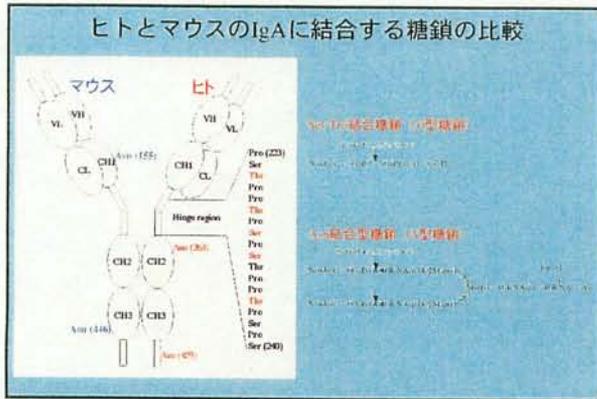
- メサンギウムの増殖性変化 (光学顕微鏡)
- メサンギウムを主体とするIgAの沈着 (免疫組織化学)
- パラメサンギウム領域への高電子密度物質の沈着 (電子顕微鏡)

その他の所見

- 顕微鏡的血尿、タンパク尿、高IgA血症

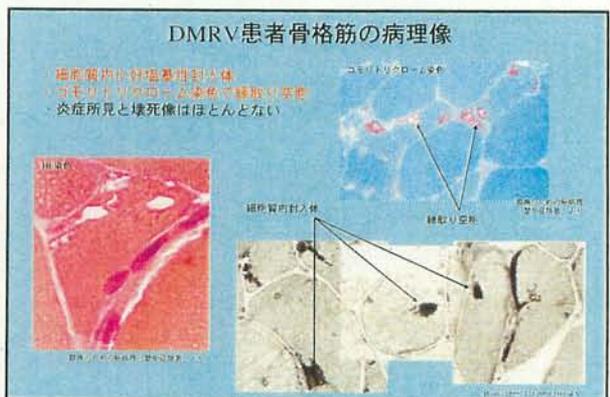
ヒトIgA腎症の発症機構

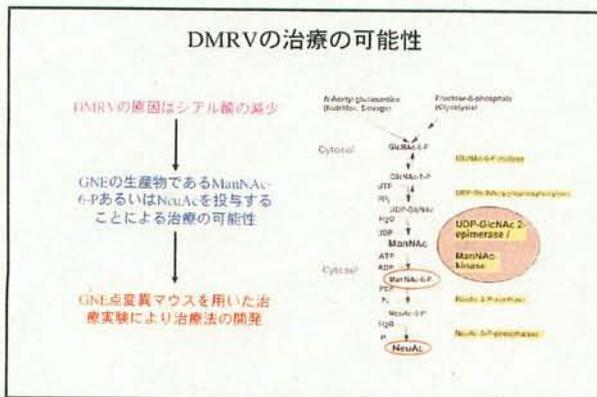
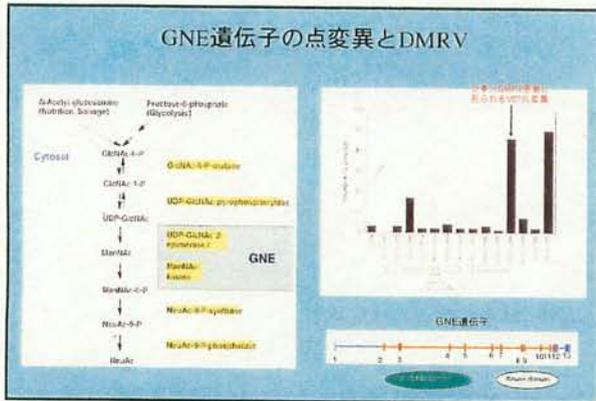
- IgA型免疫複合体の糸球体への沈着
原因抗原の候補：細菌、ウイルス、食物、自己抗原など
- 糸球体におけるIgA特異的な受容体の存在
IgA受容体の候補：Fcα受容体、アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGR)、トランスフェリン受容体
- 高IgA血症
3.5 mg/ml以上が高IgA血症、原因の多くは不明
- 腸炎により引き起こされるIgAの過剰産生
T細胞の活性化による腸内リンパ球でのIgAの過剰産生とIgA輸送の異常
- IgA分子の糖鎖異常
IgA1分子のヒンジ領域に結合するO型糖鎖不全



患者と同じ遺伝子変異をマウスの遺伝子に導入

シアル酸合成酵素遺伝子に点変異を導入した縁取り空胞型遠位型ミオパチー (DMRV) のモデルマウス





共同研究者

IgA腎症のモデルマウス

金沢大学学際科学実験センター
西江敏和、橋本憲佳、成瀬智恵
中部労災病院・病理部：宮石理
大阪医科大学・泌尿器科：東治人
金沢大学医学系研究科・腎臓内科
和田隆志
金沢医科大学・腎臓内科
横山仁
産業技術総合研究所・糖鎖工学研究センター
亀山明彦、成松久

DMRVのモデルマウス

金沢大学学際科学実験センター
杉原一司、吉原亨、伊藤光俊
国立病院機構七尾病院
浅賀知也
長浜バイオ大学
山本章嗣
金沢大学医学系研究科・腎臓内科
和田隆志

