

博 士 論 文

免疫不全ブタ開発に関する研究

2014 年

鈴木 俊一

免疫不全ブタ開発に関する研究

第1章 序論

第1節 免疫不全動物の開発とその利用	1
第2節 体細胞クローン技術による遺伝子ノックアウトブタの開発	4
第3節 医療用モデルとしてのブタの利用	6
第4節 免疫不全ブタ開発とその応用	13
付図	14

第2章 *IL2RG* 遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの開発および表現型解析

第1節 緒言	15
第2節 材料および方法	21
第3節 結果	25
第4節 考察	29
付図および付表	32

第3章 同種骨髄移植による免疫系再構築可能性の検討

第1節 緒言	42
第2節 材料および方法	49
第3節 結果	51
第4節 考察	54
付図および付表	58

第4章 ブタ胎仔期における胸腺発達過程の解析

第1節 緒言	64
第2節 材料および方法	69
第3節 結果と考察	71
付図および付表	74

第5章 総合考察

参考文献	85
謝辞	113

第1章 序論

第1節 免疫不全動物の開発とその利用

実験動物は、生物学・医学の基礎的な研究に加え、医薬品や医療機器などの開発に際し、有効性や安全性を確認するためのモデルとして、広く利用されている。特に、げっ歯類のマウスは小型で扱いやすい上、多産で世代間隔が短いという繁殖特性から最も広く利用されている実験動物である。また、遺伝的背景が明確であり、遺伝子操作（遺伝子導入、遺伝子ターゲティング）が比較的容易であることから、ヒトの種々の病態を模した疾患モデル動物が作出され、病態解明や治療法の開発など、医学の発展にも多大な貢献をしてきた。しかしながら、げっ歯類で得られた実験結果が必ずしもヒトの症例を反映しないという例も少なくなく、その橋渡しとして考えられたのが、ヒト化マウスである。ヒト化マウスとは、免疫不全マウスにヒト細胞を移植し、生着させて得られる、体内にヒト細胞・組織を持つマウスであり、いわば、ヒトの *in vivo* 研究をマウスで行うためのモデル動物である。具体例として、以下のような研究が進められている。

1. 免疫系ヒト化モデル

ヒト造血幹細胞の移植により、マウス体内にヒト免疫系を再構築させることを目指したものである。ヒト免疫系の研究に用いるほか、以下に記す感染症モデル等のプラットフォームとしても用いられる。

2. 感染症モデル

主として、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトTリンパ球向性ウイルスI型（HTLV-1）やエプスタイン・バーウイルス（EBV）などのウイルスを対象に、ヒト特異的な感染や病態をマウス体内で再現させ、病態解析や新薬開発に用いる（Dewan et al., 2006; Watanabe et al., 2007; Yajima et al., 2008）。

3. がんモデル

種々のヒトがん細胞を移植し、生着させ、転移に関わる因子の探索などに用いる。

4. ヒト型臓器モデル

特に、薬物代謝活性に種差が認められること、肝細胞の *in vitro* 培養が困難であることから、マウスの肝臓をヒト肝臓に置き換えるというヒト化肝臓モデルの研究が進展している。*uPA* (urokinase-type plasminogen activator) 遺伝子や HSV (Herpes simplex virus) –*TK* (thymidine kinase) 遺伝子を肝臓に発現させることによって肝障害を誘起した上で、ヒト肝細胞を移植することにより、ヒト型肝臓の構築に成功している (Suemizu et al., 2008; Hasegawa et al., 2011)。薬物代謝研究の他、肝炎ウィルスなどの感染症研究にも応用可能である。その他にも、ヒト卵巣や子宮内膜を移植したモデルが作製されている。

こうしたヒト化モデルの作製には、免疫不全マウスが必要不可欠である。最初に使用された免疫不全マウスは1962年に被毛と胸腺のない突然変異マウスとして発見されたヌードマウスである (Flanagan, 1966; Pantelouris and Hair, 1970)。このマウスは細胞性免疫の中心を担う T 細胞を欠損しており、ヒトがん細胞を生着させることができた。1983年には機能的な T および B 細胞を欠損する突然変異を持つ重症複合免疫不全 (Severe combined immunodeficiency : SCID) マウスが発見された (Bosma et al., 1983)。このマウスに、ヒトの胎児肝臓および胸腺を移植することにより、ヒト T 細胞を発生させることができ、SCID-hu マウスとして広く利用された (McCune et al., 1988)。その後の研究から、このマウスでは、DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-dependent protein kinase : DNA-PK) という遺伝子に変異が生じた結果、T 細胞受容体や免疫グロブリンの遺伝子再構成が起こらず、機能的な T・B 細胞が発生しないことが明らかとなった (Kirchgessner et al., 1995)。さらに1995年にはやせ型糖尿病モデルである NOD (Non Obese Diabetes) 近交系に SCID 変異を導入することにより、NOD-scid マウスが樹立された (Shultz et al., 1995)。このマウスでは、従来の SCID マウスと比較し、異種細胞の生着率が著しく向上し、ヒト造血幹細胞をある程度分化させることが可能となったが、T 細胞への分化は確認されなかった (Greiner et al., 1995; Lowry et al., 1996)。このマウスで異種細胞の生着率が向上したのは、補体、マクロファージ、NK 細胞など自然免疫系の活性が低下しているためと考えられている。その後、ノックアウトマウスの作製技術が応用されるようになり、NOD-scid マウスを背景として、免疫系細胞の発生に重要なインターロイキン 2 受容体 γ 鎖 (Interleukin-2 receptor gamma chain : *Il2rg*) 遺伝子をノックアウトすることにより、NOG マウス (Ito et al., 2002; 2008)、NSG マウス (Ishikawa et al., 2005) が相次いで作製された。これらのマウスにおけるヒト細胞の生着性は、NOD-scid よりはるかに高く、CD4⁺および CD8⁺T 細胞

への分化も認められた。SCID 由来の T・B 細胞欠損、NOD 変異に由来する自然免疫機能低下に、Il2rg ノックアウトによる NK 細胞の欠損が加わったことにより、ヒト細胞の高い生着性がもたらされたと考えられている。以上に述べた、免疫不全マウス開発の経緯を図 1-1 に示した。

また、最近 Zinc finger nuclease (ZFN) による遺伝子変異導入法を用いて、免疫不全ラットの作製が報告された (Mashimo et al., 2012)。これは、DNA-PK と Il2rg の機能を欠損させたものであるが、ヒトがん細胞や肝細胞の生着は認められたのに対し、造血幹細胞の生着は認められず、NOD 変異に由来する自然免疫系の機能低下の重要性が再確認された。

第2節 体細胞クローン技術による遺伝子ノックアウトブタの作製

分化の進んだ体細胞を用いたクローン動物は、1962年にアフリカツメガエルのおタマジヤクシの細胞核を移植することで作製されたのが最初である (Gurdon, 1962)。哺乳類においては、Wilmut らにより報告された、雌ヒツジ乳腺細胞由来のクローンヒツジ「ドリー」の誕生が (Wilmut et al., 1997)、成体の体細胞から作られたクローンとしては最初であった。さらに、1998年には Kato らにより、ウシにおいて体細胞クローンの誕生が報告された (Kato et al., 1998)。これらの報告においては、除核した卵子と体細胞を電気刺激により融合させる方法 (電気融合法) が用いられていたが、マウスやブタなどの卵子では同時に活性化が誘起されてしまうという問題があった。1998年に Wakayama らが、体細胞核を除核した卵子の細胞質中に直接注入する顕微注入法を開発し、その手法により体細胞クローンマウスの作製に成功した (Wakayama et al., 1998)。これにより、核の導入と活性化を分けて行うことが可能となり、電気刺激により卵子の活性化が誘起される動物種においても、クローン作製効率の改善が期待された。その後はこの手法が主流となり、ヤギ (Baguisi et al., 1999)、ウマ (Galli et al., 2003)、ラバ (Woods et al., 2003)、ウサギ (Chesne et al., 2002)、ブタ (Bettauser et al., 2000; Onishi et al., 2000; Polejaeva et al., 2000)、ネコ (Shin et al., 2002)、ラット (Zhou et al., 2003)、イヌ (Lee et al., 2005)、シカ、オオカミ (Kim et al., 2007)、スイギュウ (Shi et al., 2007)、フェレット (Li et al., 2006)、ラクダ (Wani et al., 2010) など多くの哺乳動物で、相次いで体細胞クローン作製の成功例が報告されている。しかしながら、体細胞クローンの成功率は、当初より各動物種において数%程度と低いうえ、産仔に異常がみられる頻度も高いという問題がある。エピジェネティックな異常が主たる原因と考えられおり、その克服に向けた多くの研究が行われてはいるが、現時点においても劇的な改善が達成されたとは言い難い。とはいえ、一定数以上の試行を行えば、ほぼ確実に産仔が得られる状況にはなっており、十分実用に耐えられる技術であると考えられる。

体細胞クローン技術の応用としては、優良形質をもつ家畜の大量生産や希少動物の保存・増殖などのほか、遺伝子組換え動物の作製があげられる。体細胞クローン技術により、培養細胞で適用できる遺伝子操作をすべて個体レベルで再現できるようになった。中でも重要なのは、生殖細胞系列に寄与できる ES 細胞が樹立されていない動物種においては、それまで事実上不可能であった遺伝子ターゲティングが可能となったことである。クローン技術を用いた最初の遺伝子ターゲティング家畜の成功例は2000年に McCreath らにより報

告された、ノックインヒツジである (McCreath et al., 2000)。ブタにおいても、2002 年に α -1,3-GT (α -1,3-galactosyltransferase : *GGTA1*) 遺伝子のノックアウトが報告された (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002) のを皮切りに、多くのノックアウト/ノックインブタが作製されている。

近年では、ZFN や TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) / Cas (CRISPR-associated) システムといったゲノム編集酵素を用いて遺伝子機能を欠損させる変異を培養細胞に導入し、遺伝子ノックアウトブタを作出する試みも進められている (Yang et al., 2011; Carlson et al., 2012; Hai et al., 2014)。

第3節 医療用モデルとしてのブタの利用

医学領域における疾患の発生機構や病態に関する基礎研究や、治療法および薬剤の開発などの応用研究においては、実験動物は必要不可欠の存在である。中でも、マウスを中心としたげっ歯類は繁殖能力の高さや取り扱いの容易さから、最も広範囲に利用されている実験動物である。マウスでは、遺伝子操作も比較的容易に行えることから、多種の遺伝子組換えによる疾患モデルマウスが作製されており、今後もその地位が揺らぐことはないと思われる。一方で、ヒトのモデル動物として考えた場合、当然ながら、小動物であるマウスには限界も存在する。主要なものは、サイズと寿命である。外科的治療法の開発のための試験については言うまでもないが、外科的処置や連続的な生検を必要とする試験にも、ある程度の大きさのある動物が望ましい。また、発がん、糖尿病などの生活習慣病、神経変性疾患など、長期間にわたる観察が重要とされる疾患のモデル動物としては、マウスは最適とは言えない。その他の疾患モデルマウスにおいても、ヒトの病態を反映しない例もあり、中型・大型の哺乳動物を実験動物として活用することの重要性が指摘されている。その中でも、ブタは生理学的・解剖学的性質のヒトに対する類似性が、げっ歯類や他の家畜より高いことから、トランスレーショナルリサーチにおけるモデル動物として、最も注目を集めている。特に、ブタの心臓や血管系はヒトに酷似しているうえ、血中リポタンパクのプロファイルもヒトに近く、動脈硬化など心血管疾患のモデルとしての有用性が高い。また、ブタは、ヒトと同様に雑食であり、胃・腸管の構造や消化効率、エネルギー代謝もヒトに近く、肥満やメタボリックシンドロームの研究にも利用可能である。また、げっ歯類と比較すると、ゲノム DNA 配列や染色体構造の類似性が高いことも利点の一つである。さらに、ブタは、比較的早期に（5－8 ヶ月）性成熟に達し、通年繁殖が可能であるため、世代間隔は約1年と短く、また多産（約10頭 / 1分娩）であることから、ウシ・ヤギ・ヒツジ・イヌなど他の中・大型動物と比べると、はるかに繁殖効率が高く、実験動物としての生産が容易であるという長所も持っている。以上のような生来の性質に加え、2000年に体細胞クローンブタ作出の成功が報告されてから、それまで事実上不可能であった遺伝子ノックアウトブタの作製が可能となり、医療用モデルブタとしての可能性が飛躍的に広がった。これまでに、遺伝子組換え技術を用いて、以下に述べるような医療用モデルブタの作出が報告されている。なお、こうした医療用モデルとしてのブタの利用については、以下にあげる総説に詳しく記述されている（Aigner et al., 2010; Fan and Lai, 2013; Prather et al., 2013）。

1. 異種移植モデルブタ

臓器のサイズや生理学的・解剖学的な特徴がヒトと類似していることから、慢性的に不足する移植用ドナー臓器の代替としてブタを利用することが考えられてきた。しかし、ブタからヒトへの移植では、数分から数時間で移植片が拒絶されるという超急性拒絶反応が発生することが最大の難関であった。超急性拒絶反応の抑制に向け、その原因となる galactose- α 1,3-galactose という糖鎖構造 (α Gal 抗原) を持たないブタ (α -1,3-galactose 転移酵素ノックアウトブタ) や補体反応の抑制が可能となるヒト型補体制御因子 (Decay accelerating factor : DAF、Membrane cofactor protein : MCP、Membrane inhibitor of reactive lysis : MIRL など) 遺伝子導入ブタが作出されている (Gock et al., 2011)。

2. 神経変性疾患モデルブタ

2-1. ハンチントン病モデルブタ

ハンチントン病は、進行性の神経変性により不随意運動、認識力低下、情動障害等の症状が現れる常染色体優性遺伝病である。ハンチントン遺伝子の 5'端にある CAG リピートの異常な伸長により、CAG 配列がコードするグルタミンが多数つながったポリグルタミン鎖が生成される結果、ハンチントンタンパクのフォールディングが異常となり、神経細胞でアポトーシスが誘導されると考えられている (Reiner et al., 2011)。2010 年に 105 個のポリグルタミンをもつ変異型ハンチントン遺伝子導入ブタが作製され、マウスモデルでは見られないヒトハンチントン病と類似した表現型が現れた (Yang et al., 2010)。

2-2. アルツハイマー病モデルブタ

アルツハイマー病は、記憶障害から認知障害、最終的には死に至る、脳における進行性の神経変性疾患であり (Bertram et al., 2010)、アミロイド β の脳内蓄積が病態形成に重要であると考えられている (Scheuner et al., 1996; Walsh and Teplow, 2012)。2009 年に Platelet derived growth factor (PDGF) - β プロモーター制御下に変異型アミロイド前駆タンパクを発現するブタが作製された (Kragh et al., 2009) が、アルツハイマー病様の症状が現れたという報告はされていない。

2-3. 脊髄性筋萎縮症モデルブタ

脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy : SMA) は、脊髄の運動神経細胞の変性によって、進行性に体幹・四肢の筋力低下、筋萎縮を呈する神経原性の筋萎縮症である

(Zanoteli et al., 2010)。*SMN*(survival of motor neuron) 1 遺伝子の欠失あるいは変異がその原因となることが分かっている (Lefebvre et al., 1995; Wirth, 2000) が、病態の発生につながる詳細なメカニズムについては未だ不明である。ヒトでは *SMN1* 遺伝子と配列がほとんど同一である、*SMN2* 遺伝子が存在するが、変異によりエキソンスキップが生じやすくなっており、*SMN1* の機能を補完することはできない。*SMN1* ノックアウトと *SMN2* の導入により、多種のマウスモデルが作られており、運動神経細胞の変性、筋力低下、筋萎縮などを呈することや、*SMN2* がコピー数依存的にその症状を緩和できることが示されている (Sleigh et al., 2011; Bebee et al., 2012)。大型で長寿命のモデル動物を得るために、ブタでも同様なモデルが作製された (Lorson et al., 2011) が、現時点では表現型についての報告はされていない。

3. 心血管系疾患モデルブタ

3-1. 内皮型一酸化窒素合成酵素強制発現ブタ / カタラーゼ強制発現ブタ

内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase : eNOS) は血管拡張作用や動脈硬化抑制作用を持つ一酸化窒素 (Nitric oxide : NO) を合成する酵素である。内皮細胞特異的に eNOS を発現するブタの作製が 2006 年に報告された (Hao et al., 2006)。また、NO のシグナル系と密接に関連する過酸化水素を分解する酵素であるカタラーゼを、内皮細胞特異的に発現するブタも作製されている (Whyte et al., 2011)。これらのブタを用いて、NO の作用機序の解明や動脈硬化、子癇前症など内皮細胞機能不全を伴う疾患の治療法の開発に役立つことが期待されている。

3-2. PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) ノックアウトブタ

2011 年に ZFN を用いて初めてブタの遺伝子改変を行った例として報告されたのが、PPAR γ ノックアウトブタ (ヘテロ) である (Yang et al., 2011)。PPAR γ の活性化はインスリン感受性の亢進、糖取り込みの促進、アディポネクチン発現の上昇、抗炎症作用など広範な効果を持つことが知られている (Ahmadian et al., 2013)。PPAR γ のノックアウトによる心血管系への影響を精査することにより、PPAR γ 活性制御による新たな治療戦略につながる可能性がある。

3-3. LDLR (Low density lipoprotein receptor) ノックアウトブタ

2012 年に TALEN を用いて初めてブタの遺伝子改変を行った例として報告されたのが、

LDLR ノックアウトブタ（ヘテロ・ホモ）である（Carlson et al., 2012）。LDLR の機能欠損は血中 LDL 濃度の上昇と LDL の酸化・変性を引き起こし、その結果としてアテローム性動脈硬化を誘発する（Tomkin and Owen, 2012）。マウスの血中リポタンパクは HDL が主であり、動脈硬化を起こしにくいことから、ブタの方がヒトと類似性が高く、よりよいモデルになると考えられる。

4. 嚢胞性線維症モデルブタ

嚢胞性線維症は、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（Cystic fibrosis transmembrane conductance Regulator : CFTR）という Cl⁻イオンチャンネルをコードする遺伝子の変異により生じる常染色体性劣性遺伝病である。上皮細胞におけるイオン輸送の異常のため、外分泌液が著しく粘稠となることにより、肺・膵臓・消化管・肝臓・精管など多くの器官に障害が発生する（Sears et al., 2011）。CFTR ノックアウトマウスでは、ヒトの典型的な症状を再現することはできなかった（Grubb and Boucher, 1999; Guilbault et al., 2007）ため、CFTR のノックアウトあるいは変異型のノックインブタの作製が試みられた（Rogers et al., 2008a; 2008b）。いずれの系統の子ブタにおいても、胎便イレウス、膵外分泌部の破壊などのヒト嚢胞性線維症と類似した症状が観察された（Welsh et al., 2009）。さらに、時間経過とともに、ヒト嚢胞性線維症の特徴である肺の病変を観察することができた（Stoltz et al., 2010）。このモデルも、マウスで再現できなかったヒトの病態を、ブタを用いて再現できることを示した好例である。

5. 眼疾患モデルブタ

ブタの眼球は、マウスと比べた場合、その大きさに加え、視細胞、特に錐体細胞の数や分布がヒトに近いことから、ブタはマウスより優れた、眼疾患のモデルを提供できる可能性がある（Beauchemin and Babel, 1973; Braekevelt, 1983）。

5-1. 網膜色素変性症モデルブタ

網膜色素変性症は、夜盲・視野狭窄を生じ、失明に至る場合もある、進行性の眼疾患である（Berson, 1993）。この疾患の原因となる遺伝子変異の約 25%を占めるのが、杆体細胞における光刺激の伝達に重要な機能を有するロドプシンの変異である（Malanson and Lem, 2009）。変異型ロドプシンを導入したマウスモデルでは、ヒトの病態を完全に再現することはできなかった（Olsson et al., 1992; Mao et al., 2011）ため、網膜の構造

がヒトに近いブタでのモデル作製が考えられた。前核注入による変異型ロドプシン (P347L, P347S) 導入ブタ (Petters et al., 1997; Kraft et al., 2005) および体細胞核移植による別の変異型ロドプシン (P23H) 導入ブタ (Ross et al., 2012) が作製され、初期の杆体細胞の喪失とそれに引き続く緩徐な錐体細胞の変性や暗順応・明順応の異常などヒトの病態に類似した症状の再現に成功している。

5-2. シュタルガルト 3 型網膜変性症モデルブタ

シュタルガルト 3 型網膜変性症は、若年時に網膜変性が開始し、視力低下、網膜萎縮などを引き起こす常染色体性優性の遺伝病であり (Edwards et al., 1999)、超長鎖脂肪酸伸長因子 4 (Elongation of very long chain fatty acids: ELOVL4) の短縮変異との相関がみられる (Donoso et al., 2001)。2011 年に、変異型 ELOVL4 を発現するブタが作製され (Sommer et al., 2011)、視細胞の喪失、網膜内層と外層の乱れ、網膜の電氣的活性の低下などを示すことが報告されている。

6. 糖尿病モデルブタ

糖尿病は高血糖を特徴とする代謝異常の総称であり、主に I 型と II 型に分類される。I 型は、自己免疫反応によってインスリンを産生する膵β細胞が破壊されることによって生じる。一方、II 型はインスリンが作用する臓器 (細胞) におけるインスリンの感受性の低下を特徴とし、環境因子や遺伝的素因、またその組み合わせなど多くの要因により生じるとされている。その他に、単一の遺伝子変異による糖尿病 [Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) 1-6] も知られている。

6-1. 若年発症成人型糖尿病 3 型モデルブタ

若年発症成人型糖尿病 3 型 (MODY3) は、転写因子 HNF (Hepatocyte nuclear factor) 1αの変異を原因とする、常染色体優性の遺伝病である。HNF1αは、膵β細胞において、糖取り込み、解糖系、ミトコンドリア代謝、開口放出、増殖など様々なステップを調節しているため、その変異により、膵島の構造異常やインスリン分泌不全を引き起こすとされている (Yamagata, 2003)。2009 年に、ヒト優性阻害変異型 HNF1αを発現するブタが作製され (Umeyama et al., 2009)、ヒト MODY3 と同様に、高血糖やインスリン分泌不全を伴う膵島の異常が観察された。

6-2. 2型糖尿病モデルブタ

2型糖尿病ではインスリン抵抗性に加え、インスリン分泌低下を伴う場合が多いことから、インスリン分泌促進作用を持つ別のホルモンであるインクレチンに注目が集まっている。インクレチンは腸管内分泌細胞から分泌されるホルモンで、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (Glucose-dependent insulinitropic polypeptide : GIP) とグルカゴン様ペプチド - 1 (Glucagon-like peptide-1 : GLP-1) からなる。2型糖尿病では、GLP-1 の作用は維持されているのに対し、GIP の作用は障害されていることが知られている (Baggio and Drucker, 2007)。優性阻害型 *Gipr* 遺伝子導入マウスが、膵島の形態的異常を含む重篤な糖尿病を呈する (Herbach et al., 2005) ことから、ブタにおいても、優性阻害型 *GIPR* 遺伝子導入が行われた (Renner et al., 2010)。このブタでは、耐糖能低下など 2 型糖尿病の主要な特徴の再現に成功している。

7. 発がんモデル

がん研究においては、マウスは基礎的研究には有用であるが、サイズの小ささや寿命の短さによる制約が小さくない。ブタのような、長寿命の大動物を用いることにより、がんの発生、進行や寛解、治療に対する反応、薬剤抵抗性の獲得など長期にわたる経過観察を伴う試験が実施可能となり、臨床応用につながるものが期待される。

7-1. p53 不活性型変異導入ブタ

p53 は、DNA 損傷に伴い、細胞周期の進行を阻害し、細胞の老化やアポトーシスを誘導する、非常に重要ながん抑制因子である。ヒトのがんの多くでは、p53 機能の改変が起こっている (Levine et al., 2009)。ヒト p53 の R175H 変異は、優性阻害型変異であり、がん促進作用を示すこと (Willis et al., 2004) から、それと相同のブタ R167H 変異を Cre recombinase により誘導可能なブタが作製されている (Leuchs et al., 2012)。

7-2. 乳がんモデルブタ

BRCA1 (Breast cancer susceptibility gene 1) はその不活性化がヒトの乳がんや卵巣がんに関連しているとされるがん抑制因子である (Rosen et al., 2003)。しかし、マウスでは、ホモノックアウトは胎生致死であり、片アリル変異では、ヒトの場合と異なり、乳がんの発生率上昇は認められていない (Gowen et al., 1996; Hakem et al., 1996)。ブタでヒトの表現型が再現されることを期待し、BRCA1 をノックアウトしたブタ (ヘテロ)

が作製されたが、生後 18 日以内にすべて死亡し、表現型の解析は不可能であった (Luo et al., 2011)。

8. 血友病モデル

血友病は、血液凝固因子の欠乏によって起こる先天性疾患で、血液凝固因子のうち第 VIII 因子 (FVIII) の異常による血友病 A と第 IX 因子の異常による血友病 B に大別される。現状では、凝固因子補充療法が一般的であるが、補充した凝固因子に対する同種抗体 (インヒビター) が発生するという問題があり、根治へ向けた遺伝子治療に対する期待は根強い (Chuah et al., 2012)。ブタはヒトに近い凝固系因子を持っていることから、自治医大と筆者らのグループにより、血友病 A モデルブタを作製した (Kashiwakura et al., 2012)。作製した FVIII ノックアウトブタ (オス) は、強い出血傾向を示した。また、ヒト第 VIII 因子が有効であり、インヒビターの出現も認められたことから、遺伝子治療のみならず凝固因子製剤や免疫寛容誘導法の開発などのモデルとしての可能性が示された。

以上、論文として報告のあるものについて記載したが、米国の国立ブタ資源研究センター (National Swine Resource and Research Center : NSRRC) では、その他にもいくつかのモデルブタが作製されている。このように、医療用モデルブタが遺伝子組換え技術を用いて続々と作製されており、近年のゲノム編集技術の急速な進展もあり、ますますこの分野が発展していくものと思われる。

第 4 節 免疫不全ブタ開発とその応用

第 1 節で述べたとおり、免疫不全マウスを用いたヒト化モデルは広範に利用されている一方、ブタなどの大型動物におけるヒト化モデルの開発は、ほとんど手つかずである。第 3 節で述べたように、ブタは臓器のサイズに加え、生理学的、解剖学的特徴がヒトに類似しているため、ヒトのモデル動物として有用である。さらに、2000 年の体細胞クローン作出以降、遺伝子ターゲティングを含む任意の遺伝子改変が可能となったことから、実験動物としての汎用性は今後増していくことが予想される。大型動物であるブタで、ヒト化モデルを作出する利点として、基盤となる生理学的、解剖学的特徴がヒトに類似していることに加え、寿命が長いということがあげられる。げっ歯類の寿命が約 2 年であるのに対し、ブタの寿命は 15 年程度といわれている。このことは、臨床的に意義の大きい数年という長期間にわたる経過観察を可能とし、特に ES 細胞や iPS 細胞などヒト由来幹細胞を移植した後の長期安定性や発がんの有無などを調べる際に、非常に有用である。また、臓器の大きさや解剖学的特徴がヒトに近いことは、原発部位と同じ場所にがん細胞を移植し転移などの経過を観察するための同所性がんモデル作出に有利である。加えて、ブタ体内で未分化細胞から機能を保持した分化細胞を誘導したり、ヒト細胞由来の臓器を形成させる技術の開発により、患者本人由来や主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex : MHC) 型の一致したドナー由来の、いわばテイラーメイドの移植用細胞・臓器を作製することも期待できる。さらに、免疫系をヒト化したブタ体内で作製したヒト型抗体の利用を考えた場合にも、マウスに比べ大量に取得できるという利点がある。こうしたブタ体内でヒト細胞を機能させる系においては、マウスに比べブタのゲノム DNA 配列がヒトに近いことも重要である。基本的には DNA 配列の相同性の高さは、タンパク質を中心とする各種生体分子の構造の相同性の高さにつながり、ヒト細胞とブタ体内環境との相互作用が、マウスと比較し、うまく機能する可能性が高いと考えられるからである。以上の観点から、筆者らはヒト化モデルブタ開発を目指し、まずそのために不可欠な免疫不全ブタの開発に着手することにした。第 2 章では、*IL2RG* 遺伝子をノックアウトすることにより、免疫不全ブタの作製を試みた。続く第 3 章では、同種骨髄移植を行い、免疫不全ブタの免疫系再構築を試みた。さらに、第 4 章においては、免疫不全ブタ体内での T 細胞分化効率上昇を目指した基盤整備の一環として、ブタ胎仔における胸腺発達過程の解析を行った。

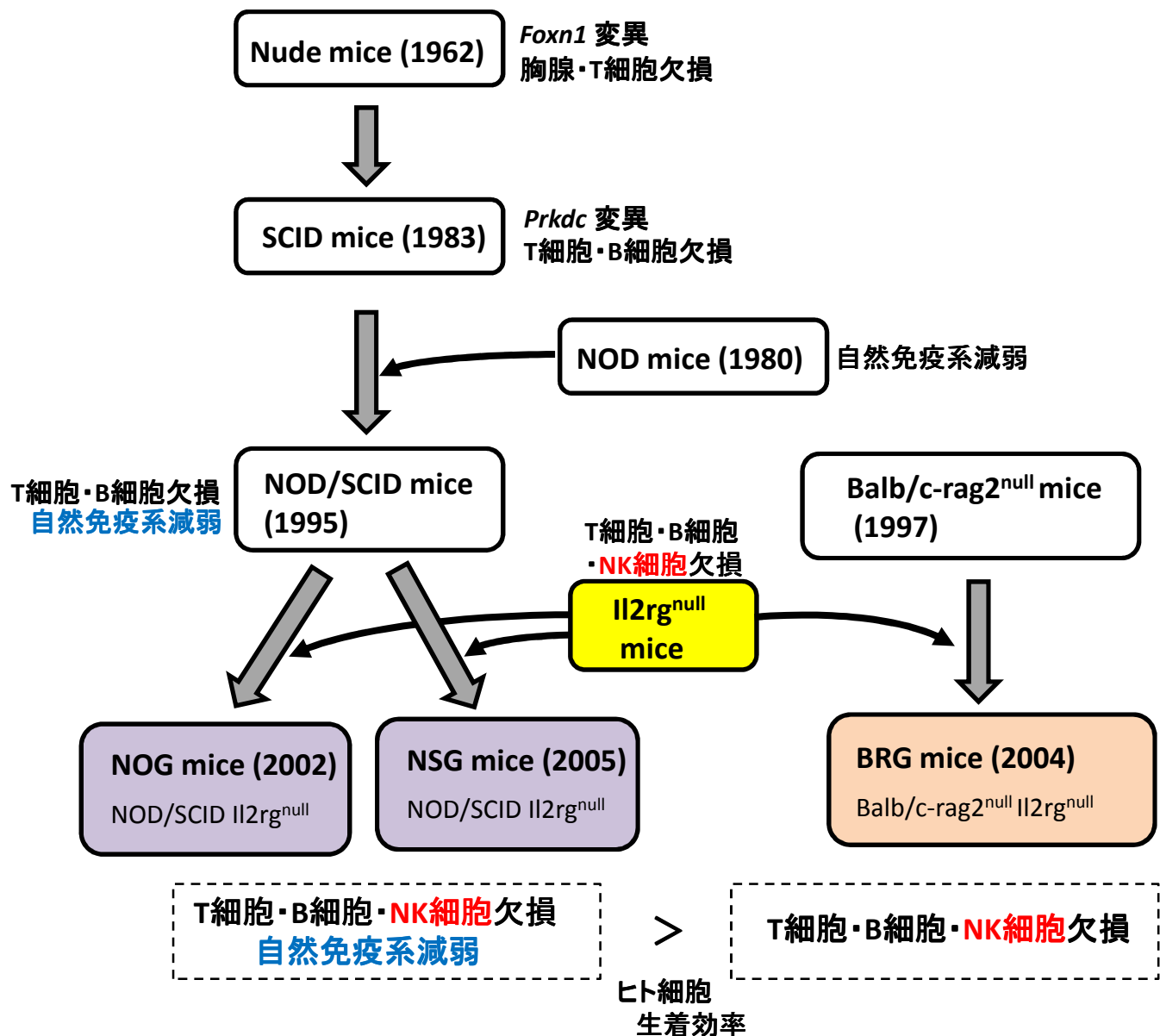


図1-1 免疫不全マウスの開発の経緯

第2章 *IL2RG* 遺伝子ノックアウトによる免疫不全ブタの開発 および表現型解析

第1節 緒言

インターロイキン 2 受容体 γ 鎖 (Interleukin-2 receptor gamma chain; *IL2RG*) は、当初、*IL-2* 受容体の 3 番目の構成要素として特定され (Takeshita et al., 1992)、その後、*IL-4* (Kondo et al., 1993; Russell et al., 1993)、*IL-7* (Noguchi et al., 1993a)、*IL-9* (Kimura et al., 1995)、*IL-15* (Giri et al., 1994)、および *IL-21* (Asao et al., 2001) の受容体の共通する構成要素であることが明らかとなった。そのため共通サイトカイン受容体ガンマ鎖 (common γ chain : γ_c) と呼ばれている。リンパ球のおおよそすべての細胞系列で検出され (Ishii et al., 1994)、その機能欠損は多種のサイトカインの機能欠損を招くため、重篤な免疫不全症状を示すことになる (Noguchi et al., 1993b) (図 2-1)。*IL2RG* 遺伝子は調べられているすべての哺乳動物種において X 染色体上に位置することが確認されており、ヒトでは、この遺伝子変異による免疫不全症は X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked Severe Combined Immunodeficiency : X-SCID) と称されている。

1. common γ 依存性サイトカインの機能

IL2RG をレセプターの構成要素とするサイトカインは、common γ 依存性サイトカインと総称される。*IL2RG* の機能欠損によって一括して不全となる、これらのサイトカインの機能について、まず個別に記述する。

1-1. *IL-2*

IL-2 あるいは *IL-2R α* 欠損マウスでは、基本的に T、B、NK 細胞に大きな異常は認められず (Schorle et al., 1991; Willerford et al., 1995)、*IL-2* シグナルはリンパ球細胞の発生に必須ではないと考えられる。しかし、このマウスは加齢とともに自己免疫症状を示す。その原因として、*IL-2* が活性化誘起細胞死 (Activation-Induced Cell Death : AICD) に関与し、その欠損が不規則な T 細胞増殖をもたらすこと、および、*IL-2* が自己反応性 T 細胞を抑制する制御性 T 細胞の発生に重要であることが示唆されている (Kovanen and Leonard, 2004)。

1-2. IL-7

IL-7 あるいは IL-7R α 欠損マウスは T および B 細胞の著減または欠乏を呈することから、IL-7 シグナルがリンパ球発生に必須であることが示された (Peschon et al., 1994; von Freeden-Jeffry et al., 1995)。胸腺では、T 細胞のダブルネガティブ (DN) 段階 (CD4⁻ CD8⁻ CD44⁻ CD25⁺) 以降の発達に必要である。その他にも、T 細胞の生存、増殖、T 細胞受容体の再構成にも関与することが示されており、IL-7 シグナルは T 細胞の発生分化に不可欠である (Fry and Macall, 2002)。また、マウスでは、初期 B 細胞の生存、増殖、免疫グロブリンの再構成にも関与すると考えられている (Fry and Macall, 2002)。しかし、ヒトの IL-7R α 欠損では、T 細胞は著減するが、B 細胞の発生は認められ、移植により T 細胞が供給されれば、正常に機能するとされている (Buckley, 2002)。このことから、ヒトでは、IL-7 シグナルが B 細胞の発生に必要ではないとされているが、加齢につれて B 細胞発生の IL-7 シグナルへの依存性が増すという報告もされている (Parrish et al., 2009)。

1-3. IL-9

IL-9 欠損マウスの解析などにより、IL-9 はリンパ球細胞の発生分化には必要ではないが、マスト細胞の増殖や活性化を誘導することが示された (Townsend et al., 2000)。さらに近年では、Th17 細胞の分化を誘導することなどにより、炎症反応に関与することが示されている (Elyaman et al., 2009; Nowak et al., 2009)。

1-4. IL-15

IL-15 の受容体は IL-15R α 、IL-2R β 、common γ 鎖からなるが、IL-15、IL-15R α あるいは IL-2R β を欠損するマウスでは、NK 細胞の欠乏または著減が認められることから、IL-15 シグナルは NK 細胞の発生に必要不可欠であることが示されている (Suzuki et al., 1997; Lodlce et al., 1998; Kennedy et al., 2000)。また、CD8⁺T 細胞の減少とメモリー CD8⁺T 細胞の欠乏も認められることから、CD8⁺T 細胞の恒常性維持にも関与すると考えられている (Lodlce et al., 1998; Kennedy et al., 2000)。

1-5. IL-4 と IL-21

IL-4 および IL-21 は主として CD4⁺T 細胞から分泌されるサイトカインで、B 細胞に対して作用する。*in vitro* での解析および IL-4 あるいは IL-4R 欠損マウスの解析から、IL-4

シグナルが免疫グロブリンの IgG₁ や IgE へのクラススイッチに重要であることが示された (Kuhn et al., 1991; Noben-Trauth et al., 1997)。ヒトにおいても、IgE や IgG₄ へのスイッチに IL-4 が作用することが示されている (Gascan et al., 1991)。一方、IL-21R 欠損マウスでは、IgG₁ 産生は減少するが、IgE が増加することが示された (Ozaki et al., 2002)。さらに、IL-4/IL-21R 二重欠損マウスでは、IgM は一部残存しているものの、IgE に加え、IgG₁、さらに IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃ すべての産生が認められなくなった (Ozaki et al., 2002)。以上のことから、IgE や IgG へのクラススイッチおよび抗体産生は IL-4 と IL-21 が協調的に制御していると考えられている。

以上から、IL2RG 機能欠損によって引き起こされる重症複合免疫不全は、T 細胞の不全は IL-7 シグナル、NK 細胞の不全は IL-15 シグナル、T 細胞不在による影響ではない B 細胞固有の欠陥は IL-4 および IL-21 シグナル、それぞれの機能欠損に起因するものと考えることができる。

2. common γ 鎖によるシグナル伝達

各 ILs が common γ とそれぞれの IL 特異的受容体の会合を仲介することで、Jak キナーゼの活性化が誘導される。大部分のサイトカイン特異的な受容体が Jak1 と結合しているのに対し、common γ と IL-2R β は Jak3 と結合している (Miyazaki et al., 1994; Zhu et al., 1998)。Jak3 は common γ 鎖によるシグナル伝達に不可欠であり、Jak3 の機能欠損は X-SCID と同様の症状を招くことが示されている (Macchi et al., 1995; Nosaka et al., 1995; Park et al., 1995; Russell et al., 1995)。Jak の活性化により、各 IL 特異的な受容体のチロシン残基がリン酸化され、Shc アダプタータンパク、インスリン受容体基質および STAT タンパクが受容体に結合できるようになる。これにより、Jak-STAT、PI3K/Akt、Ras-MAPK 経路が活性化され、各サイトカインに依存する遺伝子発現や生物学的作用を示すと考えられている (Kovanen and Leonard, 2004)。

3. ヒト X-SCID およびそのモデル動物

IL2RG 遺伝子の機能を欠損した哺乳動物種として、これまでに、ヒト X-SCID、ノックアウトマウスおよびラット、自然発症の X-SCID イヌが報告されている。

3-1. ヒトX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID)

ヒト X-SCID は、X 染色体上に存在する *IL2RG* 遺伝子の変異が原因で生じる、細胞性免疫・液性免疫ともに不全となる重症複合免疫不全である。典型的な X-SCID では、総リンパ球数の減少、T・NK 細胞のほぼ完全な欠失を呈し、B 細胞については、数は正常もしくは増加するが、IgM⁺の初期 B 細胞であり、機能欠損を生じている (T⁻B⁺NK⁻)。また、IgA、IgM の血中濃度は低く、IgG は生時には正常であるが、母体由来の IgG が消失する 3 か月齢以降に減少する。通常、胸部レントゲンで確認できる胸腺の影が見られず、生検によっても T 細胞は存在せず未発達であることが示されている (Geha and Rosen, 2007)。罹患した男児は、生時は正常に見えるが、母体由来の抗体が減少するにつれ、易感染性を示すようになる。カンジタ症、扁桃・リンパ節の欠損、日和見感染などがほぼ共通してみられる特徴である。なお以上の内容に関しては、Allenspach らの総説に詳述されている (Allenspach et al., 2003-2013)。

3-2. *Il2rg* 遺伝子ノックアウトマウス

Il2rg 遺伝子をノックアウトしたマウスは、完全欠失型の 2 系統 (Cao et al., 1995; Di Santo et al., 1995) と細胞内ドメインの欠失型 (Ohbo et al., 1996) の 3 系統が報告されており、ほぼ共通した表現型を示している。胸腺は著しく萎縮しており、皮質・髄質ともに形成不全であった。それに伴い、T 細胞数の著しい減少が認められたが、胸腺中には、CD4、CD8 のダブルポジティブ (DP)、シングルポジティブ (SP) の T 細胞が存在しており、CD4-SP の比率が上昇していた。それを反映し、CD4-SP の T 細胞は末梢血中에서도検出された。以上から、*Il2rg* 遺伝子ノックアウトマウスでは T 細胞の分化過程より、増殖の方が重大な影響を受けていると考えられる。ヒトの場合とは異なり、骨髓および末梢血中での、B 細胞数の著減も認められた。一方で、加齢に伴い、脾臓中で、T 細胞や B 細胞が増加する現象も認められた。血中の免疫グロブリンは、IgM については、系統により差が認められるが、野生型と顕著な違いはなかったのに対し、IgE や IgG は大きく減少しており、IL-4 シグナル不全によるクラススイッチの障害が想起される。また、単球や顆粒球は野生型と比べ、増加もしくはほぼ同レベルであったが、NK 細胞はほぼ完全に欠失していた。加えて、 $\gamma\delta$ T 細胞や上皮内リンパ球もほぼ完全に欠失しており、末梢のリンパ節も検出困難なほどに萎縮していた。

3-3. *Il2rg* 遺伝子ノックアウトラット

2010 年に ZFN を用いて、*Il2rg* 遺伝子の機能を欠損したラットの作製が報告された (Mashimo et al., 2010)。このラットでは、胸腺は著しく萎縮しており、上皮細胞の残渣のみであった。また、脾臓も若干小さくなっており、白脾髄の顕著な低形成が認められた。末梢のリンパ節やパイエル板は肉眼的に観察することはできなかった。末梢血中の総白血球数の減少も認められた。フローサイトメトリーによる末梢血中の血球細胞の解析によると、B 細胞、NK 細胞、CD4⁺CD8⁺T 細胞はほとんど欠損していた。CD4⁺CD8⁺T 細胞も大きく減少していたが、一定数の残存が認められた。血中の免疫グロブリンについては、IgM がやや増加していたのに対し、IgG の減少、IgA の著減が認められた。

3-4. X-SCID イヌ

自然突然変異により、*IL2RG* 遺伝子に 4 塩基欠失あるいは 1 塩基挿入が生じることにより、機能欠損となったイヌの系統が報告されている (Felsburg et al., 1998; 1999)。このイヌでは、胸腺は低形成であり、リンパ節、扁桃、パイエル板はほとんど観察できない。末梢血における FACS 解析によると、4 週齢以下では、T 細胞の著減、B 細胞は通常あるいは増加というヒト X-SCID と同様の症状を呈している。ただし、8 週齢以降では、T 細胞レベルが上昇する個体が存在する。血中の免疫グロブリンについては、IgM はほぼ正常値であるが、IgG が激減し、IgA はほぼ欠損していた。このイヌにおいても、ヒトやマウスと同様、抗体のクラススイッチが障害されていると考えられる。一方、胸腺中の T 細胞のサブセット解析では、CD4CD8-DN 細胞の割合が上昇し、CD4CD8-DP 細胞の割合が減少しており、DN から DP へ移行する段階が障害されていると考えられる。マウス・ラットでみられるような CD4⁺T 細胞の相対的増加は認められていない。

4. *IL2RG* 遺伝子ノックアウトブタの作製

以上のように、*IL2RG* は少なくとも哺乳動物においては、本質的に同等の機能を有し、その機能欠損が重症免疫不全をもたらすことが明らかとなっている。ブタにおいても、その機能解析についての報告はないものの、他の動物種と類似した遺伝子構造やリンパ球における発現が確認されている (Honma et al., 2003)。そこで、ブタにおいても、*IL2RG* の機能欠損させることにより、免疫不全症状を誘起できると考え、*IL2RG* ノックアウトブタの作製に着手することにした。他の動物種では、この遺伝子が X 染色体上に存在することから、ヘミ欠損型のオス (X⁻Y) で重篤な免疫不全症状を呈すのに対し、ヘテロ欠損型のメ

スは異常を示さないことが分かっている (Puck et al., 1987; Cao et al., 1995)。ブタにおいても、*IL2RG* 遺伝子は X 染色体上に存在することから、初代クローンとしてヘテロ欠損型のメス (*IL2RG*^{+/-}) をまず作製し、その後代を用いて表現型の解析を行うこととした。

第2節 材料と方法

供試動物

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、畜産草地研究所にて飼育されている、ランドレース (L)、大ヨークシャー (W)、デュロック (D) 種およびその交雑種を用いた。すべてのブタは、市販の配合飼料を用い、1日2回の制限給餌、自由飲水条件で飼養された。試験屠殺は、大型ブタの場合、電気ショックで気絶させた後、頸動脈を切断して失血死させることにより行った。また、子ブタの場合は、ケタラルによる深麻酔の後、頸動脈を切断して失血死させることにより行った。

すべての動物実験は、独立行政法人農業生物資源研究所の動物実験委員会の承認を受け、同所の「動物実験規程」に基づいて実施した。また遺伝子組換え生物を使用する実験については、同所の遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受け、「遺伝子組換え生物等の使用等に係る安全規程」を遵守して実施した。

ターゲティングベクターの作製

ブタ *IL2RG* 遺伝子領域を含む BAC クローンをブタ BAC ライブラリーより、スクリーニングし、ターゲティングベクター作製に供した。この BAC クローン由来の DNA を *EcoRI* (東洋紡、大阪) で消化し、exon 7 の一部、intron 7、exon 8 と 3'非翻訳領域を含む約 10kb の断片を切り出し、pBluescript II (KS-) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) にサブクローニングした。この断片の 3'側の約 400 bp をシーケンスし、サザンブロットティングの 3'側プローブとして用いることとした。3'側の約 1 kb を *AatI* (東洋紡) と *SaII* (東洋紡) を用いて除去し、平滑末端化したのち、セルフライゲーションさせることにより、ターゲティングベクターの 3'-アーム部 (約 9 kb) を作製した。intron 4 の一部、exon 5、intron 5 の一部を含む、約 1 kb の 5'-アーム部は、BAC DNA を鋳型とした PCR により増幅した。用いたプライマー (Gcint4F1XhoI : 5' - ACA TCT CGA GGA TTC CCA GCT CCT ATT CTC - 3' および Gcint5R1SalI : 5' - TAG AGT CGA CTG CCC TTA CTG TAT GCC AGC - 3') には、それぞれ *SaII*、*XhoI* 認識配列を付加し、増幅した断片を *SaII/XhoI* で処理し、pKJ2 (大阪大学 八木健教授より供与) 由来のネオマイシン耐性遺伝子発現コンストラクト (PGK-neo-pA) を組み込んだ pBluescript II (KS-) の *XhoI* サイトに挿入した。さらに、この 5'-アームと PGK-neo-pA を含むプラスミドの *XhoI* サイトにネガティブ選択用のジフテリア毒素 A 断片発現コンストラクト (MC1-DTA-pA) (大阪大学 八木健

教授より供与) を挿入した。得られた DTA-5'-アーム-neo 構造を含むプラスミドを *NotI* (東洋紡) と *EcoRI* で 3 つの断片に分解し、pBluescript 部以外の 2 つの断片を、*NotI/EcoRI* 処理した 3'-アームを含むプラスミド (上述) に順番に挿入した。さらに、*EcoRI* による部分消化とセルフライゲーションにより 3'-アームの 5'側末端に存在する *EcoRI* サイトを破壊した。最終的なターゲティングベクターは、ブタ *IL2RG* ゲノム DNA 由来の約 1kb の 5'-アームと約 9kb の 3'-アーム、およびその間に存在する PGK-neo-pA と 5'-アームの外側に存在する MC1-DTA-pA から構成される (図 2-2)。このターゲティングベクターは、エレクトロポレーションによる遺伝子導入に用いるため、*NotI* により線状化し、フェノール/クロロホルムによる精製、エタノール沈殿の後、HEPES Buffered Saline (HBS) で 25 nM となるように調製した。

ブタ胎仔線維芽細胞の分離と培養

ブタ胎仔線維芽細胞は、メスのランドレース (L) とオスの大ヨークシャー (W) の交配により得られた、胎齢 62 日 (DG62) の LW 胎仔より分離した。頭部および内臓組織を除いた胎仔を、Phosphate Buffered Saline [PBS (-)] で洗浄後、細切し、20 ml の PBS (-) で懸濁した。低速遠心により組織片を回収し、20 ml の 0.1% (w/v) トリプシンを含む PBS (-) で懸濁し、4°C で一晩インキュベートした。遠心分離によりトリプシン溶液を除去し、ペレットを 37°C で 30 分間インキュベートした後、10% Fetal Calf Serum (FCS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 中でピペッティングすることにより、細胞を分散させた。100 μ m のセルストレイナー (BD Bioscience, San Jose, California, USA) を通した後、遠心分離により細胞を回収し、DMEM 10% FCS に再浮遊させ、175 cm² の培養フラスコに播種した。以後、常法に従い、37°C、5% CO₂ のインキュベーター中で培養を行った。

ターゲティングベクターの導入

1 x 10⁷ 個のメス胎仔細胞を 400 μ l の HBS に懸濁後、25 nM に調製した線状化したベクターDNA 100 μ l と混合 (終濃度 : 5 nM) し、電気穿孔法による遺伝子導入を行った。遺伝子導入は、電気穿孔装置 (Gene pulser II; BioRad, Hercules, California, USA) を用い、750 V/cm、950 μ F、抵抗 ∞ の条件で、単一の減衰波により行い、導入後の細胞は 10 cm 培養ディッシュ 3 枚に播種した。48 時間後、800 μ g/ml となるように G418 (ナカライテスク、京都) を添加し、G418 耐性細胞の選択を行った。9 日後に、G418 耐性コロニーを 0.25% ト

トリプシン/EDTA を浸みこませた濾紙ディスクを用いて、24 well 培養プレートに 1 枚/well となるように継代した。移した細胞がコンフルエントに達した後、細胞をトリプシンにより剥離させ、そのうち半分を PCR スクリーニングに供し、残りは培養を継続した。

PCR による相同組換え細胞のスクリーニング

分離した薬剤耐性クローン細胞（24 well の半分）を PBS(-)で洗浄後、200 µg/ml Proteinase K を含む超純水 50 µl 中に懸濁し、55°C で 3 時間インキュベートした。95°C 、10 分間の処理により Proteinase K を失活させた後、1 µl を AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) を用いた PCR に供し、相同組換えの生じた細胞のスクリーニングを行った。PCR のサイクルは、94°C 10 分の後、94°C 30 秒・58°C 25 秒・72°C 1 分 15 秒を 35 サイクル、最後に 72°C を 7 分とした。用いたプライマーは、FP1 (5'- GCC TGC TCT TTA CTG AAG GC -3') と Gcint4F4 (5'- CAA TCA GTC CAG TAG GAA GG -3') であり、組換えアレル特異的に 1.1 kb の産物を生じるよう設計した。核移植・胚移植後のクローン胎仔・産仔、後代の子ブタの遺伝子型判定にも同様な方法を用いた。

核移植と胚移植

大西らの既報 (Onishi et al., 2000) と同様に、核移植・胚移植を実施した。5 µg/ml のサイトカラシン B (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) を含む Porcine Zygote Medium-3 (PZM-3) で作成したドロップ中に保持した Metaphase II の卵子から斜角に研磨した除核用ピペットを用い、第一極体を細胞質ごと除去した。サイトカラシン B を除いた PZM-3 培地中で除核卵子を洗浄した後、ピエゾ式マイクロマニピュレーター (プライムテック、土浦) に取り付けられた鈍端の注入用ピペットを用いて、*IL2RG* 遺伝子の組換えが確認された細胞の核を除核した卵子に注入した。核移植後の卵子を 0.28 M D-マンニトール、0.05 mM CaCl₂、0.1 mM MgSO₄、0.01% BSA からなる電気刺激用溶液に移し、1.5 kV/cm、100 msec x 1 回の直流パルス刺激 (SSH-2; 島津製作所、京都) により、活性化処理を行った。その後、サイトカラシン B を含む PZM-3 で 2 時間処理し、第 2 極体の放出を抑制する処理を行った。核移植後の再構築胚をさらに、5% CO₂、5% O₂、38.5°C の条件下でさらに 2 日間、PZM-3 培地中において培養した。分割し 2-8 細胞期胚となった再構築胚を、人工流産により発情を誘起した仮親となる母ブタの卵管 (約 200 個/仮親) に、麻酔下で移植した。(大西彰博士およびプライムテック株式会社の岩元正樹博士、橋本径子氏により実施)

サザンブロット解析

ゲノム DNA はクローン胎仔由来線維芽細胞あるいは産仔由来の組織（耳片）から抽出した。剥離した細胞あるいは細切した組織片は、lysis buffer (50 mM Tris : pH8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 0.5 mg/ml Proteinase K) 中で 55°C にて一晩処理し、溶解させた。フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出により精製した後、エタノール沈殿によりゲノム DNA を回収した。胎仔細胞および産仔より回収したゲノム DNA 各 10 µg を *EcoRI* により 37°C にて一晩処理し、0.8%アガロースゲルで泳動した後、Hybond N+ メンブレン (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) にブロッティングした。プローブとして用いる DNA 断片は、以下に示すプライマーセット (5'プローブ : 5' - CTG AGC TCC AGC CTA CCA ACC TAA C - 3' および 5' - AGT CCA GCT GCG GTC CCG GTC ACT C - 3'、3'プローブ : 5' - TCA ACA CTC CCA GCA CTT TG - 3' および 5' - TCT TAG TGC GAA AGA TCC GC - 3') と BAC DNA を鋳型として用いた PCR により増幅させた。作製した DNA 断片を High Prime DNA Labeling Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いたランダムプライミング法により、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP を用いて RI 標識した。メンブレンを RI 標識したプローブでハイブリダイズさせた後、Imaging plate (富士フイルム、東京) に感光させ、FLA-3000G Imaging Analyzer (富士フイルム) を用いて解析した。

FACS 解析

細胞懸濁液は、脾臓あるいは胸腺を磨砕することにより作成した。また、末梢血は、単核・多核両方の細胞を検出するため、溶血のみを行い、密度勾配遠心等による単核細胞の濃縮は行わなかった。CD4⁺および CD8⁺の T 細胞、CD45RA⁺CD3⁻の B 細胞、CD16⁺CD3⁻の NK 細胞を同定するため、mouse anti-pig CD3e (Abcam, Cambridge, UK)、CD4 (BD pharmingen, San Diego, California, USA)、CD8 (BD pharmingen)、CD16 (AbD Serotec, Oxford, UK)、CD45RA (AbD Serotec)、monocyte/granulocyte (Beckman Coulter, Brea, California, USA) 抗体をそれぞれ用いた。染色は、 5×10^4 個の細胞を含む懸濁液に各抗体を添加し、4°C で 30 分間 incubate することによって行った。染色後の細胞を 0.5% FCS を添加した PBS(-)で洗浄後、FACSCantoII (BD Biosciences) を用いて、各抗原発現量の定量を行った。

統計処理

平均値の比較は、Student の t 検定により行い、 $p < 0.05$ の場合を有意と判定した。

第3節 結果

IL2RG 遺伝子ターゲティングベクターの作製

公開されているブタ *IL2RG* cDNA 配列と、ヒトおよびマウスの *IL2RG* 遺伝子の構造を比較することにより、ブタ *IL2RG* 遺伝子のエクソン/イントロン構造を予測した。ベクター作製時には、ブタゲノム DNA 配列情報が公開されていなかったため、ランドレース種由来 BAC ライブラリーから *IL2RG* 遺伝子領域を含むクローンのスクリーニングを行った。その結果、1 個のクローン (L274-G22) が得られた。得られたクローン由来の BAC DNA より、*IL2RG* 遺伝子領域を単離し、ターゲティングベクターの相同領域として用いた。

ターゲティングベクターは、exon 4 の一部から intron 5 の一部に相当する 1 kb の 5'相同領域と exon 7 の一部から 3'非翻訳領域に相当する 3'相同領域を含み、通常のポジティブ・ネガティブセクションが可能なものを設計した (図 2-2)。ターゲティングが成功した場合、PGK-neo 発現カセットによって intron 5 の一部、exon 6、intron 6 および exon 7 の一部が置換される。*IL2RG* がレセプターとして機能するために必須となる膜貫通ドメインをコードする配列が exon 6 に位置しているため、*IL2RG* 遺伝子機能の不活化が起こることが想定された。

IL2RG 遺伝子組換えブタ胎仔線維芽細胞の作製

胎齢 62 日のメス胎仔から得られた線維芽細胞に、直線状にしたターゲティングベクターを導入し、G418 による薬剤選択を行った。出現した耐性コロニーを回収し、24 ウェル培養ディッシュで増殖させた。2 回の遺伝子導入操作により、合計で 597 個の解析可能な細胞クローンが得られた。これらの細胞からゲノム DNA を抽出し、プライマー FP1 (PGK-neo 発現カセットの 3'側末端に位置する配列) と Gcint4F4 (5'側相同領域のすぐ外側の intron 4 に位置する配列) を用いた PCR 解析によるスクリーニングを行った。その結果、解析した 597 個のうち、3 個 (0.50 %) のクローンで、ターゲティングされたアリル特異的に増幅する約 1.1 kb のバンドを検出することができた (図 2-2, 表 2-1)。

IL2RG 遺伝子組換え細胞を用いた核移植由来胎仔の遺伝子型解析

前項で得られた PCR 陽性の細胞クローンは、核移植に使用するために増殖させた。3 個の細胞クローンのうち 1 個を用い、計 3 回の核移植・胚移植を実施した。核移植後に生存していた総数 1,365 個の核移植胚のうち、761 個 (55.8%) が正常な 2-8 細胞期胚まで体外で

発生した。この 761 個の分割胚を、3 頭の雌ブタの卵管へ移植した (表 2-2)。

同定した PCR 陽性の細胞クローンは、非相同組換え細胞が、様々な割合で含まれている可能性が高く、誕生するクローン産仔のうちに占める組換え個体の割合が低くなり、非効率的となることが予測された。したがって、均一な組換え細胞のみからなる細胞集団を得るため、妊娠した雌ブタから胎齢 32 日あるいは 39 日に胎仔を採取し、線維芽細胞を回収した。回収した線維芽細胞から、ゲノム DNA を抽出し、PCR およびサザンブロット解析により遺伝子型の判定を行った。胚移植を施した 3 頭の雌ブタのうち、2 頭から計 9 頭の胎仔が採取でき (表 2-2)、そのうち 6 頭が PCR 陽性であった。また、この 6 頭について、サザンブロッティング解析を行った結果、5'側・3'側いずれのプローブを用いた場合についても、野生型/変異型のバンドが各々確認され、想定通りヘテロノックアウト型となっていることが確認された (図 2-2b)。

IL2RG 遺伝子組換えクローン胎仔由来細胞を用いた再核移植・胚移植

前項で得られた IL2RG 遺伝子組換えクローン胎仔由来の線維芽細胞を用いて、計 12 回の核移植・胚移植を実施した。核移植後に生存していた総数 5,255 個の核移植胚のうち、2,482 個 (47.2%) が正常な 2-8 細胞期胚まで体外で発生した。この 2,482 個の分割胚を、12 頭の雌ブタの卵管へ移植した結果、6 頭が分娩に至り、計 31 頭 (死産 14 頭を含む) の産仔を得ることができた (表 2-2)。17 頭の生存産仔のうち 3 頭で、原因不明の生後直死が見られた。これらの短命だった子ブタの生時体重 (0.6 ± 0.2 kg) は、その他の 14 頭 (1.0 ± 0.3 kg) よりも有意に小さかった (表 2-3)。さらに、他の 10 頭は、肺炎や重度の関節炎により衰弱し、生後 7-70 日の間に死亡した (5 頭の安楽死を含む)。最終的に、見かけ上は健康である 4 頭が、長期間 (1 年以上) 生存し、うち 1 頭から通常的人工授精により後代を得ることができた。

IL2RG 遺伝子組換えクローン産仔の遺伝子型・表現型解析

PCR 解析により、誕生した 31 頭の子ブタすべてが、IL2RG 遺伝子のノックアウトアليلを保持していることが確認された。加えて、長期生存した 4 頭については、サザンブロット解析を行い、想定通り相同組換えが生じ、IL2RG 遺伝子ヘテロノックアウト個体であることが確認された (図 2-2c)。IL2RG 遺伝子のヘテロノックアウト個体は、マウスやヒトの場合 (Puck et al., 1987; Cao et al., 1995) と同様、表現型においては正常なブタと識別不可能であることが予想された。しかしながら、下痢症、肺炎、重度の関節炎の頻発や異常

に高い死産の発生率から、感染症に対する感受性が高くなっていることが示唆された。こうした現象の原因を調べるため、死産および生後死のクローン産仔の脾臓および胸腺といった免疫系組織の状態を解析した。死産および生後直死産仔の脾臓の大きさは正常もしくはわずかに小さい程度であったが、リンパ系の凝集（白脾髄）の低形成が高頻度で観察された（図 2-3a）。死産および生後死計 27 頭のうち 20 頭では、胸腺が観察できないほどに萎縮していた。残り 7 頭のうち 4 頭で中程度の萎縮が認められ、ほぼ正常とみられる胸腺が観察されたのはわずか 3 頭であった（表 2-3、図 2-3b）。さらに、これらのクローン個体の免疫学的形質を調べるため、末梢血中および脾臓中の T 細胞の存在状態を FACS により解析した。長期生存の見られた 4 頭では、CD4⁺、CD8⁺T 細胞とも野生型と同等レベルでの存在が確認された。また、萎縮した胸腺が観察された個体（4 頭）のうち 3 頭では、野生型より明らかに減少しているものの、T 細胞の存在を検出することができた。一方、胸腺の存在が確認できなかった個体では、T 細胞をほとんど検出することはできなかった（図 2-4a,b）。加えて、末梢血有核細胞由来の RNA を用いた定量的 PCR により、死亡した胸腺の確認できなかった個体では、*IL2RG* および *CD4*、*CD8* の発現量が長期生存した 4 頭や野生型と比べ、大きく低下していることが明らかとなった（図 2-4c）。

IL2RG 遺伝子組換えブタ（後代）の遺伝子型・表現型解析

IL2RG^{+/-}型の初代クローンで、予想外の免疫不全症状が認められたことを踏まえ、体細胞クローン作製によるエピジェネティック異常の可能性という不確定要因を排し、*IL2RG* 機能欠損の影響を明確化するため、エピジェネティックな異常が修正される、その後代において、免疫学的性状の解析を行った。

長期生存した 4 頭の *IL2RG* ヘテロノックアウトクローンのメスに、野生型のオス由来の精液を用いて通常の人工授精を施し、後代を得ることに成功した。解析時点で、合計 19 頭の F1 個体（オス 12 頭、メス 7 頭）と 21 頭の F2 個体（オス 13 頭、メス 8 頭；うち 10 頭が分娩障害により死亡した）を得ることができた。組換え型アレル特異的な PCR により遺伝子型判定を行った結果、オス 25 頭のうち 14 頭がヘミノックアウト、11 頭が野生型であった。また、メスでは、15 頭のうち 8 頭がヘテロノックアウト、7 頭が野生型であり、通常の伴性遺伝の型式での変異アレルの伝達が可能であった。剖検により胸腺の状態を確認した結果、14 頭のヘミノックアウト（*IL2RG*^{-/-}）のオスすべてが、胸腺の著しい萎縮を認めたのに対し、野生型（*IL2RG*^{+/-}、*IL2RG*^{+/+}）とともにヘテロノックアウト（*IL2RG*^{+/-}）のメスにおいても通常と同様な胸腺が観察された（表 2-4、図 2-5a）。

末梢血の血液学的解析により、全白血球数 (WBC) が、*IL2RG*^{-Y} オス ($6.4 \pm 1.6 \times 10^3/\mu\text{l}$, n=5) において、野生型 ($17.8 \pm 2.3 \times 10^3/\mu\text{l}$, n=6) に比べ、有意に ($p=0.0041$) 減少していることが示された。一方、ヘモグロビン値 (Hgb)、血小板数 (Plt) については変化が認められなかった。また、*IL2RG*^{+/+}メスにおいては、すべての項目について野生型との有意な差は認められなかった (図 2-5b)。

さらに、生後 1 週までの間に末梢血・脾臓・胸腺 (野生型のみ) から細胞を回収し、FACS により、T 細胞、B 細胞、NK 細胞およびミエロイド系細胞の存在様式の解析を行った。野生型メス (*IL2RG*^{+/+}) 末梢血において、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、B 細胞 (CD3-CD45RA⁺)、NK 細胞 (MonoGra-CD3-CD16⁺) およびミエロイド系細胞 (MonoGra⁺) を各々検出することができることを確認した (図 2-6a,b)。*IL2RG*^{+/+}メス末梢血においては、野生型と同レベルの T、B、NK 細胞およびミエロイド系細胞の存在が認められた。一方、*IL2RG*^{-Y} オスの末梢血では、野生型と比較し、T 細胞 (*IL2RG*^{-Y}, $1.5 \pm 1.0\%$; *IL2RG*^{+/Y}, $57.3 \pm 4.3\%$; n=4 each, $p<0.0001$) および NK 細胞 (*IL2RG*^{-Y}, $0.1 \pm 0.1\%$; *IL2RG*^{+/Y}, $3.6 \pm 1.1\%$; n=4 each, $p=0.0162$) の有意な減少が認められた (図 2-6c,d)。同様に、脾臓においても *IL2RG*^{-Y} オスで T 細胞 (*IL2RG*^{-Y}, $2.3 \pm 1.1\%$; *IL2RG*^{+/Y}, $13.0 \pm 1.4\%$; n=4 each, $p=0.0011$)、NK 細胞 (*IL2RG*^{-Y}, $0.1 \pm 0.0\%$; *IL2RG*^{+/Y}, $0.8 \pm 0.2\%$; n=4 each, $p=0.0162$) の有意な減少が見られた (図 2-6c,d)。それに対し、B 細胞やミエロイド系細胞については、末梢血・脾臓ともに、*IL2RG*^{-Y} と野生型との間で有意な差は認められなかった。加えて、*IL2RG*^{-Y} オスの液性免疫の状態についても、生後 1 週から 9 週にかけて血液中の IgG、IgA、IgM の濃度を測定することによって評価した。血中 IgG および IgA は、すべての遺伝子型において、1 週目に高レベルで存在し 3 から 5 週目にかけて徐々に減少した。7 週目以降、野生型および *IL2RG*^{+/+} では血中濃度の再上昇が認められたのに対し、*IL2RG*^{-Y} では低値のままであった。IgM は野生型および *IL2RG*^{+/+} で継続的な上昇が確認されたが、*IL2RG*^{-Y} では上昇は認められなかった (図 2-6e)。

第4節 考察

本研究では、免疫不全動物を用いたヒト化モデルを、大型動物であるブタにおいて実現させる前提条件となる、免疫不全ブタ開発を目指したものである。そのために本章では、免疫系の発生分化に不可欠な *IL2RG* 遺伝子をノックアウトしたブタの作製を試みた。第1節に記したとおり、この遺伝子の機能を欠損した動物として、ノックアウトマウス およびラット、イヌの変異体、ヒトの X-SCID 患者についての報告がある。これらの動物種では、この遺伝子が X 染色体上に存在することから、ヘミ欠損型のオス (−/Y) で重篤な免疫不全症状を呈すのに対し、ヘテロ欠損型のメスは異常を示さないことが分かっている (Puck et al., 1987; Cao et al., 1995)。ブタにおいても、*IL2RG* 遺伝子は X 染色体上に存在することから、初代クローンとしてヘテロ欠損型のメス (*IL2RG* ^{+/−}) をまず作製し、その後代を用いて表現型の解析を行うことを意図した。しかしながら、*IL2RG* ^{+/−} 型の初代クローン個体において、肺炎・関節炎などの感染症と思われる症状が発生し、死に至るケースが頻発したため、免疫学的形質の解析を行った。その結果、当初の予想に反し、*IL2RG* ^{+/−} 型の初代クローン個体の多くが胸腺の著しい低形成、T 細胞の著減といった免疫不全の症状を示していると判断された。

この異常の原因は、1) 同一胎仔由来の細胞によるクローン個体間で異なった表現型が表れること、また 2) その後に得られた後代においてはこうした表現型は表れないことから、体細胞クローン作出に伴うエピジェネティックな異常ではないかと考えられる。中でも、標的とした *IL2RG* 遺伝子が X 染色体上にあることから、X 染色体不活化 (Lyon, 1961) の偏りが原因となっている可能性がある。通常のメスの胚発生においては、種による違いはあるが、プラストシスト期からエピプラスト期にかけての時期にランダムに一方の X 染色体が不活化されることが示されている (Bermejo-Alvarez et al., 2012)。体細胞クローンマウスあるいはクローンブタ胚盤胞においては、X 染色体不活化の偏りや X 染色体上の遺伝子の発現異常が報告されており (Senda et al., 2004; Nolen et al., 2005; Jiang et al., 2008)、これらの報告と同様な現象が生じている可能性はある。しかしながら、ヒトやイヌの X-SCID のキャリア (*IL2RG* ^{+/−}) において、T 細胞の X 染色体不活化が偏っていること (Puck et al., 1992; Deschenes et al., 1994) から推測されるように、多少の不活化状態の偏りがあっても変異型アリルが不活化した細胞が選択的に増殖することにより正常レベルのリンパ球系細胞が発生する可能性が高い。クローン作製に用いた体細胞は薬剤選択遺伝子が発現していることから、変異型の X 染色体が活性型となっていると考えられる。ここで

免疫不全となった個体は、その体細胞における X 染色体不活化状態がクローン作製に伴う胚発生過程においても初期化されず、ほぼ完全に維持された結果と考えられる。我々のグループで作製した、X 染色体上の遺伝子を操作した別の組換えブタにおいても同様な現象が認められていること（未公表データ）からも、そのように推測される。また、ヒト iPS 細胞作製に伴う初期化過程においても、マウスの場合とは異なり、X 染色体不活化が維持されるという報告（Tchieu et al., 2010）があり、X 染色体不活化は最も初期化されにくいエピジェネティック要素の 1 つと考えられる。ブタ初期胚における X 染色体の再活性化は、通常の胚発生では生じない現象であり、体細胞核の初期化の 1 過程と位置付けることができる。マウスでは、インプリントによる父方由来 X 染色体の選択的不活化と内部細胞塊での再活性化が起こるとされており（Mak et al., 2004）、状況が異なる。しかしながら、本研究におけるブタの体細胞クローンは、マウスだけでなく、ウシ（Xue et al., 2002）とも異なった現象を示しており、ブタ体細胞における X 染色体の不活化状態が他の動物種より安定的であるなどの特徴を持っている可能性がある。

エピジェネティックな異常が修正される、クローンの後代においては、全身的衰弱は *IL2RG*^{-/-}型に限定され、*IL2RG*^{+/+}型は野生型と外見的な差は認められなかった。また、*IL2RG*^{-/-}型のブタは、胸腺の顕著な萎縮、T 細胞・NK 細胞の著減、B 細胞の残存といった形質を示したのに対し、*IL2RG*^{+/+}では野生型との差は認められなかった。このことから、ブタにおいても、他の哺乳動物と同様に、*IL2RG* はリンパ球の発生・分化に重要な役割を果たし、その機能欠損が免疫不全症状を誘導することが示された。また、B 細胞の残存が認められたことから、B 細胞の著減を伴うマウス・ラットのノックアウトとは異なり、X-SCID のヒトやイヌと同様な形質を示すことが明らかとなった（第 1 節 3. 参照）。免疫グロブリンの血中濃度は、出生当初は初乳由来の IgG、IgA が存在するため、野生型と差が見られなかったが、野生型では、IgA は 5 週齢以降、IgG は 7 週齢以降に子ブタ自身により合成された抗体による濃度の上昇が認められるのに対し、*IL2RG*^{-/-}ではこの再上昇が観察されなかった。全身的な衰弱が顕在化するのがこの時期以降であり、それは初乳由来の免疫グロブリンの消失に起因すると考えられた。ヒト X-SCID でも同様であり、症状が顕在化するのは、母体由来の免疫グロブリンが消失した後の 3-6 か月齢とされている（Allenspach et al., 2003-2013）。また、IgM は出生当初は低値ながらも一定量存在しているが、すみやかにほぼ消失してしまうことが明らかとなった。これは、マウス・ラットやイヌでは、IgM は通常もしくは増加しているのとは対照的であるが、ヒト X-SCID では、血中 IgM は低いとされており（Allenspach et al., 2003-2013）、ヒトに近い表現型と見ることもできる。IgM は

初期 B 細胞の表面に B 細胞レセプターとして発現し、その発現に T 細胞との相互作用を必要としないとされている。*IL2RG*^{-/-}型のブタで、B 細胞が存在するにもかかわらず、血中 IgM の存在を検出できなかったことから、この B 細胞は膜型 IgM の発現段階にとどまり、抗原刺激により IgM 抗体として血中へ分泌される段階が障害されている可能性が考えられる。この点を明確化するためには、ここで存在している B 細胞の状態についてのさらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

上述したように、*IL2RG*^{-/-}型のブタは通常の飼育環境下では、下痢症、肺炎、重度の関節炎などを呈するが、これらはリンパ球の機能不全によって引き起こされる、日和見感染と考えられる。こうした感染症の原因微生物を詳細に調査することにより、飼育環境下に潜在する病原微生物を明らかにすることができる。また、ここで顕在化する感染症は、ミエロイド系細胞のみでは防除できず、リンパ球系細胞の反応が必要なものと考えられる。さらに、現在作成中の RAG2 欠損ブタ (T・B 細胞欠損、NK 細胞保持) との比較も合わせて行うことにより、各種微生物感染の防除に対する、ミエロイド系細胞、NK 細胞、T・B 細胞 (獲得免疫系) 各々の寄与の仕方を明らかにできると考えられ、ブタの感染防御技術の研究開発に資することも期待できる。加えて、下痢症の発生には腸内細菌叢の異常も関係していると考えられる。腸内細菌叢の構成維持には、腸管内の IgA が重要であるとされている (Mantis et al., 2011) ことから、IgA 産生能をもたない *IL2RG*^{-/-}型では通常と異なる腸内細菌叢が形成されている可能性が高い。*IL2RG*^{-/-}型ブタと野生型ブタにおいて、乳汁から IgA の供給を受ける授乳期から離乳後にかけての変化を比較検討することにより、IgA がブタの腸内細菌叢の構成に及ぼす影響を明らかにすることができると考えられる。

以上、本章では *IL2RG* 遺伝子をノックアウトしたブタを作製し、その表現型解析を行った結果、*IL2RG* ノックアウトブタは、T、NK 細胞を欠損し、B 細胞は存在するものの機能不全であることが示された。すなわち、他の動物種における X-SCID と同様、重篤な免疫不全症状を呈することが確認され、ヒト化ブタ開発に向けた基盤となるブタを作製することができた。そこで次章では、同種骨髄移植を行うにより、この *IL2RG* ノックアウトブタの免疫系再構築が可能であるかどうかを検討することにした。

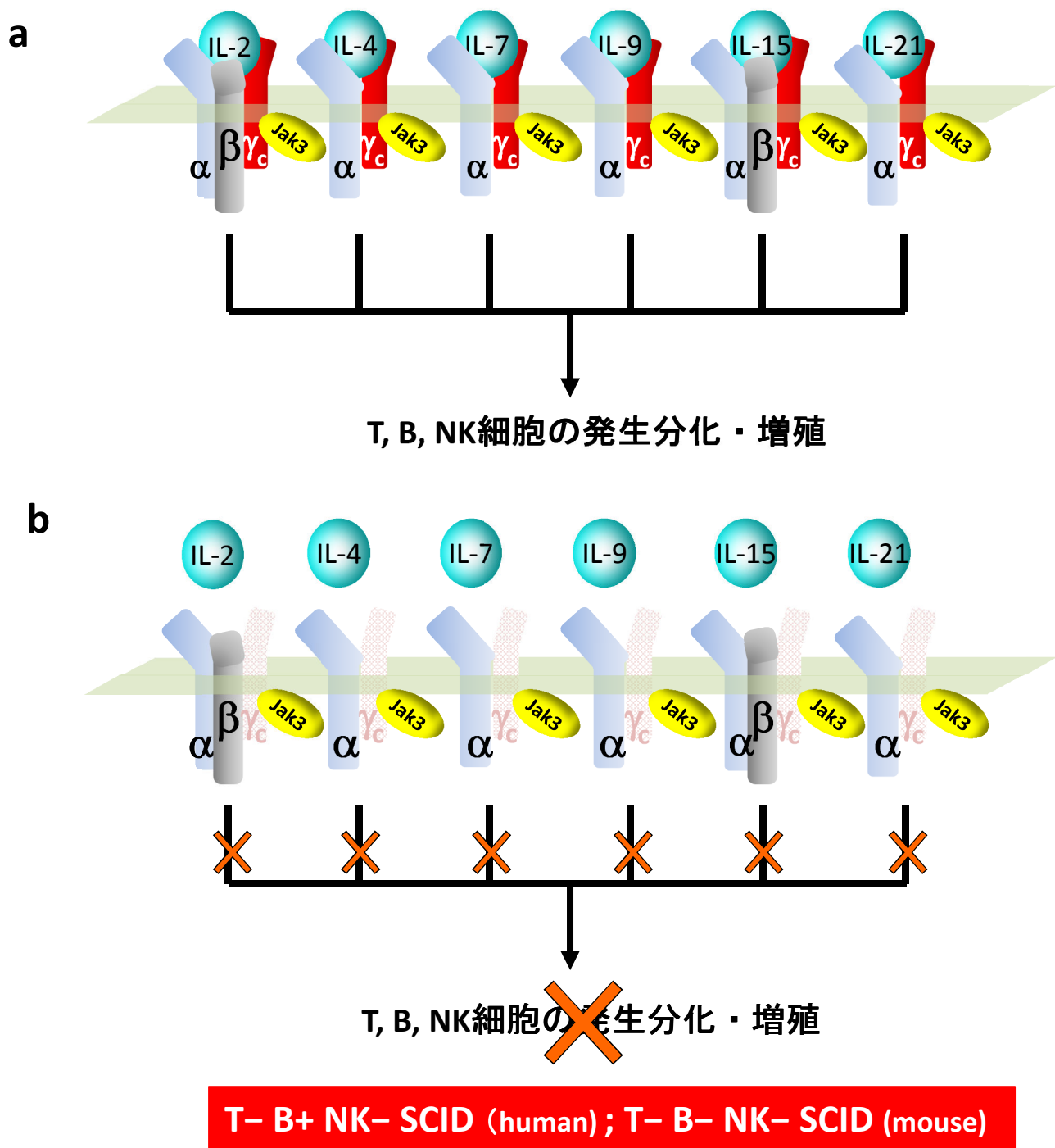


図2-1 IL2RG機能の概略図

a. 正常、b. 機能欠損

IL2RG機能欠損により、IL-2,4,7,9,15,21の作用が一括して阻害され、重篤な免疫不全 (SCID) が誘発される。

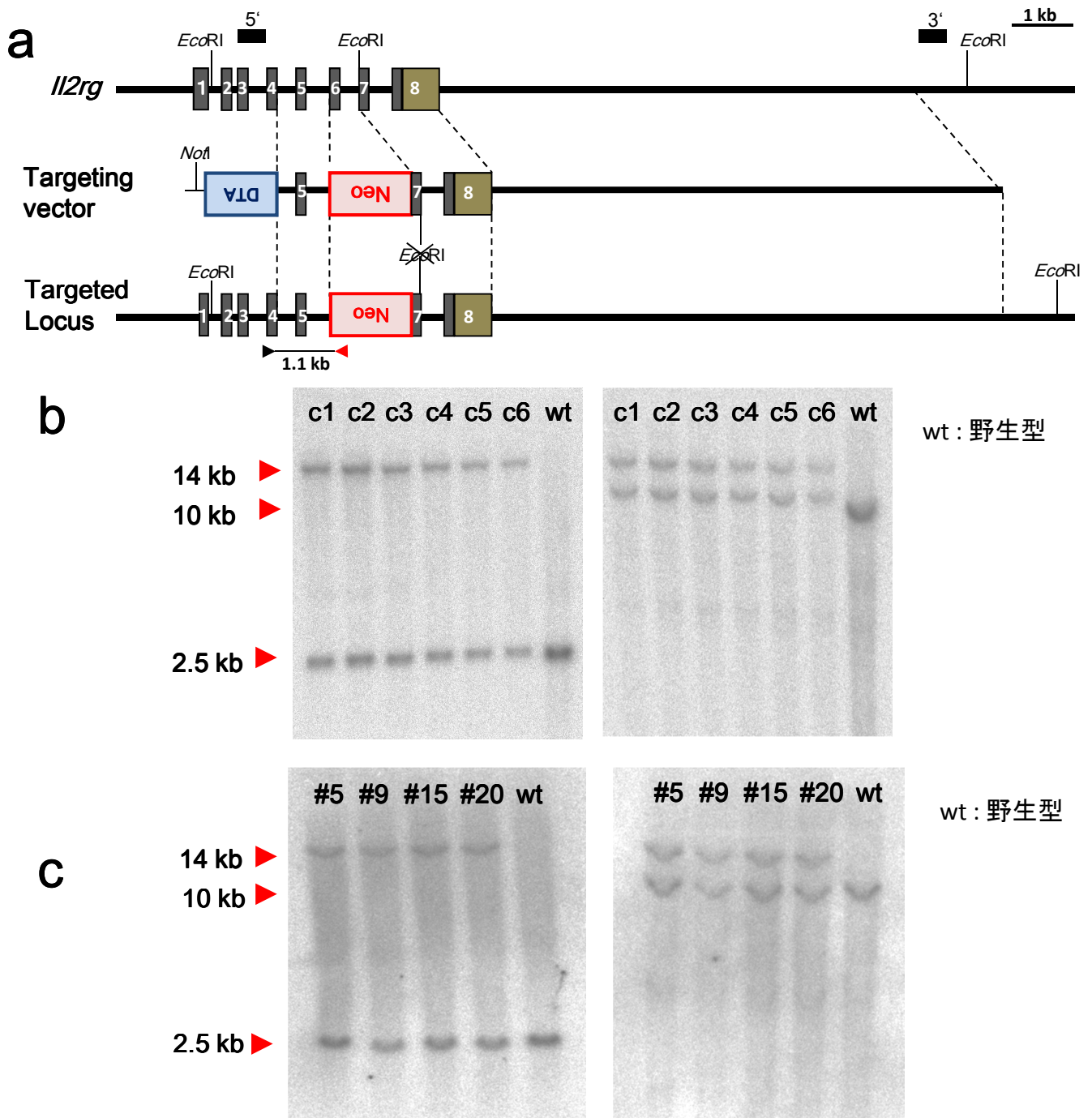


図2-2 IL2RGノックアウトブタの作製

a. IL2RG遺伝子ターゲティングの概念図

数字はexonの番号を示す。

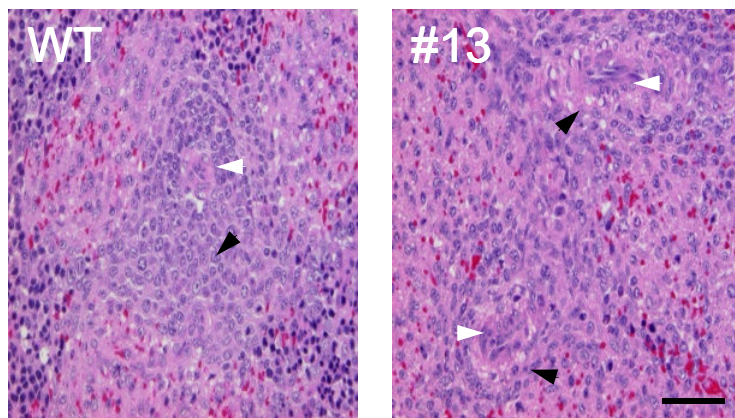
矢頭はPCRスクリーニングに用いたプライマーの位置を示す。変異型で1.1 kbの産物が得られる。

5'、3'はサザンブロッティング用のプローブを示す。5'プローブでは、野生型2.5 kb、変異型14 kb、3'プローブでは、野生型10 kb、変異型14 kbのバンドが検出される。

b. クローン胎仔におけるサザンブロッティング解析 (左:5'プローブ、右:3'プローブ)

c. 再クローニングにより得られた産仔 (長期生存した4頭) におけるサザンブロッティング解析 (左:5'プローブ、右:3'プローブ)

a



b

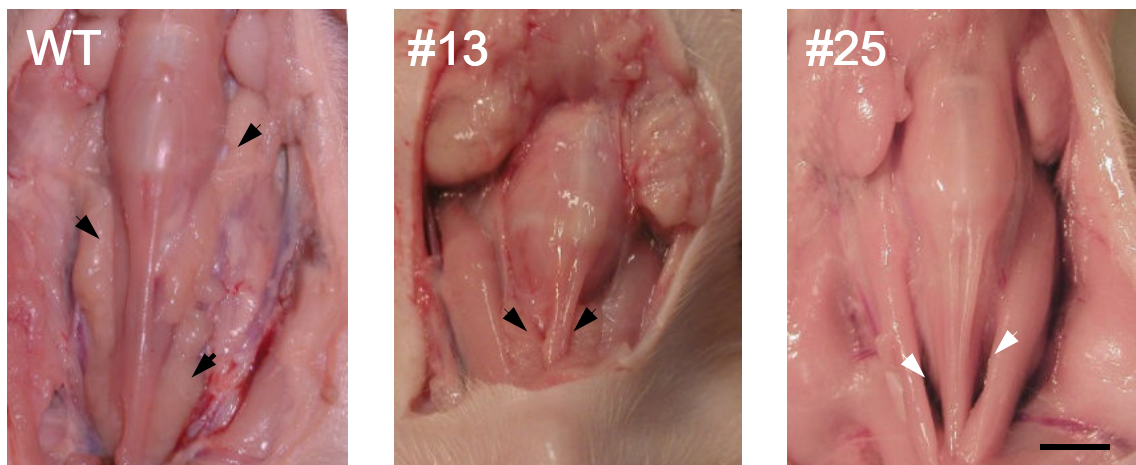


図2-3 $IL2RG^{+/-}$ 型クローンの脾臓・胸腺の表現型

- a. 野生型 (WT)、 $IL2RG^{+/-}$ クローン (#13)の脾臓組織像 (HE染色)
 白矢頭: 胚中心、黒矢頭: 白脾髄
 $IL2RG^{+/-}$ クローンでは白脾髄の低形成が認められる。
- b. 野生型 (WT)、 $IL2RG^{+/-}$ クローン (#13、#25)の胸腺 (黒矢頭)
 $IL2RG^{+/-}$ クローンでは胸腺の低形成 (#13)、あるいは検出不能 (#25: 本来あるべき位置を白矢頭で示す) が認められる。

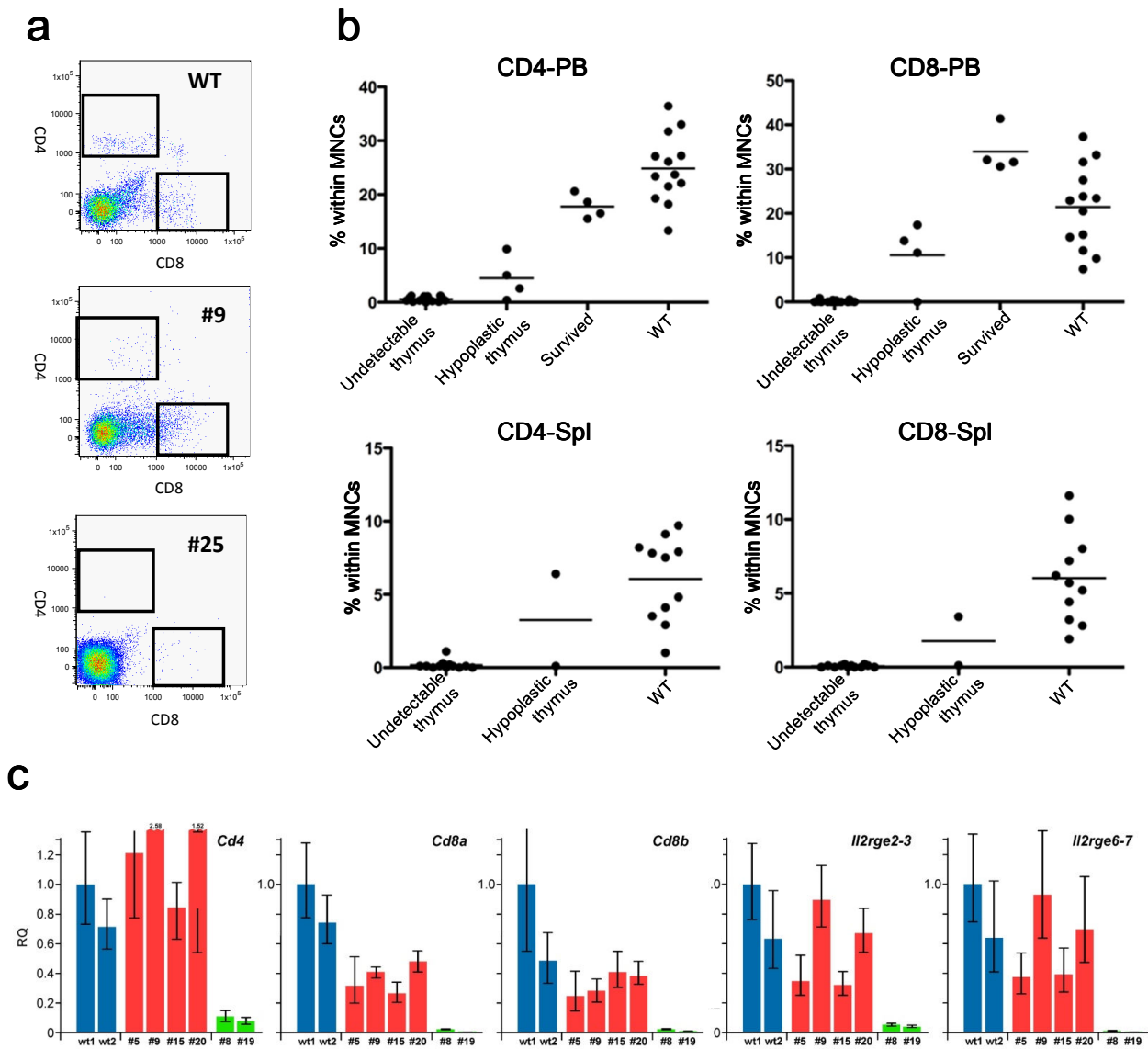


図2-4 *IL2RG*^{+/-}型クローンにおけるT細胞マーカーの発現解析

a. 末梢血由来単核細胞のFACS解析の代表例

野生型 (WT)、長期生存*IL2RG*^{+/-}型クローン (#9)、胸腺検出不能*IL2RG*^{+/-}型クローン (#25)
野生型、長期生存クローンでは、CD4+あるいはCD8+ T細胞が検出されたのに対し、
胸腺検出不能クローンではいずれも検出されなかった。

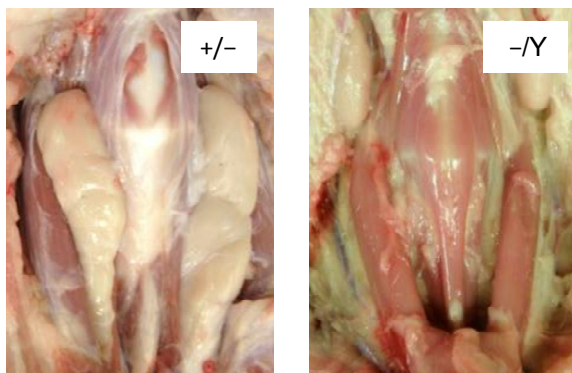
b. 末梢血 (PB) / 脾臓 (Spl) 由来単核細胞のFACS解析

Undetectable thymus: 胸腺検出不能*IL2RG*^{+/-}型クローン、
Hypoplastic thymus: 胸腺低形成*IL2RG*^{+/-}型クローン、
Survived: 長期生存*IL2RG*^{+/-}型クローン、WT: 野生型
野生型、長期生存クローンでは、同レベルのCD4+あるいはCD8+ T細胞が検出されたのに対し、
胸腺低形成クローンでは低レベル、胸腺検出不能クローンではほとんど検出されなかった。

c. 末梢血 (PB) 由来単核細胞のmRNA発現解析

青棒: 野生型、赤棒: 長期生存*IL2RG*^{+/-}型クローン、緑棒: 胸腺検出不能*IL2RG*^{+/-}型クローン
野生型、長期生存クローンでは、同レベルのmRNA発現レベルであったが、胸腺検出不能クローン
ではいずれも低値であった。

a



b

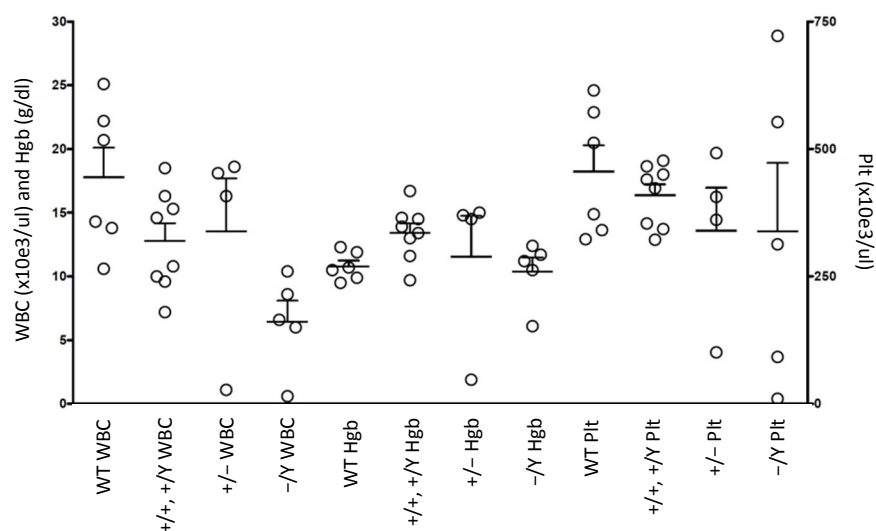


図2-5 IL2RGノックアウト後代における表現型解析 (1)

a. 胸腺の表現型

左 : *IL2RG* +/-型メス、右 : *IL2RG* -/Y型オス

IL2RG -/Yでは胸腺の著しい萎縮が認められたが、*IL2RG* +/-では野生型と差がなかった。

b. 全血球計算値

WT: 非血縁野生型、+/+, +/Y : 同腹野生型、+/- : *IL2RG* +/-型メス、-/Y : *IL2RG* -/Y型オス
IL2RG -/Yでは、総白血球数の低下が見られた。

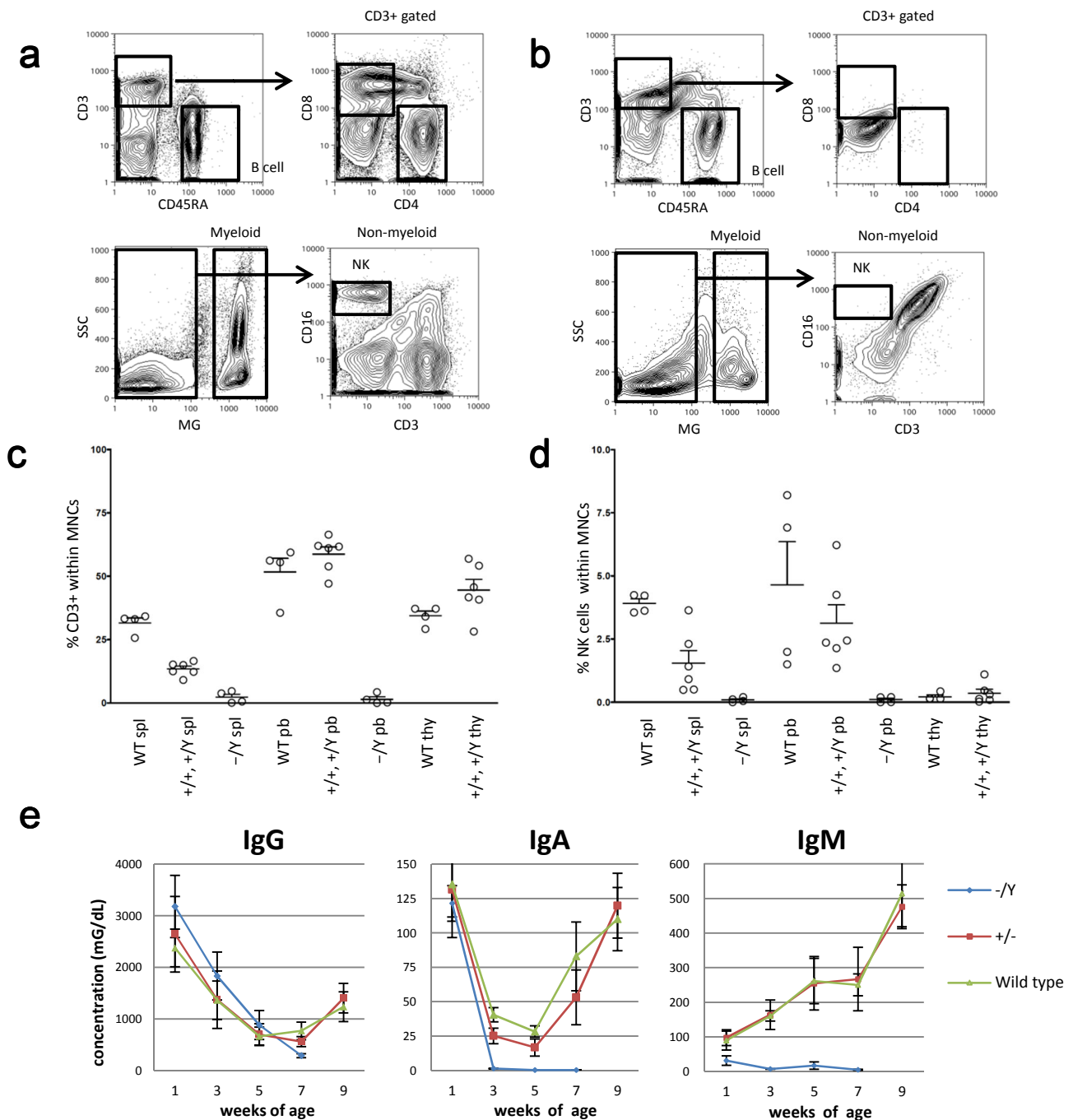


図2-6 *IL2RG*ノックアウト後代における表現型解析 (2)

a, b. T細胞、B細胞、NK細胞の同定

(a) *IL2RG* +/+型メス、(b) *IL2RG* -/Y型オス

IL2RG -/Y (b) では、T細胞 (CD3+CD4+およびCD3+CD8+)・NK細胞 (non-myeloid, CD3-, CD16+) の著減が認められた。B細胞 (CD3-CD45RA+)は残存していた。

c, d. 脾臓 (spl)、末梢血 (pb)、胸腺 (thy) 中のT細胞・NK細胞の定量的比較

WT: 非血縁野生型、+/+, +/Y: 同腹野生型、+/- : *IL2RG* +/-型メス、-/Y : *IL2RG* -/Y型オス

IL2RG -/Yでは、T細胞・NK細胞の著減が認められた。

e. 末梢中の免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM) 濃度の比較

wild type : 同腹野生型、+/- : *IL2RG* +/-型メス、-/Y : *IL2RG* -/Y型オス

IL2RG -/Yでは、Ig濃度上昇が認められなかった。

表2-1 遺伝子ターゲティングの効率

試行回	G418耐性コロニー数	PCR陽性コロニー数 (%) ^a
1	136	1 (0.74)
2	461	2 (0.43)
計	597	3 (0.50)

^a G418耐性コロニー数に対する割合

表2-2 核移植・胚移植によるIL2RG^{+/+}-クローンの作製

ドナー細胞	再構築胚数	移植胚数 (%) ^c	移植レシ ピエント数	妊娠30日に 達した仮親 の数 (%) ^e	回収胎仔数 (%) ^g	分娩した 仮親の数 (%) ^h	産仔数 (%) ⁱ	長期生存 産仔数 (%) ^j
G418耐性 胎仔線維芽細胞 ^a	1,365	761 (55.8) ^d	3	2 (66.7) ^f	9 (1.18)	-	-	-
ノックアウトされた クローン胎仔由来 線維芽細胞 ^b	5,255	2,482 (47.2) ^d	12	-	-	6 (50.0)	31 (1.25)	4 (12.9)

^a 遺伝子導入とG418による選択後に得られたPCR陽性コロニーに由来

^b ノックアウトが確認されたクローン胎仔から分離した線維芽細胞

^c 再構築胚数に対する割合

^d 2日間培養後に2－8細胞期に達した胚をレシピエントに移植した。

^{e,h} 移植レシピエント数に対する割合

^f 妊娠32あるいは39日目に胎仔を回収し、線維芽細胞の分離に供した。

^{g,i} 移植胚数に対する割合

^j 産仔数に対する割合

表2-3 IL2RG^{+/−}クローンの形質（胸腺および生存性）

		死産	生後直死 ^a	生存期間 ^b		
				1-3 週間	4-10 週間	> 1 年
個体数		14	3	6	4	4 ^c
胸腺の 形質	正常	2	1	0	0	—
	萎縮	1	1	2	0	—
	検出不能	11	1	4	4	—
生時体重 ^d		0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2

^a 24時間以内に死亡

^b 重篤な関節炎のため安楽死させた5頭を含む。

^c 末梢血中のT細胞数は正常範囲内であった。

^d kg ± 標準誤差

表2-4 $IL2RG^{+/-}$ クローン由来後代 (F_1) の形質 (胸腺)

	IL2RG 遺伝子型	計					
		オス			メス		
		-/Y	+/Y	+/-	+/-	+/+	+/+
胸腺の 形質	正常	0	11	4	7		22
	萎縮	0	0	0	0		0
	検出不能	14	0	0	0		14
	計	14	11	4 ^a	7		36

^a 他に未解析の4頭を繁殖用に維持している。

第3章 同種骨髄移植による免疫系再構築可能性の検討

第1節 緒言

免疫不全ブタの実用化に向けた大きな目標の一つとして、ヒト造血幹細胞の移植による造血・免疫系のヒト化がある。ヒト特異的な感染症研究やがん研究、幹細胞移植の際の長期安定性や安全性試験などにおけるプラットフォームとしての利用に加え、抗体医薬の開発を見据えたヒト型抗体の大量調製に向けた利用も想定される。免疫不全マウスを用いた造血・免疫系ヒト化の研究はまだ解決すべき課題も多く残されているが、着実に進展しつつある。そこでまず、免疫不全マウスを用いた免疫系ヒト化の現状について、以下に述べる。

1. マウスにおける免疫系ヒト化の現状

免疫系ヒト化においては、T・B細胞機能欠損 [SCID 変異、RAG (Recombination activating gene) ノックアウト]、NK細胞欠損 (IL2RG ノックアウト)、ヒト細胞に対する貪食能低下 [NOD 変異、ヒト SIRP (Signal-regulatory protein) α 導入] などの特徴をもつ高度免疫不全マウスが主に使用されている。具体的には、NOD/SCID/*Il2rg*^{Y or -/-} (NOG、NSG) (Ito et al., 2002; Ishikawa et al., 2005)、BALB/c-*Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{Y or -/-} (BRG) (Traggiai et al., 2004)、hSIRPAtg*Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{Y or -/-} (SRG) (Strowig et al., 2011) といった系統である。加えて、ヒト胸腺組織内での T 細胞を発達させることを目的として、ヒト造血系細胞と胎児肝臓、胎児胸腺を NOD/SCID マウスに移植したモデル (BLT) (Lan et al., 2006) も利用されているが、倫理的問題から日本国内での使用は困難である。

こうした免疫不全マウスを用いても、ヒト造血幹細胞の効率的な生着には不十分であり、残存する自然免疫の減弱と宿主の造血幹細胞の減少を目的に、移植の前に致死量以下の放射線照射が施されるのが一般的である。ブスルファンのような薬剤を用いた処置によっても同様な効果を得ることができる (Hayakawa et al., 2009)。また、成体期より新生仔期に移植を行うことがヒト細胞の生着率が高いことが示されている (Brehm et al., 2010)。これは、宿主の自然免疫系が未熟なため生着率が上昇することや、本来の造血・リンパ系の発達時期に合わせて移植を行うことにより分化効率が高まった結果であると考えられる。

以上のような手法を駆使することにより、末梢レベルで 30–60% のヒト CD45⁺細胞の生

着が得られ、6 から 9 ヶ月間にわたり維持することが可能となっている (Ito et al., 2002; Traggiai et al., 2004; Ishikawa et al., 2005)。また、T・B・NK 細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、赤血球、血小板といったほぼ全ての造血系細胞をある程度は分化させることが可能になっている (Ito et al., 2002; Traggiai et al., 2004; Ishikawa et al., 2005)。しかしながら、これらの細胞は完全にヒトの生理的状态を再現するには至っておらず、以下に述べるような個々の細胞種に特有の問題点が少なからず残されている。なお、マウスにおける造血・免疫系のヒト化に関しては、Rongvaux らの総説 (Rongvaux et al., 2013) に詳細に記述されている。

1-1. T 細胞

T 細胞は幹細胞移植後約 3 から 6 ヶ月にかけて安定して存在し、胸腺内で正常に分化し、末梢でも CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、制御性 T 細胞の存在割合はヒトの生理的な値と同等になる (Ito et al., 2002; Gimeno et al., 2004; Ishikawa et al., 2005)。しかし、その後ナイーブ T 細胞の供給が減少し、エフェクター/セントラルメモリー細胞の割合が上昇する。機能的には、一部 CD8⁺T 細胞の細胞障害活性が認められているが、抗原刺激に対する応答は限定的である。マウス MHC とヒト HLA (Human leukocyte antigen) の違いが原因の 1 つと考えられ、実際 HLA の導入により改善が認められる (Shultz et al., 2010; Danner et al., 2011)。その他にも、T 細胞の発達や十全な機能発揮のためには、マウスマクロファージによる貪食の抑制による造血系幹細胞の維持、ヒト型サイトカイン (IL-7、IL-15) による支持、MHC のヒト化、マウス樹状細胞の除去によるヒト樹状細胞とナイーブ T 細胞の相互作用の促進、リンパ節形成の促進、といった点が課題とされている。

1-2. B 細胞

ヒト B 細胞はヒト化マウスにおいて幹細胞移植 1 ヶ月後から検出され、3 ヶ月程度まで増殖する。骨髄中では正常な前駆細胞が検出されるが、末梢では CD5⁺の細胞が多数を占め、機能が不十分であることが報告されている。抗原特異的な免疫反応は大部分が IgM 型であり、IgM レベルがヒトと同等に達するのに対し、IgG は 1/100 程度にとどまる (Traggiai et al., 2004; Ishikawa et al., 2005)。未熟/移行段階とされる B1 細胞が多数を占め、成熟した B2 細胞まで発生が進んでいないと考えられており、ヒト型の IL-7 や BAFF (B cell activating factor belonging to TNF family) といったサイトカインの導入

により改善する可能性がある。一方、BLT マウスやヒト MHC クラス II を発現するマウスでは、抗原特異的 IgG の産生が見られることから、ヒト T 細胞の機能性が高まり、T-B 相互作用がうまく進むようになることも重要と考えられている。さらに最近では、ヒト T 細胞の定着が進んだ移植後 5 から 6 ヶ月以降において、成熟した B 細胞の増加と IgG レベルの上昇が示され、リンパ節における T-B 相互作用の重要性が改めて示唆されている (Lang et al., 2013)。

1-3. NK 細胞

免疫系ヒト化マウスにおいて、NK 細胞は検出されるものの、ヒトに比べその数は少なく、最終分化も不十分である。KIR (Killer cell immunoglobulin-like receptor) を発現する細胞が少ないため、IFN- γ の産生や細胞障害活性が減弱している。マウスマクロファージの貪食能の制御やヒト型 IL-15/IL-15R α の供給により、NK 細胞の増加や機能の改善が認められている (Huntington et al., 2009; Pek et al., 2011)。加えて、完全な NK 細胞の成熟には、ヒト MHC クラス I をマウスで発現させ、NK 細胞上のヒト KIR とヒト MHC クラス I の相互作用による「ライセンスング」の誘導が必要となる可能性が考えられている (Rongvaux et al., 2013)。

1-4. ミエロイド系細胞

免疫系ヒト化マウスにおいて、ヒトのミエロイド細胞が検出され、機能的であることが示されている (Tanaka et al., 2012)。しかし、その存在割合は、通常のヒト (60–70%) に比べかなり低く、ヒト型全白血球の 5–10% 以下にとどまっている (Ito et al., 2002; Traggiai et al., 2004; Ishikawa et al., 2005; Strowig et al., 2011)。効率的なヒトミエロイド系細胞の分化に向け、SCF (Stem cell factor)、GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)、IL-3、M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)、TPO (Thrombopoietin) などの導入やヒト型への置換が行われ、各々一定の効果が得られている (Nicolini et al., 2004; Rathinam et al., 2011; Rongvaux et al., 2011; Willinger et al., 2011)。

1-5. 樹状細胞

免疫系ヒト化マウスにおいて、骨髄系樹状細胞、形質細胞様樹状細胞ともに、ヒトの生理的レベル同様の割合で検出することができ、機能的にも大きな問題はない (Traggiai

et al., 2004; Ishikawa et al., 2007; Tanaka et al., 2012)。ヒト型サイトカインの導入は必要ではなく、樹状細胞の発達に最も重要なサイトカインである Flt3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) が十分な交差反応性を持っていると考えられる。ただし、実際の抗原提示の際にはマウス樹状細胞と競合するため、ヒト T 細胞とヒト樹状細胞の相互作用の促進に向けては、マウス樹状細胞を低減・抹消することが有用と考えられている (Rongvaux et al., 2013)。

1-6. 赤血球および血小板

免疫系ヒト化マウスの骨髄中ではヒト赤血球系細胞の分化が認められるが、末梢血中のヒト赤血球はほとんど検出されない (Hu et al., 2011)。このマウスでは、clodronate による食細胞の除去により末梢血中のヒト赤血球の割合が上昇すること (Hu et al., 2011)、さらにヒト SIRPα 導入マウスで、移植したヒト赤血球の生存が促進されること (Strowig et al., 2011) から、主として食作用による末梢での破壊がその原因となっていると考えられる。また、血小板の元となるヒト巨核球も骨髄中には存在するが、末梢血中のヒト血小板はほとんど検出されない (Hu and Yang, 2012)。clodronate による食細胞の除去により、末梢血中ヒト血小板の増加が認められること (Hu and Yang, 2012) から、血小板の欠損も主として食作用による末梢での破壊によるものと考えられている。

2. 同種骨髄移植による免疫系再構築

本研究で開発した免疫不全ブタを用いて免疫系ヒト化ブタ開発を目指す上で、異種間の移植よりハードルの低い同種間の移植による免疫系再構築を試行することは、原理実証実験として有用である。同種間の骨髄移植による SCID 個体の免疫系再構築の試みとして、ヒトの X-SCID を含む原発性免疫不全症の治療として行われる骨髄移植や X-SCID イヌを用いた同種骨髄移植に関する知見が以下のように報告されている。

2-1. ヒト X-SCID および JAK3 欠損

ヒトでは様々な原発性免疫不全症が存在し、根治のためには骨髄移植が不可欠である。ここでは、X-SCID および病因の分子的基盤を共有する JAK3 欠損を中心にヒト同種骨髄移植による免疫系再構築に関する知見を述べる。

ヒト同種骨髄移植後の免疫系再構築と長期予後に影響する要因として、ドナーと宿主の HLA 型、移植の実施年齢、前処置および移植片対宿主病 (Graft versus host disease :

GVHD) 予防 (免疫抑制) の有無などが検討されている。ドナーとしては、HLA 型の一致した近親者が最善であるが、利用できない場合が多く、ハプロ一致の両親など近縁者あるいは HLA 型の一致した非血縁者が利用される。HLA 一致の近親者からの移植の場合、前処置は必要なく、B 細胞は宿主由来のままであることが多いものの、近年では 90% 以上の長期生存率が得られている。一方、HLA ミスマッチの場合に長期生存率は 50–80%にとどまり、生涯免疫グロブリンの補充が必要となるケースも多い。また、ドナーの T 細胞が宿主に対して免疫反応を起こすために生じる GVHD も問題となるが、移植前にドナーの骨髄細胞から効率よく T 細胞を除去することにより、致命的な GVHD は予防することが可能となっている。移植の時期は感染症のリスクを避けるためにもなるべく早い方が良くとされており、生後 3.5 ヶ月以内に移植を行った場合の生存率が高く、臨床的な問題も発生しにくいことが示されている (Railey et al., 2009)。また、生後 28 日以内での移植例ではその後の移植に比べ、移植後 3 年間にわたる、T 細胞数の増加と機能の亢進が認められている (Myers et al., 2002)。

T 細胞系はほとんど全てのケースで移植後 1 年以内に回復が認められる (Buckley et al., 1986; 1999)。HLA 一致近親者から T 細胞除去を行わずに移植を行う場合、2 週間程度で成熟 T 細胞が末梢に現れるが、これは移植細胞中の T 細胞の増殖によるものである。通常 3 から 4 ヶ月後に認められる胸腺依存的な T 細胞形成の結果、ナイーブ T 細胞の数だけでなく、T 細胞受容体のレパトアの多様性も増加する (Sarzotti-Kelsoe et al., 2009)。加えて、胸腺サイズの正常化も認められる (Myers et al., 2002)。

T 細胞と異なり、B 細胞の機能獲得は一般に効率が低く、SCID の原因遺伝子型による違いや前処置の効果など多くの検討すべき課題が残されている。可能な場合であっても、全ての Ig アイソタイプを含む B 細胞の完全な再構築は CD4⁺T 細胞の再生に依存し、1 から 2 年かかる (Zanotti et al., 2012)。ヒト X-SCID のような B⁺SCID では、ホストの B 細胞が機能的な欠陥をもつため、B 細胞キメリズムの成立が機能回復に必要である。そのため、前処置を行うことで改善することが期待され、実際明瞭な効果を示したとする報告もある (Friedrich et al., 2007) が、前処置を行っても免疫グロブリン補充が必要となる例も少なくない (Buckley, 2010)。また、前処置を行わなくても約 1/3 で B 細胞キメリズムが得られたとする報告もある (Sarzotti-Kelsoe et al., 2009)。最近、骨髄移植後の B 細胞機能について、SCID の原因遺伝子ごとに比較した報告が出された (Buckley et al., 2013)。これによると、X-SCID や JAK3 欠損患者の骨髄移植後の B 細胞の特徴として、未熟な CD10⁺B 細胞が多く、CD27⁺メモリー B 細胞が少ないことや、B 細胞受容体のレ

パトアは正常に近く、必ずしも T 細胞受容体のレパトアには依存しないといったことが示されている。

NK 細胞については、移植後 1 ヶ月以内に機能の回復が認められる (Zanotti et al., 2012) とされているが、IL2RG 欠損の場合、健常者よりは低値にとどまる (Buckley et al., 1999)。ただし、このことがその後の生存性に影響することを示す報告はない。

IL2RG 欠損あるいは JAK3 欠損の場合、T 細胞に加え、NK 細胞も欠いているため、拒絶反応の回避という点での前処置は必要ではない。しかし、前処置を行わないと T および NK 細胞はドナー由来で、他の白血球系細胞はホスト由来という、分割キメリズムを呈することが多いため (Haddad et al., 1998)、B 細胞機能の再構築を目的に前処置が行われる場合がある。ただし前処置には、移植前後の免疫能の低下による感染リスクの増加や成長遅滞や妊孕性の低下、その他臓器の機能障害などの晩発的な副作用といった問題点があり、臨床的には慎重な判断が必要とされる。こうしたリスクを軽減するため、近年では、従来行われてきた骨髄破壊的前処置 (ブスルファン+シクロホスファミド) の代わりに、骨髄非破壊的前処置 (フルダラビン+メルファラン、フルダラビン+ブスルファン) が試みられるようになり、好成績が報告されている (Rao et al., 2005; Kumaki et al., 2013)。

2-2. X-SCID イヌに対する同種骨髄移植

X-SCID イヌに対する同種移植として、骨髄細胞を移植した例 (Felsburg et al., 1997; Hartnett et al., 1999; Vernau et al., 2007) と造血幹細胞を多く含むと考えられる CD34⁺細胞を移植した例 (Hartnett et al., 2002; Kennedy et al., 2009) が報告されている。いずれも適合性のあるドナーを用い前処置は施されていない。骨髄細胞を移植した場合は、リンパ球数は移植後 2 ヶ月で正常と同等になった。移植前には T 細胞の著減と B 細胞の増加が認められたが、移植後 2 ヶ月までに正常化し T 細胞が 90%以上、B 細胞が 10%以下となった。T 細胞のうちの 90%以上が、胸腺から移出したナイーブ T 細胞と考えられる CD45RA⁺の細胞であった。また、T 細胞受容体のレパトアは野生型と同様な多様性を獲得するが、移植後 2 から 3 年以降では減少傾向を示した (Vernau et al., 2007)。一方、IgG レベルは移植後 4-6 ヶ月で正常化した。抗原刺激後に産生される Ig は、XSCID イヌではクラススイッチが障害されているため IgM がほとんどであるが、移植後には野生型と同様に、主として IgG になっていた。キメリズム解析の結果、T 細胞は実質的に 100%がドナー由来となっているのに対し、B 細胞は 20-50%がドナー由来であった。

また、単球はすべてがレシピエント由来のままであった。これは各細胞種の発達における IL2RG の必要性を反映したものと考えられる。CD34⁺細胞を移植した例でもほぼ同様な結果を示したが、B 細胞のキメリズムはさらに低く最大で 18%、6 頭中 4 頭が 4%以下にとどまっていた。またこの例では、移植後 4 ヶ月後で胸腺構造が正常化していることも確認されている (Kennedy et al., 2009)

以上の知見をふまえ、本章においては、免疫系ヒト化ブタ作製に向けた原理実証実験として、同種骨髄移植により、IL2RG ノックアウトブタの免疫系を再構築できるかどうかを検討することにした。骨髄非破壊的前処置の実施区と非実施区を設けた上で、同種骨髄移植による免疫系細胞再構築の過程を経時的に観察するとともに、キメリズム解析を行い、免疫系細胞の遺伝的由来を明らかにすることを目指した。

第2節 材料と方法

骨髓非破壊的前処置

生後3日目より、フルダラビン（フルダラ錠；ジェンザイム・ジャパン、東京）およびブスルファン（マブリン散 1%；大原薬品工業、甲賀）により、前処置を行った。フルダラビンは、30 mg/m²を day -7 から day -2 にかけて6回、ブスルファンは、4 mg/kg を day -3 と day -2 の2回、いずれもカプセルを用いて経口投与した。全血球計算は、赤血球（RBC）、白血球（WBC）、ヘマトクリット値（HCT）、ヘモグロビン濃度（Hgb）、血小板数（PLC）を対象として行い、day -7、+7、+14 に実施した。なお、day +1 を骨髓移植の実施日と想定して示している。

同種骨髓移植

同種骨髓移植は、生後11から12日の *IL2RG*^{-/-} オスをレシピエントとして、(1) 前処置を実施せず、同腹野生型 (*IL2RG*^{+/+}) をドナーとして用いた区 (NS)、(2) 前処置を実施し、同腹野生型をドナーとして用いた区 (CS)、および (3) 前処置を実施し、血縁関係のない EGFP 発現ブタ (Watanabe et al., 2005) をドナーとして用いた区 (CG)、の3区を設定し (表 3-1)、以下のように実施した。

骨髓は大腿骨を切開し、かき出すようにして回収した。細切した後、5 µg/ml DNase (Sigma) を添加した PBS (-) 中に入れ、30 分間 4°C で攪拌した。骨髓細胞は、濾過した後、遠心分離して回収し、PBS (-) 中に懸濁させた。

得られた骨髓細胞から、磁気細胞分離装置 (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて、T 細胞の除去を行った。骨髓細胞を PE ラベルされた anti-pig CD3e (Beckman Coulter)、anti-pig CD4a、anti-pig CD8a (BD Pharmingen) と反応させた後、anti-PE マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) と結合させた。マイクロビーズに結合した細胞を MACS によって回収し、回収されなかった細胞を以下の移植に用いた。

2-3 x 10⁹ 個の細胞を 50 ml の PBS (-) に懸濁し、*IL2RG*^{-/-} オスに、麻酔下で経静脈的に移植した。移植後、2 から 3 週間ごとに末梢血を採取し、第2章に記した方法により、T・B・NK 細胞の検出および血中免疫グロブリン濃度の測定を行った。

マイクロサテライトマーカーを用いたブタ遺伝子型解析

骨髓移植後の免疫系細胞の由来の判定には、マイクロサテライトマーカーによる個体識

別法を用いた。10 種類 (S0316、SW1550、SW2429、SW1027、ACR、SW24、SW443、SWR1921、SW1263、SW1328) あるいは、6 種類 (SW841、SW1475、S0214、S0107、S0175、SWR1367) のマイクロサテライト部位を各々同時に検出することが可能な蛍光ラベルされたプライマーセットを用いて、2 種類の多重 PCR を行った。増幅後、ABI 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて、キャピラリー電気泳動を行い、その結果を Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystems) により解析した。

第3節 結果

骨髓非破壊的前処置

ヒト SCID 患者の骨髓移植において免疫系の再構築に有効とされている、骨髓非破壊的前処置の影響を調べた。フルダラビンおよびブスルファンの経口投与により、白血球数と血小板数の有意な減少が認められた (表 3-2)。しかしながら、処置を行った 6 頭のうち 3 頭は、薬剤による毒性が原因で、投与後 2 週間以内に死亡した。

同種骨髓移植後の免疫系細胞の検出

表 3-1 に示したように、計 5 頭の *IL2RG*^{-/-} オスに対し、同腹の子ブタ (#603、#602) あるいは全身的に EGFP を発現する子ブタ (#184) から回収し、T 細胞を除去した骨髓細胞を移植した。そのうち CS 区の 1 頭 (#115) は、移植後 15 日で前処置による副作用と思われる症状により死亡した。また、NS 区の 1 頭 (#605) は、移植後 140 日で肺炎と思われる症状により死亡した。その他の 3 頭は、移植後 2 年以上経過した現在も生存している。

同種骨髓移植後 12 週における *IL2RG*^{-/-} オスの末梢血を用い、FACS により免疫系細胞の各サブセットの検出を試みた。その結果、ミエロイド系細胞に加え、非移植の *IL2RG*^{-/-} オスには存在しないナイーブ T 細胞 (CD3+CD45RA⁺) および、メモリー T 細胞 (CD3+CD45RA⁻) を検出することができた (図 3-1)。また、B 細胞 (CD45RA⁺CD3⁻) と NK 細胞 (MonoGra⁻CD16⁺) についても、相当数検出することができた (図 3-1)。これを踏まえ、同種骨髓移植後の免疫系再構築の過程を明らかにするため、T 細胞、B 細胞およびミエロイド系細胞の経時的な解析を行った。

同種骨髓移植後の免疫系細胞の経時的解析

末梢血中の顆粒球や単球はすべての個体で、一貫して野生型と同等なレベルで存在していた (図 3-2c, d, g, h)。T 細胞は死亡した #115 を除くすべての個体で、移植後 6 週目から急速に増加し、12 週 (3 ヶ月) までには、ほぼ正常値に回復し、その後も安定的に存在するという共通の動態を示した (図 3-2a, e)。

一方、B 細胞については、前処置を行わなかった場合、一貫して、野生型より低値であるが、検出可能なレベルを維持していた (図 3-2b)。それに対し、前処置を行った場合、移植当初に高値を示すが、その後野生型以下のレベルまで減少し、前処置を行わなかった場合と同等になった (図 3-2f)。中でも、#113 (CS 区) は移植後 16 週目まで野生型より明らか

に高い値を示し、その後徐々に減少するという、例外的な挙動を示した(図 3-2f)。移植当初の高値は、前処置により白血球数が減少したレシピエント中に T 細胞を除去した (B 細胞が相対的に増加した) 骨髄細胞を移植したためと考えられる。また、この解析過程において、移植を行わなかった IL2RG ノックアウトブタでは、出生直後は存在していた B 細胞がその後ほぼ消失することも明らかとなった (図 3-2b, f)。

NK 細胞については、経時的解析を行わなかったが、移植後 12 週 (図 3-1) に加え 39 週目においても、野生型よりは少ないものの、相当数存在することが確認できた。

同種骨髄移植後の免疫グロブリンの経時的解析

次に、B 細胞の機能性を評価するため、血中免疫グロブリン (IgG、IgA、IgM) の経時的変化を解析した (図 3-3)。移植後 140 日で死亡した#605 (NS 区) では各 Ig ともほとんど検出されず、B 細胞機能の再構築がうまくいかなかったと考えられる。他の長期生存個体においては、当初は変動が大きい移植後 16 週目以降で、ほぼ安定した値となった。#610 (NS 区) と#113 (CS 区) では、IgM は野生型よりやや低値を示すが、IgG、IgA は野生型と同様のレベルに達していた。一方、EGFP 発現ブタの骨髄細胞を移植した#122 (CG 区) では、IgG は野生型と同等となるのに対し、IgA、IgM は検出可能であるが、かなり低い値であった。

免疫系細胞のキメリズム解析

続いて、長期生存したレシピエントの末梢血中に存在する免疫系細胞のキメリズムを明らかにするために、マイクロサテライトマーカーを用いた個体識別を行った (図 3-4)。具体的には、各レシピエントの末梢血中の全有核細胞、ソーティングにより回収した T 細胞、B 細胞、NK 細胞、各々からゲノム DNA を抽出し、ドナーおよびレシピエントの DNA と比較することにより、免疫系細胞の遺伝的由来を調べた。合わせて、EGFP 発現ブタの骨髄細胞を移植した#122 においては、EGFP の蛍光を検出することによるキメリズム解析を行った。その結果、すべての個体において、T・B・NK 細胞については、ほぼ全てがドナー由来であることが明らかとなった (図 3-4, 3-2e, f)。

全有核細胞については、#610 (CS 区) と#122 (CG 区) では、ドナーとレシピエントの混合キメリズムを示した (図 3-4) のに加え、#122 で EGFP を発現する顆粒球や単球がほとんど検出されなかったこと (図 3-2g, h) から、ミエロイド系細胞はほとんど置換されていないと考えられる。一方、#113 (CS 区) は全有核細胞についてもほぼ全てがドナー由来の

細胞に置換されていることが明らかとなった（図 3-4）。

第4節 考察

本章では、免疫系ヒト化ブタ開発へ向けた原理実証実験として同種骨髄移植により IL2RG ノックアウトブタの免疫系を再構築することが可能であるかどうかを検証することを目的とし、骨髄細胞の移植を行った後の IL2RG ノックアウトブタにおける免疫系細胞の動態の解析を行った。T 細胞については、移植後間もなく死亡した 1 頭 (#115) を除き、移植後約 6 週間で明瞭な増加を認め、12 週 (3 ヶ月) までには、ほぼ正常値に回復していた。移植後 12 週で、CD45RA⁺のナイーブ T 細胞と考えられる細胞の出現が確認されており、この時期までに胸腺依存的な T 細胞分化が起こっていると考えられる。移植後約 3 ヶ月という時期は、イヌの約 2 ヶ月とヒトの約 4 ヶ月の中間にあたり、各動物種における未分化前駆細胞から T 細胞への分化に必要とされる時間を反映したものと考えられる。末梢血中の T 細胞は、前処置の有無に関わらず、3 ヶ月以降も安定して存在しており、ブタにおいても同種骨髄移植による T 細胞の再構築は比較的容易に達成しうることが明らかとなった。ただし、T 細胞レセプターレパトアの多様性や胸腺構造の回復の程度、数年という長期間での安定性など、詳細な解析が今後の課題として残されている。

B 細胞の再構築は他の動物種と同様に困難であり、初期に高値を示した一例 (#113) を除き、一貫して低値を示していた。ただし、長期生存の認められた 3 頭 (#610、#113、#122) については、血中 IgG が正常レベルまで回復しており、機能的に正常な B 細胞が出現していることは間違いないと考えられる。移植後 140 日で死亡した #605 は B 細胞が最も少なかったうえ、IgM、IgA、IgG とともにほとんど認められず、B 細胞機能の回復には至らなかったと考えられる。この #605 は骨髄非破壊的前処置を行わなかった個体 (NS 区) であることから、例数が不十分ではあるが、B 細胞の再構築に促進的効果を持つ可能性が考えられる。ただし、#610 も前処置を行っていない固体 (NS 区) であるため、前処置が必須ではないことも確かである。

また、この解析過程において、移植を行わなかった IL2RG ノックアウトブタにおいて、ヒトやイヌとは異なり、出生直後は存在していた B 細胞がその後ほぼ消失することも明らかとなった。胎仔期における肝臓由来の B 細胞分化は正常に進行するが、造血幹細胞が骨髄に移行した後の B 細胞分化が障害されている可能性が考えられる。第 2 章で述べたように血中 IgM が出現しないことと考え合わせると、IL2RG ノックアウトブタにおいて出生直後に検出される B 細胞は、ヒトやイヌの X-SCID と比べ、未熟な段階にとどまっている可能性が考えられる。また、ヒツジやウシで顕著であるが、家畜においては B 細胞の発生の

場として回腸パイエル板が重要とされていることから、IL2RG ノックアウトブタが回腸パイエル板を含む腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue : GALT) をほとんど欠損していること (データは示していない) が原因となっている可能性もある。しかし、骨髄移植後に B 細胞機能の回復が認められることから、必要条件とは言えないと考えられる。ただし、GALT の発達を誘導するリンパ組織誘導細胞 [LTi cells (Lymphoid tissue inducer cells)] は血球系細胞から分化すること (Randall et al, 2008) から、骨髄移植後に腸管関連リンパ組織が (部分的に) 発生している可能性も想定され、今後の検討が必要である。

NK 細胞については経時的解析を行わなかったが、移植後 12 週および 39 週において、末梢血中に NK 細胞が存在していることが明らかとなり、ヒトの場合と同様、移植後速やかに NK 細胞の回復が起こり安定的に維持されるものと考えられる。

さらに、マイクロサテライトマーカーによる個体識別や EGFP の蛍光検出 (EGFP 遺伝子導入ブタを骨髄細胞のドナーとして用いた #122 の場合) により、すべてのレシピエントにおいて、T・B・NK 細胞ともほぼ全てがドナー由来の細胞に置換されていることが明らかとなった。T 細胞や NK 細胞は他の動物種でも見られるとおりであるが、B 細胞がほぼ全てドナー由来となっているのは、レシピエント由来の B 細胞が安定的に存在しうる X-SCID のヒトやイヌでは認められない現象である。これは、IL2RG ノックアウトブタにおいて、生後は B 細胞が安定して存在することができないことを改めて裏付けるものである。この特徴はヒト X-SCID の疾患モデルとして利用する際には問題となる可能性があるが、免疫系細胞をヒト型に置換することを意図する場合には有用であると考えられる。

一方、骨髄系細胞を含む全有核細胞のキメリズムについてはレシピエント間での差異が認められた。#122 と #610 についてはドナー型とレシピエント型の混合キメリズムを示したことから、単球や顆粒球はレシピエント起源のものが保持され、ドナー細胞からの分化はあったとしても限定的であると考えられる。これは、#122 の顆粒球、単球中に GFP 陽性の細胞がほぼ検出されなかったことから明らかである。一方、#113 は全有核細胞についてもほぼ全てがドナー由来の細胞に置換されていることが明らかとなった。このことは、IL2RG ノックアウトブタで欠損しているリンパ球以外の単球や顆粒球もドナー由来となっていることを示し、移植した骨髄細胞中の造血幹細胞がレシピエント体内に生着し機能していることを強く示唆するものである。#113 は前処置を施した個体であり、造血幹細胞の生着には前処置が必要となる可能性がある。しかし、同様に前処置を行った #122 ではドナー由来の骨髄系細胞が検出されなかったことや、ヒトの例からも明らかであるが、前処置

の効果は全か無かといった絶対的なものではない。また、6 頭中 3 頭で 2 週間以内での死亡が発生したように、副作用が大きく、投与条件や効果とのバランスなど、今後詳細に検討する必要がある。

以上のように、骨髓細胞の移植により免疫系を再構築できるようになったことは、免疫系ヒト化の原理実証実験として重要な意味を持つだけでなく、ブタ免疫系の発生・分化の研究に有用なツールを提供するものでもある。まず第 1 に、さまざまな細胞分画をラベルした上で移植することにより、その細胞分画の発生や増殖の過程を追跡することが可能となる。マウスやヒトと比べるとまだ十分な知見が得られていない、ブタ造血系細胞の分化系譜に関する研究において、こうした手法が有用である。また、マウスやヒトと異なるブタの特徴として、末梢血中に $\gamma\delta$ T 細胞が高頻度に存在することや CD4CD8-DP の $\alpha\beta$ T 細胞が存在することがあげられる (Chase and Lunney, 2012) が、これらの細胞の発生や増殖の過程も明らかにすることができる可能性がある。第 2 に、IL2RG ノックアウトブタが腸管関連リンパ組織 (GALT) をほぼ欠損していることから、これらの組織の発達過程を調べるモデルとして利用できる可能性がある。ブタを含む家畜においては、ヒトやマウスに比べ、GALT が著しく発達しており、回腸パイエル板が連続状に存在するなどの特徴がある (保田, 2009; Chase and Lunney, 2012)。また、ブタのリンパ節は他の動物種と異なり、髄質が外側、皮質が内側に位置していることが知られており (Chase and Lunney, 2012)、発生学的にも興味深い。マウスでは、GALT は、器官原基に存在する間質細胞 [LTo cells (Lymphoid tissue organizer cells)] と造血系由来のリンパ組織誘導細胞 (LTi cells) の直接的な相互作用によって形成されることが示されている (Randall et al., 2008)。リンパ組織誘導細胞は IL-7 受容体陽性の細胞であり、その発生に IL2RG を必要とすると考えられることと、今回作製した IL2RG ノックアウトブタが GALT をほぼ欠損していたことを考え合わせると、ブタにおいても基本的には同様な機構が存在すると考えられる。その場合、IL2RG ノックアウトブタへ骨髓細胞を移植することによって GALT の発生が誘導される可能性が高く、このモデルを用いることにより、ブタの LTi 細胞の探索・同定やその発生機構の解析、さらに LTi 細胞の原基への集積や LTo 細胞との相互作用の過程の解析などが可能になることが期待できる。

本章においては、同種骨髓移植により IL2RG ノックアウトブタの免疫系再構築が可能であることを示すことができた。これを発展させ、免疫系ヒト化ブタの開発へとつなげていくためには、さらなる遺伝子改変による高度免疫不全ブタ系統の樹立とともに、移植前処置や移植細胞、移植時期など効率的な生着や免疫系細胞の分化に向けた細胞移植条件の最

適化を進めていく必要がある。この際、胸腺の存在様態が T 細胞の分化とその後の免疫系再構築に大きな影響を与える要因の 1 つであると考えられることから、次章では、ブタ胎仔胸腺発達過程の解析を行い、移植条件最適化へ向けた基盤整備の一環とすることを目指した。

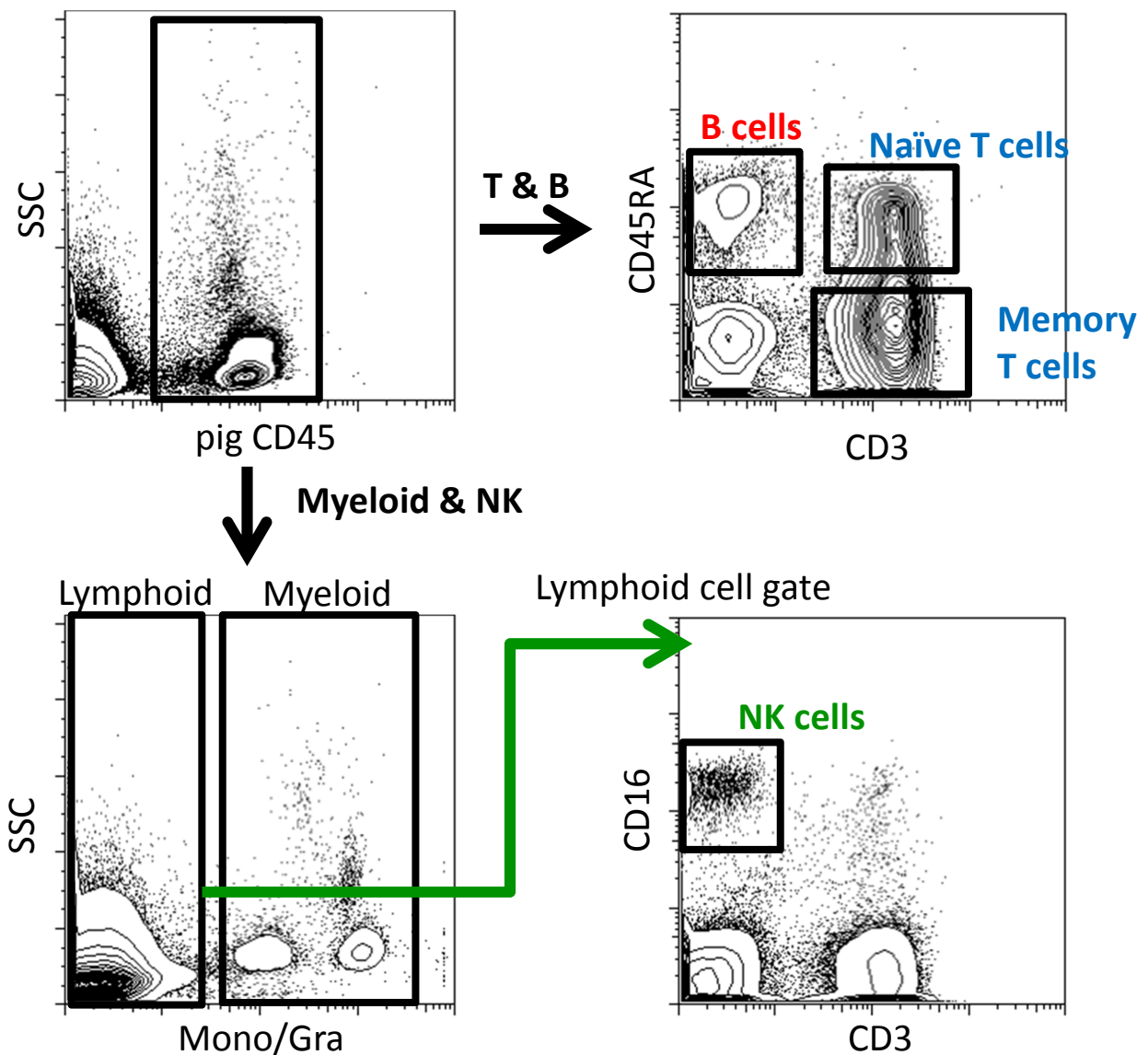


図3-1 同種骨髄移植による免疫系細胞の再構築

骨髄移植後12週における $IL2RG^{-}/Y$ 型オス (#610) の末梢血を用い、FACSにより免疫系細胞の各サブセットの検出を行った。

(上段) B細胞 (CD45RA+CD3-)、ナイーブT細胞 (CD3+CD45RA+)、メモリーT細胞 (CD3+CD45RA-) の検出

(下段) NK細胞 (MonoGra- CD16+) の検出

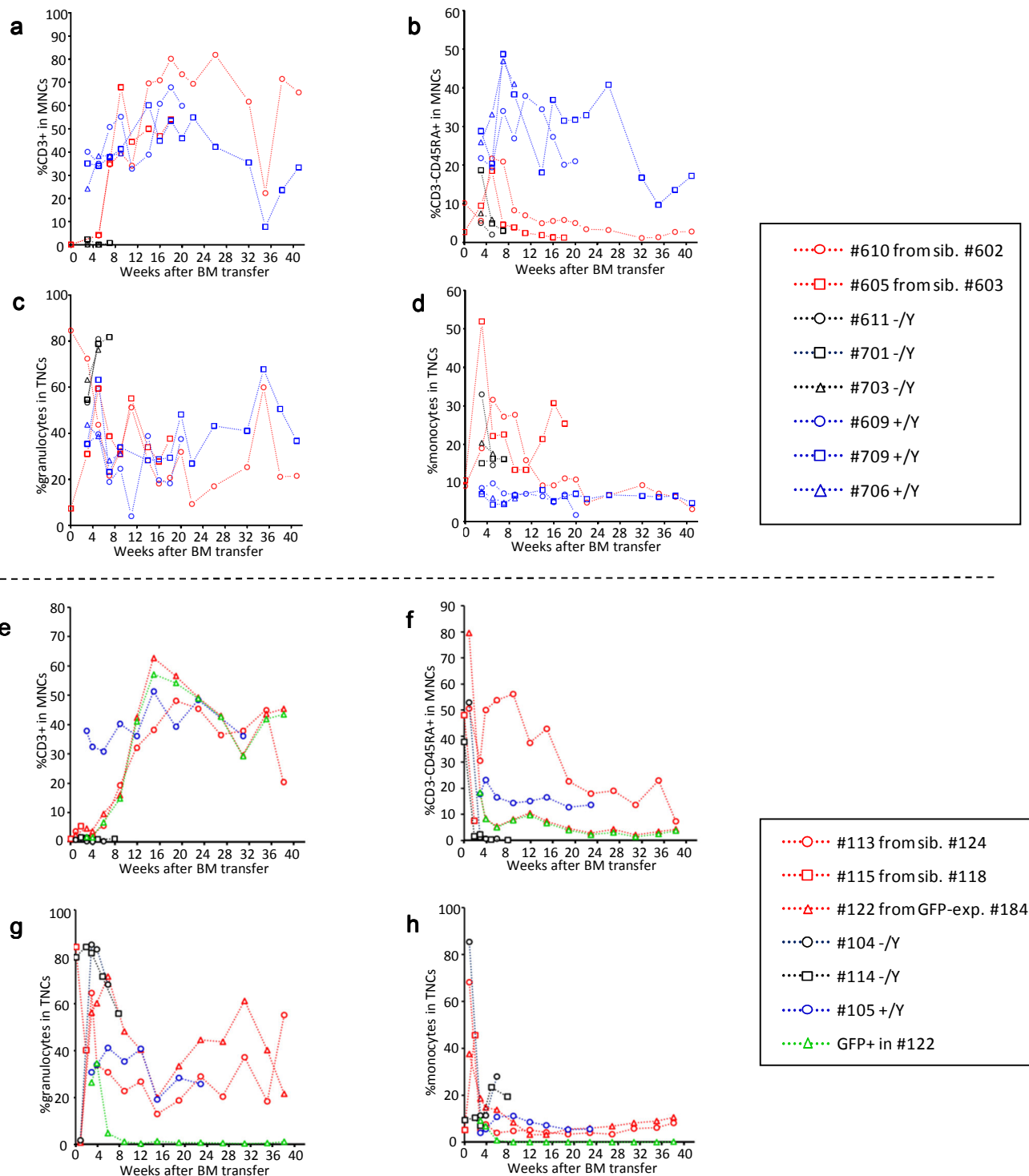


図3-2 骨髄移植後の各白血球サブセットの経時的変化

IL2RG $-/Y$ 型オスに骨髄移植後の末梢血中の各白血球サブセットをFACSにより定量し、同一週齢の変異型および野生型との比較を行った。

赤：*IL2RG* $-/Y$ 型 (変異型) オス+骨髄移植、黒：*IL2RG* $-/Y$ 型 オス、青：*IL2RG* $+/Y$ 型 (野生型) オス、緑：GFP陽性

a-d. 前処置なしの骨髄移植 (#605, #610) の結果

e-h. 前処置ありの骨髄移植 (#105, #113, #122) の結果

a,e. T細胞 (CD3+), b,f. B細胞 (CD45RA+CD3-), c,g. 顆粒球, d,h. 単球

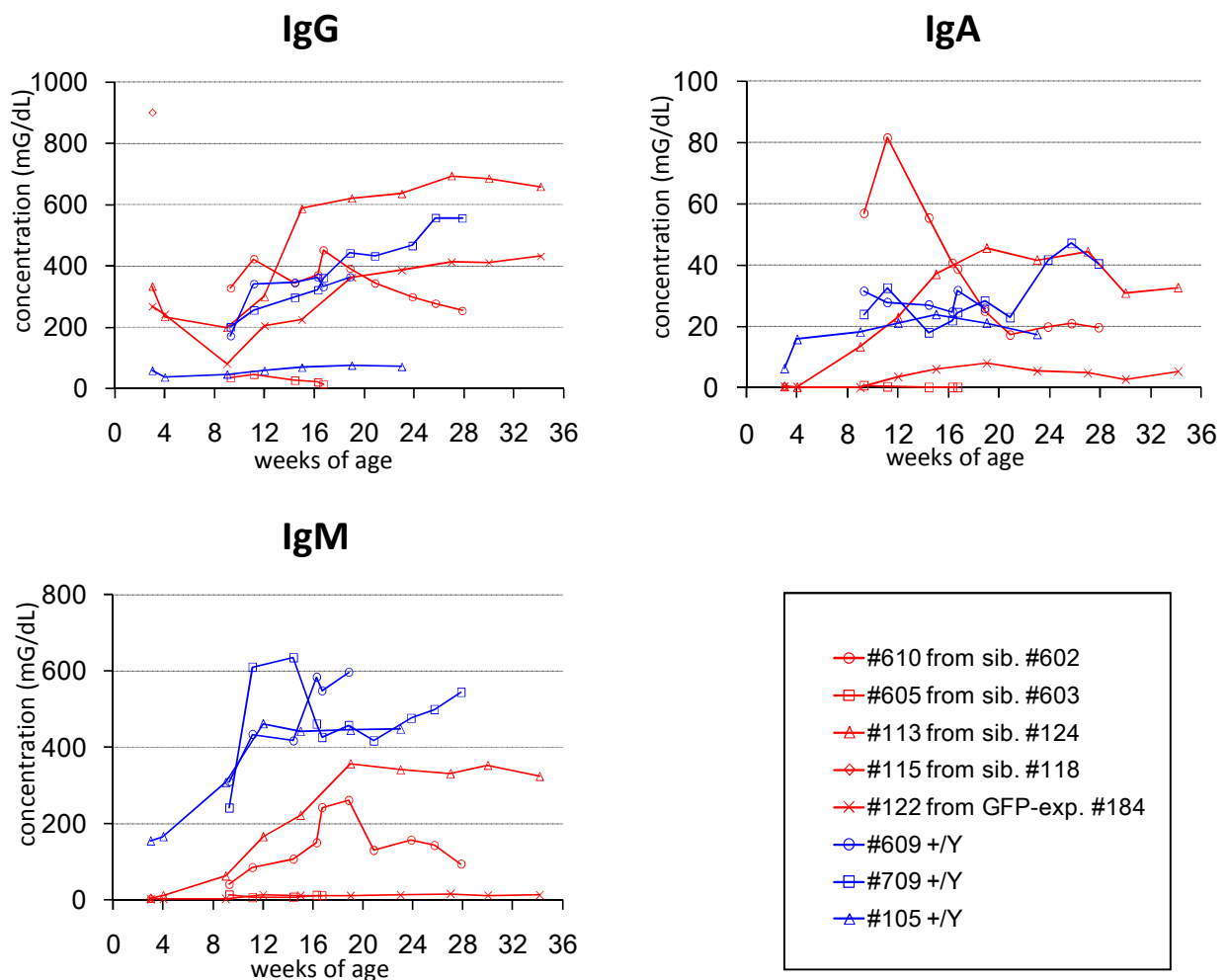


図3-3 骨髄移植後の血清中免疫グロブリンの経時的変化

IL2RG $-/Y$ 型オスに骨髄移植後の血清中の各免疫グロブリンサブタイプの濃度をELISAにより定量し、同一週齢の*IL2RG* $+/Y$ 型 (野生型) との比較を行った。

赤 : *IL2RG* $-/Y$ 型 (変異型) オス + 骨髄移植、青 : *IL2RG* $+/Y$ 型 (野生型) オス

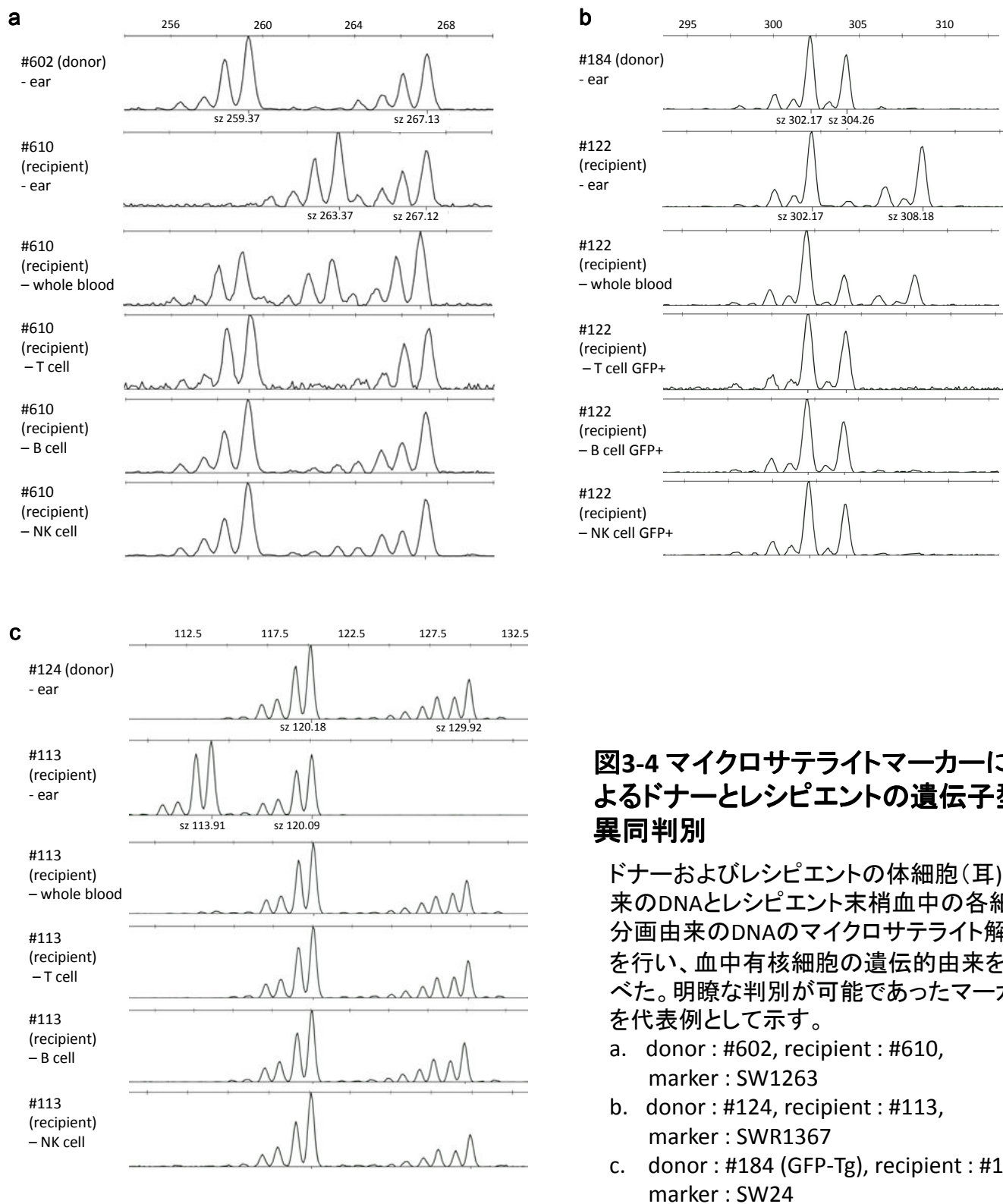


表3-1 同種骨髄移植の実験区およびその後の経過

	ドナー	前処置	骨髄移植後の経過
NS 区	同腹産仔	なし	#605：移植後140日で死亡
			#602：移植後2年以上生存
CS 区	同腹産仔	あり	#113：移植後2年以上生存
			#115：移植後15日で死亡
CG 区	EGFP発現ブタ	あり	#122：移植後2年以上生存

表3-2 骨髓非破壊的前処置による全血球計算値の変動

		前処置あり				前処置なし							
日 ^a		-/Y				-/Y				+/Y			
RBC (x10 ⁶ /μl)	- 7	4.9	±	1.4	(6)	5.7	±	0.7	(2)	4.9	±	0.9	(12)
	+ 7	5.0	±	0.8	(5) ^b	6.0	±	0.1	(2)	5.4	±	0.8	(12)
	+14	4.8	±	1.3	(3) ^c	5.8	±	0.3	(2)	6.2	±	0.7	(12)
WBC (x10 ³ /μl)	- 7	18.1	±	12.5	(6)	16.3	±	15.7	(2)	15.6	±	4.6	(12)
	+ 7	2.1	±	2.6	(5)	23.8	±	21.8	(2)	24.1	±	16.2	(12)
	+14	2.6	±	3.1	(3)	25.6	±	6.5	(2)	26.6	±	17.9	(12)
Hgb (g/dL)	- 7	13.1	±	3.3	(6)	14.6	±	0.8	(2)	12.3	±	1.1	(12)
	+ 7	13.7	±	2.0	(5)	15.7	±	0.7	(2)	13.4	±	2.5	(12)
	+14	11.9	±	2.9	(3)	14.9	±	0.1	(2)	13.8	±	2.3	(12)
HCT (%)	- 7	33.6	±	10.0	(6)	37.7	±	5.9	(2)	32.8	±	5.3	(12)
	+ 7	32.3	±	6.9	(5)	34.5	±	0.4	(2)	33.9	±	6.0	(12)
	+14	31.9	±	8.9	(3)	34.2	±	1.1	(2)	37.6	±	5.2	(12)
PLT (x10 ³ /ml)	- 7	230.8	±	133.6	(6)	246.5	±	3.5	(2)	251.8	±	128.5	(12)
	+ 7	127.2	±	32.2	(5)	1273	±	1529	(2)	257.3	±	102.4	(12)
	+14	81.0	±	13.1	(3)	587.5	±	367	(2)	269.3	±	100.5	(12)

すべてのデータは平均値 ± 標準偏差 (例数) で示す。

^a +1 日を骨髓移植実施日と仮定した。

^b RBC : 赤血球数

^c WBC : 白血球数

^d Hb : ヘモグロビン濃度

^e HCT : ヘマトクリット値

^f PLT : 血小板数

^g +7 日までに1頭、+14 日までにさらに2頭が死亡した。

第4章 ブタ胎仔期における胸腺発達過程の解析

第1節 緒言

1. 免疫系ヒト化に向けた制約要因

第3章において、IL2RG ノックアウトブタに同種骨髄細胞移植を施すことで免疫系を再構築できることを示した。しかしながら、異種であるヒト細胞の効率的な生着とヒト免疫系の再構築には以下に述べるような多くのハードルが存在することが予測される。

1-1. 残存する免疫系による拒絶

今回作製した IL2RG ノックアウトブタでは、T・B・NK 細胞の著減が認められたが、完全な欠損とはなっていない。これは、他の動物種でも同様であり、T 細胞受容体および免疫グロブリンの遺伝子再構成に必須である DNA-PK あるいは RAG1 / 2 の機能欠損により、獲得免疫系を完全に欠失させることで達成できると考えられる。筆者らは、すでに RAG2 ノックアウトブタの作製に成功しており、今後 IL2RG ノックアウトブタとの交配を進め、その二重欠損ブタの免疫不全形質を詳細に解析する予定である。

また、IL2RG ノックアウトブタでは自然免疫系は基本的に正常に保たれており、異種細胞に対しては貪食反応が生じる。これについては、薬剤や放射線等により一時的に顆粒球を減少させる前処置を施すことで、部分的には克服可能と考えられる。マウスでは、NOD 変異の導入による自然免疫系の減弱がヒト細胞の生着に効果的であることが、NOG や NSG マウスと Il2rg / Rag2 ダブルノックアウトマウスの比較から明らかとなっている (Brehm et al., 2010)。こうした影響を及ぼす NOD 変異の本態は、マクロファージなどによる貪食反応に関わる SIRP α の変異であることが明らかとなっている。同種細胞間では、貪食細胞の膜上に発現する SIRP α が他の細胞の CD47と相互作用することにより貪食が抑制される一方、異種細胞間ではこの相互作用が起こらず、貪食反応が起こる。NOD 変異を持つマウスでは、変異型の SIRP α がヒト CD47 と相互作用を起こし、貪食を抑制することが示唆されている (Takenaka et al., 2007; Yamauchi et al., 2013)。このことから筆者らは、ヒト型 SIRP α をブタに発現させ、ヒト細胞に対する貪食能を抑制することを検討している。最終的には、IL2RG-KO / RAG2-KO / hSIRP α -Tg となるブタを作製し、NOG マウスや NSG マウスに匹敵するレベルの高度免疫不全ブタの開発を目指して

いる。

1-2. T 細胞の MHC 拘束性

免疫不全動物を用いたヒト化研究の大きな問題点として挙げられるのが、ヒト T 細胞が宿主動物の胸腺上皮細胞との相互作用により分化・成熟することである。すなわち、分化したヒト T 細胞の抗原特異性が宿主動物の MHC により規定されることになる。このことにより、ヒト B 細胞上のクラス II HLA 分子/抗原複合体との相互作用が不十分となり、抗体クラススイッチが障害されると考えられている。実際、ヒト化マウスにおいては、ヒト IgM は十分に産生されるが、IgG の産生は極めて微弱である。同様に、クラス I HLA を介した被感染細胞との相互作用に依存する細胞傷害性 T 細胞の機能も不十分になると考えられる。こうした問題の克服に向け、クラス I HLA (Shultz et al., 2010)、クラス II HLA (Danner et al., 2011; Suzuki et al., 2012) を発現させたマウスが既に作成されており、クラス I では機能的な細胞傷害性 T 細胞の出現、クラス II では抗原特異的なヒト IgG の産生が、それぞれ認められることが報告されている。

1-3. サイトカイン等生体分子の種間交差反応性

宿主動物中でのヒト免疫系細胞の分化や分化後の免疫反応には、サイトカイン等の多種の補助分子が必要となる。これらは大部分が宿主動物由来となるため、ヒト細胞との反応性が低い、あるいはないというケースも少なからず存在することが想定される。こうした問題を克服する目的で、ヒト IL-3 / GM-CSF ノックインマウス (Willinger et al., 2011) やヒト *THPO* (thrombopoietin) のノックインマウス (Rongvaux et al., 2011) が作製されヒト免疫細胞の分化促進が認められることが報告されている。この点においては、ゲノム DNA 配列がマウスと比べヒトに近いブタを利用することが、有利となる可能性が高いと考えられる。

1-4. 胸腺構造の維持と T 細胞の分化

免疫不全マウスにおけるヒト造血系細胞の移植は、主として新生仔期に行われている。新生仔期と成体期におけるヒト細胞移植後の動態を調べた報告では、CD45 陽性細胞全体では、有意な差が認められないのに対し、CD3 陽性の T 細胞に限ると新生仔期での移植の方が有意に多くのヒト細胞を検出できることが示されている (Brehm et al., 2010)。一方で、*Il2rg* ノックアウトマウスでは、萎縮した胸腺が存在しているが、年齢とともに囊

胞状の構造が拡大し組織構造の破壊が進むことが示されている (Ikebe et al., 1997)。これらのことから、胸腺構造がある程度発達し、なおかつその健全性が保たれている段階においてヒト造血幹細胞等を移植することが効率のよい T 細胞誘導につながると考えられている。

2. 胸腺の発生と機能

胸腺は、T 細胞の発生・分化に必要不可欠な器官であり、上述したようにその存在様態が免疫不全動物における免疫系の再構築にも密接に関わっている。そのため、胸腺の発達や機能に関する解析は、効率的な免疫系ヒト化ブタの開発にも大いに資するものと考えられる。そこでまず、胸腺の発生と機能について、マウスの知見を中心に述べる。

2-1. 胸腺の発生

マウスの場合、胸腺の器官形成は胎齢 10 日ごろに、咽頭領域で開始される。胎仔の第 3 鰓嚢の内胚葉細胞が陥入するような形で増殖し、副甲状腺と胸腺の共通原基を形成する。胎齢 11.5 日から胸腺と副甲状腺原基の分化が進み、胎齢 12.5 日までには、原基は増殖しながら塊状となり、咽頭壁から分離する。その後胸腺は、副甲状腺と分離し、心臓の上あたりまで下降する。マウスやヒトでは、基本的に胸腺は心臓の上に存在しているが、ブタを含む家畜においては、頸部から心臓直上までつながった形で存在している。家畜においては、胸腺が下降するのではなく、頸部の胸腺が維持された状態で、胸部まで組織が広がっていくという過程を経て発達すると考えられる。また、マウスでは、リンパ系細胞は胎齢 11.5 日に最初に検出される。皮質様領域と髄質様領域の分化は胎齢 13 日までにすでに認められ、胎齢 15.5 日まではリンパ球非依存的に進行するが、その後は、胸腺細胞からのシグナルに依存的となることが示されている。ブタにおいては、胸腺へのリンパ系細胞の流入は胎齢 35–40 日とされており (Sinkora et al., 2000)、皮質様領域と髄質様領域の分化はその時期以降に進行すると考えられる。

加えて、マウスにおいては、胸腺の発生に関わる分子の解析も進んでおり、咽頭弓の形成にかかわる *Tbx1* (T-box 1) や胸腺・副甲状腺共通原基の形成に必須とされる *Hoxa3* (Homeobox A3) などが胸腺形成に重要であることが示されている。また、ヌードマウスの原因遺伝子として知られる *Foxn1* (Forkhead box N1) は胸腺・副甲状腺共通原基の形成には必要ではないが、その後の胸腺上皮の分化に加え、成体においても胸腺微小環境の維持に必須であり、胸腺機能の獲得のためには最も重要な因子の 1 つである。さらに、

髄質の形成には胸腺細胞と胸腺上皮細胞の相互作用が重要となるが、その分子的本体は、RANK (Receptor activator of NF- κ B) /RANKL (RANK ligand) および CD40/CD40L (CD40 ligand) であることが明らかとなっている (Akiyama et al., 2008; Hikosaka et al., 2008; Irla et al., 2008)。なお、以上に関しては、以下にあげる総説に詳しく述べられている (Nowell et al., 2007; Manley and Condie, 2010)。

2-2. 胸腺の機能

胸腺の T 細胞分化に関わる機能についても、マウスにおいては、詳細な解析が進められている。初めに血流中から T 前駆細胞が胸腺皮質に流入する。この過程には、ケモカイン Ccl25 [Chemokine (C-C motif) ligand 25] とそのレセプターである Ccr9 [Chemokine (C-C motif) receptor 9] が少なくとも部分的には関与している (Lai and Kondo, 2007; Schwarz et al., 2007)。胸腺に定着した細胞は、Rag 複合体により T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の再構成を受け、CD4CD8-DP 細胞となる (Bassing et al., 2002)。胸腺皮質上皮細胞により提示される自己抗原と MHC の複合体に対して、低い親和性を示す TCR 複合体を発現する胸腺細胞が生存する (正の選択) (Starr et al., 2003)。この際、胸腺上皮細胞特異的に発現するプロテアソーム (胸腺プロテソーム : $\beta 5t$) が作り出した特徴的なペプチド鎖が重要な役割を果たしている (Xing et al., 2013)。正の選択を受けた胸腺細胞は、ケモカイン Ccl19 [Chemokine (C-C motif) ligand 19] とレセプター Ccr7 [Chemokine (C-C motif) receptor 7] のシグナルにより髄質へと移動する (Ueno et al., 2004)。続いて、髄質上皮細胞や樹状細胞により提示された自己抗原と MHC の複合体と強い親和性を示す TCR を発現する胸腺細胞は、自己反応性 T 細胞としてアポトーシスにより除去される (負の選択) (Starr et al., 2003)。この負の選択には、末梢性自己抗原の発現に関わるとされる Aire (Autoimmune regulator) が関与している (Anderson et al., 2002)。負の選択を回避した胸腺細胞は、CD4 あるいは CD8-SP 細胞として、胸腺から移出される。

2-3. ブタ胎仔胸腺発達過程の解析

第 2 章で述べた通り、今回作成した IL2RG ノックアウトブタでは、出生時にすでに胸腺の萎縮が進行し、肉眼的には観察不可能であった。胸腺細胞の増殖分化が障害された IL2RG ノックアウトブタでは、胸腺構造の正常な発達に必要とされる胸腺上皮細胞や間質細胞と胸腺細胞との相互作用を欠くためと考えられる。ただし、マウスの例では、胸腺細胞が欠損した条件でも、一定程度の胸腺構造の発達が認められており (van Ewijk et

al., 2000; Klug et al., 2002)、ブタでも同様と考えられる。したがって、胎仔期におけるヒト細胞の移植が胸腺構造の維持・発達とその後のヒト T 細胞誘導に効果的である可能性が高く、IL2RG ノックアウトブタの胎仔において胸腺発達過程を観察する必要がある。加えて、胎仔期においては、免疫系の発達が不十分であることから、1-1.で述べた残存する免疫系の影響についても、最小化が可能と考えられ、ヒト細胞の生着効率の上昇にも寄与する可能性が高い。しかしながら、比較対象となる野生型ブタにおいても、胎仔期の胸腺の構造や機能の発達過程についての報告はほとんど存在しない。そこで、以上で述べたような因子について、胎仔発達に伴う、胸腺における遺伝子発現レベルの変化を解析し、胸腺の構造的・機能的発達の過程を探る手がかりとした。合わせて、組織化学的な解析を行い、胸腺構造の発達過程について視覚的に観察した。

第2節 材料と方法

供試動物と採材

第2章で記述した条件で飼育された健康なブタ（ランドレース、大ヨークシャー、デュロックの交雑種）を供試した。胎齢35、40、45、50、55、65、85日の胎仔、および生後2日目の子ブタから頸部および心臓上方に存在する胸腺を採取し、以下の解析に用いた。また、胎齢35日から55日の胎仔については、組織化学的解析のために、頸部全体も採取した。すべての動物実験は、独立行政法人農業生物資源研究所の動物実験委員会の承認を受け、同所の「動物実験規程」に基づいて実施した。

RNA抽出と定量的RT-PCR

全RNAはセパゾール（ナカライテスク）を用い、APGC法により抽出した。抽出したRNAはDNaseI処理の後、逆転写反応に供した。逆転写反応は、PrimeScript RT reagent kit（タカラバイオ、大津）を用いて、37°Cで30分間処理することにより行った。得られたcDNAはLight cycler（Roche Applied Science）およびSYBR premix Ex TaqII（タカラバイオ）を用いたリアルタイムPCR反応に供した。各遺伝子の増幅に用いたプライマーの配列は、表4-1に示した。対象とする遺伝子の発現量相対比較のための内部標準として、*HPRT1*（Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1）遺伝子を用いた。

HE染色

胸腺や頸部断片をO.C.T. コンパウンド（サクラファインテックジャパン、東京）で包埋後、液体窒素で急速凍結した。クリオスタット（HM-500; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany）を用いて、6 μmの切片を作製し、使用時まで-80°Cで保存した。凍結切片を室温で風乾させ、固定液（ホルマリン：エタノール：酢酸 = 20:80:1）中に15分間浸して固定した。PBS（-）で洗浄後、マイヤーヘマトキシリン溶液（和光純薬、大阪）に8分間浸した。10分間流水で洗浄した後、1%エオジンY溶液（和光純薬）に3分間浸した。蒸留水による洗浄を行い、続いてエタノールによる脱水とキシレンによる透徹を行った後、エンテランニュー（Merck Millipore, Darmstadt, Germany）を用いて封入し、検鏡した。

免疫組織化学

前項で作製・保存した凍結切片を室温で風乾させ、4%パラホルムアルデヒド / PBS（-）

中に 15 分間浸して固定した。PBS (-)で洗浄後、10 mM クエン酸バッファー (pH6.0) に浸し、フードスチーマーで 25 分間加熱することにより、抗原賦活化を行った。PBS (-) で洗浄後、10 % 正常ウサギ血清 / 0.05% Tween20 / PBS (-) (FOXN1 の場合)、10 % 正常ウサギ血清 / PBS (-) (AIRE の場合)、10 % 正常ヤギ血清 / PBS (-) [Cytokeratin 5 (CK5) の場合]、のいずれかを用いて、室温で 60 分間ブロッキングした。その後、anti-FOXN1 抗体 (Abcam; PBS (-) / 1% BSA / 0.05% Tween20 で 50 倍希釈)、anti-AIRE (Everest Biotech, Oxfordshire, UK; PBS (-) / 1% BSA で 750 倍希釈)、あるいは anti-CK5 (Abcam; PBS (-) / 1% BSA で 100 倍希釈) 溶液中で、4°C で一晩反応させた。PBS (-) で洗浄後、0.3 % H₂O₂ / PBS (-) で 15 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに、PBS (-) で洗浄後、anti-goat ImmPRESS reagent (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA; FOXN1 および AIRE の場合) 中で室温 30 分間、あるいは HRP 標識された anti-rabbit IgG (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA; PBS (-) / 1% BSA で 100 倍希釈; CK5 の場合) 中で室温 60 分間、各々反応させた後、DAB (ナカライテスク) を基質として用い、発色させた。ヘマトキシリンによる対比染色を行い、脱水・透徹をした後に、エンタランニューを用いて封入し、検鏡した。

統計処理

平均値の比較は、Turkey の HSD (Honestly significant difference) 検定により行い、 $p < 0.05$ の場合を有意と判定した。

第3節 結果と考察

胎仔胸腺における遺伝子発現の変化

胸腺上皮細胞あるいは胸腺細胞で発現する遺伝子について、胎齢 35 日から生後 2 日にかけて、発現量の変化を経時的に解析した。まず、胸腺上皮細胞に発現する遺伝子について解析を行った (図 4-1)。胸腺の発生に重要であり、未分化な段階から発現するとされる *FOXN1* は、胎齢 35 日で有意に発現が高く、以後はほぼ変化がなかった。皮質上皮細胞で発現し、胸腺プロテアソーム $\beta 5t$ をコードする *PSMB11* [proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 11] も胎齢 35 日で最も発現が高く、胎齢 65 日にかけて減少し、その後はほぼ一定であった。このことは、胎齢 35 日においては、すでに胸腺皮質上皮細胞の分化が進行していることを示している。その後、相対的な発現レベルが減少しているのは、胸腺発達に伴い、胸腺組織中における胸腺皮質上皮細胞の占める割合が減少することを反映していると考えられる。一方、髄質上皮細胞に発現する *AIRE* は胎齢 45 日から発現上昇が認められ、生後 2 日目まで一貫して上昇傾向を示したことから、胸腺髄質の分化が胎齢 45 日前後に開始し、以後の胎仔期全体を通して、髄質の発達が継続することが示唆された。

続いて、胸腺細胞の移動に関わるケモカインとそのレセプターについて発現量の解析を行った (図 4-2)。胸腺への移入に関わり、胸腺上皮細胞で発現する *CCL25* は胎齢 35 日で最も発現が高く、胎齢 45 日にかけて減少し、以後はほぼ一定であった。これは、*FOXN1* や *PSMB11* とほぼ同様の動態であり、皮質上皮細胞で発現していることが示唆された。そのレセプターである *CCR9* は胎齢 45 日から上昇傾向が認められ胎齢 65 日にかけて上昇し、その後はほぼ一定であった。*CCR9* は、胸腺への移入する前駆細胞のほか、胸腺内では主に DP 胸腺細胞で強く発現しているとされている (Carramolino et al., 2001; Wurbel et al., 2006)。胎齢 45 日から胎齢 65 日にかけての発現が上昇し以後一定となることから、この時期に胸腺細胞の定着・増殖が進行し、その後は胸腺皮質においては、定常的に T 細胞分化が生じている状態へ移行すると考えられる。一方、皮質から髄質の移動に関わり、髄質の上皮細胞で発現するとされる *CCL19* は胎齢 55 日から発現が増加し、胎齢 85 日目まではほぼ一定であり、生後 2 日目でさらに増加していた。これは髄質上皮の発生を反映する *AIRE* の発現上昇よりやや遅れており、髄質上皮細胞の分化の進行が *CCL19* の発現に必要となる可能性が考えられる。そのレセプターである *CCR7* は胎齢 65 日にかけて徐々に増加する傾向が見られ、生後 2 日目でさらに増加していた。この発現上昇は *CCR9* よりやや遅れており、*CCR9* の発現が胎齢 65 日以降ほぼ一定となるのに対し、生後 2 日目まで増加傾向を維

持していた。このことは、胎齢 65 日以降は、*CCR9*を発現する DP 胸腺細胞が遷移状態として一定量存在しつつ、*CCR7*を発現する SP 胸腺細胞が蓄積していく過程に移行すると考えたと説明ができる。また、*AIRE* に加え、*CCL19*、*CCR7* の発現パターンから、胎仔期全体を通して、胸腺髄質の発達が継続することが改めて示唆された。

さらに、胸腺細胞で発現する遺伝子についての発現解析を行った (図 4-3)。血球系細胞のマーカー *CD45* (*PTPRC*: Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C)、リンパ球系細胞で広範に発現する *IL2RG*、T 細胞のマーカーである *CD3E* (*CD3 epsilon*) は、いずれも胎齢 65 日にかけて上昇するという共通の傾向を示したことから、胎齢 65 日までの間に、T 前駆細胞の流入・定着・増殖という過程が急速に進むことが示唆された。*IL2RG* および *CD3E* は胎齢 65 日以降あまり変化がなかったのに対し、*PTPRC* は胎齢 85 日から生後 2 日にかけて有意な発現上昇を認めた。このことは、T 細胞の成熟に伴い *PTPRC* の発現が上昇する可能性を示している。また、TCR の遺伝子再構成に関わる *RAG1* / *RAG2* の発現もこれらと同様に胎齢 55 日までに急速に増加することから、速やかに T 細胞分化が開始されることが考えられる。これらの遺伝子の発現を、DP 段階で発現が上昇する *CCR9* の発現パターンと比較すると、胎齢 40 から 50 日にかけての発現増加が大きいことが分かる。マウスでは T 細胞受容体の遺伝子再構成は DN3 段階 (*CD4⁻CD8⁻CD44⁻CD25⁺*) で起こる (Godfrey et al., 1994) とされており、このタイムラグは DN から DP へ移行する時間を反映するものと考えることができる。また、制御性 T 細胞の分化に関わる *FOXP3* (Forkhead box P3) は胎齢 55 日以後に有意な発現上昇が認められ、髄質の発生と相関していると考えられる。免疫組織化学による解析でも、*FOXP3* は髄質に局在した発現が認められたこと (データは示していない) から、制御性 T 細胞の分化は髄質で起こることが考えられる。

HE 染色によるブタ胎仔胸腺発達過程の観察

次に、胎仔期ブタの胸腺発達過程を調べるため視覚的に観察するため、胎齢 35 から 55 日の頸部切片を作製し、HE 染色を行った (図 4-4)。胎齢 35 日において、小葉構造の形成は既に認められたが、細胞密度は疎であり、T 前駆細胞の流入はまだ起こっていないと考えられる。胎仔の成長につれ、細胞密度は高くなっていくが、胎齢 45 日までは髄質を認めることはできなかった。胎齢 50 日で中心部にヘマトキシリンで周囲より淡染される髄質と思われる領域が出現し、胎齢 55 日では、明瞭な髄質が認められるようになった。

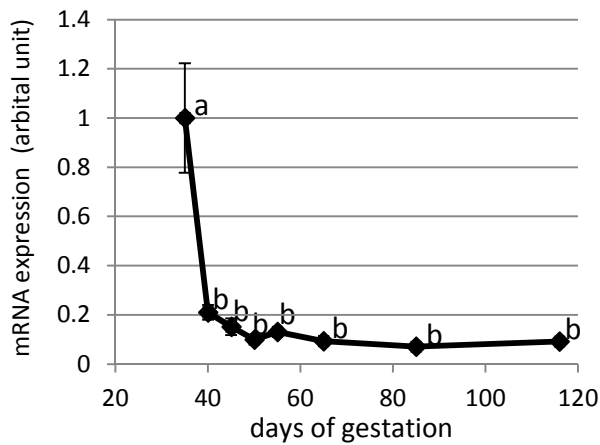
免疫染色によるブタ胎仔胸腺発達過程の観察

髄質形成をさらに明確に検出するため、髄質マーカーとして知られる **CK5** の免疫染色を行った (図 4-5)。胎齡 35 日および 40 日では、**CK5** の発現が、胸腺全体で散在的に認められた。このことから、未成熟な胸腺上皮細胞では **CK5** が発現しているが、皮質と髄質各々の分化の進行に伴い、皮質では発現が消失し、髄質では維持される結果、髄質上皮細胞への局在が形成されていくと考えられる。胎齡 45 日から 55 日にかけて、染色部位は小葉の中心部に局在するようになり、ヘマトキシリンで淡染される髄質領域と一致していることから、この時期に皮質上皮細胞における **CK5** の発現が消失し、髄質を形成する領域が確定されていくものと考えられる。

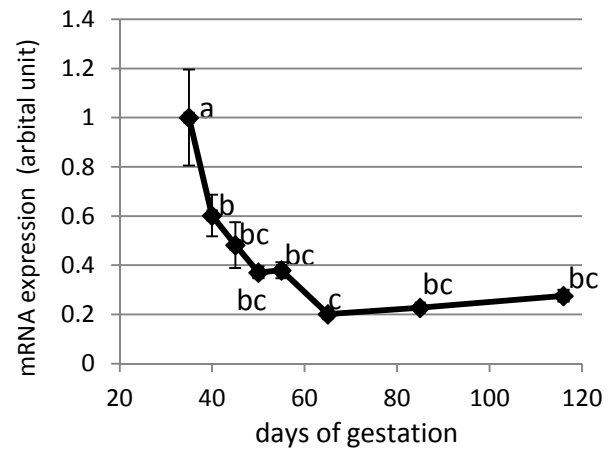
続いて、胸腺上皮細胞で発現する転写因子である **FOXP3** (図 4-6) と **AIRE** (図 4-7) の免疫染色を行った。胎齡 35 日では、各細胞の染色は弱いものの、ほぼすべての細胞が **FOXP3** 陽性であった。その後は、陽性細胞の割合は減少していったが、生後 2 日も含め、全段階において胸腺全体に散在的に陽性細胞が認められた。皮質と髄質両領域に陽性細胞が存在していたが、その密度は皮質領域の方が高い傾向がみられた。一方、**AIRE** は胎齡 45 日までは検出されなかったが、それ以降の段階では髄質領域限定的に陽性細胞が認められ、髄質の機能的分化も胎齡 50 日前後には開始されることが示唆された。

以上のことから、ブタ胎仔における胸腺髄質の形成開始時期は、胎齡 45 日から 50 日の間であることが示され、正負選択を経た成熟した T 細胞の出現は早くとも胎齡 45 日以降であると推測することが可能である。マウスにおいて、胸腺上皮細胞、特に髄質の発生や維持には、胸腺細胞からのシグナルが必要であることが示されている。しかし、胎齡約 15 日までは、胸腺細胞非依存的に発生が進行することが分かっている (van Ewijk et al., 2000; Klug et al., 2002.)。この時期は髄質の発生開始から少し経過した時期であり、本章の解析結果を基にブタ胎仔に当てはめると、胎齡 50 日前後と考えられる。生時には検出不可能なほどに胸腺が委縮してしまう免疫不全ブタにおいて、ヒト T 細胞を効率的に分化させることを考えた場合、胎齡 50 日までにヒト造血系細胞を移植することが有効と考えられる。このことと、上述したブタ胎仔胸腺における T 細胞系の発達過程、さらに移植操作自体の可能性を考え合わせると、ブタ胎仔へのヒト造血系細胞の移植を行うには、胎齡 45-50 日が適切な時期なのではないかと考えている。

a. *FOXN1*



b. *PSMB11*



c. *AIRE*

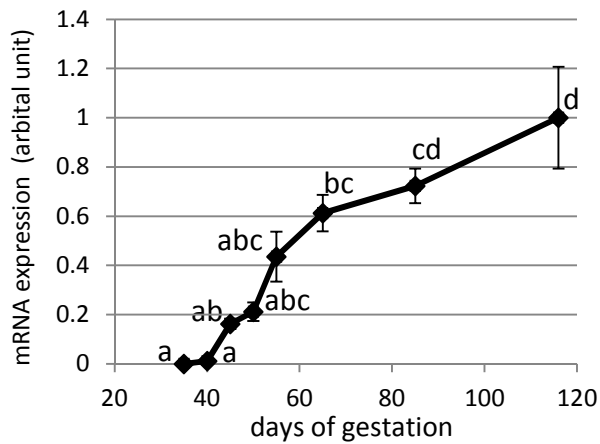


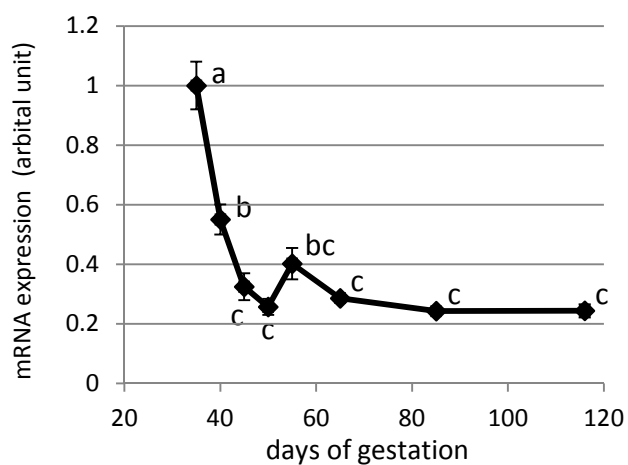
図4-1 ブタ胎仔胸腺における遺伝子発現の胎齢に伴う変化 (1)

胸腺上皮細胞に発現する遺伝子である*FOXN1*(a)、*PSMB11*(b)、*AIRE*(c)の胎齢35、40、45、50、55、65、85日および生後2日の胸腺における遺伝子発現の変化を調べた。

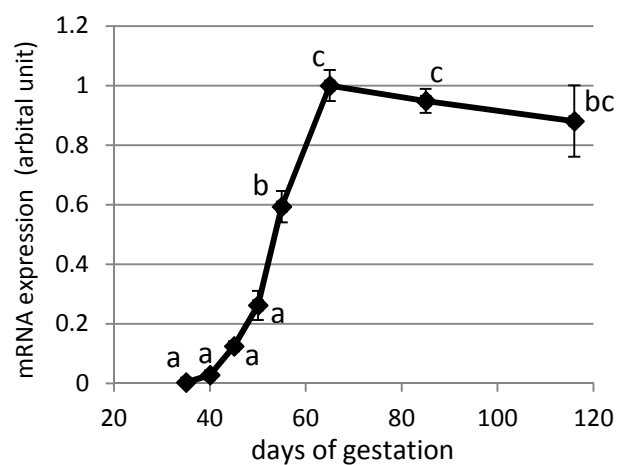
*HPRT1*遺伝子を内部標準として、リアルタイムPCRにより定量化した。

異符号は統計的に有意な差があることを示す ($P < 0.05$; Tukey's honestly significant difference)。

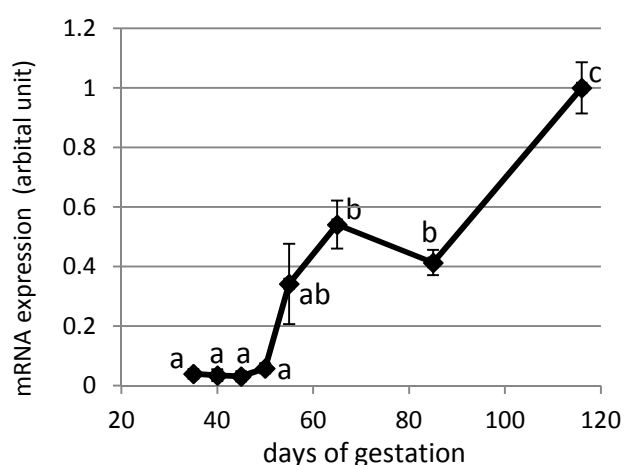
a. *CCL25*



b. *CCR9*



c. *CCL19*



d. *CCR7*

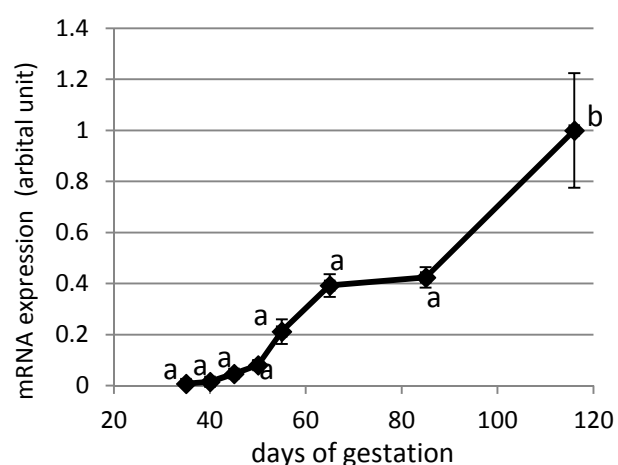


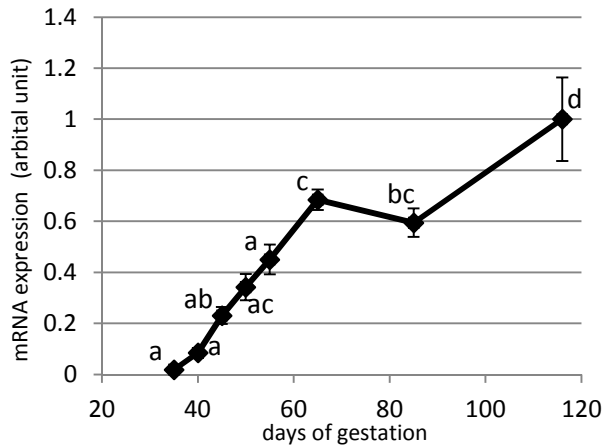
図4-2 ブタ胎仔胸腺における遺伝子発現の胎齢に伴う変化 (2)

胸腺細胞の移動に関わる遺伝子である*CCL25*(a)、*CCR9*(b)、*CCL19*(c)、*CCR7*(d)の胎齢35、40、45、50、55、65、85日および生後2日の胸腺における遺伝子発現の変化を調べた。

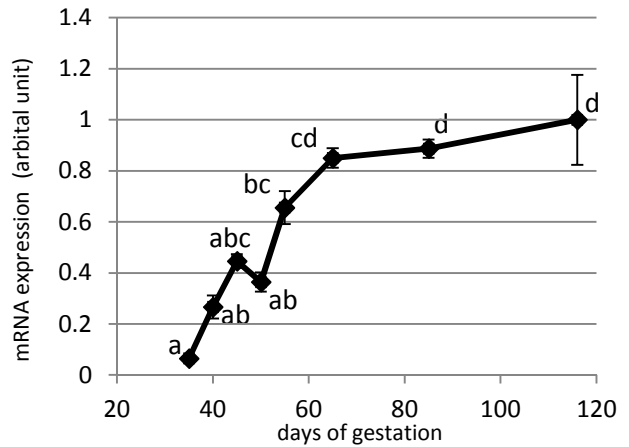
*HPRT1*遺伝子を内部標準として、リアルタイムPCRにより定量化した。

異符号は統計的に有意な差があることを示す ($P < 0.05$; Tukey's honestly significant difference)。

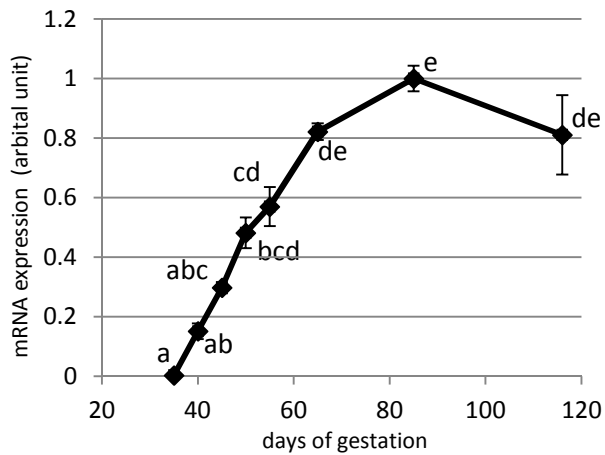
a. *PTPRC*



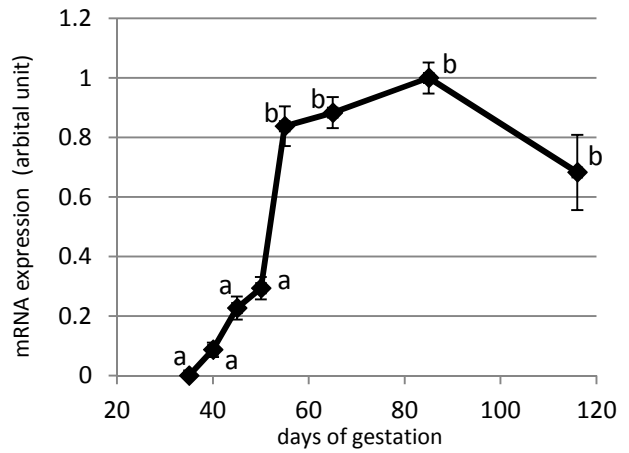
b. *IL2RG*



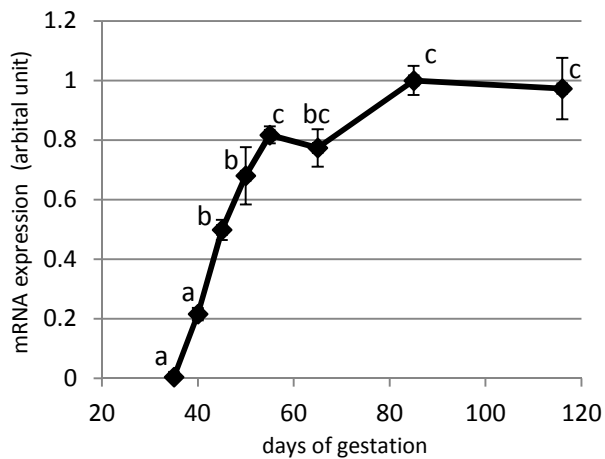
c. *CD3E*



d. *RAG1*



e. *RAG2*



f. *FOXP3*

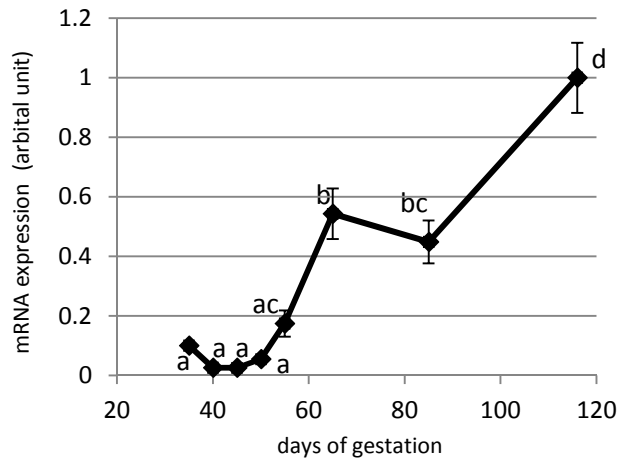


図4-3 ブタ胎仔胸腺における遺伝子発現の胎齢に伴う変化 (2)

胸腺細胞(T細胞系列)で発現する遺伝子である*PTPRC*(a)、*IL2RG*(b)、*CD3E*(c)、*RAG1*(d)、*RAG2*(e)、*FOXP3*(f)の胎齢35、40、45、50、55、65、85日および生後2日の胸腺における遺伝子発現の変化を調べた。*HPRT1*遺伝子を内部標準として、リアルタイムPCRにより定量化した。

異符号は統計的に有意な差があることを示す ($P < 0.05$; Tukey's honestly significant difference)。

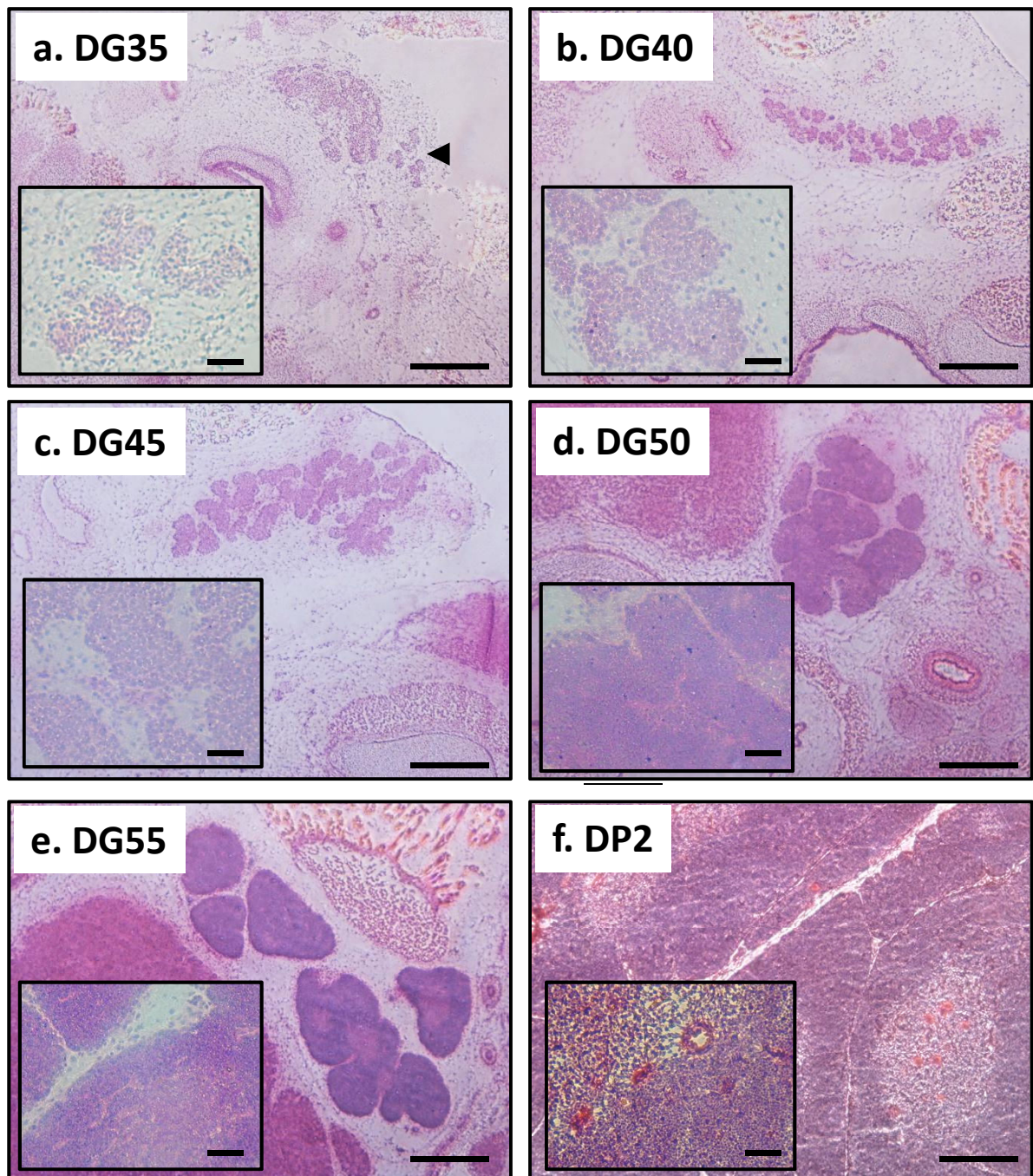


図4-4 ブタ胎仔胸腺発達過程の組織学的解析

胎齢35 (a)、40 (b)、45 (c)、50 (d)、55 (e)日および生後2日 (f)の胸腺のHE染色像。

(a) 矢頭が胸腺を示す。スケールバーは500 μm に相当する。

各挿入図は高倍率像であり、スケールバーは100 μm に相当する。

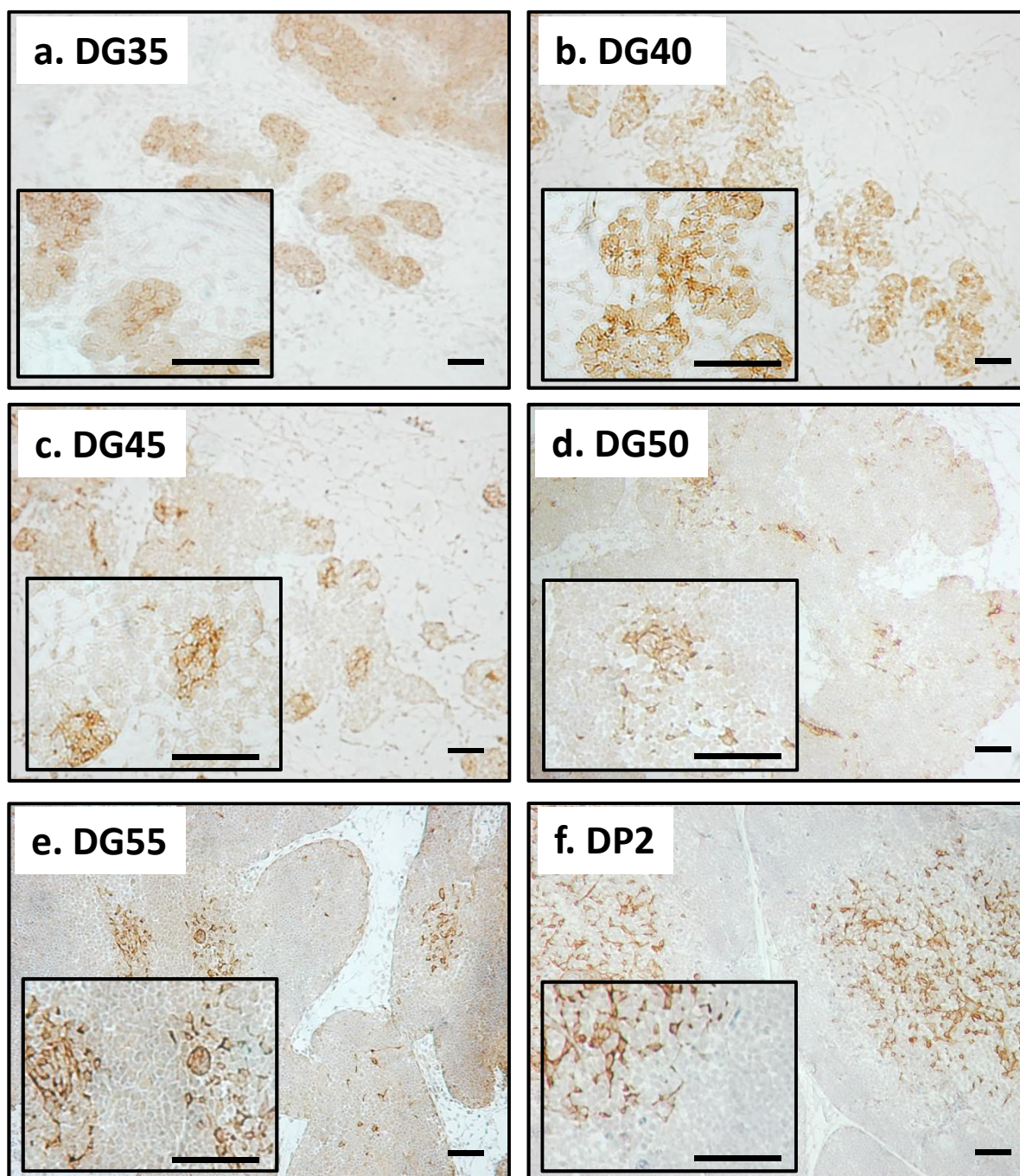


図4-5 ブタ胎仔胸腺におけるCytokeratin 5の免疫染色

胎齢35 (a)、40 (b)、45 (c)、50 (d)、55 (e)日および生後2日 (f)の胸腺におけるCytokeratin 5の免疫染色像。ヘマトキシリンにより対比染色を行った。スケールバーは100 μ mに相当する。各挿入図は高倍率像であり、スケールバーは50 μ mに相当する。

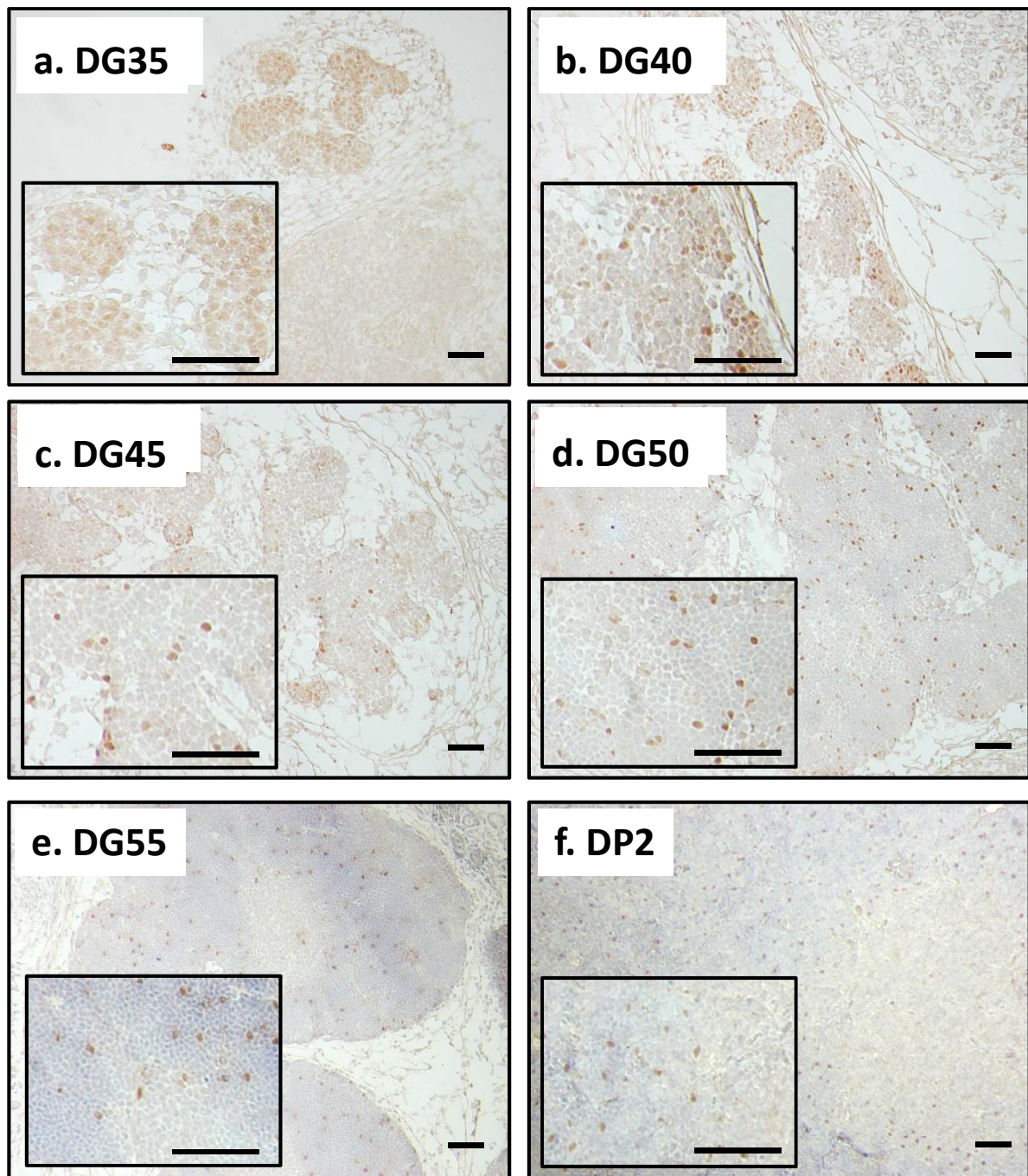


図4-6 ブタ胎仔胸腺におけるFOXN1の免疫染色

胎齢35 (a)、40 (b)、45 (c)、50 (d)、55 (e)日および生後2日 (f)の胸腺におけるFOXN1の免疫染色像。ヘマトキシリンにより対比染色を行った。スケールバーは100 μm に相当する。各挿入図は高倍率像であり、スケールバーは50 μm に相当する。

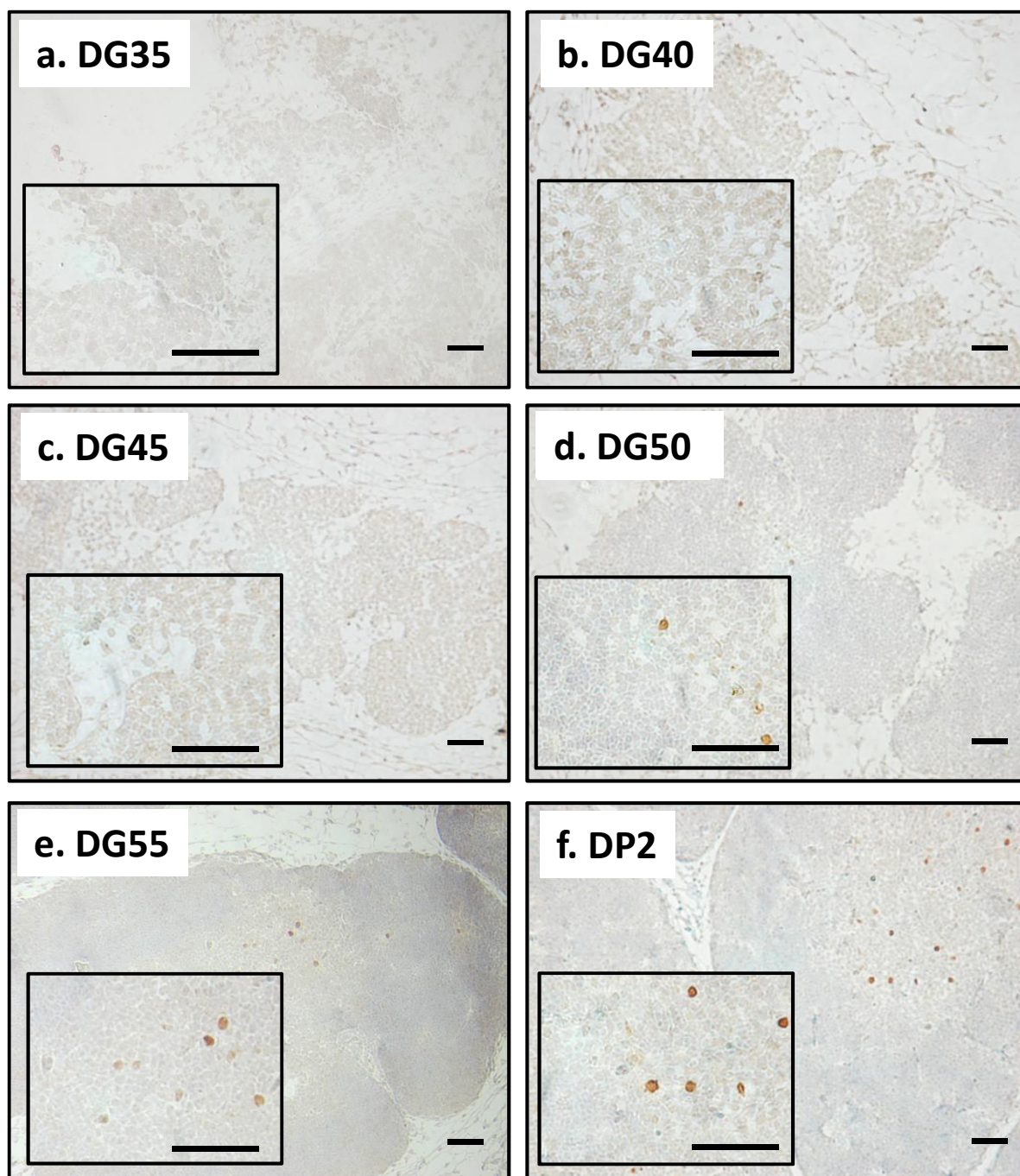


図4-7 ブタ胎仔胸腺におけるAIREの免疫染色

胎齢35 (a)、40 (b)、45 (c)、50 (d)、55 (e)日および生後2日 (f)の胸腺におけるAIREの免疫染色像。ヘマトキシリンにより対比染色を行った。スケールバーは100 μm に相当する。各挿入図は高倍率像であり、スケールバーは50 μm に相当する。

表4-1 定量的PCRに用いたプライマー配列

	forward	reverse	accession No.
FOXN1	TGACGGAGCACTTTCCTTAC	TGCATCTTGTGATCTTGGC	DB803240
PSMB11	GCTACGACATGAGCACCCAG	ACTCTCCCGCACGTGGAAGA	XM_001925763
AIRE	ATGTCCACTTCGGTCCAGAG	CCTGGATGCACCTTCTTGGAG	XM_003358989
CCL25	TCCTGCTATCCATGCTCAAG	ATATCACAGCAGGCAGGTTG	NM_001025214
CCR9	CAGAAAGCCGCAAGTCTGATG	AACACGAGCCAGTACAAATGG	NM_001001624
CCL19	GCTAAGCCTCTGGACTTCTC	CAGCCATCTCGAATGAGCAG	NM_001170516
CCR7	TGAAGAAGAGCCCTGCTGGTG	TAAAGGTCCGCACGTCCTTC	NM_001001532
PTPRC	ACAAGGTGGATGTCTATGGC	CAAGCTCACTTCTGTTTCTC	XM_003130596
IL2RG	CTTGGAACAGCAGCTCTGAG	ACCAACAGCCAGAAAGTGATC	NM_214083
CD3E	GTAGTTGACATCTGCATCAC	TGGGCTCATAGTCTGGATTG	NM_214227
RAG1	ATGCGGAGAAAGTCCCTTCTG	CAC TGGGTAATCGTCCACAG	NM_001123184
RAG2	TCTCATGGAGATGGGCATTG	CTTGCTATCTCCACATGCTC	NM_001128481
FOXP3	CATGGAGTACTTCAAGTTCC	AACATGCGTGTGAACCAGTG	NM_001128438
HPRT1	TACTGTAATGACCAGTCAACG	GCAACCTTGACCATCTTTGG	NM_001032376

第5章 総合考察

実験動物は、ヒト疾患の基礎的研究及び医薬品・医療機器などの有効性や安全性を確認するためのモデルとして欠かせないものである。特に、げっ歯類のマウスはその扱いやすさや繁殖力の高さに加え、遺伝子操作が比較的容易であることから、最も広く利用されている。しかしながら、マウスで得られた実験結果が必ずしもヒトの症例を反映しないという例も少なくなく、その橋渡しとして考えられたのが、ヒト化マウスである。ヒト化マウスとは、免疫不全マウスにヒト細胞を移植し、生着させて得られるヒト細胞・組織を持つマウスであり、いわば、ヒトの *in vivo* 研究をマウスで行うためのモデル動物である。しかしながら、小動物であるマウスは個体のサイズや寿命といった点でヒトと大きく異なるため、外科的処置や長期にわたる経過観察には適していない。また、基盤となる生理学的特徴の違いも比較的大きいため、実験結果のヒトへの外挿が困難となる場合も少なくない。一方で、ブタは臓器のサイズや生理学的・解剖学的特徴がヒトに類似しているのに加え、寿命が15年程度と比較的長く、臨床的に意義の大きい数年という長期間にわたる経過観察が可能であることから、ヒトのモデル動物として有用とされている。さらに、2000年の体細胞クローン作出以降、遺伝子ターゲティングを含む任意の遺伝子改変が可能となったことから、実験動物としての汎用性は今後増していくことが予想される。そこで、実験動物として上記のような利点を持つブタに、ヒト化マウスの概念を適用したヒト化モデルブタ開発を目指し、その基盤となる免疫不全ブタの開発に着手した。

<本研究の総括>

第2章では、*IL2RG* 遺伝子をノックアウトすることにより、T・B・NK細胞の機能を欠損した重症複合免疫不全を呈するブタが作製できた。このノックアウトブタは、自然免疫系は正常なままで維持されたものであるが、ヒトがん細胞や肝細胞など比較的多数の均質な細胞を移植することが可能な系においては、十分に利活用が可能なものであると考えられる。実際、予備的試験においてはヒトがん細胞の生着と増殖を支持できることが示されている（未公表データ）。このモデルは、同所的ながん細胞の移植や数年といった長期間にわたる経過観察など、マウスでは困難な場合の多い解析において、有用となると期待される。また、肝障害を誘導したブタにヒト肝細胞を移植することで肝臓をヒト化し、移植用の臓器を供給することや、ヒト特異的な薬物代謝活性の試験、肝炎の感染実験などの用途に用いることも期待できる。加えて、ES/iPS細胞などの多能性幹細胞の移植によるヒト型

臓器/組織の作成や、再生医療の実験モデルとして幹細胞の長期安定性や発がん性の試験などへの応用も期待される。さらに後に述べるような改良を加えた高度な免疫不全ブタを開発することにより、より広範な利活用が可能になると考えられる。

第3章では、第2章で作製した **IL2RG** ノックアウトブタを用いて、同種骨髄細胞移植による免疫系再構築の可能性を検討した。その結果、移植した骨髄由来の細胞が **IL2RG** ノックアウトブタ体内に生着し、リンパ球系細胞を再構築したことが示唆された。このことは、今回作製した **IL2RG** ノックアウトブタにおいて、移植した細胞による免疫系の再構築が可能であることを実証したものであり、ヒト造血幹細胞の移植による免疫系ヒト化ブタ開発に向けた第1歩となるものである。ただし、今回移植した骨髄細胞は多種の細胞を含むものであり、どのような細胞がどのような過程を経ることによって、免疫系再構築が達成されたかについては今後の課題である。こうした点についても、さらなる解析を進めることにより、より効率的な免疫系再構築が可能となると考えられる。

効率的な免疫系ヒト化ブタ開発に向けては、その他にも、多くの課題が残されている。まず第1に、**IL2RG** ノックアウトブタでは、マクロファージ等の自然免疫系は正常のままであり、移植したヒト細胞の食食が起こるため、その制御が必要である。次に、ブタ由来のサイトカインなどの生体活性分子のヒト細胞との相互作用が不十分なため、ヒト細胞の発生・分化がうまく進行しない可能性も考えられる。また、ヒト **T** 細胞がブタ胸腺中でブタの **MHC** に依存し発生することになるため、ヒト由来の **T** 細胞と **B** 細胞の相互作用が不十分となり、その結果免疫グロブリン、特に **IgG** の産生が起こりにくくなると考えられる。さらに、今回作製した **IL2RG** ノックアウトブタは胸腺が著しく萎縮しているため、ヒト **T** 細胞の分化・成熟自体が非効率的になる可能性も考えられる。

こうした制約要因の克服に向けた方策の1つとして、胎仔期においてヒト細胞の移植を行うことが考えられる。この方策の利点の1つは、自然免疫系が未熟であることにより、ヒト細胞の生着率向上が見込めることである。また、**Il2rg** ノックアウトマウスでの知見から、**IL2RG** ノックアウトブタにおいても、胎仔期の途中までは正常な胸腺発達が起こることが予想され、その段階でヒト細胞を移植することにより、胸腺構造の維持・発達とヒト **T** 細胞の分化・成熟の両方を促すことができると考えられる。そこで、この方策の実現に向けた準備として、第4章において胎仔期ブタにおける胸腺の発達過程についての解析を行った。その結果、胎齢35日時点で皮質の発達はすでに進んでおり、その後胎齢40日から50日にかけて髓質が明確化することが示された。髓質の発生にはある程度分化した **T** 細胞が必要であることから、**IL2RG** ノックアウトブタではこの時期に胸腺の発生が停止するこ

とが予想される。このことから、ヒト細胞の移植時期として胎齢 50 日前後が適当であることが示唆された。この時期の胎仔のサイズであれば、造血幹細胞の肝臓への移植は手技的には可能であり、この方策により胸腺構造の維持・発達とヒト T 細胞の効率的な分化・成熟の促進が実現できると考えられる。

<今後の展望>

ヒト細胞生着率向上に向けた別の方策として、さらなる遺伝子組換えによって、NOG/NSG マウスに匹敵するような高度な免疫不全ブタを作製することも考えられる。まず第 1 に、SCID 変異と同等な表現型を示す RAG2 ノックアウトブタの作製が挙げられる。IL2RG ノックアウトの作用点はリンパ球系細胞の増殖や分化であるのに対し、RAG2 ノックアウトでは T 細胞レセプターや免疫グロブリンの遺伝子組み換えが起こらなくなるため、獲得免疫系を完全に欠損させることができるからである。この 2 つの遺伝子をノックアウトすることにより、T・B・NK 細胞の機能を完全に欠損したブタの作製が可能となると思われる。次に、マウスの NOD 変異に対応する遺伝子組換えとして、ヒト *SIRPA* 遺伝子の導入が考えられる。これにより、移植したヒト細胞がマクロファージ等の貪食細胞に自己と認識されることで、貪食から免れることが可能となる。これは、移植したヒト細胞の生着率の向上につながることは勿論であるが、ブタ体内で増殖・分化したヒトの細胞が安定的に存在しやすい環境を提供するという意味でも重要である。

以上のように、本研究においては、ブタの体内に安定的にヒト細胞を維持することのできるヒト化モデルブタの作製に向け、その基盤となる免疫不全ブタの開発に成功した。本研究で開発した免疫不全ブタにさらなる改良が加えられ、ヒトの医療への応用を目指したトランスレーショナルリサーチの優れたモデル動物の 1 つとして、広く利活用されることが期待される。

参考文献

- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M. & Evans, R. M. 2013. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 19, 557-66.
- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wunsch, A. & Wolf, E. 2010. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*, 88, 653-64.
- Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J. M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y. & Inoue, J. 2008. The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity*, 29, 423-37.
- Allenspach E, Rawlings D. J. & Scharenberg A. M. 2003-2013. X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH & K, S. (eds.) *GeneReviews [Internet]*.
- Anderson, M. S., Venzani, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. & Mathis, D. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298, 1395-401.
- Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D. & Sugamura, K. 2001. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol*, 167, 1-5.
- Baggio, L. L. & Drucker, D. J. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132, 2131-57.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempe, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres,

- S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W. & Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 17, 456-61.
- Bassing, C. H., Swat, W. & Alt, F. W. 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, 109 Suppl, S45-55.
- Beauchemin, M. L. & Babel, J. 1973. Proceedings: A preliminary study on the ultrastructure of the pig retina. *Exp Eye Res*, 17, 400.
- Bebbee, T. W., Dominguez, C. E. & Chandler, D. S. 2012. Mouse models of SMA: tools for disease characterization and therapeutic development. *Hum Genet*, 131, 1277-93.
- Bermejo-Alvarez, P., Ramos-Ibeas, P. & Gutierrez-Adan, A. 2012. Solving the "X" in embryos and stem cells. *Stem Cells Dev*, 21, 1215-24.
- Berson, E. L. 1993. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 1659-76.
- Bertram, L., Lill, C. M. & Tanzi, R. E. 2010. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, 68, 270-81.
- Betthausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S. & Bishop, M. 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol*, 18, 1055-9.
- Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301, 527-30.
- Braekevelt, C. R. 1983. Fine structure of the retinal rods and cones in the domestic pig. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 220, 273-8.

- Brehm, M. A., Cuthbert, A., Yang, C., Miller, D. M., DiIorio, P., Laning, J., Burzenski, L., Gott, B., Foreman, O., Kavirayani, A., Herlihy, M., Rossini, A. A., Shultz, L. D. & Greiner, D. L. 2010. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation. *Clin Immunol*, 135, 84-98.
- Buckley, R. H., Schiff, S. E., Sampson, H. A., Schiff, R. I., Markert, M. L., Knutsen, A. P., Hershfield, M. S., Huang, A. T., Mickey, G. H. & Ward, F. E. 1986. Development of immunity in human severe primary T cell deficiency following haploidentical bone marrow stem cell transplantation. *J Immunol*, 136, 2398-407.
- Buckley, R. H., Schiff, S. E., Schiff, R. I., Markert, L., Williams, L. W., Roberts, J. L., Myers, L. A. & Ward, F. E. 1999. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 340, 508-16.
- Buckley, R. H. 2002. Primary cellular immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, 109, 747-57.
- Buckley, R. H. 2010. B-cell function in severe combined immunodeficiency after stem cell or gene therapy: a review. *J Allergy Clin Immunol*, 125, 790-7.
- Buckley, R. H., Win, C. M., Moser, B. K., Parrott, R. E., Sajaroff, E. & Sarzotti-Kelsoe, M. 2013. Post-transplantation B cell function in different molecular types of SCID. *J Clin Immunol*, 33, 96-110.
- Cao, X., Shores, E. W., Hu-Li, J., Anver, M. R., Kelsall, B. L., Russell, S. M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E. T. & et al. 1995. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*, 2, 223-38.
- Carlson, D. F., Tan, W., Lillico, S. G., Stverakova, D., Proudfoot, C., Christian, M., Voytas, D. F., Long, C. R., Whitelaw, C. B. & Fahrenkrug, S. C. 2012. Efficient

- TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 17382-7.
- Carramolino, L., Zaballos, A., Kremer, L., Villares, R., Martín, P., Ardavín, C., Martínez-A, C. & Márquez, G. 2001. Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood*, 97, 850-7.
- Chase, C. C. L. & Lunney, J. K. 2012. "16 Immune System" in Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz K. J. & Stevenson, G. W.(Editors) *Diseases of Swine (10th Edition)*, 227-50.
- Chesne, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. & Renard, J. P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 20, 366-9.
- Chuah, M. K., Nair, N. & VandenDriessche, T. 2012. Recent progress in gene therapy for hemophilia. *Hum Gene Ther*, 23, 557-65.
- Dai, Y., Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H., Phelps, C. J., Ball, S., Monahan, J. A., Jobst, P. M., McCreath, K. J., Lamborn, A. E., Cowell-Lucero, J. L., Wells, K. D., Colman, A., Polejaeva, I. A. & Ayares, D. L. 2002. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 20, 251-5.
- Danner, R., Chaudhari, S. N., Rosenberger, J., Surls, J., Richie, T. L., Brumeanu, T. D. & Casares, S. 2011. Expression of HLA class II molecules in humanized NOD.Rag1KO.IL2RgcKO mice is critical for development and function of human T and B cells. *PLoS One*, 6, e19826.
- Deschenes, S. M., Puck, J. M., Dutra, A. S., Somberg, R. L., Felsburg, P. J. & Henthorn, P. S. 1994. Comparative mapping of canine and human proximal Xq and genetic analysis of canine X-linked severe combined immunodeficiency. *Genomics*, 23, 62-8.

- Dewan, M. Z., Uchihara, J. N., Terashima, K., Honda, M., Sata, T., Ito, M., Fujii, N., Uozumi, K., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., Kubuki, Y., Okayama, A., Toi, M., Mori, N. & Yamamoto, N. 2006. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood*, 107, 716-24.
- DiSanto, J. P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. & Rajewsky, K. 1995. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 377-81.
- Donoso, L. A., Edwards, A. O., Frost, A., Vrabec, T., Stone, E. M., Hageman, G. S. & Perski, T. 2001. Autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy. *Surv Ophthalmol*, 46, 149-63.
- Edwards, A. O., Miedziak, A., Vrabec, T., Verhoeven, J., Acott, T. S., Weleber, R. G. & Donoso, L. A. 1999. Autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy: I. Clinical characterization, longitudinal follow-up, and evidence for a common ancestry in families linked to chromosome 6q14. *Am J Ophthalmol*, 127, 426-35.
- Elyaman, W., Bradshaw, E. M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renauld, J. C., Kuchroo, V. K. & Khoury, S. J. 2009. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12885-90.
- Fan, N. & Lai, L. 2013. Genetically modified pig models for human diseases. *J Genet Genomics*, 40, 67-73.
- Felsburg, P. J., Somberg, R. L., Hartnett, B. J., Suter, S. F., Henthorn, P. S., Moore, P. F., Weinberg, K. I. & Ochs, H. D. 1997. Full immunologic reconstitution following nonconditioned bone marrow transplantation for canine X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood*, 90, 3214-21.
- Felsburg, P. J., Somberg, R. L., Hartnett, B. J., Henthorn, P. S. & Carding, S. R. 1998. Canine X-linked severe combined immunodeficiency. A model for investigating

- the requirement for the common gamma chain (gamma c) in human lymphocyte development and function. *Immunol Res*, 17, 63-73.
- Felsburg, P. J., Hartnett, B. J., Henthorn, P. S., Moore, P. F., Krakowka, S. & Ochs, H. D. 1999. Canine X-linked severe combined immunodeficiency. *Vet Immunol Immunopathol*, 69, 127-35.
- Flanagan, S. P. 1966. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*, 8, 295-309.
- Friedrich, W., Honig, M. & Muller, S. 2007. Long-term follow-up in patients with severe combined immunodeficiency treated by bone marrow transplantation. *Immunologic Research*, 38, 165-173.
- Fry, T. J. & Mackall, C. L. 2002. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*, 99, 3892-904.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. & Lazzari, G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424, 635.
- Gascan, H., Gauchat, J. F., Roncarolo, M. G., Yssel, H., Spits, H. & de Vries, J. E. 1991. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med*, 173, 747-50.
- Geha R. S. & Rosen F. S. 2007. *Case Studies in Immunology: A Clinical Companion* , 81-7.
- Gimeno, R., Weijer, K., Voordouw, A., Uittenbogaart, C. H., Legrand, N., Alves, N. L., Wijnands, E., Blom, B. & Spits, H. 2004. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/- gammac-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood*, 104, 3886-93.

- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D. & Anderson, D. 1994. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J*, 13, 2822-30.
- Gock, H., Nottle, M., Lew, A. M., d'Apice, A. J. & Cowan, P. 2011. Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 25, 9-20.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Mombaerts, P., Tonegawa, S. & Zlotnik, A. 1994. Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation. *J Immunol*, 152, 4783-92.
- Gowen, L. C., Johnson, B. L., Latour, A. M., Sulik, K. K. & Koller, B. H. 1996. Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet*, 12, 191-4.
- Greiner, D. L., Shultz, L. D., Yates, J., Appel, M. C., Perdrizet, G., Hesselton, R. M., Schweitzer, I., Beamer, W. G., Shultz, K. L., Pelsue, S. C. & et al. 1995. Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *Am J Pathol*, 146, 888-902.
- Grubb, B. R. & Boucher, R. C. 1999. Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev*, 79, S193-214.
- Guilbault, C., Saeed, Z., Downey, G. P. & Radzioch, D. 2007. Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 36, 1-7.
- Gurdon, J. B. 1962. The transplantation of nuclei between two species of *Xenopus*. *Dev Biol*, 5, 68-83.
- Haddad, E., Le Deist, F., Aucouturier, P., Cavazzana-Calvo, M., Blanche, S., De Saint Basile, G. & Fischer, A. 1999. Long-term chimerism and B-cell function after bone marrow transplantation in patients with severe combined

- immunodeficiency with B cells: A single-center study of 22 patients. *Blood*, 94, 2923-30.
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W. & Zhou Q. 2014. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 24, 372-5.
- Hakem, R., de la Pompa, J. L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F., Firpo, E., Hui, C. C., Roberts, J., Rossant, J. & Mak, T. W. 1996. The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*, 85, 1009-23.
- Hao, Y. H., Yong, H. Y., Murphy, C. N., Wax, D., Samuel, M., Rieke, A., Lai, L., Liu, Z., Durtschi, D. C., Welbern, V. R., Price, E. M., McAllister, R. M., Turk, J. R., Laughlin, M. H., Prather, R. S. & Rucker, E. B. 2006. Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Res*, 15, 739-50.
- Hartnett, B. J., Henthorn, P. S., Moore, P. F., Weinberg, K. I., Ochs, H. D. & Felsburg, P. J. 1999. Bone marrow transplantation for canine X-linked severe combined immunodeficiency. *Vet Immunol Immunopathol*, 69, 137-44.
- Hartnett, B. J., Yao, D., Suter, S. E., Ellinwood, N. M., Henthorn, P. S., Moore, P. E., McSweeney, P. A., Nash, R. A., Brown, J. D., Weinberg, K. I. & Felsburg, P. J. 2002. Transplantation of X-linked severe combined immunodeficient dogs with CD34+ bone marrow cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8, 188-97.
- Hasegawa, M., Kawai, K., Mitsui, T., Taniguchi, K., Monnai, M., Wakui, M., Ito, M., Suematsu, M., Peltz, G., Nakamura, M. & Suemizu, H. 2011. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun*, 405, 405-10.
- Hayakawa, J., Hsieh, M. M., Uchida, N., Phang, O. & Tisdale, J. F. 2009. Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2Rgamma(null) mice. *Stem Cells*, 27, 175-82.

- Herbach, N., Goeke, B., Schneider, M., Hermanns, W., Wolf, E. & Wanke, R. 2005. Overexpression of a dominant negative GIP receptor in transgenic mice results in disturbed postnatal pancreatic islet and beta-cell development. *Regul Pept*, 125, 103-17.
- Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J. M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T. & Takahama, Y. 2008. The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity*, 29, 438-50.
- Honma, D., Uenishi, H., Hiraiwa, H., Watanabe, S., Tang, W., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., Yasue, H. & Sakimura, K. 2003. Cloning and characterization of porcine common gamma chain gene. *J Interferon Cytokine Res*, 23, 101-11.
- Hu, Z., Van Rooijen, N. & Yang, Y. G. 2011. Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. *Blood*, 118, 5938-46.
- Hu, Z. & Yang, Y. G. 2012. Full reconstitution of human platelets in humanized mice after macrophage depletion. *Blood*, 120, 1713-6.
- Huntington, N. D., Legrand, N., Alves, N. L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H. & Di Santo, J. P. 2009. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med*, 206, 25-34.
- Ikebe, M., Miyakawa, K., Takahashi, K., Ohbo, K., Nakamura, M., Sugamura, K., Suda, T., Yamamura, K. & Tomita, K. 1997. Lymphohaematopoietic abnormalities and systemic lymphoproliferative disorder in interleukin-2 receptor gamma chain-deficient mice. *Int J Exp Pathol*, 78, 133-48.
- Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I. R., Hubert, F. X., Scott, H. S., Takahama, Y., Holländer, G. A. & Reith, W. 2008. Autoantigen-specific

- interactions with CD4⁺ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity*, 29, 451-63.
- Ishii, N., Takeshita, T., Kimura, Y., Tada, K., Kondo, M., Nakamura, M. & Sugamura, K. 1994. Expression of the IL-2 receptor gamma chain on various populations in human peripheral blood. *Int Immunol*, 6, 1273-7.
- Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., Watanabe, T., Akashi, K., Shultz, L. D. & Harada, M. 2005. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood*, 106, 1565-73.
- Ishikawa, F., Niino, H., Iino, T., Yoshida, S., Saito, N., Onohara, S., Miyamoto, T., Minagawa, H., Fujii, S., Shultz, L. D., Harada, M. & Akashi, K. 2007. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood*, 110, 3591-660.
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T. & Nakahata, T. 2002. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100, 3175-82.
- Ito, M., Kobayashi, K. & Nakahata, T. 2008. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol*, 324, 53-76.
- Jiang, L., Lai, L., Samuel, M., Prather, R. S., Yang, X. & Tian, X. C. 2008. Expression of X-linked genes in deceased neonates and surviving cloned female piglets. *Mol Reprod Dev*, 75, 265-73.
- Kashiwakura, Y., Mimuro, J., Onishi, A., Iwamoto, M., Madoiwa, S., Fuchimoto, D., Suzuki, S., Suzuki, M., Sembon, S., Ishiwata, A., Yasumoto, A., Sakata, A., Ohmori, T., Hashimoto, M., Yazaki, S. & Sakata, Y. 2012. Porcine model of hemophilia A. *PLoS One*, 7, e49450.

- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. & Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095-8.
- Kennedy, D. R., McLellan, K., Moore, P. F., Henthorn, P. S. & Felsburg, P. J. 2009. Effect of ex vivo culture of CD34+ bone marrow cells on immune reconstitution of XSCID dogs following allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15, 662-70.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S. & Peschon, J. J. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*, 191, 771-80.
- Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J., Hwang, W. S., Hossein, M. S., Kim, J. J., Shin, N. S., Kang, S. K. & Lee, B. C. 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, 9, 130-7.
- Kimura, Y., Takeshita, T., Kondo, M., Ishii, N., Nakamura, M., Van Snick, J. & Sugamura, K. 1995. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int Immunol*, 7, 115-20.
- Kirchgessner, C. U., Patil, C. K., Evans, J. W., Cuomo, C. A., Fried, L. M., Carter, T., Oettinger, M. A. & Brown, J. M. 1995. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science*, 267, 1178-83.
- Klug, D. B., Carter, C., Gimenez-Conti, I. B. & Richie, E. R. 2002. Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol*, 169, 2842-5.
- Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K. & Sugamura, K. 1993. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science*, 262, 1874-7.

- Kovanen, P. E. & Leonard, W. J. 2004. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev*, 202, 67-83.
- Kraft, T. W., Allen, D., Petters, R. M., Hao, Y., Peng, Y. W. & Wong, F. 2005. Altered light responses of single rod photoreceptors in transgenic pigs expressing P347L or P347S rhodopsin. *Mol Vis*, 11, 1246-56.
- Kragh, P. M., Nielsen, A. L., Li, J., Du, Y., Lin, L., Schmidt, M., Bogh, I. B., Holm, I. E., Jakobsen, J. E., Johansen, M. G., Purup, S., Bolund, L., Vajta, G. & Jorgensen, A. L. 2009. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res*, 18, 545-58.
- Kuhn, R., Rajewsky, K. & Muller, W. 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 254, 707-10.
- Kumaki, S., Sasahara, Y., Kamachi, Y., Muramatsu, H., Morio, T., Goi, K., Sugita, K., Urabe, T., Takada, H., Kojima, S., Tsuchiya, S. & Hara, T. 2013. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol*, 98, 355-60.
- Lai, A. Y. & Kondo, M. 2007. Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6311-6.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R. J. & Prather, R. S. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295, 1089-92.
- Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S. & Yang, Y. G. 2006. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood*, 108, 487-92.

- Lang, J., Kelly, M., Freed, B. M., McCarter, M. D., Kedl, R. M., Torres, R. M. & Pelanda, R. 2013. Studies of lymphocyte reconstitution in a humanized mouse model reveal a requirement of T cells for human B cell maturation. *J Immunol*, 190, 2090-101.
- Lee, B. C., Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J., Hossein, M. S., Kim, J. J., Kang, S. K., Schatten, G. & Hwang, W. S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 436, 641.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P. & Zeviani, M. 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80, 155-65.
- Leuchs, S., Saalfrank, A., Merkl, C., Flisikowska, T., Edlinger, M., Durkovic, M., Rezaei, N., Kurome, M., Zakhartchenko, V., Kessler, B., Flisikowski, K., Kind, A., Wolf, E. & Schnieke, A. 2012. Inactivation and inducible oncogenic mutation of p53 in gene targeted pigs. *PLoS One*, 7, e43323.
- Levine, A. J. & Oren, M. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, 9, 749-58.
- Li, Z., Sun, X., Chen, J., Liu, X., Wisely, S. M., Zhou, Q., Renard, J. P., Leno, G. H. & Engelhardt, J. F. 2006. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol*, 293, 439-48.
- Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S. & Ma, A. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*, 9, 669-76.
- Lorson, M. A., Spate, L. D., Samuel, M. S., Murphy, C. N., Lorson, C. L., Prather, R. S. & Wells, K. D. 2011. Disruption of the Survival Motor Neuron (SMN) gene in pigs using ssDNA. *Transgenic Res*, 20, 1293-304.

- Lowry, P. A., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Hesselton, R. M., Kittler, E. L., Tiarks, C. Y., Rao, S. S., Reilly, J., Leif, J. H., Ramshaw, H., Stewart, F. M. & Quesenberry, P. J. 1996. Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2, 15-23.
- Luo, Y., Bolund, L. & Sorensen, C. B. 2011. Pig gene knockout by rAAV-mediated homologous recombination: comparison of BRCA1 gene knockout efficiency in Yucatan and Gottingen fibroblasts with slightly different target sequences. *Transgenic Res*, 21, 671-6.
- Lyon, M. F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190, 372-3.
- Macchi, P., Villa, A., Giliani, S., Sacco, M. G., Frattini, A., Porta, F., Ugazio, A. G., Johnston, J. A., Candotti, F., O'Shea, J. J. & et al. 1995. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*, 377, 65-8.
- Mak, W., Nesterova, T. B., de Napoles, M., Appanah, R., Yamanaka, S., Otte, A. P. & Brockdorff, N. 2004. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, 303, 666-9.
- Malanson, K. M. & Lem, J. 2009. Rhodopsin-mediated retinitis pigmentosa. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 88, 1-31.
- Manley, N. R. & Condie, B. G. 2010. Transcriptional regulation of thymus organogenesis and thymic epithelial cell differentiation. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 92, 103-20.
- Mantis, N. J., Rol, N. & Corthésy B. 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol*. 4, 603-11.

- Mao, H., James, T., Schwein, A., Shabashvili, A. E., Hauswirth, W. W., Gorbatyuk, M. S. & Lewin, A. S. 2011. AAV delivery of wild-type rhodopsin preserves retinal function in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther*, 22, 567-75.
- Mashimo, T., Takizawa, A., Voigt, B., Yoshimi, K., Hiai, H., Kuramoto, T. & Serikawa, T. 2010. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*, 5, e8870.
- Mashimo, T., Takizawa, A., Kobayashi, J., Kunihiro, Y., Yoshimi, K., Ishida, S., Tanabe, K., Yanagi, A., Tachibana, A., Hirose, J., Yomoda, J., Morimoto, S., Kuramoto, T., Voigt, B., Watanabe, T., Hiai, H., Tateno, C., Komatsu, K. & Serikawa, T. 2012. Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Rep*, 2, 685-94.
- McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H., Colman, A., Schnieke, A. E. & Kind, A. J. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405, 1066-9.
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M. & Weissman, I. L. 1988. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 241, 1632-9.
- Miyawaki, K., Yamada, Y., Yano, H., Niwa, H., Ban, N., Ihara, Y., Kubota, A., Fujimoto, S., Kajikawa, M., Kuroe, A., Tsuda, K., Hashimoto, H., Yamashita, T., Jomori, T., Tashiro, F., Miyazaki, J. & Seino, Y. 1999. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14843-7.
- Myers, L. A., Patel, D. D., Puck, J. M. & Buckley, R. H. 2002. Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival. *Blood*, 99, 872-8.

- Nicolini, F. E., Cashman, J. D., Hogge, D. E., Humphries, R. K. & Eaves, C. J. 2004. NOD/SCID mice engineered to express human IL-3, GM-CSF and Steel factor constitutively mobilize engrafted human progenitors and compromise human stem cell regeneration. *Leukemia*, 18, 341-7.
- Noben-Trauth, N., Shultz, L. D., Brombacher, F., Urban, J. F., Jr., Gu, H. & Paul, W. E. 1997. An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10838-43.
- Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S. M., Ziegler, S. F., Tsang, M., Cao, X. & Leonard, W. J. 1993a. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science*, 262, 1877-80.
- Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W. & Leonard, W. J. 1993b. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*, 73, 147-57.
- Nolen, L. D., Gao, S., Han, Z., Mann, M. R., Gie Chung, Y., Otte, A. P., Bartolomei, M. S. & Latham, K. E. 2005. X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev Biol*, 279, 525-40.
- Nosaka, T., van Deursen, J. M., Tripp, R. A., Thierfelder, W. E., Witthuhn, B. A., McMickle, A. P., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. & Ihle, J. N. 1995. Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science*, 270, 800-2.
- Nowak, E. C., Weaver, C. T., Turner, H., Begum-Haque, S., Becher, B., Schreiner, B., Coyle, A. J., Kasper, L. H. & Noelle, R. J. 2009. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med*, 206, 1653-60.
- Nowell, C. S., Farley, A. M. & Blackburn, C. C. 2007. Thymus organogenesis and development of the thymic stroma. *Methods Mol Biol*, 380, 125-62.

- Ohbo, K., Suda, T., Hashiyama, M., Mantani, A., Ikebe, M., Miyakawa, K., Moriyama, M., Nakamura, M., Katsuki, M., Takahashi, K., Yamamura, K. & Sugamura, K. 1996. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood*, 87, 956-67.
- Olsson, J. E., Gordon, J. W., Pawlyk, B. S., Roof, D., Hayes, A., Molday, R. S., Mukai, S., Cowley, G. S., Berson, E. L. & Dryja, T. P. 1992. Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron*, 9, 815-30.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. & Perry, A. C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289, 1188-90.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H. C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P. L. & Leonard, W. J. 2002. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*, 298, 1630-4.
- Pantelouris, E. M. & Hair, J. 1970. Thymus dysgenesis in nude (nu nu) mice. *J Embryol Exp Morphol*, 24, 615-23.
- Park, S. Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T. & Saito, T. 1995. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity*, 3, 771-82.
- Parrish, Y. K., Baez, I., Milford, T. A., Benitez, A., Galloway, N., Rogerio, J. W., Sahakian, E., Kagoda, M., Huang, G., Hao, Q. L., Sevilla, Y., Barsky, L. W., Zielinska, E., Price, M. A., Wall, N. R., Dovat, S. & Payne, K. J. 2009. IL-7 Dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow. *J Immunol*, 182, 4255-66.
- Pek, E. A., Chan, T., Reid, S. & Ashkar, A. A. 2011. Characterization and IL-15 dependence of NK cells in humanized mice. *Immunobiology*, 216, 218-24.

- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D. & Davison, B. L. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*, 180, 1955-60.
- Petters, R. M., Alexander, C. A., Wells, K. D., Collins, E. B., Sommer, J. R., Blanton, M. R., Rojas, G., Hao, Y., Flowers, W. L., Banin, E., Cideciyan, A. V., Jacobson, S. G. & Wong, F. 1997. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol*, 15, 965-70.
- Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D. L., Colman, A. & Campbell, K. H. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407, 86-90.
- Prather, R. S., Lorson, M., Ross, J. W., Whyte, J. J. & Walters, E. 2013. Genetically Engineered Pig Models for Human Diseases. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1, 203-219.
- Puck, J. M., Nussbaum, R. L. & Conley, M. E. 1987. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest*, 79, 1395-400.
- Puck, J. M., Stewart, C. C. & Nussbaum, R. L. 1992. Maximum-likelihood analysis of human T-cell X chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Hum Genet*, 50, 742-8.
- Railey, M. D., Lokhnygina, Y. & Buckley, R. H. 2009. Long-term clinical outcome of patients with severe combined immunodeficiency who received related donor bone marrow transplants without pretransplant chemotherapy or post-transplant GVHD prophylaxis. *J Pediatr*, 155, 834-840.e1.

- Randall, T. D., Carragher, D. M. & Rangel-Moreno, J. 2008. Development of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*, 26, 627-50.
- Rao, K., Amrolia, P. J., Jones, A., Cale, C. M., Naik, P., King, D., Davies, G. E., Gaspar, H. B. & Veys, P. A. 2005. Improved survival after unrelated donor bone marrow transplantation in children with primary immunodeficiency using a reduced-intensity conditioning regimen. *Blood*, 105, 879-85.
- Rathinam, C., Poueymirou, W. T., Rojas, J., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Rongvaux, A., Eynon, E. E., Manz, M. G. & Flavell, R. A. 2011. Efficient differentiation and function of human macrophages in humanized CSF-1 mice. *Blood*, 118, 3119-28.
- Reiner, A., Dragatsis, I. & Dietrich, P. 2011. Genetics and neuropathology of Huntington's disease. *Int Rev Neurobiol*, 98, 325-72.
- Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., von Waldthausen, D. C., Kessler, B., Ulrichs, K., Chodnevskaja, I., Moskalenko, V., Amselgruber, W., Goke, B., Pfeifer, A., Wanke, R. & Wolf, E. 2010. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*, 59, 1228-38.
- Rogers, C. S., Hao, Y., Rokhlina, T., Samuel, M., Stoltz, D. A., Li, Y., Petroff, E., Vermeer, D. W., Kabel, A. C., Yan, Z., Spate, L., Wax, D., Murphy, C. N., Rieke, A., Whitworth, K., Linville, M. L., Korte, S. W., Engelhardt, J. F., Welsh, M. J. & Prather, R. S. 2008a. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest*, 118, 1571-7.
- Rogers, C. S., Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Ostedgaard, L. S., Rokhlina, T., Taft, P. J., Rogan, M. P., Pezzulo, A. A., Karp, P. H., Itani, O. A., Kabel, A. C., Wohlford-Lenane, C. L., Davis, G. J., Hanfland, R. A., Smith, T. L., Samuel, M., Wax, D., Murphy, C. N., Rieke, A., Whitworth, K., Uc, A., Starner, T. D.,

- Brogden, K. A., Shilyansky, J., McCray, P. B., Jr., Zabner, J., Prather, R. S. & Welsh, M. J. 2008b. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, 321, 1837-41.
- Rongvaux, A., Willinger, T., Takizawa, H., Rathinam, C., Auerbach, W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Eynon, E. E., Stevens, S., Manz, M. G. & Flavell, R. A. 2011. Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2378-83.
- Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E. E., Flavell, R. A. & Manz, M. G. 2013. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol*, 31, 635-74.
- Rosen, E. M., Fan, S., Pestell, R. G. & Goldberg, I. D. 2003. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol*, 196, 19-41.
- Ross, J. W., Fernandez de Castro, J. P., Zhao, J., Samuel, M., Walters, E., Rios, C., Bray-Ward, P., Jones, B. W., Marc, R. E., Wang, W., Zhou, L., Noel, J. M., McCall, M. A., DeMarco, P. J., Prather, R. S. & Kaplan, H. J. 2012. Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 501-7.
- Russell, S. M., Keegan, A. D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Friedmann, M. C., Miyajima, A., Puri, R. K., Paul, W. E. & et al. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science*, 262, 1880-3.
- Russell, S. M., Tayebi, N., Nakajima, H., Riedy, M. C., Roberts, J. L., Aman, M. J., Migone, T. S., Noguchi, M., Markert, M. L., Buckley, R. H., O'Shea, J. J. & Leonard, W. J. 1995. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science*, 270, 797-800.

- Sarzotti-Kelsoe, M., Win, C. M., Parrott, R. E., Cooney, M., Moser, B. K., Roberts, J. L., Sempowski, G. D. & Buckley, R. H. 2009. Thymic output, T-cell diversity, and T-cell function in long-term human SCID chimeras. *Blood*, 114, 1445-53.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. & Younkin, S. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2, 864-70.
- Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A. & Horak, I. 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*, 352, 621-4.
- Schwarz, B., Sambandam, A., Maillard, I., Harman, B., Love, P. & Bhandoola, A. 2007. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *Journal of Immunology*, 178, 2008-2017.
- Sears, E. H., Gartman, E. J. & Casserly, B. P. 2011. Treatment options for cystic fibrosis: state of the art and future perspectives. *Rev Recent Clin Trials*, 6, 94-107.
- Senda, S., Wakayama, T., Yamazaki, Y., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R. & Shiota, K. 2004. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 38-44.
- Shi, D., Lu, F., Wei, Y., Cui, K., Yang, S., Wei, J. & Liu, Q. 2007. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod*, 77, 285-91.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. & Westhusin, M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415, 859.

- Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V., Greiner, D. L. & et al. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*, 154, 180-91.
- Shultz, L. D., Saito, Y., Najima, Y., Tanaka, S., Ochi, T., Tomizawa, M., Doi, T., Sone, A., Suzuki, N., Fujiwara, H., Yasukawa, M. & Ishikawa, F. 2010. Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 13022-7.
- Sinkora, M., Sinkora, J., Reháková, Z. & Butler, J. E. 2000. Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J Immunol*, 165, 1832-9.
- Sleigh, J. N., Gillingwater, T. H. & Talbot, K. 2011. The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Dis Model Mech*, 4, 457-67.
- Sommer, J. R., Estrada, J. L., Collins, E. B., Bedell, M., Alexander, C. A., Yang, Z., Hughes, G., Mir, B., Gilger, B. C., Grob, S., Wei, X., Piedrahita, J. A., Shaw, P. X., Petters, R. M. & Zhang, K. 2011. Production of ELOVL4 transgenic pigs: a large animal model for Stargardt-like macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 95, 1749-54.
- Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 139-76.
- Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Pezzulo, A. A., Ramachandran, S., Rogan, M. P., Davis, G. J., Hanfland, R. A., Wohlford-Lenane, C., Dohrn, C. L., Bartlett, J. A., Nelson, G. A. t., Chang, E. H., Taft, P. J., Ludwig, P. S., Estin, M., Hornick, E. E., Launspach, J. L., Samuel, M., Rokhlina, T., Karp, P. H., Ostedgaard, L. S., Uc, A., Starner, T. D., Horswill, A. R., Brogden, K. A., Prather, R. S., Richter, S. S.,

- Shilyansky, J., McCray, P. B., Jr., Zabner, J. & Welsh, M. J. 2010. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med*, 2, 29ra31.
- Strowig, T., Rongvaux, A., Rathinam, C., Takizawa, H., Borsotti, C., Philbrick, W., Eynon, E. E., Manz, M. G. & Flavell, R. A. 2011. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2^{-/-}gamma(c)^{-/-} mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 13218-23.
- Suemizu, H., Hasegawa, M., Kawai, K., Taniguchi, K., Monnai, M., Wakui, M., Suematsu, M., Ito, M., Peltz, G. & Nakamura, M. 2008. Establishment of a humanized model of liver using NOD/Shi-scid IL2Rgnull mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 248-52.
- Suzuki, H., Duncan, G. S., Takimoto, H. & Mak, T. W. 1997. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med*, 185, 499-505.
- Suzuki, M., Takahashi, T., Katano, I., Ito, R., Ito, M., Harigae, H., Ishii, N. & Sugamura, K. 2012. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γnull mouse. *Int Immunol*, 24, 243-52.
- Takenaka, K., Prasolava, T. K., Wang, J. C., Mortin-Toth, S. M., Khalouei, S., Gan, O. I., Dick, J. E. & Danska, J. S. 2007. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 8, 1313-23.
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M. & Sugamura, K. 1992. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science*, 257, 379-82.
- Tanaka, S., Saito, Y., Kunisawa, J., Kurashima, Y., Wake, T., Suzuki, N., Shultz, L. D., Kiyono, H. & Ishikawa, F. 2012. Development of mature and functional human

- myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2 γ KO mice. *J Immunol*, 188, 6145-55.
- Tchieu, J., Kuoy, E., Chin, M. H., Trinh, H., Patterson, M., Sherman, S. P., Aimiwu, O., Lindgren, A., Hakimian, S., Zack, J. A., Clark, A. T., Pyle, A. D., Lowry, W. E. & Plath, K. 2010. Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. *Cell Stem Cell*, 7, 329-42.
- Tomkin, G. H. & Owens, D. 2012. LDL as a Cause of Atherosclerosis. *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal*, 5, 13-21.
- Townsend, J. M., Fallon, G. P., Matthews, J. D., Smith, P., Jolin, E. H. & McKenzie, N. A. 2000. IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity*, 13, 573-83.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J. C., Lanzavecchia, A. & Manz, M. G. 2004. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science*, 304, 104-7.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R. L. & Takahama, Y. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*, 200, 493-505.
- Umeyama, K., Watanabe, M., Saito, H., Kurome, M., Tohi, S., Matsunari, H., Miki, K. & Nagashima, H. 2009. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res*, 18, 697-706.
- van Ewijk, W., Holländer, G., Terhorst, C. & Wang, B. 2000. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development*, 127, 1583-91.
- Vernau, W., Hartnett, B. J., Kennedy, D. R., Moore, P. F., Henthorn, P. S., Weinberg, K. I. & Felsburg, P. J. 2007. T cell repertoire development in XSCID dogs following

- nonconditioned allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13, 1005-15.
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E. & Murray, R. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med*, 181, 1519-26.
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. & Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394, 369-74.
- Walsh, D. M. & Teplow, D. B. 2012. Alzheimer's disease and the amyloid β -protein. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 107, 101-24.
- Wani, N. A., Wernery, U., Hassan, F. A., Wernery, R. & Skidmore, J. A. 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 82, 373-9.
- Watanabe, S., Iwamoto, M., Suzuki, S., Fuchimoto, D., Honma, D., Nagai, T., Hashimoto, M., Yazaki, S., Sato, M. & Onishi, A. 2005. A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin. *Biol Reprod*, 72, 309-15.
- Watanabe, S., Terashima, K., Ohta, S., Horibata, S., Yajima, M., Shiozawa, Y., Dewan, M. Z., Yu, Z., Ito, M., Morio, T., Shimizu, N., Honda, M. & Yamamoto, N. 2007. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood*, 109, 212-8.
- Welsh, M. J., Rogers, C. S., Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K. & Prather, R. S. 2009. Development of a porcine model of cystic fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 120, 149-62.

- Whyte, J. J., Samuel, M., Mahan, E., Padilla, J., Simmons, G. H., Arce-Esquivel, A. A., Bender, S. B., Whitworth, K. M., Hao, Y. H., Murphy, C. N., Walters, E. M., Prather, R. S. & Laughlin, M. H. 2011. Vascular endothelium-specific overexpression of human catalase in cloned pigs. *Transgenic Res*, 20, 989-1001.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A. & Alt, F. W. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3, 521-30.
- Willinger, T., Rongvaux, A., Takizawa, H., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Auerbach, W., Eynon, E. E., Stevens, S., Manz, M. G. & Flavell, R. A. 2011. Human IL-3/GM-CSF knock-in mice support human alveolar macrophage development and human immune responses in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2390-5.
- Willis, A., Jung, E. J., Wakefield, T. & Chen, X. 2004. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene*, 23, 2330-8.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-3.
- Wirth, B. 2000. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat*, 15, 228-37.
- Woods, G. L., White, K. L., Vanderwall, D. K., Li, G. P., Aston, K. I., Bunch, T. D., Meerdo, L. N. & Pate, B. J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301, 1063.
- Wurbel, M. A., Malissen, B. & Campbell, J. J. 2006. Complex regulation of CCR9 at multiple discrete stages of T cell development. *Eur J Immunol*, 36, 73-81.

- Xing, Y., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. 2013. Thymoproteasome subunit- $\beta 5T$ generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 6979-84.
- Xue, F., Tian, X. C., Du, F., Kubota, C., Taneja, M., Dinnyes, A., Dai, Y., Levine, H., Pereira, L. V. & Yang, X. 2002. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, 31, 216-20.
- Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N. & Fujiwara, S. 2008. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis*, 198, 673-82.
- Yamagata, K. 2003. Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J*, 50, 491-9.
- Yamauchi, T., Takenaka, K., Urata, S., Shima, T., Kikushige, Y., Tokuyama, T., Iwamoto, C., Nishihara, M., Iwasaki, H., Miyamoto, T., Honma, N., Nakao, M., Matozaki, T. & Akashi, K. 2013. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood*, 121, 1316-25.
- Yang, D., Wang, C. E., Zhao, B., Li, W., Ouyang, Z., Liu, Z., Yang, H., Fan, P., O'Neill, A., Gu, W., Yi, H., Li, S., Lai, L. & Li, X. J. 2010. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Mol Genet*, 19, 3983-94.
- Yang, D., Yang, H., Li, W., Zhao, B., Ouyang, Z., Liu, Z., Zhao, Y., Fan, N., Song, J., Tian, J., Li, F., Zhang, J., Chang, L., Pei, D., Chen, Y. E. & Lai, L. 2011. Generation of PPARgamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 21, 979-82.

- Zanoteli, E., Maximino, J. R., Conti Reed, U. & Chadi, G. 2010. Spinal muscular atrophy: from animal model to clinical trial. *Funct Neurol*, 25, 73-9.
- Zanotti, C., Caimi, L. & Imberti, L. 2012. Severe Combined Immunodeficiency Patients: Immune Recovery After Stem Cell Transplantation. *Stem cells and cancer stem cells*.
- Zhou, Q., Renard, J. P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A. & Cozzi, J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 302, 1179.
- Zhu, M. H., Berry, J. A., Russell, S. M. & Leonard, W. J. 1998. Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1-independent functional recruitment of Jak3 to Il-2Rbeta. *J Biol Chem*, 273, 10719-25.
- 保田 昌宏 2009. 動物の腸管付属リンパ組織の形態と機能 日本家畜臨床感染症研究会誌, 4, 78-87.

謝辞

本稿を終えるにあたり、学生時代の恩師でもあり、本研究論文の取りまとめの際にも、終始ご懇篤なご指導をいただきました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学研究室の山内啓太郎准教授に深く感謝の意を表します。

本研究遂行にあたり、暖かくご指導・ご鞭撻をいただきました独立行政法人農業生物資源研究所医用モデルブタ研究開発ユニットの前ユニット長（現・日本大学教授）、大西彰博士に深く感謝いたします。また、本研究遂行にあたり、暖かいご協力・ご支援をいただきました、同ユニットの淵本大一郎博士、千本正一郎博士、中井美智子博士、鈴木美佐枝氏、渡邊直美氏、飯島一子氏に深く感謝いたします。

本研究遂行にあたり、クローンブタ作製過程を中心に全般的なご協力をいただきました、プライムテック株式会社の岩元正樹博士、大石貴嗣氏、橋本径子氏、矢崎智子氏に深く感謝いたします。また、FACS 解析を中心に、本研究全般に関しご支援・ご指導をいただきました、石川文彦博士をはじめとする、理化学研究所ヒト疾患モデル研究グループの皆様にも深く感謝いたします。また、骨髄移植の際にご協力をいただきました、三室淳博士をはじめとする、自治医科大学分子病態研究部の皆様にも深く感謝いたします。

本研究遂行にあたり、マイクロサテライト解析の際にご協力いただきました、農業生物資源研究所家畜ゲノム研究ユニット、美川智博士に深く感謝いたします。また、病理解析に関してご協力をいただきました、元動物衛生研究所動物疾病対策センター、久保正法博士に深く感謝いたします。

本研究遂行にあたり、ターゲティングベクターの構築に使用したプラスミドを提供してくださった、大阪大学の八木健教授に深く感謝いたします。また、試験に供したブタの飼養管理・採材などに当たり、多大なご協力を頂いた、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、畜産草地研究所業務 2 科の職員の皆様および砂田弘毅氏に深く感謝いたします。

最後に、公私にわたりこれまでの研究生生活を支えてくださった多くの方々に謝意を表します。