教育講演

個体の遺伝子操作による新しい実験医学¹勝 木 元 也²

はじめに

そもそも医術とは、ヒトを身体的苦痛や不自由や、あるいは社会的不適応から解放し、社会のなかでその生を寿命まで全うさせるための技術のことである。医学は、このヒトの病気を治す医術から発展し、ヒトの生物学を基礎とする科学となった。科学である以上、実証的研究による法則の発見が重要な意味をもつ。かつてクロード・ベルナールは、その著『実験医学序説』(1865)のなかで動物実験を行って実験的検証を得ることこそ、医学が科学の体裁を備える道であると説いている。このことでもわかるとおり、実験医学とは動物実験に根ざした医学研究のことである。しかし、医学は今も術である。しかし、術の背後にどれほどの科学があり、どれだけの自然法則との調和があるかを常に知る必要があるし、その知識の総量が多くの場合、医学を普遍性のある学問にする。

近代医学は、感染症や薬物中毒など、外来性の因子による病気に対して、抗生物質の発見と発明、ワクチンの発明と普及、解毒剤の開発などによって対応してきた。このような近代医学の知識と治療法の開発とによって、日本のような先進国では良好な栄養状態の普及とともに、長寿社会がもたらされた。しかし、感染症が克服されたと思ったのはまちがいで、次々に新たなウイルスや細菌がはびこり、抗生物質に抵抗性の遺伝子をもつ細菌や真菌が生まれてきた。個別の戦いは始まったばかりのものもある。それでも昔に比べれば感染症は克服された。それは、免疫学など普遍性の高い医学知識の蓄積によっている。このような感染症の克服にもかかわらず、ヒトは病気になり続ける。それ

には何か原因があるはずだが、その最大のものが遺伝的な要因と考えられるようになった。たとえば、特定の病気にかかるか否かに関係する免疫のシステムは、個々人の遺伝的素因に大きく依存していることや、動脈硬化には脂質代謝に関与する遺伝的素因が関係していることが明らかになってきた。

ところで、病気を知るには、普通は、症状、すなわち表現型が頼りとなる。われわれは頭が重い、お腹が痛いといって病院に行くけれども、そこでは症状から診断が下され、病名がつき、薬をもらったり、精密検査に回されたり、ときにはすぐに入院となる。同じ症状でもさまざまな病気が考えられるのである。医師が症状や検査結果を見て経験に照らして病気を診断していることはいうまでもない。しかし、真の病因と治療法の背後にある科学的知識が、自信をもって語られることは、むしろまれであろう。

科学的知識を得るには原因と結果との関係を実証的に研究する以外に道がない。ヒトが実験の対象にならない以上、ヒトだけを相手にする医療の現場からは確実な知識を得ることは困難である。そこでヒトに替わる実験対象として実験動物を用いた動物実験が行われる。動物実験は症状を手がかりにし、よく似た症状を示す動物を探すことから始まる。同じ様な症状であれば、ヒトの病気と同じ原因によって病気を起こしている可能性が高いと考えられるからである。

遺伝病の場合、モデルとなる動物の症状がヒトとよく似ていれば、動物の遺伝解析を行い、結果的にヒトと同じ病因遺伝子が見出されることもある。

一方、病気のヒトの細胞から異常遺伝子を発見できるようになってきた。このような研究が進むと、同じ症状のマウスとヒトとでその症状の原因となる遺伝子異常が発見され、それを比較することができる。しかし、これまでの経験では、せっかく症状が同じでも、まったく違う原因であることのほうが圧倒的に多いのだ。それは、出発点を症状におき、頭が重いとか、熱がでたなどの共通性が認められても、風邪をひいた場合もあれば、食あたりの場合もあるのと同じことである (Fig. 1)。このように、単純に症状状

¹ 1996年11月、平成8年度日本動脈硬化学会冬季大会(金沢)において発表。

² 東京大学医科学研究所

A new system for experimental medicine: Gene manipulation of the mouse

Katsuki Motoya: The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

原稿受取日: 1997年4月10日

Fig. 1 症状モデルの研究戦略.

Fig. 2 ヒト疾患モデル創造による研究戦略.

けを比べたのでは原因の解明は困難である。

現在では、多くの病気がなんらかの遺伝子の異常に起因しているといわれている。そこで、遺伝子の異常を同一にした実験動物を作ることができれば、症状のように曖昧な尺度によらず、病因が同一の実験動物モデルになるに違いない。しかし、遺伝子操作を動物個体に施すことなど不可能なことと思われていた。それを可能にしたのは、遺伝子工学の著しい進歩と、発生工学の登場とである。

1980年を境にして、マウス個体の遺伝子操作が可能になった。また、遺伝子工学の発展により、ヒトの遺伝子が次々に単離され、その遺伝子の生物学的機能を調べたり、個体の遺伝子操作によるモデル動物の作成が可能になったのである。

こうして、症状と表現型との相似性で、モデル動物を探し、病因となる遺伝子異常に到達するという過程をとってきた実験医学の研究は、現在では、まず病因となる遺伝子

が単離され、つづいて、その病因と同じ遺伝子異常をもつマウスを作り、実験的研究を行えるようになったのである (Fig. 2)。

ここで、個体の遺伝子操作の発展過程を見てみよう。

I. 遺伝子操作技術の発展経緯

ヒトを対象とする個体の遺伝子操作は多くの倫理的かつ技術的な問題をはらんでいるが、動物個体の遺伝子操作の技術的な可能性は以前から検討されてきた。そして、1960年代に、畜産、獣医学分野の研究者が、哺乳動物の胚を体外で培養したり、凍結保存してアメリカから日本に輸送したり、初期胚や受精卵でさまざまな操作を加えたのち個体にまで発生させる技術を検討してきた。こうして、体外受精や体外培養などの技術が開発された。

しかし、胚を体外で培養するだけでは目的を達成できない。哺乳動物は体内で育つため、体外培養しても胎盤や子

宮という環境が必要だからだ。現状では、人工子宮や人工胎盤ができていない。そこで、体外培養した胚を母親の卵管や子宮に戻す技術が確立した。今では胚を操作した後、その仔動物を生ませることができるまでに技術が進歩した。

1970年代の半ばから種々の生物からさまざまな遺伝子が単離されるようになると、遺伝子工学の研究者はその機能を知るために体外で培養されている細胞に注目した。最初は、株化された培養細胞であったが、やがて、マウスの受精卵に焦点が当てられた。胎内の胚に遺伝子を注入することは難しそうで、初めからあきらめていたが、体外にあれば、顕微鏡下で受精卵の核をみながら DNA を注入することはそれほど困難ではないと考えられたからだ。事実、この方法は 1980 年に米国のエール大学のグループによって実現された。

マウスの受精卵に DNA を注入すると、その遺伝子はマウスの染色体の一部に組み込まれる。エール大学ではウイルスの DNA を使ったが、この技術は DNA の種類を選ばない。すぐに、ヒトの DNA も導入できることが明らかになった。

細いガラスピペットで DNA 溶液を受精卵に注入し、その受精卵を仮親に戻すと、20 日後に仔が生まれる。この仮親の体内では、1 細胞期に注入された DNA が染色体に組み込まれ、細胞が 2 倍、4 倍……と分裂するさいに、各細胞の染色体にそれぞれ分配され、やがて、マウス個体が誕生する。このとき、注入された遺伝子は全細胞に広がっている。すなわち、受精卵に注入した DNA が得られた個体のすべての細胞に組み込まれていることになる。単離されたヒトの疾病に関連する遺伝子がマウスに導入され、個体でのその機能が検討できる。このようなマウスを遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）と呼ぶ。

もちろん、生殖細胞にも組み込まれているため、導入された遺伝子はメンデルの法則に従って子孫に伝達される。すなわち、繰り返し導入遺伝子の機能が生化学的、生理学的に個体レベルで研究できるシステムが完成したといえる。

しかし、トランスジェニックマウスシステムは、導入遺伝子の染色体上の挿入部位や挿入コピー数を制御できない欠点があった。この欠点は、新たな遺伝子破壊を生む危険性と、設計どおりの組織特異的遺伝子発現が実現しないことがあるという本質的な要素を潜在的にもっていた。

ところが、最近のバイオサイエンスは、標的遺伝子組換え（ジーンターゲッティング）法という革命的な方法の開発によって、マウス個体の遺伝子を、ある程度自由に操作できるまでに進歩した。

ジーンターゲッティング法は、今のところマウスでしか

Fig. 3 ES 細胞から個体マウスを作る方法。

実現できない。それは、胚幹細胞（ES 細胞）と呼ばれる個体にまで発生分化できる特殊な性質の細胞株がマウスでのみ樹立されているからである。ES 細胞は、シャーレのなかでは、未分化のまま、ほぼ無限に増殖する。ところが、この細胞を、正常に発生している胚盤胞に注入し、キメラマウスを作ると、生殖細胞を含む個体のすべての細胞種に分化する。したがって、このキメラマウスの子孫を採れば、ES 細胞の遺伝情報をもつ個体が得られることになる（Fig. 3）。

この革命的ともいえるジーンターゲッティング法を使えば、細胞レベルで標的とする遺伝子を計画的に任意の塩基配列に置換することができる。

II. ヒト型動物実験モデルの作成

標的組換え法の詳細については他に多くの綜説が書かれているので、それを参考にさせていただきとして、ここでは、われわれが最近新しく提案し、確立した方法をセロトニン受容体 1B の遺伝子置換を例に紹介する。

セロトニンは中枢神経系の神経伝達物質の一つである。セロトニンは、レセプター（受容体）を介して働くことが知られており、セロトニン受容体遺伝子もサブタイプのいくつかが単離されている。サブタイプのなかには、マウスとヒトとで薬理作用の異なるものが見出される。特に、サブタイプ 1B の遺伝子がクローニングされ、薬理作用がふたたび調べられた結果、第 7 番目の膜貫通部分に存在する 355 番目のアミノ酸がヒトではスレオニン（Thr）であるが、ラットやマウスではアスパラギン（Asn）であり、この 1 アミノ酸の変異をヒトの細胞に導入すると、セロトニンに対する反応は不変であるにもかかわらず、スマトリプタンなどの薬理作用は完全にラットやマウス型に変換した。

以上のことは、薬理的な動物実験に対して一つの警告

を発している。ヒトで作用する薬剤が動物で働かないからといって、ヒトで作用している受容体が存在しないと考えるてはならないことである。また、わずかなアミノ酸配列の相異によってラットやマウスがセロトニン受容体 1B の関与する薬理学的研究のモデル動物になり得ないことが示された。

この問題を解決するには、従来であれば実験系を変えるか、好運に期待しながら、偶然に得られるかもしれないラットやマウスのセロトニン受容体 1B 突然変異を待つことぐらいであったらう。

われわれは、この問題を解決できる良い方法を開発した。それは、ジーンターゲティング法を二段階に用いる標的遺伝子置換法である。この方法を用いれば、目的とする標的遺伝子をマウス型からヒト型に変換させたマウス個体を作ることができる (Fig. 5)。

III. 二段階相同組換えによる標的遺伝子置換法

ジーンターゲティングは導入遺伝子がどのくらいの頻度で相同組換えをおこすかによって可能か否かが決まるが、一般的には、DNA 導入細胞の 0.1% 以下であると推定されている。G418 耐性の細胞株のほとんどは、ランダムな染色体の位置に組み込まれるから、このなかから、1,000～10,000 個に 1 個の割合で含まれる目的のクローンを得るのは容易でない。しかし最近では、多くの研究者によって、10～100 個の G418 耐性細胞株をとれば 1 個は必ず相同組換え体に当たるような工夫がなされている。

ところで、Fig. 4 に示す方法からは、挿入突然変異は容易に作れても、点突然変異を導入したり、ヒトの相同遺伝子と置換することは難しい。まして、薬剤耐性遺伝子を除くことは原理的に不可能である。そこで、マウスセロトニン受容体 1B 遺伝子をヒト型、特に第 355 番目のアミノ酸をアスパラギンからスレオニンに変換するには、もうひとつ工夫を凝らす必要がある。

G418 耐性で選択したように、他の選択マーカーをもう一つ加えて、しかも 2 段階で遺伝子を相同組換えによって置換したときに細胞が耐性になるようなマーカー遺伝子を

Fig. 4 標準的遺伝子組換え。

Fig. 5 二段階標的遺伝子置換法。

用いられよう。

そこで Fig. 5 に示すような方法を考えた。マウスセロトニン受容体 1B 遺伝子はイントロンのない遺伝子である。そこで、この遺伝子のエクソン部分に、neo 遺伝子および大腸菌のグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Eco-gpt) 遺伝子を重連に並べて構築する (neo-gpt カセット)。第一段階の相同組換えを G418 耐性を指標にして行い neo-gpt カセットをもつ相同組換え体を選択する。この細胞は、Eco-gpt 遺伝子をもつため、培地中に 6 チオグアニン (6TG) が存在すると、これを ES 細胞の DNA に取り込み、DNA のそれ以上の伸長がはばまれ、結果として死滅することが知られている。もし第二段階で、Eco-gpt が染色体から除去された相同組換えがおきれば、その細胞は、6TG 耐性であることが推定される。逆に考えてみれば、6TG 耐性を指標にして、第二段階のジーンターゲティングを行えば、得られる 6TG 耐性株の中に相同組換え体が含まれているはずである。

Fig. 5 をたどっていただければ理解されると思うが、最初染色体がマウス型であった ES 細胞から、neo-gpt カセットによる挿入変異体を得られ、次に第二段階のターゲティングによって、第 355 番目のアミノ酸がアスパラギンからスレオニンへと置換できるはずである。そして、実際にできたのである。

IV. 今後の展望

われわれの二段階法による標的遺伝子置換法は、原理的には遺伝子の構造を自在に変換できるものである。プロモーター領域はもちろん、イントロンをなくし cDNA で置換することもできるし、ヒトの相同遺伝子とも置き換え得る。また点突然変異や欠失はもちろん、キメラ遺伝子にすることも可能である。

たとえば、中枢のグルタミン酸受容体やカテコールアミン受容体の機能の修飾を自在な点突然変異の導入によって作り出すことができるはずである。

以上のように、セロトニン受容体のみならず今後発見されるであろうヒトと動物との間の分子レベルにおける薬理的あるいは生理学的なギャップを、この方法で変換された遺伝子を用いることによって、一挙に埋め得るのではなかろうか。

その意味で医学研究のための、まったく新しい動物実験システムが誕生しつつあることを確信する。

おわりに

ES 細胞株に遺伝子を導入し、標的とする遺伝子を任意の塩基配列に変換した突然変異株を作ることが可能となった。

すなわち、ヒトの病気の原因として見出された遺伝子をマウスの遺伝子と置き換えることも原理的には可能になった。ヒト疾患の原因遺伝子を遺伝子操作によりマウスに移植することができる。

従来は、表現型や症状から出発し、症状の類似性を頼りに動物のなかからヒト疾患のモデルを探し出し、その遺伝解析から遺伝子に到達していた。これはこれで重要な側面

をもっていたが、この方法で原因遺伝子に到達してもヒトとモデル動物とではとれた遺伝子がまったく異なってしまうなど、あてが外れる場合が多かった。現在では、ヒトの症状から出発して遺伝解析を行い、遺伝子を単離し、相同性を利用してマウスの相同遺伝子を単離し、さらにそれを胚操作を通して遺伝子導入個体をつくり、表現型を解析することによって、ふたたびヒトに還元して得られる知識をもとに、さらに精細な解析を行うような研究戦略がとられている (Fig. 2)。

それによって得られるマウスの表現型がヒトの表現型と同じかどうかは、必ずしも保証できないが、病因は明らかに同じである。ヒト疾患の症状から出発し、遺伝子解析を行い、原因遺伝子に到達し、その遺伝子をヒトではできない遺伝子操作によってマウスの相同遺伝子と置き換え、マウスの個体レベルでの研究を行い、それをヒトに還元することが可能となったといえる。

もし、遺伝子を移植してもヒトに認められるような病気の症状が出てこなければ、マウスとヒトとの違いを再度検討することになる。いずれにしても Fig. 2 に示すような個体の遺伝子操作をとおしての現代のバイオサイエンスの大きな輪が回り始めることになる。

医学の研究は、ヒトの生物学の研究である。この輪のなかでモデル系が使えることこそが、実験の対象となりえないヒトの研究を実証的な科学にする道といえよう。

文 献

- 1) 勝木元也：ヒト疾患モデル研究の夜明け。分子医科学シリーズ 1, DNA 研究と医学, pp 63-86, メディカルヴェー社, 東京, 1996