

# 遺伝子ノックアウトマウス作製と免疫応答解析への利用

高井 俊行

岡山大学工学部生物応用工学科

## 1 遺伝子ノックアウトマウスとは

細胞レベルあるいは動物の個体レベルで遺伝子機能を阻害する方法として現在、どのような技術が用いられているのであろうか。

- 蛋白質の特異的阻害剤の利用
- 抗体による蛋白質機能の不活性化
- 遺伝子欠損変異体の検索
- アンチセンス・オリゴヌクレオチドによる翻訳阻害
- ドミナント・ネガティブ (優性阻害変異) 転スジェニックマウスの作製
- 遺伝子ノックアウトマウスの作製

などが主な方法と言えるが、このうち特定の遺伝子の機能を完全に消失させることのできる方法が、最後に挙げた遺伝子ノックアウトマウスの作製である。1980年代後半に開発されたこの方法<sup>1)</sup>は、瞬く間に全世界に広がり、既に多くの遺伝子ノックアウトマウスが作製された。更に現在でも極めて多くのグループがこの技術の利用に取り組んでいる。これほどまでにこの技術が注目される理由として、

- 目的とする遺伝子のみを任意に変異、欠損させることができる
- マウスの個体レベルでの解析が可能であるという2点を挙げることができる。しかしながら、改良が重ねられているとはいえ、現在でもこの技術はかなり難しい部類に属すると思われる。その理由の第一は、

○マウス初期胚由来の多分化能を持った胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES cell) の培養が難しく、長期培養によって多分化能が失われ、その結果ジャームライン・トランスミッションの効率が低下する

という点である。ジャームライン・トランスミッション、つまりノックアウトされたゲノムがマウスの子孫に伝達されないと、それまで費やした労

力と時間と費用は全て無に帰してしまう。その他の欠点として、

- シングルコピーの遺伝子に限られる
- ノックアウトした結果の表現形質がはっきり現れないことがある
- 致死的変異になることがある
- ランニングコストが高い
- 技術の習得を必要とする
- 約1.5年から2年を要する

など、多くの問題点がある。逆に言えば、多くの場合これらの問題点を克服するだけの価値をノックアウトマウスに見い出せるかどうかポイントになる。

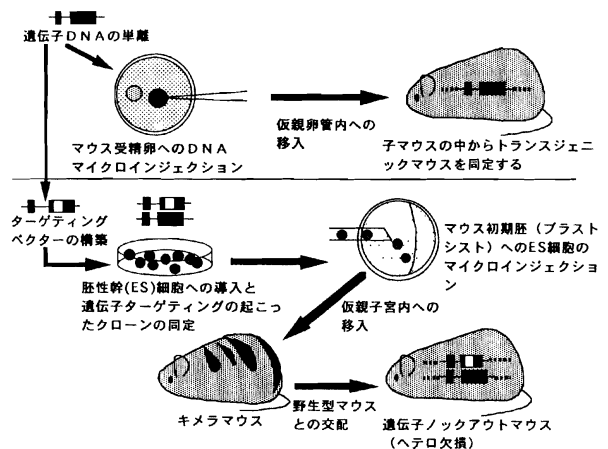


図1 遺伝子ノックアウトマウスの作製

手順上半分はトランスジェニックマウス、下半分はノックアウトマウスの作製手順を示す。

図1に、遺伝子ノックアウトマウスの作製までの手順を示した。従来のトランスジェニックマウスの作製方法は、まずクローン化された遺伝子を発

現可能な形にしておき、マウス受精卵の雄性前核に微細なガラスピペットを使ってマイクロインジェクションする。これを偽妊娠マウス卵管内へ移入して出産させ、これらの子マウスの中から導入した遺伝子を安定に発現しているトランスジェニックマウスを同定し、交配により繁殖させるという、比較的シンプルなものである。導入遺伝子が発現された際、正常な内在性遺伝子の機能を隠蔽するように仕組まれたものをドミナント・ネガティブ・トランスジェニックと呼び、ひとつの有用な遺伝子機能阻害の方法である。一方、遺伝子ノックアウトマウスの作製方法は、やや複雑なステップを踏む。まず、目的とする遺伝子をターゲティングにより破壊するためのベクターを構築し、マウスES細胞にトランスフェクトする。目的とするターゲティングの起こったES細胞クローンを同定し、これをマウス初期胚（プラストシスト）にマイクロインジェクションする。偽妊娠マウス子宮管内に移入して出産させ、ES細胞と宿主側マウスとのキメラを得る。キメラマウスと野生型マウスとの交配により、ES細胞由来のゲノムを有するヘテロ欠損マウスを得、これらどうしの交配により、ホモ欠損個体を得る。実際の詳細な手技に関しては、成書を参照願いたい<sup>2)3)</sup>。

## 2 Fcレセプター $\gamma$ 鎖遺伝子ノックアウトマウスの作製

Fcレセプター (FcR) は、抗体を中心とする体液性免疫と、エフェクター細胞を中心とする細胞性免疫の間の橋渡し役となる重要な分子群である。

1980年代後半に遺伝子クローニングにより詳細な構造が解明され、これらが免疫グロブリン・スーパーファミリーに属するひとつの遺伝子群を構成することが明らかになった<sup>4)</sup>。これまで構造が解明されているマウスのFcRには、IgEに対する高親和性レセプターであるFc $\epsilon$ RI、IgGの高親和性レセプターであるFc $\gamma$ RI、そしてIgGの低親和性レセプターのFc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIIIなどがあり(図2)、それぞれが発現される血球系細胞の分布は複雑である。これらFcRの個々の機能を確定しようとする試みは、抗FcR抗体の特異性に限界があることや、各FcRの仲介するレスポンスがお互いにオーバーラップし合っていることなどが原因で曖昧さを残してしまう。筆者らは各FcRの機能と役割分担を明らかにする目的で、遺伝子ノックアウトによるFc $\gamma$ 鎖

欠損マウスを作製し、興味深い知見を得たので<sup>5)</sup>、以下にこの研究のねらい、ノックアウトマウス作製のプロセスおよび解析結果について簡単に紹介したい。

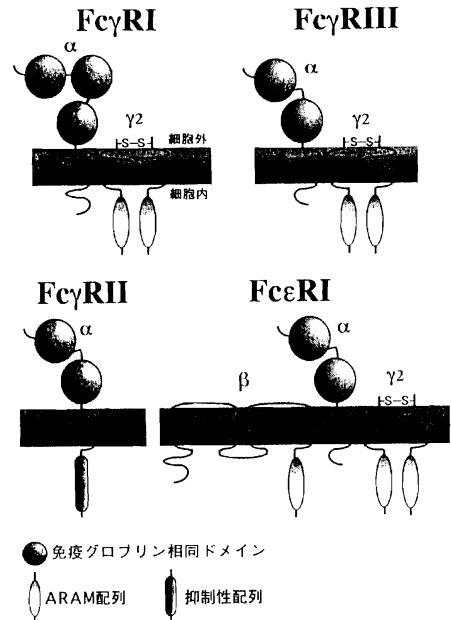


図2 マウスFcレセプターの構造

免疫グロブリン・スーパーファミリーに属するマウスFcR $\alpha$ 鎖は、細胞外に免疫グロブリン相同ドメインを2個あるいは3個有し、免疫グロブリンのFc部分と結合する。Fc $\gamma$ RIIの細胞内領域には、B細胞で抑制性シグナルを伝達するモチーフがある。その他のタイプのFcR $\alpha$ 鎖は、シグナル伝達を仲介するARAM配列をもつ $\beta$ 鎖や $\gamma$ 鎖ダイマーとアソシエートしている。

FcR $\gamma$ 鎖は、もともとFc $\epsilon$ RIを構成するサブユニットのひとつとして同定された、分子量約7800の膜結合型タンパクである<sup>6)</sup>。この分子は、Fc $\gamma$ RIIIの細胞表面上への発現に必須であることや<sup>6)7)</sup>、T細胞レセプター(TCR)・CD3複合体と鎖との構造的、機能的相同性が示され、細胞内領域にantigen recognition activation motif (ARAM)と呼ばれるアミノ酸配列を有することがわかり、細胞内にシグナルを伝達する重要な分子であることも示されている<sup>8)9)</sup>。また、ヒト培養単球ではFc $\gamma$ RIとも会合していることが示唆されている<sup>10)11)</sup>。するとFcR $\gamma$ 鎖遺伝子をターゲティングにより破壊することで、少なくともFc $\epsilon$ RIおよびFc $\gamma$ RIIIの

発現がブロックされた変異マウスが作成できるかも知れない。もしこのマウスが様々な免疫機能を消失した状態を示すならば、逆にこれらFcR分子の機能を確定できるはずである。筆者らの研究は、このようなねらいで始められた。

まず筆者らはFcR $\gamma$ 鎖の遺伝子クローンを129系マウス・ゲノムライブラリーから単離し、そのエクソン2にネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを挿入したターゲティング・ベクターを構築した(図3)。129系雄マウス由来のES細胞であるE14約 $5 \times 10^7$ 個にエレクトロポレーションによりトランスフェクトし、ネオマイシン・アナログであるG418および抗ヘルペス剤のひとつであるFIAUによるポジティブ・ネガティブ選択を行った。得られたコロニー225個についてサザン・プロットティングを行い、目的とする相同組み換えの起こったクローンを18個同定した。これらをC57BL/6マウスのプラストシストにマイクロインジェクションし、キメラマウスを得た。キメラズムはC57BL/6由来の黒の毛色に対する129マウス由来のagouti色(茶色)の割合で評価したが、高いものはほぼ100%であった。しかし、ES細胞が雄由来であるためにキメラが雄に片寄るというmale distortionという現象は、顕著ではなかった。雄キメラマウスと雌C57BL/6とを交配したところ、7匹のキメラマウスのうち2匹において、agoutiの毛色を持つ子マウスが生まれた。つまり、これらのキメラはES細胞のゲノムを子孫に伝達した(ジャームライン・トランスミッション)。サザン・プロットティングによりヘテロ欠損個体を同定した後、交配によりホモ欠損個体を得た。これらのマウスのマクロファージ、マスト細胞、ナチュラルキラ

ー細胞などのmRNAをRT-PCR法により解析し、正常なFcR $\gamma$ 鎖mRNAの発現が見られないことを確認した。また、蛋白レベルでも発現が見られないことを、ウエスタン・プロットティングにより確認した。

### 3 FcR $\gamma$ 鎖ノックアウトマウスの機能解析

i) マスト細胞 骨髓細胞をIL-3存在下で培養して得たマスト細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ、これらの細胞上にFc $\epsilon$ RI分子の発現は見られなかった。機能的にも、マスト細胞がIgEの架橋刺激によって示す脱顆粒、セロトニン遊離、プロスタグランジンD<sub>2</sub>の放出、IL-4遺伝子の転写などを調べても全てバックグラウンドレベルであった(図4)。これらのことから、このマウスはFc $\epsilon$ RIを介する機能を消失していることが明らかになった。なお、Dombrowiczら<sup>12)</sup>もFc $\epsilon$ RIの $\alpha$ 鎖のノックアウトにより同様の機能欠損を観察している。また筆者らは、マウスに予めジトロフェニル基(DNP)特異的IgE抗体を皮内注射しておき、後で抗原となるDNP-ヒト血清アルブミンと色素エバンスブルーを静脈注射したときに見られる受身皮膚アナフィラキシー(I型アレルギー反応)が、ノックアウトマウスにおいて著しく低下していることを観察した。即ち、in vivoレベルでも組織中のマスト細胞のFc $\epsilon$ RIが機能していないことが確かめられた。

ii) ナチュラルキラー細胞 他の多くの血球系細胞表面上には複数種のFcRが発現していることが多いが、ナチュラルキラー細胞は例外的にFc $\gamma$ RIIIしか発現しておらず、このレセプター機能を検定す

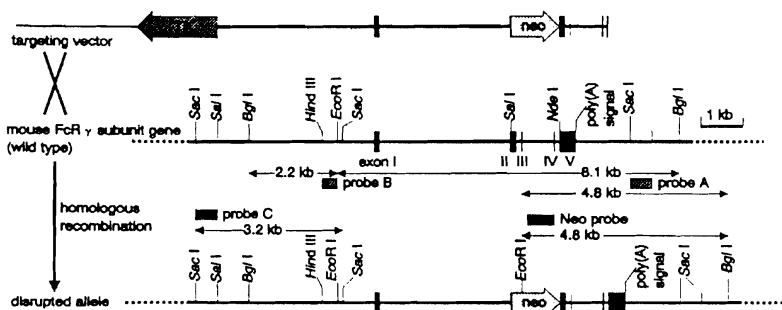


図3 FcR $\gamma$ 鎖遺伝子およびターゲティング・ベクターの構造

遺伝子の破壊およびポジティブ選択のためにFcR $\gamma$ 鎖遺伝子エクソン2にネオマイシン耐性遺伝子発現カセット(neo)を挿入し、ネガティブ選択のためにヘルペス・チミジンキナーゼ遺伝子(TK)を持つターゲティング・ベクターを構築した。目的の相同組み換えが起こるとneoが発現し、TKは除去されることになる。

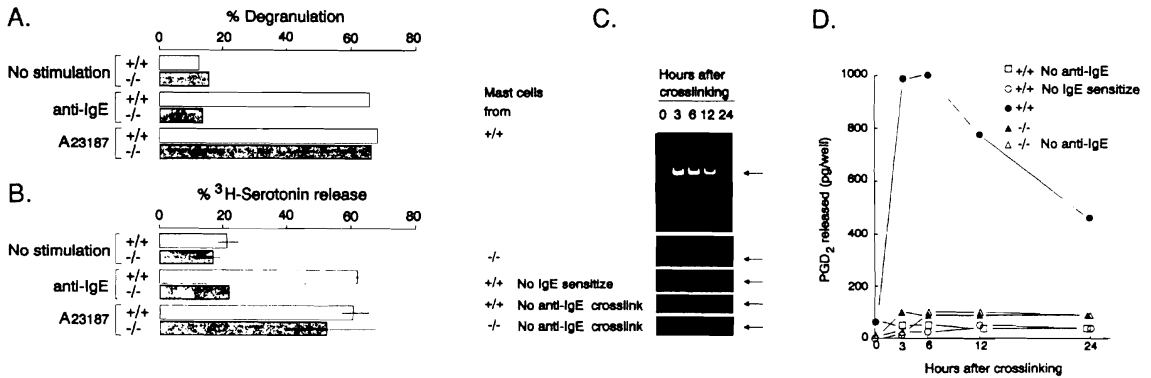


図4 マスト細胞表面上の機能的FcεRIの消失

マスト細胞をIgEで感作後、抗IgE抗体で架橋刺激したときの(A)脱顆粒、(B)<sup>3</sup>H-セロトニン遊離、(C)IL-4 mRNAの転写、(D)プロスタグランジンD<sub>2</sub>の遊離。FcγR鎖欠損マウス(-/-)ではいずれの現象もバックグラウンドレベルである<sup>9)</sup>。

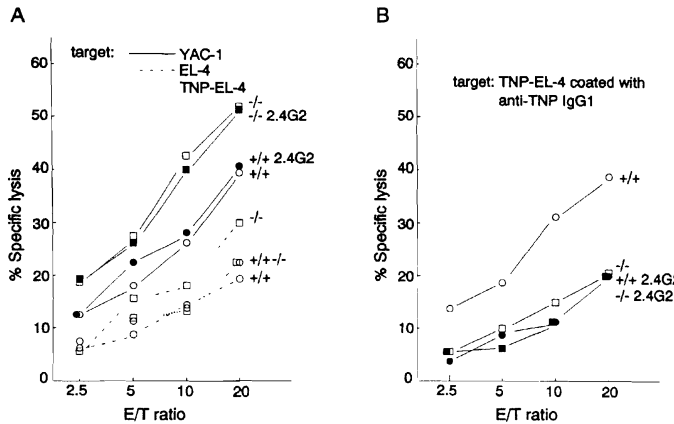


図5 ナチュラルキラー細胞のADCC活性の消失

ナチュラルキラー活性(A)とADCC活性(B)を示す。FcγR鎖ノックアウトマウスではナチュラルキラー活性が見られるが、IgGでコートされた標的細胞をFcγR IIIを介して破壊することができない<sup>9)</sup>。

る上で好都合である。ノックアウトマウス脾臓細胞からIL-2によってナチュラルキラー活性を持つ細胞集団を増殖誘導させ、フローサイトメトリーによりFcγR IIIの発現が消失している事を確認した。次にEL-4などの標的細胞をIgG抗体でコートしたものに対する抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を検定したところ、ナチュラルキラー細胞のADCC活性は検出されず、この細胞におけるFcγR IIIの機能を確定することができた(図5)。

iii) マクロファージ マウスの好中球、単球、マクロファージの細胞表面上には、FcγRI、FcγRII、FcγRIIIの3種全てのFcγRが発現しており、これらの細胞が示す抗体依存性の貪食反応や

ADCCに貢献していると考えられるが、それぞれの関与の程度ははっきりわかっていない。野生型マウスの腹腔マクロファージはIgGでコートされたヒツジ赤血球(SRBC)を細胞表面上に結合し(ロゼット形成)、かつ活発に貪食する。ところがノックアウトマウスではわずかにFcγRIIを介すると思われるロゼット形成能が残存していたが、貪食能は完全に消失していた(図6)。これは少なくともタイプIとタイプIIIのFcγRが機能を失った事を示唆している。つまりFcγRIIIの細胞表面上への発現が失われると共に、FcγRIの機能も極端に低下していると考えられるのである。ヒト単球でγ鎖がFcγRIと会合しているという報告<sup>10)11)</sup>はあるもののその機能との関係は不明であったが、マウスに

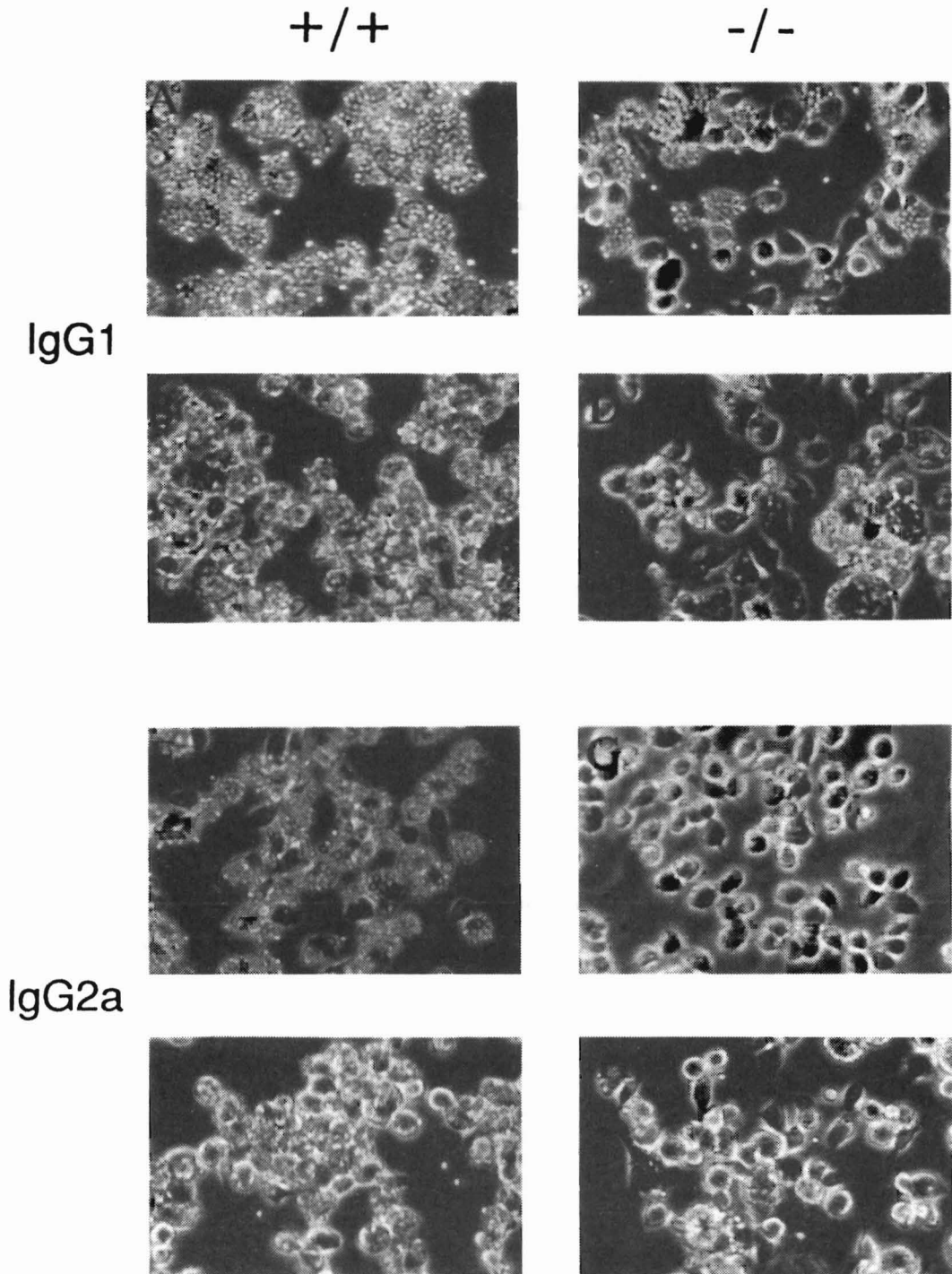


図6 FcR $\gamma$  鎖ノックアウトマウスのマクロファージは貧食活性をもたない

野生型マウス(+/+)の腹腔マクロファージはIgG1あるいはIgG2aでコートされたSRBCを結合し(第1段、第3段)、活発に貧食する(第2段、第4段)。ところがノックアウトマウス(-/-)ではSRBCとの結合がほとんど見られず(第1段、第3段)、したがって貧食も起こらない(第2段、第4段)<sup>5)</sup>。

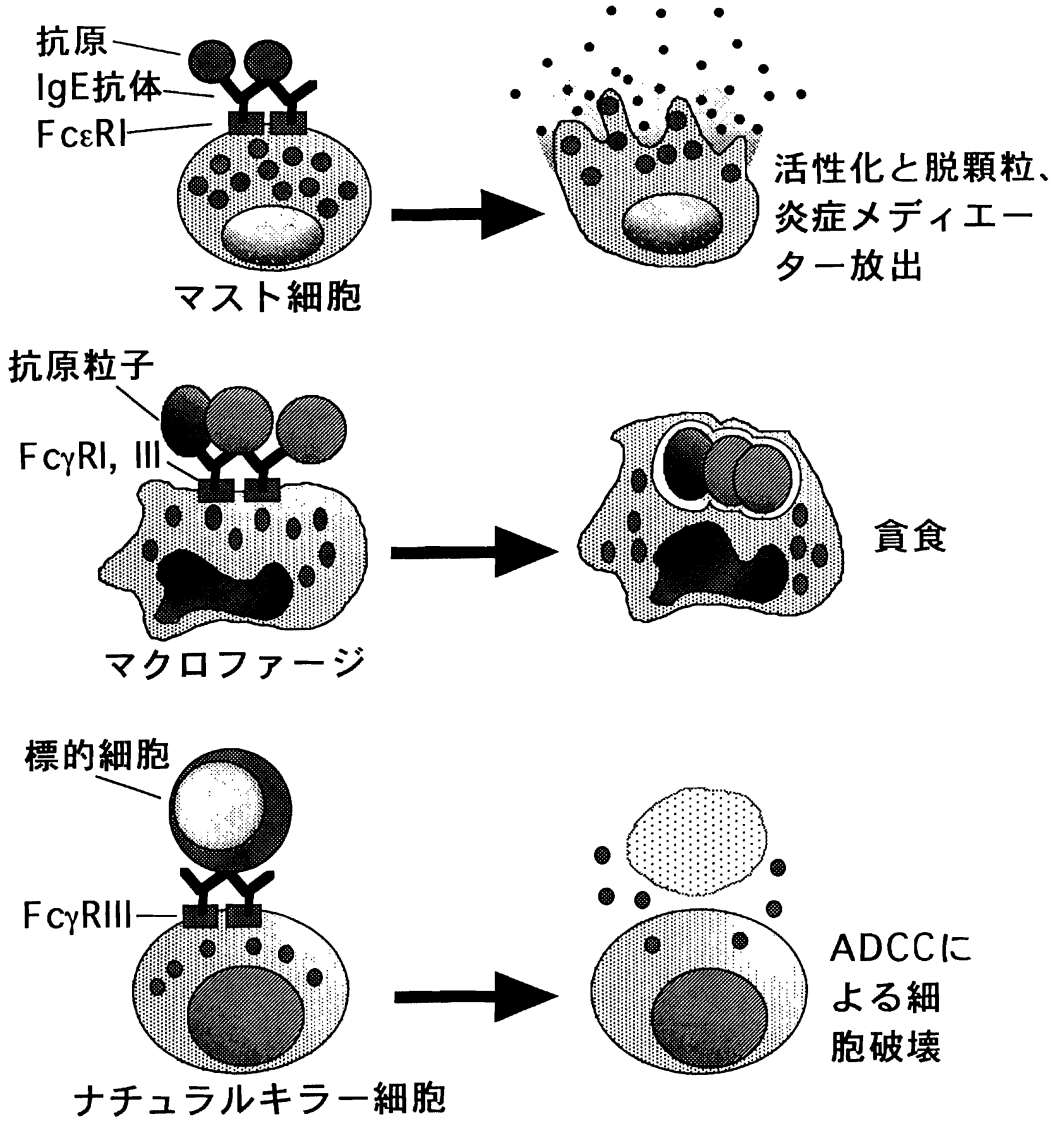


図7 FcR $\gamma$  鎖ノックアウトマウスにおいて欠損しているエフェクター機能

$\gamma$  鎖欠損マウスでは、マスト細胞表面上にFc $\epsilon$ RIが発現しないため、IgEを介する架橋刺激に応答しない。マクロファージではFc $\gamma$ RI、IIIの機能が失われ、抗体でコートされた抗原粒子に対する貪食作用が見られない。ナチュラルキラー細胞ではFc $\gamma$ RIIIの発現が見られず、標的細胞をADCC活性によって破壊できない。

において  $\gamma$  鎖は  $Fc\gamma$  RI の細胞表面上への機能的発現に重要であることがわかった。

#### iv) T 細胞、ナチュラルキラー細胞の development

$FcR\gamma$  鎖は前述のように、TCR-CD3 複合体と鎖との構造的、機能的相同性が示されている<sup>13)</sup>。Love ら<sup>14)</sup>、大野ら<sup>15)</sup>による TCR/CD3 と鎖欠損マウスでは TCR の発現が低下し、T 細胞の分化・成熟が抑制される。また、 $Fc\gamma$  RIII はナチュラルキラー細胞の development において何らかの役割を担っている可能性が指摘されていた。ところが、 $FcR\gamma$  鎖欠損マウスではナチュラルキラー細胞や T 細胞集団に顕著な変化は見られないことから、 $\gamma$  鎖や  $Fc\gamma$  RIII がこれらの細胞の development に与える影響は小さいと思われる。しかし末梢 T 細胞の亜集団において  $\gamma$  鎖が development に必要であることが示唆されており<sup>16)</sup>、これら末梢 T 細胞の機能との関係で注目される。

#### まとめ

以上のように、 $FcR\gamma$  鎖の欠損が予想以上に多くの  $FcR$  の機能消失をもたらすことが明らかになった (図7)。また、これまで曖昧さが多分に含まれていた各  $FcR$  の機能について、たいへんはっきりした形で、 $Fc\gamma$  RIII や  $Fc\epsilon$  RI の機能を確定することができた。多くの  $FcR$  の機能欠損を持つこのマウスは SPF の環境下で飼育する限りは見かけ上全く健康である。ところがマスト細胞の項で述べたように、またその後の研究により<sup>17)</sup>、in vivo の実験的アレルギーの誘導にはほとんど応答せず、これまで補体中心に考えられてきた炎症反応の開始機構を  $FcR$  中心に考え直さねばならなくなるなど<sup>18)</sup> 19)、アレルギーの発症メカニズムを探るための極めて重要な実験材料として利用されている。

ここに紹介した筆者らの研究は遺伝子ノックアウトのほんの一例に過ぎない。しかし遺伝子ノックアウトマウスの作製は、年単位の多大な労力を費やさねばならないが、その成功により学問的知見を飛躍的に増大させる可能性を秘めた重要な技術であり、今後 もいくつかの改良を重ねながら発

展していくものと考えられる。最近では、生体内のある特定の細胞種のみにおいて遺伝子欠損を誘導する方法などが実用化されつつあり<sup>20)</sup> 21)、これからのこの領域の技術開発の動向を探るうえで興味深い。

#### 文献

- 1) Capecchi, M. R.: Science, 244: 1288-1292 (1989)
- 2) Robertson, E. J., ed.: Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. IRL Press, Oxford (1987)
- 3) Joyner, A. L., ed.: Gene targeting: a practical approach. IRL Press, Oxford (1993)
- 4) Ravetch, J. V. & Kinet, J. P.: Annu. Rev. Immunol., 9: 457-492 (1991)
- 5) Takai, T. et al.: Cell, 76: 519-529 (1994)
- 6) Ra, C. et al.: J. Biol. Chem., 264: 15323-15327 (1989)
- 7) Kurosaki, T. & Ravetch, J. V.: Nature, 342: 805-807 (1989)
- 8) Paolini, R. et al.: J. Exp. Med., 181: 247-255 (1995)
- 9) Shiue, L. et al.: Mol. Cell. Biol., 15: 272-281 (1995)
- 10) Ernst, L. K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6023-6027 (1993)
- 11) Masuda, M. & Roos, D.: J. Immunol., 151: 7188-7195 (1993)
- 12) Dombrowicz, D. et al.: Cell, 75: 969-976 (1993)
- 13) Rodewald, H. R. et al.: Cell, 69: 139-150 (1992)
- 14) Love, P. E. et al.: Science, 261: 918-921 (1993)
- 15) Ohno, H. et al.: J. Exp. Med., 179: 365-369 (1994)
- 16) 朴承龍, 他 : Proc. Jpn. Soc. Immunol., 24: 400 (1994)
- 17) Sylvestre, D. L. & Ravetch, J. V.: Science, 265: 1095-1098 (1994)
- 18) Ravetch, J. V.: Cell, 78: 553-560 (1994)
- 19) Colten, H. R.: Nature, 371: 474-475 (1994)
- 20) Gu, H. et al.: Science, 265: 103-106 (1994)
- 21) Barinaga, M.: Science, 265: 26-28 (1994)