

# 個体発生のゲノム機能と分子機構の解明

融合研究機関：厚生労働省国立成育医療センター

（農業生物資源研究所動物生命科学研究所

（研究総括責任者：雨宮 浩）

## I 研究の全体計画

### 1. 研究の趣旨

本研究では、発生・分化機序の解明に基づいて小児難病および家畜繁殖障害を克服し、次世代の健康保持へ貢献することを目的とする。

少子高齢化において小児難病の克服が求められている。畜産分野では家畜の繁殖障害の克服が急務である。いずれの場合も個体の発生・分化機序の解明が重要であり、各々の分野が保有する情報を共有し技術を交流することにより課題の克服を加速することが可能となる。また、融合研究の成果は、泌乳性医薬品や医療モデルの開発など畜産の新たな産業分野の創出につながる。

国立成育医療センター研究所では疾患と結びついたヒトゲノム情報整備、ヒトゲノム情報に基づいた疾患あるいは発生・分化モデルマウスの作製を行ってきたが、治療法の開発を展望した場合、ヒトの解剖や生理に近似の家畜レベルの疾患モデルが必要である。これを達成するには遺伝子改変による形質転換家畜の作出が必要だが、わが国では農業生物資源研究所・動物生命科学研究所でのみ実施可能であり、融合研究が必須である。一方、農業生物資源研究所・動物生命科学研究所では、繁殖障害の原因遺伝子を追及してきたが、病状の把握が困難であることより原因遺伝子特定に支障をきたしている。これを達成するには国立成育医療センター研究所に蓄積されている病態と結びついたゲノム情報を活用することが責任遺伝子解明の最短距離である。このように両施設が保有する情報・技術を共有し補完することにより課題達成が促進される。

本研究では最終目標として、1) 小児難病、家畜繁殖障害について原因遺伝子の解明と障害発生機序解明、2) 初期器官形成における分子伝達機構とその障害発生機序解明、3) 形質転換家畜・マウスによる再生医学への応用を目指した新規治療基盤の整備、を設定している。これらの目標達成に向けて、テーマ1「個体発生のゲノム機能」、テーマ2「個体発生の分子機構」およびテーマ3「モデル動物を用いた解析」が協調して研究を進める。また、重点課題として、1) 発生の各時期ならびに臓器特異的な標準化cDNAチップ作製と障害解析への応用、2) 再生医学への応用を目指した免疫不全家畜の作出、を設定している。

### 2. 開放的融合研究の概要

#### 【1】 研究の概要

##### 1. テーマ1 「個体発生のゲノム機能」

先天性臓器形成異常症などの小児難病ならびに繁殖障害を高頻度で生じる豚交配モデルを用い、ゲノム情報や病態情報を共有・補完し障害責任遺伝子の構造と変異を同定する。また、情報を相互に利用して解析能を高め胎児（胎子）発生に関わる遺伝子群を整理する。

1) 眼球形成におけるSSH（ソニックヘッジホッグ）とPAX6の相互作用解析。

2) PAX6の2種類のアイソフォームについて、ニワトリ胚に電気穿孔法によって発現ベクターを導入し、その機能の差を解析する。

3) 伸張グルタミンによる細胞死の機構を解析する。伸張グルタミンの物理化学的性質を明らかとする。

4) ブタ繁殖障害関連遺伝子について、ヒトゲノム解析から当該領域の遺伝子を特定し、ブタ染色体の当該領域内での存在を確認し詳細なヒト染色体との対応地図を作製する。

5) 候補遺伝子であるTGF- $\beta$ の全エキソン領域について詳細な解析を行う。また、上記地図を基に新たな候補遺伝子探索を行う。

##### 2. テーマ2 「個体発生の分子機構」

個体発生における分子機構に着目し、胎子-胎盤-母体間での情報ネットワークを担う重要分子の同定を行う。また、シグナル伝達とアポトーシス機構解析による先天性心奇形や造血障害の発生機序の解明を行う。さらに、発生の各時期ならびに臓器特異的に発現する遺伝子カタログと標準化cDNAチップ作製を行う。

1) 子宮組織改変酵素遺伝子動態の定量的PCRによる解析を行う。

2) 胎盤特異物質の糖鎖構造の解析を行う。

3) 循環器系発生での交感神経受容体の個体生理機能の解析を行う。

4) 実験動物臓器別DNAチップの開発と臓器別遺伝子発現プロファイルの解析を行う。

5) 病態動物モデルのDNAチップによる解析を行う。

##### 3. テーマ3 「モデル動物を用いた解析」

上記2テーマの成果を基に、国立成育医療センター研究所での形質転換マウスの作出、農業生物資源研究所での形質転換家畜の作出を共同で行い小児難病モデルや動物工場などの医用動物作製および新しい家畜繁殖技術の開発を行う。

1) 組換え細胞をドナーとした核移植実験を継続し、組換

えヤギを作出する。

- 2) 得られた組換えヤギの遺伝子解析等の評価を行う。
- 3) ES細胞、血液幹細胞を用いた肝幹細胞への分化誘導を行う。
- 4) 遺伝子導入による肝幹細胞の自己複製能の増幅を達成する。
- 5) 子宮内胎仔への幹細胞移植による出生前治療法の確立と子宮内胎仔操作による胎児肝細胞のヒト幹細胞での置換を行う。
- 6) ヒトおよびマウスの造血幹細胞からBリンパ球を誘導培養しCD24ならびにCD20等の刺激伝達分子の機能を解析する。
- 7) 巨核球への特異分子発現系についてトランスジェニックマウスを用いて完成する。

#### 4. 重点課題

平成12年度から設定した重点2課題については、テーマ内およびテーマ間での連携による研究推進であり、ここに別記する。

- 1) 着床および胎盤形成に関わる特異物質のマイクロアレイによる解析、胎児肝遺伝子のマイクロアレイ作成を完了する。
- 2) クローンブタ作製手法による免疫不全ブタ（RAG1ノックアウトおよびIL2Rノックアウト）の作出、変異型RAG過剰発現ベクターによる免疫不全ウサギ作出を完了する。また、抗体およびcDNAライブラリー解析によるブタ免疫能情報整理を完了する。

### 【2】 融合への取り組みの概要

#### 1. 研究総括責任者の指導性

当初設定した3テーマは引き続き実施するとともに、2つの重点課題についてもサブテーマ間の連携を継続させる。

研究総括責任者の指導性については、1) 定例化した合同推進会議での研究進捗状況報告の義務化と効果的な研究推進の提案、2) 重点課題の目標達成に向けたサブテーマ間連携の強化、人的交流促進および特別予算措置、を行う。平成14年度は、重点研究課題のひとつである免疫不全ブタ作成に向けて米国研究者との共同研究実施を計画しており、複数研究者を現地に派遣し研究促進を図る。また、一

方の重点課題であるDNAアレイを用いたウシ初期発生発現遺伝子プロファイルに関する研究については、その成果を基盤情報（データベース）として登録するよう指導する。

開放性については、平成13年度同様、1) 研究総括責任者および主要研究者の併任措置、2) 開放融合研究員の相互施設訪問と研究実施による交流、3) 大型機器（セルソーター、DNAアレイ作成・解析装置）および特殊施設（形質転換家畜実験施設）の相互利用、4) 外国人を含む外部研究者による最新技術および情報の導入、5) 欧文原著論文作成や国際公開シンポジウム開催による情報発信、などの措置を行う。特に、平成14年度は米国研究者との共同研究によるモデル家畜作成を実現する。

#### 2. サブテーマ間の連携

重点研究としてふたつの課題を設定したが、これらの研究推進にはテーマ間の連携が必須である。DNAアレイを用いたウシ初期発生発現遺伝子プロファイルに関する研究については、テーマ2内のサブテーマ(1)（農生研グループ）とサブテーマ(2)（成育センターグループ）が連携する。免疫不全ブタ作成に関する研究については、テーマ1、サブテーマ(2)（農生研グループ）とテーマ3、サブテーマ(3)（成育センターグループ）が連携して主体的に取り組み、テーマ3、サブテーマ(1)（農生研グループ）とテーマ3、サブテーマ(2)（成育センターグループ）がそれを支える形で参加する。

#### 3. 融合への取り組み

融合性については、基本的に平成13年度に実施した項目を引き続き実施する。特に、重点研究課題の目標達成に向けては、研究グループ間の交流を従来以上に促進し確実に成果を出せるよう人的交流、技術共有ならびに資金援助を行う。また、成果の発表に際しては共同執筆を促進し、知的所有権については共同で保持できるよう配慮する。

#### 4. 融合研究推進委員会における支援の取り組み

国立小児病院から国立成育医療センターへの改組に伴い、融合研究推進委員会の構成を変更した（下記、「III融合研究推進委員会」参照）。融合研究推進委員会は、研究推進に向けての施設内研究者の交流積極化ならびに機器・場所等の利用に関する支援、併任人事の促進および関係省庁への支援、中央事務局設置の承認と事務的支援、成果の積極的公開に関する提言等を行う。

3. 年次計画

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
<b>&lt;テーマ1&gt; 個体発生のゲノム機能</b>					
サブテーマ(1): ヒト疾患遺伝子の探索とゲノム異常の同定					
① 既存遺伝子による腎・眼形成不全症の候補アプローチ	←				→
② 成長に係わるインプリンティング遺伝子解析	←		→		
③ 多因子性遺伝疾患の遺伝子解析				←	→
④ 成長因子と受容体遺伝子の異常の解析			←	→	
⑤ ブタ胚発生過程での発現遺伝子の検索	←			→	
⑥ 発生障害を起こした胚の障害時期の特定		←	→		
⑦ ヒト発育障害遺伝子情報とブタ発現遺伝子の比較	←			→	
⑧ 障害胚と正常胚の発現遺伝子の差異の検討				←	→
サブテーマ(2): 家畜の繁殖傷害関連ゲノム領域の推定					
① 繁殖障害をもつブタ家系の作成	←	→			
② 遺伝連鎖マーカーの高密度化	←			→	
③ マーカーの遺伝型解析による繁殖障害領域の特定			←		→
④ 比較地図作製による候補遺伝子の選択				←	→
⑤ 繁殖障害での細胞周期制御分子の関与				←	→
⑥ 家畜多因子障害関連遺伝子によるヒト疾患解析			←	→	
<b>&lt;テーマ2&gt; 個体発生の分子機構</b>					
サブテーマ(1): 胎子胎盤相互作用の分子機構					
① ブタ胎子, 子宮内膜の接着関連物質の解析	←			→	
② 接着関連物質の遺伝子発現様式の検討			←		→
③ ブタ妊娠初期における胚, 母体間信号物質の解析	←			→	
④ 信号物質の遺伝子発現様式の検討			←		→
⑤ 妊娠ブタの母体操作と難治疾患モデル			←		→
⑥ 信号物質受容体の遺伝子発現様式の検討			←		→
サブテーマ(2): 分子伝達機構の解明					
① 器官形成シグナル伝達受容体の細胞内局在解析	←	→			
② 腎発生分化に関する転写調節因子の解析	←				→
③ 循環器系発生での交感神経受容体の役割の解析		←			→
④ 胎盤特異物質の発現様式の解明	←			→	
⑤ PRL/GH ファミリーの構造および生物活性の解明	←			→	
⑥ 母子間情報伝達および調節機構の解明			←		→
サブテーマ(3): 細胞死・細胞周期制御の生理と病理					
① 細胞死関連新規生体分子の同定	←		→		
② 細胞周期制御関連新規生体分子の同定	←			→	
③ 細胞死機能の応用による難病治療戦略構築 (テーマ1(1)へ)					
④ 難治性疾患での細胞死・細胞周期制御障害の解明		←	→		
⑤ ヒト及びブタ細胞死関連分子の相同性解析 (テーマ1(1)へ)					
<b>&lt;テーマ3&gt; モデル動物を用いた解析</b>					
サブテーマ(1): 形質転換家畜の作出と解析					
① 形質転換ヤギ作出技術の高度化	←			→	
② 体細胞核移植による形質転換ヤギの作出	←				→

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
③ 形質転換ヤギの評価			←→		
④ ヒト疾患関連遺伝子の家畜相同遺伝子単離		←→			
サブテーマ(2)：肝組織再構築に関する研究					
① 肝幹細胞・羊膜細胞による肝再構築(課題⑥に再編成)			←→		
② 疾患モデル動物への応用			←→		
③ クローン臓器製造技術開発(課題⑥に再編成)					
④ 家畜での肝再構築モデルの作成(課題⑥に再編成)					
⑤ 肝幹細胞・羊膜細胞の分離と応用	←→				
⑥ 動物内で異種・同種動物間のハイブリッド肝の構築	←→				
サブテーマ(3)：血球の発生・分化と制御法					
① 臍帯血幹細胞単離と維持法の確立	←→				
② 胎児造血の発生・分化・増殖機構の解析	←→				
③ 小児造血障害の病態解明とモデル動物作成	←→				
④ 家畜でのヒト造血再構築		←→			
<重点研究課題>					
重点課題1：家畜初期発生発現遺伝子解析					
1. ウシ胎盤 cDNA 作成			←→		
2. ウシ胎盤 DNA マイクロアレイ作成・解析				←→	
3. ウシ肝 cDNA 作成と解析				←→	
重点課題2：免疫不全家畜作出と応用					
1. ブタ・ウサギ免疫関連遺伝子単離・構造解析			←→		
2. 発現ベクター構築・解析			←→		
3. 家畜免疫機能解析			←→		
4. 免疫不全家畜作出				←→	
所要経費(合計)	402百万円	371百万円	371百万円	378百万円	327百万円

## II 平成14年度における実施体制

研究総括責任者：雨宮 浩(国立成育医療センター研究所・元国立小児病院小児医療研究センター長)

研究項目	担当機関	研究担当者
<テーマ1> 個体発生のゲノム機能	(独)農業生物資源研究所	◎安江 博
サブテーマ(1)：ヒト疾患遺伝子の探索とゲノム異常の同定		
疾患遺伝子変異と病態解析	国立成育医療センター研究所	○山田 正夫
中枢神経変性とアポトーシス解析	国立成育医療センター研究所	宮下 俊之
疾患遺伝子変異と病態解析	国立成育医療センター病院	奥山 虎之
	国立成育医療センター研究所	田所 恵子
性分化異常に関する解析	国立成育医療センター病院	田中 敏章
	国立成育医療センター研究所	勝又 規行
内分泌代謝疾患の病態解析	国立成育医療センター研究所	早川 江

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
先天性肝疾患の責任遺伝子解析 易感染性の遺伝的背景解析	国立成育医療センター病院 国立成育医療センター研究所	香坂降夫 中尾浩 綱脇祥子 岩谷誠
各種免疫疾患の遺伝的背景解析 疾患遺伝子変異と病態解析 眼形成不全症の遺伝子変異解析 疾患遺伝子変異と病態解析	国立成育医療センター研究所 国立成育医療センター研究所 国立成育医療センター病院 国立成育医療センター病院	四宮貴久 鹿間芳明 東 範行 宮内潤
ブタゲノム情報のヒト疾患解析への応用 性分化異常に関する解析 遺伝子マッピング解析 アポトーシス関連遺伝子解析 DNA修復遺伝子に関する解析 疾患遺伝子変異と病態解析	国立がんセンター (独)農業生物資源研究所 東京電力病院 帝京大学 東京医科歯科大学 慶応大学 国立成育医療センター研究所	大木操 安江博 緒方勤 高野貴子 水谷修紀 瀬川薫
ブタ胎子 cDNA ライブラリー作成 サブテーマ(2)：家畜の繁殖障害関連ゲノム領域の推定	国立成育医療センター研究室	恒松由記子 長尾和右子 於保祐子 渡邊康子
ブタ繁殖障害遺伝子同定 ブタ胚発生障害時期の特定 ブタ胚発生での発現遺伝子解析 DNA マーカーと発現形質連鎖解析 DNA マーカー開発と遺伝型特定 ブタ繁殖障害遺伝子同定 遺伝子ネットワーク解析 DNA 配列とアッセンプリ解析 ブタ免疫系発現遺伝子解析 遺伝病責任遺伝子解析 RH マッピング解析 ブタ繁殖障害遺伝子同定 ブタ免疫系発現遺伝子解析	(独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 国立成育医療センター研究所 兵庫医科大学 広島大学 北里大学 INRA-CRJ 研究所 Toulouse 研究所 (独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所	○安江博 三橋忠由 上西博英 林 武司 美川智 山田正夫 山本義弘 西堀正英 高垣洋太郎 Chardon, P. Yerle, M. 木内幸子 江口智子
<テーマ2> 個体発生の分子機構 サブテーマ(1)：胎子胎盤相互作用の分子機構	国立成育医療センター研究所	◎辻本豪三
胎子胎盤機能の分子的解析 ウシ胎盤特異生理活性物質探索 プロラクチン産生部位特定 胎盤細胞培養系開発 胎盤細胞の高次培養システム構築 cDNA アレイ作成 子宮内膜接着分子探索	(独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 (独)農業生物資源研究所 国立成育医療センター研究所 (独)農業生物資源研究所	○居在家義昭 橋爪一善 今井敬 高橋透 竹澤俊明 辻本豪三 岸 久司
サブテーマ2：分子伝達機構の解明 臓器形成での分子伝達機構解析	国立成育医療センター研究所	○辻本豪三

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
臓器形成モデル動物作成と解析	国立成育医療センター研究所	田 上 昭 人
ヒト胎盤機能解析	国立成育医療センター研究所	平 澤 明
機能ゲノムと分化関連分子探索	国立成育医療センター周産期診療部長	名 取 道 也
受精・発生機序解析	三重大学	田 中 利 男
卵成熟の分子機能解析	滋賀医科大学	高 田 達 也
母胎における環境因子解析	東海大学	和 泉 俊 一 郎
心臓電気生理活動と初期発生相関	明治薬科大学	越 前 宏 俊
	慶応義塾大学	小 川 聡
	東京理科大学	小 野 秀 樹
母胎における環境因子解析	千葉大学	千 葉 寛
G 蛋白共役刺激伝達の詳細解析	東京大学	堅 田 利 明
受精の分子機構解析	東京女子	淡 路 健 雄
胎盤特異物質の発現様式解析	東京大学	今 川 和 彦
受容体を介する刺激伝達解析	国立成育医療センター研究所	細 田 千 尋
プロラクチン等の発現と構造解析	㈱農業生物資源研究所	石 渡 広 子
<テーマ3> モデル動物を用いた解析	国立成育医療センター研究所	◎藤 本 純 一 郎
サブテーマ(1): 形質転換家畜の作出と解析		
クローンヤギ等モデル家畜作出技術開発	㈱農業生物資源研究所	○徳 永 智 之
遺伝子導入細胞の選別法開発	㈱農業生物資源研究所	細 江 実 佐
ヤギ未受精卵の除核法開発	㈱農業生物資源研究所	居 在 家 義 昭
核移植技術の高度化	㈱農業生物資源研究所	高 橋 清 也
ヤギ未受精卵の大量作出法開発	㈱農業生物資源研究所	赤 木 悟 史
体内成熟卵子の回収技術確立	㈱農業生物資源研究所	淵 本 大 一 郎
遺伝子ベクター開発	㈱農業生物資源研究所	渡 部 聡
モデル家畜機能解析	国立成育医療センター研究所	藤 本 純 一 郎
		鈴 木 盛 一
遺伝子組換え家畜開発	㈱CSK リサーチパーク	内 田 昌 樹
形質転換ヤギ作出技術の高度化	京都大学大学院農学研究科教授	今 井 裕
モデル家畜作出技術開発	AgResearch Ltd. 主任研究員	L' Huiller, P.
ヤギ体細胞培養と遺伝子導入	㈱農業生物資源研究所	Bossak, N
核移植技術の高度化	㈱農業生物資源研究所	大 越 勝 広
サブテーマ(2): 肝組織再構築に関する研究		
肝再構築技術の開発	国立成育医療センター研究所	○鈴 木 盛 一
肝代替細胞の機能解析	国立成育医療センター研究所	絵 野 沢 伸
		木 村 廣 光
肝幹細胞単離と機能解析	国立成育医療センター研究所	梨 井 康
肝への遺伝子治療戦略作成	国立成育医療センター病院	奥 山 虎 之
家畜を用いた肝再生能解析	㈱農業生物資源研究所	徳 永 智 之
肝幹細胞単離と機能解析	筑波大学	谷 口 英 樹
肝細胞の表現形質解析	東京農業大学	天 野 卓
肝形成における発現遺伝子解析	千葉大学	古 関 明 彦
肝細胞の不死化に関する研究	㈱河野臨床医学研究所	常 盤 孝 義
肝への遺伝子治療戦略作成	国立成育医療センター研究所	尾 崎 倫 孝
肝幹細胞単離と機能解析	国立成育医療センター研究所	張 慧 琪

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
肝幹細胞単離と機能解析	国立成育医療センター研究所	高橋 奈々恵
サブテーマ3：血球の発生・分化と制御法	国立成育医療センター研究所	○藤本 純一郎
血球再生技術開発	国立成育医療センター研究所	清河 信敬
Bリンパ球成熟制御法開発	国立成育医療センター研究所	斎藤 博久
肥満細胞成熟制御法開発	㈱農業生物資源研究所	徳永 智之
ヒト造血の家畜内維持法開発	国立相模原病院	海老澤 元宏
Tリンパ球の成熟機構解析	京都大学	片村 憲司
肥満細胞成熟制御法開発	日本医科大学	Pawankar, R.
	順天堂大学	羅 智靖
造血幹細胞発生に関する解析	東京大学	中内 啓光
	熊本大学	須田 年生
Bリンパ球発生機序解析	東京医科大学	鳥山 一
ブタTリンパ球機能解析	国立成育医療センター研究所	唐 巍然
Bリンパ球発生機序解析	国立成育医療センター研究所	田口 智子
Bリンパ球成熟制御法開発	国立成育医療センター研究所	片桐 洋子
肥満細胞の単離と成熟制御法開発	国立成育医療センター研究所	松本 健治

(注：◎はテーマ責任者，○はサブテーマ責任者)

### Ⅲ 融合研究評価委員会・融合研究推進委員会

#### (1) 融合研究評価委員会

委 員	所 属
○鴨下 重彦	厚生労働省 国立国際医療センター 名誉総長
渥美 和彦	東京大学 名誉教授
位田 隆一	京都大学 大学院法学研究科 教授
菊池 浩吉	札幌医科大学 名誉教授
辻 莊一	神戸大学 教授
角田 幸雄	近畿大学 教授
丸山 英二	神戸大学 法学部基礎法講座 教授
丸山 公明	明治大学 農学部 教授
Catt Kevin J	アメリカ NIH 副所長
Schmid Wolfgang	ドイツ 癌研究所細胞分子生物学 教授
Schook Lawrence,B	アメリカ ミネソタ大学 教授, 副学部長

(注：○は研究評価委員長)

(2) 融合研究推進委員会

委 員	所 属
○松 尾 宣 武	厚生労働省 国立成育医療センター 総長
雨 宮 浩	厚生労働省 国立成育医療センター 研究総括責任者
井 上 元	㈱農業生物資源研究所 理事
桂 直 樹	㈱農業生物資源研究所 理事長
北 井 暁 子	厚生労働省 国立成育医療センター 運営部長
秦 順 一	厚生労働省 国立成育医療センター 研究所長
若 山 弘	㈱農業生物資源研究所 総務部長

(注：○は研究推進委員長)