

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：82643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15641

研究課題名(和文) 遺伝性網膜疾患カニクイザルの作製とその病理学的解析

研究課題名(英文) Development of disease monkey model for hereditary retinal disease by gene editing

研究代表者

岩田 岳 (Iwata, Takeshi)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・部長

研究者番号：90374157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：黄斑などの眼球構造がヒトと類似するカニクイザルの遺伝子改変眼疾患モデルを作製するために、受精卵へCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術を応用した。顕微授精により雄雌前核を持つ受精卵を作り出し、この前核に目的の眼疾患遺伝子の変異を誘導するように構築したCRISPR/Cas9発現ベクターを注入した。このベクター注入卵について体外培養および胚移植を行った。体外培養したベクター注入卵は胚盤胞に発生し、これからES細胞が樹立された。このES細胞において目的遺伝子の変異が誘導されていることが確認された。また、ベクター注入卵の胚移植を行ったところ、1個体が妊娠を継続し、雌の新生児を得るに至った。

研究成果の概要(英文)：The primate eye has unique structural characteristic such as macula, which do not exist in experimental animals, mouse, rat, and zebrafish. In this study, CRISPR/Cas9 was used to specifically cut the genome DNA in the fertilized egg to develop gene manipulated cynomolgus macaque monkeys with hereditary retinal disease. The fertilized egg was injected with CRISPR/Cas9 vector to specifically cut gene responsible for inherited macula disease. ES cell were detected with DNA cleavage at the site targeted. The detection of targeted mutation in ES cells provides the possibility of new born mutation by continuation of further experiments. A single offspring was born recently born. The new methods of CRISPR/Cas9 will be used to create other inherited macula diseases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：医歯薬学 外科系臨床医学 眼科学 眼生化学・分子生物学 カニクイザル

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの眼疾患を忠実に再現するモデル動物は医学研究において欠かせない実験材料である。モデル動物は病態機序についての貴重な基礎的情報をもたらす、新薬の評価にも利用されている。特にマウスについては遺伝子改変技術が進歩し、眼疾患関連遺伝子のノックアウト・マウスやノックイン・マウスが多数作製されている。しかしながらヒトの眼球構造は高等霊長類にのみ共通なものであり、厳密には他の生物種と異なる。実験用マウスには黄斑は存在せず、視神経乳頭の構造も大きく異なる。

我々はこれまでに複数の眼科疾患モデル動物の作製を行ってきた。黄斑変性カニクイザル(Umeda, Iwata et al, FASEB J 2005, IOVS 2005)や緑内障遺伝子 Optineurin (Chi, Iwata et al, Hum Mol Genet 2010)、WDR36 (Chi, Iwata et al, Hum Mol Genet 2010)の変異体を発現するマウス、さらに Vav2/Vav3 ダブルノックアウトによる閉塞緑内障マウス等の作製である。常にサルとマウスの眼球を研究材料としてきた我々にとって、カニクイザルにも応用できる遺伝子改変技術を待っていた。2009年、実験動物中央研究所の佐々木らによって世界で初めてのトランスジェニック・マーマセットが報告され(Sasaki et al, Nature 2009)、遺伝子改変によって GFP 遺伝子を生殖細胞で発現し、次の世代へ受け継がれた初めての霊長類が作製された。しかしながらマーマセットは新世界ザルに属し、下等霊長類に分類され、眼球構造もヒトとは異なる。また、ノックアウトやノックインの技術は確立されていない。2007年、Sangoma BioSciences の Miller らによって zinc finger nuclease(ZFN)によるゲノム改変技術が発表された(Miller et al, Nat Biotechnol 2007)。ZFN は DNA 配列を認識して切断し、切断面を分解する酵素であるが、この認識部位を改変することによって、ゲノム上の任意の場所を特異的に切断し、分解する酵素を作製することができる。この技術を応用して、ZFN DNA を受精卵に注入し、これを発現させることによって目的とする複数の遺伝子をターゲットにこれを切断・分解することができる。さらに切断時に切断部位と相同的な塩基配列の外来 DNA を用いることによってノックインやトランスジェニックの動物が作製できる。すでにウシ(Yu et al, Cell Res 2011)、ウサギ(Flisikowska et al, PLoS One 2011)、ブタ(Hauschild et al, PNAS 2011)、カエル(Young et al, PNAS 2011)、ゼブラフィッシュ(Doyon et al, Nat Biotechnol 2008)、ラット(Cui et al, Nat Biotechnol 2011)、マウス(Li et al, Nature 2011)で報告されておりサルへの応用が期待されている。我々はすでに ZFN の技術を用いた緑内障遺伝子オ

プチニユリンのノックアウト・マウスの作製に成功しており、同様な機能が報告されている CRISPR/Cas9 についてもノックイン・マウスの開発を行っている。サルへの応用は十分に可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

ヒトの眼疾患は高等霊長類に特徴的な眼球構造が強く影響していると考えられる。緑内障、加齢黄斑変性、黄斑ジストロフィーなどの眼疾患をより忠実に実験動物において再現するには霊長類を用いることが望ましい。これまで技術的な問題から遺伝子改変霊長類を作製することは困難であった。本研究ではこの技術的な問題を克服した Zinc Finger Nuclease (ZFN), CRISPR/Cas9 などの遺伝子改変技術を用いて、眼疾患原因遺伝子に関連するノックアウトあるいはノックイン・カニクイザルの作製を目的とする。この研究によって、より患者の病態に近い眼疾患モデル動物の作製が期待される。研究対象の遺伝子は優性遺伝の眼疾患原因遺伝子を対象とする。作製された個体については、病理学的、視覚機能の解析を行い、疾患個体の繁殖による量産をめざす。

### 3. 研究の方法

本研究はゲノム上の任意の配列を認識し、切断・分解する CRISPR/Cas9 の特徴を利用して、眼疾患原因遺伝子をターゲットにこれを欠損あるいは遺伝子変異を挿入し、遺伝子改変カニクイザルを作製する。この方法によって複数のターゲット遺伝子を同時に改変することが可能である。繁殖能力や他臓器への影響を最小限にするために、眼での発現が優位な眼疾患原因遺伝子を選別する。初年度は受精卵から分裂過程における CRISPR/Cas9 の特異的切断・分解能力を確認し、CRISPR/Cas9 DNA の適正注入量を検討する。また注入方法を改善して、より確実に F0 の段階で遺伝子改変のホモ個体が作製できるように検討する。CRISPR/Cas9 のみを注入して作製するノックアウトから外来遺伝子ベクターを用いたノックインの実験を試みる。遺伝子改変動物は複数の方法によって総合的に評価される。

1) CRISPR/Cas9 の設計およびカニクイザル由来の培養細胞を用いたノックアウト、ノックインの確認実験:

繁殖能力や他臓器への影響を最小限にするために、眼での発現が優位な眼疾患原因遺伝子を選別する。ノックアウトの対象としては劣性の疾患である黄斑ジストロフィー原因遺伝子 ABCA4、ELOVL4 などとし、また遺伝子変異のノックインの対象としては緑内障原因遺伝子ミオシリン(MYOC)、オプチニユリン

(OPTN)、網膜色素変性原因遺伝子 Rhodopsin、RPE65、RP1、RP2、加齢黄斑変性感受性遺伝子 Complement Factor H などとする。カニクイザル用にカスタム設計された CRISPR/Cas9 の特異的切断能力を調べるためにカニクイザル由来の網膜色素上皮細胞と毛様体上皮細胞に CRISPR/CAS9 のプラスミドをトランスフェクションして、その作用を一部で確認した。また、ノックインについては、8Kbp 以下の DNA を前後 800bp の相対的配列で囲むことによって、任意のゲノム上に挿入することができる。挿入する配列を変異体にするによってノックインやトランスジェニックを作製可能である。目的の機能が確認された一部の ZFN については DNA を作製し、受精卵のインジェクションに利用した。

## 2) 受精卵を用いた CRISPR/Cas9 によるノックアウト、ノックインの実験:

カニクイザルの受精卵から分裂過程における CRISPR/Cas9 の発現量や対象遺伝子の切断・分解を確認し、受精卵への CRISPR/Cas9 DNA を注入した。注入した受精卵は、通常の受精卵と同様に一部において発生が継続した。今後はさらに注入方法を改善して、精子と卵子由来の両核に CRISPR/Cas9 DNA を注入し、確実に F0 の段階で遺伝子改変のホモ個体が作製できるように検討する。CRISPR/Cas9 DNA のみを注入して遺伝子を破壊する実験を行う予定であるが、一度諸条件が確立されれば外来遺伝子ベクターを用いたノックインの実験を試みる。

## 3) CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト、ノックイン・カニクイザルの作製:

トランスジェニック・マウスの作製に準じた方法で、サル前核期受精卵へ CRISPR/Cas9 DNA (ノックインの場合 CRISPR/Cas9 DNA + プラスミド) を注入し、その受精卵を仮腹の雌ザルへ移植することで遺伝子操作ザルを作製する(図 3)。この一連の操作において、重要となる卵は卵胞発育を人為的に刺激し、過剰な発育を誘起する必要がある。マウスや家畜では確立している技術であるがカニクイザルにおいては確立しておらず、採取される卵の内、実験に使用できる成熟卵の数や質は制限される。そこで、良質且つ数を多く得ることを目的とした卵胞発育誘起法の検討を実施した。この過程で採取された成熟卵は、雄から採取した精子を顕微注入(顕微授精)し、受精卵を作出した。卵採取時にプロゲステロン値が急激な上昇あるいはほとんど変動がない時に、採取された卵は少なく、そのような卵から作出した受精卵の発生は確認できなかった。この結果を踏まえて、良質と考えられる状態の卵から作出した雌雄前核を有する受精卵に対して、本研究において、

肝となる遺伝子改変を誘導する CRISPR/Cas9 DNA を前核へ注入し、受精卵の DNA の切断・分解を行う。CRISPR/Cas9 DNA を注入した受精卵から個体を作製するために、母体への移植(胚移植)が必要となる。移植する母体は排卵が確認された個体で有ること、且つ卵の発生ステージをある程度同調させる必要がある。そこで、母体への負担が少ない採血を行い、血中エストロジオール(E2)を測定する。E2 値を排卵が行われると予想される月経出血確認から 9 日目以降に測定を開始し、その値の急激な上昇および急激な値の低下を確認し、排卵日を特定する。卵の発生ステージとほぼ同調する母体の卵管あるいは子宮内へ胚移植を行う。胚移植後約 35 日に最初の妊娠診断を行う。この方法により、ノーマルな受精卵の胚移植により妊娠が成立した。このような胚移植からおよそ 165 日で出産あるいは帝王切開により産子を得た際には、胎盤等の胎児付属臓器を採取して解析を行い、目的遺伝子の欠損を調べる。遺伝子改変カニクイザルの存在が確認されれば、性成熟後安定した時期となる 3 才以降には、別性の個体との同居、繁殖を行い、繁殖能力の有無および操作遺伝子の伝達を確認する。遺伝子改変カニクイザルが雄である場合には、非侵襲的に精子を採取し、複数の雌から採取した卵へ顕微授精を行い発生工学的な手法による子孫の作出(継代)も平行して実施する

## 4) 遺伝子改変カニクイザルの診断:

出産直後に DNA 検査を行い、目的とする遺伝子改変を確認し、定期的に視機能を検査して目的とする疾患が発症するか診断を行う。緑内障の診断としては眼底撮影、眼圧、光干渉断層計(OCT)による視神経乳頭の観察を行い、網膜色素変性の診断としては眼底撮影、網膜電図、光干渉断層計による観察、そして黄斑ジストロフィーと加齢黄斑変性の診断としては眼底撮影、網膜電図、蛍光眼底造影(FA, ICG)、光干渉断層計による観察を行う。この診断は 3 か月間隔で行う。緑内障、網膜色素変性、黄斑ジストロフィーの原因遺伝子および加齢黄斑変性感受性遺伝子による遺伝子改変カニクイザルについては電気生理学的に視機能検査を行い、共焦点レーザー走査型眼底検査装置(HRA)とスペクトラルドメイン OCT が融合したハイデルベルグ・スペクトラリス(ハイデルベルグエンジニアリング社)を用いて視神経乳頭、黄斑部の網膜から脈絡膜の断層像、蛍光造影(FA, ICG)による網膜血管および脈絡膜血管の状態を観察する。

## 4. 研究成果

従来通りの受精卵の作出法に加え、GnRH アンタゴニストを投与する卵胞発育刺激誘起

法を用いて採取した卵は、顕微授精によって受精卵を作成できること、さらにCRISPR/Cas9 プラスミドを前核に注入しても正常に卵割し、発生が進行することを確認した。また、受精卵培養には従来牛血清添加CMRL-1066 培地を使用していたが、牛血清のロット差による培養成績への影響が危惧される。そこで、均一な成績を得ることを目的に成分が明らかな完全合成培地を用いたところ、胚盤胞への発生を確認することができた。卵の採取および受精卵の培養のような基盤的技術の改善が確認できた。そして、CRISPR/Cas9 プラスミド注入受精卵を仮親に胚移植したところ、妊娠が得られたものの流産した。受胎産物を回収することができなかったために、CRISPR/Cas9 による遺伝子の改変を確認することはできなかった。流産の要因は、受精卵の質、胚移植後の母体の状況、その他多くの要因が考えられる。CRISPR/Cas9 プラスミドによる受精卵への負の影響も考えられることから、全く新たに構築したRNA タイプのCRISPR/Cas9 を用意した。受精卵への応用を行う前に、カニクイザル体細胞を用いた遺伝子改変を検討した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1: Iejima D, Nakayama M, Iwata T. HTRA1 Overexpression Induces the Exudative Form of Age-Related Macular Degeneration.

Age-Related Macular Degeneration. *J Stem Cells* 2015;10:193-203.

2: Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Sergeev Y, Akahori M, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsunoda K, Tsuneoka H, Iwata T. Congenital Achromatopsia and Macular Atrophy Caused by a Novel Recessive PDE6C Mutation (p.E591K). *Ophthalmic Genet*. 2015;36:137-44.

doi: 10.3109/13816810.2014.991932.

3: Kato Y, Tsunoda K, Fujinami K, Iwata T, Saga M, Oguchi Y. Association of Retinal Artery and Other Inner Retinal Structures With Distribution of Tapetal-like Reflex

in Oguchi's Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:2162-72.

doi: 10.1167/iovs.14-16198.

4: Iwata T. Author Response: Postnatal Overexpression of the Human ARMS2 Gene Does Not Induce Abnormalities in Retina and Choroid in Transgenic Mouse Models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56:1389. doi:10.1167/iovs.14-16174

5: Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Tsunoda K, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Reduced rod electroretinograms in carrier parents of two Japanese siblings with autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with PDE6B gene mutations. *Doc Ophthalmol*. 2015;131:71-9.

doi: 10.1007/s10633-015-9497-7.

6: Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Kominami T, Yasuda S, Kondo M, Tsunoda K, Iwata T, Terasaki H. Pathologic Changes of Cone Photoreceptors in Eyes With Occult Macular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:7243-9. doi: 10.1167/iovs.

7: Katagiri S, Hayashi T, Ohkuma Y, Sekiryu T, Takeuchi T, Gekka T, Kondo M, Iwata T, Tsuneoka H. Mutation analysis of BEST1 in Japanese patients with Best's vitelliform macular dystrophy. *Br J Ophthalmol*. 2015;99:1577-82.

doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-306830.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(無し)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(無し)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.iwata-lab.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岩田 岳 (IWATA, Takeshi)  
国立病院機構東京医療センター・臨床研究センター・部長  
研究者番号：90374157

### (2)研究分担者

溝田 淳 (MIZOTA, Atsushi)  
帝京大学医学部・教授  
研究者番号：10239262

### (3)研究分担者

下澤 律浩 (SHIMOZAWA, Nobuhiro)  
医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・主任研究員  
研究者番号：50300786