

令和元年6月17日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04650

研究課題名(和文) 多様な発想で研究可能なリソースとしての遺伝子改変マーモセット作製法の開発

研究課題名(英文) Development of a new generation method of transgenic common marmoset, a potential resource for various researches

研究代表者

崎村 建司 (Sakimura, Kenji)

新潟大学・脳研究所・フェロー

研究者番号：40162325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脳機能と疾患を理解する上で必要な霊長類マーモセットの遺伝子改変モデル作製には、経済的・倫理的障壁があり、これまで実現困難であった。本研究では、これら問題を克服するために、安価かつ動物福祉的にもかなった手法でマーモセット受精卵を取得する方法を検討した。廃用個体や死亡個体から取得した卵巣組織をヌードマウスの腎臓被膜下に移植し、ホルモン投与により移植片からの卵子の取得に成功した。さらに、取得した卵子から、桑実胚まで発生する受精卵を作製する方法を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの研究者が多様な発想で遺伝子改変マーモセットを用いるには経済的・倫理的障壁があり、現実的に困難である。本研究により、マーモセット受精卵を安価かつ動物福祉的にも問題のない手法で取得することが可能になった。この成果は、遺伝子編集などの手法を用いて、疾患モデルを作出するためのブレイクスルーになり、ヒト脳疾患理解に大きな貢献をするものである。

研究成果の概要(英文)：Creation of genetically modified models of primate marmosets is indispensable to understand human brain functions and diseases, but there have been economic and ethical barriers that have made it difficult to put into practice until very recently. In this study, to overcome these problems, we examined a method of obtaining marmoset fertilized eggs, which is both inexpensive and considerate to animal welfare. We transplanted ovarian tissues obtained from disused and dead individuals into the kidney capsule of nude mice, and with the addition of hormonal administration succeeded in obtaining eggs from the graft. Furthermore, we developed a new method of producing fertilized eggs which can grow to a morula stage, from the acquired eggs.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：マーモセット 異種動物間キメラ ES細胞 胚盤胞補完法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト脳機能と疾患を解明する霊長類モデル動物としてコモンマーマモセットが注目され、我が国でも「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」で集中的な研究がおこなわれている。我々の脳を理解する上で霊長類モデルは必須である。一方、一般の研究者が多様な発想で遺伝子改変マーマモセットをリソースとした研究に参画するのは、この動物が非常に高価であり、近年爆発的に進んでいる CRISPR/Cas9 システムなどの遺伝子編集技術を持ってしても現実的に困難である。我々が本研究を計画した時点では、マーマモセットにおける遺伝子改変動物をいかに迅速にかつ安価に作出できるかが重要な課題であった。さらに、霊長類を実験動物として利用するには、倫理的に厳しい目が社会から注がれている状況があり、その点の配慮も必要であった。

我々は、行動実験など脳機能解析に優れた C57BL/6 系統マウスから ES 細胞株を樹立し、コンディショナルノックアウトマウスを迅速かつ安価に作出する手法を開発してきた。この技術を用いて、脳機能分子の floxed 型マウスや脳の部位や細胞に選択性高く Cre を発現する各種のドライバーマウスを中心に約 500 系統のマウスを作出して脳研究者コミュニティーに広く供与し、多くの成果を上げてきた。また最近、マウスよりも賢く脳高次機能解析に向くラットの遺伝子改変を安価におこなうために、ラット ES 細胞を精巢形成不全レシピエントマウス胚に導入して異種動物間キメラ法にてラット精子を得る方法を確立した。この精子を用いて顕微授精をすることにより非常に安価に遺伝子改変ラットの樹立が可能になった。これらの状況の下で、我々は遺伝子改変マーマモセット作製を可能にする基盤技術の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子改変マーマモセットを安価かつ動物倫理的にも問題が無い形で作出する基盤技術を創出することである。この目的のために、我々が開発した胚盤胞補完法でラット ES 細胞からマウス体内でラット精子を作製させ、遺伝子改変ラットを作出した手法の利用を考えた。ナイーブ化したマーマモセット ES 細胞で遺伝子改変をおこない、この細胞からマーマモセットの精子をキメラマウスの体内で作出し、顕微授精により得た受精卵をマーマモセット仮親に移植することで遺伝子改変マーマモセットを樹立しようというものである。この目標を達成するために 2 つの方向から研究開発を進める。第 1 は、異種動物間キメラ法を利用し遺伝子改変したマーマモセット ES/iPS 細胞からマウス体内でマーマモセット精子を作製することである。このために、マーマモセット ES 細胞のナイーブ化条件の検討をする。また、細胞性免疫不全で生殖組織を欠損するマウスコロニーを樹立し、胚盤胞補完法用のレシピエント胚を準備する。第 2 は、これまで廃棄されていた実験死や病死したマーマモセット卵巣を利用して、動物倫理に抵触しない形で安価に卵子を取得する方法の確立である。この目的のために、取得した卵巣をヌードマウスに移植し、ホルモン投与により授精可能な成熟卵子を取得する方法を確立し、体外受精による受精卵取得を目指す。

3. 研究の方法

齧歯類以外の細胞で異種動物間キメラができる受容胚を作るためには、細胞性免疫不全動物の利用が必須である。そこで、ラットで用いた精巢形成不全受容胚作出に必要な 2 種類のマウス (FTB-Tg(Ddx4-Cre)1Dcas/J と 129-Gt(ROSA)26Sortm1(DTA)Mrc/J) の遺伝子背景をヌードマウスのものにした。さらに、マーマモセット ES/iPS 細胞のナイーブ化をおこなうために、未分化マーカーの発現を指標にして、ベースとなる培地、使用するフィーダー細胞、添加する各種細胞代謝調節剤の組み合わせ等を検討した。一方、人工授精に用いる卵は、通常成体マーマモセットからホルモンによる排卵処置をして取得するが、当該動物が非常に高価である事と、動物福祉倫理の問題から多数の卵を同一個体から繰り返し採取することは困難である。そこで、本研究では、この問題を解決するために、飼育現場である頻度で発生する死亡個体や実験死さ

せた個体から未使用の卵巣の分与を受け、その卵巣組織をヌードマウスに皮下移植し、その組織から成熟卵子を得た。そのために、卵巣組織の移植場所や形態、卵子成熟を惹起するホルモン投与方法などを検討した。さらに、取得した成熟卵子を体外受精し、移植可能な受精卵を取得する培養条件等の検討をおこなった。なお死亡個体組織に関しては、日本クレア八百津飼育場(約 1200 頭飼育繁殖)や京大霊長類研などの飼育研究機関に協力を要請して、分与を受けた。

4 . 研究成果

まず、ES/iPS 細胞由来の精子をマウスで作製する異種動物間キメラ受容胚の生産に関しては、生殖細胞に特異的に Cre を発現するドライバーマウス FTdx4-Cre)1Dcas/J と Cre 依存的に細胞死を引き起こす DTA を発現する 129-Gt(ROSA)26Sortm1(DTA)Mrc/J を交配させる方法を採用することで、雄の胚を 1/2 の確率で採取できることを確認した。次に、これらのマウスとヌードマウスを交配させ、Foxn1^{-/-}の遺伝子背景を持つマウスコロニーを整備した。この 3 重遺伝子変異を持つマウス胚にラット ES 細胞を注入することで効率的にラット精子が採取できることを確認している。

生殖細胞に分化するマーマセット ES/iPS 細胞の樹立をおこなうために、ナイーブ化の培養条件を検討した。理研より入手したマーマセット ES 細胞をマウスフィーダー上に播種し、ベースになる培地、添加するサプリメント、各種の成長因子、代謝阻害剤等を加えて、その形態と発現する未分化遺伝子プロファイルを検討したが、ナイーブ化した齧歯類 ES 細胞に近い状態を保つ条件は見いだせなかった。さらに、ヒト ES 細胞のナイーブ化を精力的に進めているイスラエルの Hanna JH 等との情報交換などを基に、培地の組成や添加物の組み合わせ、また、継代の手法など多くの要素の検討をおこなった。ベースになる培地、添加するサプリメント、各種の成長因子、代謝阻害剤等を加えて、その形態と発現する未分化遺伝子プロファイルを検討したが、ナイーブ化したと判断できる培養条件を決定することはできなかった。上述した、胚盤胞補完法により精子作製をする系は、それ自体が生殖細胞への分化能を持つ細胞のスクリーニング系であるので、この系を広く内外の研究者に利用してもらい、マーマセットのナイーブ化した ES/iPS 細胞の樹立に貢献したい。

安価且つ動物福祉的にもかなった手法でマーマセット受精卵を取得する方法を検討した。廃用個体や死亡個体から取得した卵巣組織を他の施設から分与を受け、これら組織を細切してヌードマウスへ移植した。移植する卵巣組織の保存状態と形態、さらに、移植するレシピエントマウスでの移植場所や性別等の状態等を検討した。Lifor (Lifeblood Medical Inc. , NJ, USA) 溶液に浸漬して冷蔵輸送した卵巣を 1~2 mm の大きさに細切し、卵巣除去したヌードマウスの皮下及び腎臓被膜下に移植したものが、良く生着した。次に、卵巣移植後、5-19 日目に PGF2

投与をおこない、その 2 日後から卵胞刺激ホルモン(FSH)の投与を行った。FSH を 9 日間投与後、hCG(ゴナトロピン)を投与し、投与 5 時間後に卵巣組織片を移植した腎臓の採材を行った(図 1)。これら移植片から卵子の取得に成功した。さらに、これら卵子の成熟培養後、体外授精及び顕微授精をおこない受精卵を得た。これら受精卵のうち、状態の良い物は桑実胚まで発生できることが明らかになった。これまで廃棄していた卵巣を用いて、安価で動物倫理的にも問題の無い形でマーマセット成熟卵子/受精卵を確保できることから、この成果は遺伝子改変マーマセット作製に資するものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 55 件)

Kim K, Suzuki A, Kojima H, Kawamura M, Miya K, Abe M, Yamada I, Furuse T, Wakana S, Sakimura K, Hayashi Y: Autophosphorylation of F-actin binding domain of CaMKII β is required for fear learning. *Neurobiol Learn Mem*, 2019, 157: 86-95 (査読有)

DOI: 10.1016/j.nlm. 2018.12.003.

Shimizu T, Osanai Y, Tanaka KF, Thai TQ, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Ikenaka K: Mechanical regulation of oligodendrocyte morphology and maturation by the mechanosensor p130Cas. *J Neurochem* 2018, in press (査読有) DOI: 10.1111/jnc.14657.

Katano T, Takao K, Abe M, Yamazaki M, Watanabe M, Miyakawa T, Sakimura K, Ito S: Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. *Mol Brain* 2018, 11(1): 63 (査読有) DOI: 10.1186/s13041-018-0407-2.

Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, Sakimura K, Takebayashi H: Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. *J Neurochem* 2018, 147: 557-572 (査読有) DOI: 10.1111/jnc.14591.

Nakayama H, Abe M, Morimoto C, Iida T, Okabe S, Sakimura K, Hashimoto K: Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. *Nat Commun* 2018, 9(1): 2830 (査読有) DOI: 10.1038/s41467-018-05100-z.

Uesaka N, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao TH, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Retrograde signaling from progranulin to Sort1 counteracts synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 2018, 97(4): 796-805.e5 (査読有) DOI: 10.1016/j.neuron.2018.01.018.

Nagahashi M, Yamada A, Katsuta E, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, Hait NC, Allegood JC, Tsuchida J, Yuza K, Nakajima M, Abe M, Sakimura K, Milstien S, Wakai T, Spiegel S, Takabe K: Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 axis that links obesity, chronic inflammation, and breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2018, 78(7): 1713-1725(査読有) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1423.

Chiu CQ, Martenson JS, Yamazaki M, Natsume R, Sakimura K, Tomita S, Tavalin SJ, Higley MJ: Input-specific NMDAR-dependent potentiation of dendritic GABAergic inhibition. *Neuron* 2018, 97(2): 368-377.e3(査読有) DOI: 10.1016/j.neuron.2017.12.032.

Yamaguchi J, Suzuki C, Nanao T, Kakuta S, Ozawa K, Tanida I, Saitoh T, Sunabori T, Komatsu M, Tanaka K, Aoki S, Sakimura K, Uchiyama Y: Atg9a deficiency causes axon-specific lesions including neuronal circuit dysgenesis. *Autophagy* 2018, 14(5): 764-777 (査読有) DOI: 10.1080/15548627.2017.1314897.

Kawai T, Okochi Y, Ozaki T, Imura Y, Koizumi S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Yamashita T, Okamura Y: Unconventional role of voltage-gated proton channels (VSOP/Hv1) in regulation of microglial ROS production. *J Neurochem* 2017, 142(5): 686-699 (査読有) doi: 10.1111/jnc.14106.

Choo M, Miyazaki T, Yamazaki M, Kawamura M, Nakazawa T, Zhang J, Tanimura A, Uesaka N, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. *Nat Commun* 2017, 8(1): 195 (査読有) DOI: 10.1038/s41467-017-00260-w.

Yamauchi K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Lickert H, Kawasaki T, Murakami F,

Hirata T: Netrin-1 derived from the ventricular zone, but not the floor plate, directs hindbrain commissural axons to the ventral midline. *Sci Rep* 2017, 7(1): 11992 (査読有)
DOI: 10.1038/s41598-017-12269-8.

Soya S, Takahashi TM, McHugh TJ, Maejima T, Herlitze S, Abe M, Sakimura K, Sakurai T: Orexin modulates behavioral fear expression through the locus coeruleus. *Nat Commun* 2017, 8(1), 1606 (査読有) DOI: 10.1038/s41467-017-01782-z.

〔学会発表〕(計 82 件)

中務胞、夏目里恵、阿部学、崎村建司：自然発症ミュータントラットからのナイーブ ES 細胞の樹立．第 66 回日本実験動物学会総会、2019

夏目里恵、中務胞、崎村建司、阿部学：C57BL/6 系統マウスにおける卵管エレクトロポレーション法を用いた遺伝子編集効率の検討．第 66 回日本実験動物学会総会、2019

中務胞、夏目里恵、阿部学、崎村建司：遺伝子改変ホモマウスへの過剰排卵処置方法の検討．第 41 回日本分子生物学会年会、2018

Watanabe M, Nakamoto C, Sakimura K, Kano M, Konno K: Extracerebellar expression of glutamate receptor GluD2 in adult mice and marmosets. 11th FENS Forum of Neuroscience, 2018

夏目里恵、阿部学、中務胞、崎村建司：卵管膨大部エレクトロポレーション法を用いた遺伝子組換えマウス作製の迅速化．第 65 回日本実験動物学会総会、2018

Sakimura K: The development of gene-manipulated animal models; Aiming to generate better suited mouse, rat and marmoset for the analysis of brain function. 8th BRI International Symposium, 2018

中務胞、夏目里恵、崎村建司：ラット卵巣卵胞内卵子の成熟培養なしでの体外受精．第 40 回日本分子生物学会年会、2017

Abe M, Peng F, Sakimura K: Aif1-iCre knock-in mouse line; A tool for conditional gene manipulation in microglia. SfN's 47th Annual Meeting Neuroscience 2017

Itoi K, Sakimura K: Regulatory mechanism of hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons by the ascending monoaminergic systems. 第 60 回日本神経化学学会大会、2017

Nakamoto C, Natsume R, Abe M, Kawamura M, Uchida H, Watanabe M, Sakimura K: GluD1 deficient mouse as a model animal of depression-like behavior. 26th ISN-ESN Biennial Meeting, 2017

中本千尋、夏目里恵、阿部学、川村名子、内田仁司、渡辺雅彦、崎村建司：GluD1 欠損マウスにみられるうつ様行動は抗うつ薬により回復する．第 40 回日本神経科学大会、2017

中務胞、夏目里恵、崎村建司：CARD HyperOva を用いた B N ラットの過剰排卵誘起処置の有用性．第 64 回日本実験動物学会総会、2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：阿部 学

ローマ字氏名：(ABE, Manabu)

所属研究機関名：新潟大学
部局名：脳研究所
職名：准教授
研究者番号（8桁）：10334674

研究分担者氏名：中務 胞
ローマ字氏名：(NAKATSUKASA, Ena)
所属研究機関名：新潟大学
部局名：脳研究所
職名：助教
研究者番号（8桁）：60641579

研究分担者氏名：夏目 里恵
ローマ字氏名：(NATSUME, Rie)
所属研究機関名：新潟大学
部局名：脳研究所
職名：技術職員
研究者番号（8桁）：60467082

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。