

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06467

研究課題名(和文) 早期老化症候群モデルサルを用いた老化早期診断法と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnosis and therapy for aging using a nonhuman primate model of premature aging

研究代表者

伊藤 靖 (Itoh, Yasushi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90324566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：早期老化症候群の病態の解明と治療法の開発のために、RecQ型DNAヘリカーゼゲノム編集マウスを作製した。出生したゲノム編集サルの末梢血細胞のRNAseq解析を行い、同年齢の野生型サルと比較し、遺伝子発現に差があることが判明した。ゲノム編集サルの末梢血細胞からiPS細胞を樹立した。このiPS細胞を免疫不全マウスに移植すると奇形腫を形成し、多能性を持つことが確認されたが、老化マーカーp16の発現が高い傾向があり、細胞老化が進行している可能性が見られた。ゲノム編集サルの不死化Bリンパ球を使い、RecQ型DNAヘリカーゼ変異タンパク質が細胞質に発現していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期老化症候群は単一遺伝子疾患であるが、他の遺伝子の変異修復異常が細胞老化の進行を早めると考えられる。人の症例では発症してから検査が行われるため、発病に必要な遺伝子変異と遺伝子多型の鑑別が困難である。早期老化症候群モデルサルを用いると、発症前から遺伝子変異の追跡が可能となり、個体の老化に先行する細胞老化を明らかにすることができると考えられる。早期老化症候群モデルサルとその細胞を用いて、細胞老化の機構と制御する因子を解明することにより、通常の老化の機構を解明にも発展でき、健康寿命の延長に関する研究に必要な基盤の整備が期待される。

研究成果の概要(英文)：We established genome-edited cynomolgus macaques with modified RecQ DNA helicase genes to examine the pathogenesis of premature ageing and to develop the therapy. We found the difference of the RNA expression in peripheral blood cells of the genome-edited macaques from wild-type macaques. We established iPS cells from peripheral blood cells of the genome-edited macaques. We confirmed pluripotency of the genome-edited iPS cells by formation of teratoma in immunodeficient mice, whereas the iPS cells showed a tendency to express p16 as a senescence maker, indicating that cell senescence is in progress in the genome-edited iPS cells. Immortalized B-lymphocytes from the genome-edited macaques showed expression of RecQ DNA helicase in the cytoplasm.

研究分野：実験病理学

キーワード：早期老化症候群 霊長類モデル ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群は日本に多い早期老化症候群の一つで、RecQ型DNAヘリカーゼ遺伝子の変異により発症し、通常加齢により見られる白内障、動脈硬化、悪性腫瘍等が早期に発生する疾患である。RecQ型DNAヘリカーゼは、ゲノムDNAが損傷を受けた際の修復に関与するタンパク質と考えられている。従って、ウェルナー症候群ではゲノムDNAの損傷が修復されず、変異が蓄積されることにより発病することが予測される。しかし、加齢に伴うDNAの変異部位と細胞老化、症状との因果関係は明らかになっていない。通常加齢に伴うDNAの変化及び塩基配列の変化を伴わないDNA修飾と細胞老化の関連、加齢に伴う遺伝子発現の変化、その集積の結果として生じる生体の老化現象のメカニズムに関する情報は少ない。これらを明らかにすることにより、加齢による臓器の機能低下を予防し、健康寿命の延長を図ることが可能となる。

ウェルナー症候群患者は、出生時は無症状であり、症状がある程度進むまで医療機関を受診しないことが多い。そのため、ウェルナー症候群患者において、本来の発病の時期、遺伝子変異の蓄積の経過を解析することは困難であり、根本的な治療法も存在しない。従って、病態の解明、治療法の開発のために動物モデルが必要である。しかし、RecQ型DNAヘリカーゼ遺伝子改変マウスは症状を示さず、病態を再現できないため、ゲノムがヒトに類似するカニクイザルを用いた疾患モデルの解析が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、早期老化症候群のモデルサルを用いて、早期老化症候群の病態と老化メカニズムを解明し早期診断法の開発を目指す。さらに、早期老化症候群遺伝子改変サルが、生活習慣病、悪性腫瘍等加齢に関連する疾患の新規治療法の開発に利用可能な動物モデルであることを実証する。

疾患の病態解明と治療法開発には、疾患を再現する動物モデルが必要である。ウェルナー症候群の原因遺伝子であるRecQ型DNAヘリカーゼ遺伝子のノックアウトマウスに異常は見られず、ウェルナー症候群のモデルとはならないことが判明している。この理由は、マウスとヒトのRecQ型DNAヘリカーゼの構造の差に加え、マウスの通常寿命の間には他の遺伝子変異が症状を起こすほど蓄積しないため発症しないとの仮説を立てた。そこで、我々はヒトにより近いDNAヘリカーゼを持つカニクイザルを用いて、これまでにRecQ型DNAヘリカーゼ遺伝子に変異を有する霊長類モデルを作成してきた。すなわち、顕微授精を用いた人工繁殖法にCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を組み合わせて、カニクイザル受精卵のRecQ型DNAヘリカーゼ遺伝子に変異を導入した。遺伝子改変カニクイザルの作出に成功しているのは、国内では滋賀医科大学のみである。このサルは従来長期間飼育しないと検出できないような遺伝子異常、老化現象が早期に生ずることが予測され、老化を引き起こす遺伝子の変化、細胞の変性を継続的に解析し、老化の分子機構を解明できると期待される。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins) を用いたゲノム編集により、カニクイザル受精卵の RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子に変異を導入したサルが出生している。このサルの症状・病態の観察と遺伝子変異を継続して解析し、加齢に伴う変化を調べ、機能の変化との関連を明らかにする。また、顕微授精に特定の MHC ハプロタイプをもつサル由来の精子を用いて、iPS 細胞と同じ MHC ハプロタイプをもつ RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子組換えサルの作出を進める。

(1) 変異 WRN ヘリカーゼ導入カニクイザルの老化マーカーの検索

既に出生し飼育中の RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サルと同年齢の野生型サルから種々のサンプルを複数回採取し、ゲノム編集サルと野生型サルの間と、同一個体加齢前後の差異を比較し、WRN ヘリカーゼ変異または加齢と関連するマーカーを抽出する。具体的には、末梢血細胞の細胞分裂能、炎症性サイトカイン濃度、血糖値、脂質等を測定し、また次世代シーケンサーを用いてゲノムの塩基配列、及び RNA の発現を解析する。

(2) MHC ハプロタイプ制御 RecQ 型 DNA ヘリカーゼ変異サルの作製

既に保有する MHC ハプロタイプがホモ接合の iPS 細胞と同じハプロタイプを持つ RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子変異サルの作出を行う。申請者らは既に、RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子の標的部位の塩基配列をクローニングし、ガイド RNA を作製した。排卵誘発により得た卵細胞にマイクロマニピュレーターを用いて、iPS 細胞と同じ MHC ハプロタイプの個体より採取した精子と CRISPR ガイド RNA 及び Cas9 mRNA またはタンパク質を導入後、仮親への移植を行う。出生したサルは (1) と同様の解析を行い、(3) の iPS 細胞移植のレシピエントとして用いる。

(3) RecQ 型 DNA ヘリカーゼ変異サルへ iPS 細胞由来細胞の移植

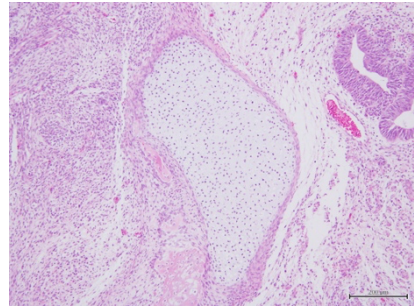
ウェルナー症候群患者では足底結合組織に萎縮が生じ、歩行障害が起き、日常生活に支障を来している。その治療モデルとして、野生型 RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子をもつ MHC 一致 iPS 細胞から間葉系幹細胞を誘導し、RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子変異サルの皮下に移植を行う。生検材料を用いて、移植細胞の生着、周囲結合組織の萎縮の程度を組織学的に評価する。

4. 研究成果

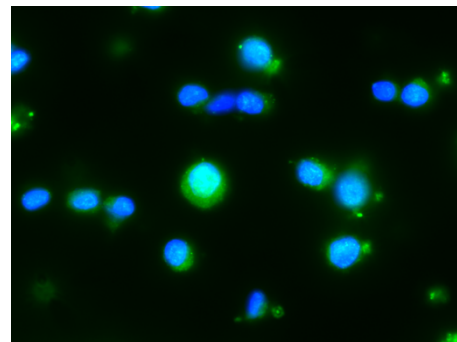
既に出生している RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サルの末梢血を採取し、RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サルと野生型サルの末梢血細胞の RNA 発現を比較した。その結果、大きく 3 群に分類され、概ね野生型、ヘテロ接合変異体、ホモ接合変異体に相当すると考えられた。しかし、完全に一致するのではないため、再度検体採取を行い、継続的に解析する必要があると考えられた。遺伝子発現の詳細な比較では、RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サルの末梢血細胞において、リンパ球活性化マーカーの発現が上昇する傾向がみられた。また、血漿中のヒアルロン酸とグルコース濃度の測定では、血液ヒアルロン酸がやや高値のときとほぼ正常の時があり、一定せず、RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サルと野生型サルに差はみられなかった。血液生化学

検査では、肝機能、腎機能は正常であった。現在もRecQ型DNAヘリカーゼゲノム編集カニクイザルの観察を継続している。これらのサルに外観上の異常は見られていない。

RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集カニクイザルの末梢血細胞からセンダイウイルスベクターを用い（京都大学 iPS 細胞研究所沖田圭介講師）、iPS 細胞を樹立した。RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サルと野生型サルの iPS 細胞は同様のコロニー形成を示した。また、免疫不全マウスの皮下に RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サル由来の iPS 細胞を接種したところ、奇形腫が形成され、多能性が確認された（右図、中央に軟骨、右上に腺管構造が見られる。）。RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集 iPS 細胞に分化誘導用培養液を加え、培養を継続すると、野生型サルの iPS 細胞に比べ、細胞生存または分化能が低下していると考えられた。これらの RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集サル iPS 細胞の p16（細胞老化マーカー）を抗体により染色したところ、RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集 iPS 細胞は正常サル iPS 細胞より高濃度に染色される傾向にあり、RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集 iPS 細胞は多能性を有しながら、細胞老化が進行している可能性が考えられた。



早期老化症候群モデルである RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集カニクイザルからの頻回の検体採取はサルの負担となるため、RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集カニクイザル由来の不死化細胞の作製を試みた。RecQ 型 DNA ヘリカーゼゲノム編集カニクイザルとコントロールサルの末梢血細胞に HVMF-II ウイルス（ヒトの EB ウイルスに相当する）を感染させて不死化リンパ球を作製した。合計 11 頭のサルの全てにおいて不死化リンパ球の樹立に成功した。これらの細胞の RecQ 型 DNA ヘリカーゼタンパク質を抗体で染色したところ、一部の細胞では細胞質にも検出され、変異タンパク質が発現していると考えられた（右図、中央の細胞では RecQ 型 DNA ヘリカーゼが核に多く発現している（核が黄緑）。他の細胞では核が青く、細胞質が緑であり、RecQ 型 DNA ヘリカーゼが細胞質に多く分布している。）。



主要組織適合遺伝子複合体 MHC のハプロタイプがホモ接合体のオスの精子と排卵誘発により得た卵細胞を使い、顕微受精を行った。発生の開始を確認後、RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子のゲノム編集を行うために、CRISPR/Cas9 のガイド RNA と Cas9 の mRNA を顕微鏡下に受精卵に導入した。約 1 週間後卵割の進行した胚を仮親に移植し、妊娠を確認した。しかし、妊娠 132 日目に流産となった。また、令和元年度に妊娠を確認したゲノム編集サルは出生したが、生後 5 日目に死亡した。肉眼で確認可能な奇形と HE 染色切片では組織学的に著変は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hirohito Ishigaki, Yasushi Itoh	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer, New York, NY	5. 総ページ数 17
3. 書名 Embryonal Carcinoma and Glioblastoma Cell Lines Derived from Monkey Induced Pluripotent Stem Cells. in: Methods in Molecular Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	依馬 正次 (Ema Masatsugu) (60359578)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授 (14202)	
研究分担者	築山 智之 (Tsukiyama Tomoyuki) (60612132)	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任准教授 (14202)	
研究分担者	石垣 宏仁 (Ishigaki Hirohito) (90432301)	滋賀医科大学・医学部・准教授 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------