

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16014

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を用いた糖尿病性腎症発症モデルブタの創出

研究課題名(英文)Generation of a pig model for the diabetic nephropathy using gene editing technology

研究代表者

谷原 史倫(Tanihara, Fuminori)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90754680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PDX1改変糖尿病ブタの精子を用いて作製した体外受精卵へのBDKRB2遺伝子を標的としたゲノム編集により糖尿病性腎症モデルブタの作出を目指した。BDKRB2遺伝子を高効率に改変するgRNA2種の同定を行い、それらを用いてゲノム編集胚を作成後に受胎ブタに移植したが産子を得ることはできなかった。一方、PDX1ヘテロノックアウトブタを作成し糖尿病に関連する表現型の観察を行ったところ、野生型ブタと比較し健康上の異常は認められず、耐糖試験の結果でも差は認められなかった。ブタでは、PDX1遺伝子単独のヘテロノックアウトでは糖尿病を誘発するには不十分であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は増加の一途を辿り、同時に問題となる糖尿病性腎症も含めてその病態解明および治療法の開発研究のため疾患モデルブタの担う役割は大きい。本研究では目的とする遺伝子改変ブタを得ることはできなかったが、本研究結果からPDX1遺伝子単独のヘテロノックアウトではブタでは糖尿病を誘発するには不十分であることが示唆された。PDX1遺伝子ヘテロノックアウトマウスでは膵臓、細胞からのインスリン分泌が低下することが知られているが、ブタでは表現型が異なることが示唆された。今後、糖尿病モデルブタの作出を目指す上で重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to generate diabetic nephropathy model pigs carrying both BDKRB2 and PDX1 genes modification from in vitro fertilized zygotes, which were prepared using sperm derived from PDX1 modified boar and introduced the CRISPR/Cas9 system targeting BDKRB2 gene by electroporation. Two gRNAs that efficiently modify the BDKRB2 gene were identified and used to generate gene-edited embryos, which were then transferred to embryonic pigs, but no offspring were obtained. In addition, we generated PDX1 monoallelic mutant pigs and observed their phenotypes related to diabetes. No health abnormalities were observed compared to wild-type pigs, and no difference was observed in the results of glucose tolerance tests. In pigs, monoallelic mutation of PDX1 gene alone is not sufficient to induce diabetes.

研究分野：動物発生工学

キーワード：ブタ ゲノム編集 CRISPR/Cas9 エレクトロポレーション 体外受精 糖尿病性腎症

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 糖尿病性腎症と高血圧

糖尿病患者は増加の一途を辿り、世界保健機関(WHO)が指定する克服すべき疾患として指定された唯一の慢性疾患である。近年の糖尿病治療技術の進歩により、血糖値のコントロールによる延命はある程度可能となったが、高血糖状態が続くことによる細小血管の障害が原因で高確率に合併症を引き起こす。なかでも糖尿病性腎症は臨床現場において最も問題となる合併症の一つであり、最終的には人工透析を必要とする重篤な腎不全に陥る。糖尿病は人工透析導入原因の第1位であり、高額な透析治療による膨大な医療費が社会的な問題となっている。

糖尿病を発症すると、高血糖状態に起因する酸化ストレス、微小炎症、糸球体内圧上昇などにより血管内皮細胞および腎細胞が傷害される。また、高血圧状態では腎糸球体内圧の上昇による糸球体の傷害とそれに起因する血流低下が起こる。糖尿病と高血圧の2つの原疾患が存在することで、腎臓病は急速に進行し、糸球体機能の低下により腎不全に陥る。

糖尿病性腎症の更なるメカニズム解明、および治療研究のため、有用なモデル動物を用いた検証は必須である。単一遺伝子の改変による高血圧モデル作製では、生理的な降血圧機構であるキニン-カリクレイン経路に関連する Bradykinin receptor B2 (BDKRB2) 遺伝子のノックアウトが知られており、Bdkrb2 ノックアウトマウスでは野生型と比較し有意に高血圧となる (Paolo et al. Immunopharmacology 1999)。

### (2) ゲノム編集技術による遺伝子改変ブタの作出

近年、CRISPR/Cas9、TALEN などを利用し、ターゲット遺伝子特異的にゲノム編集を行う技術が飛躍的に発展している。その中で、研究実施者らはエレクトロポレーションにより CRISPR/Cas9 システムをブタ胚に導入することで遺伝子改変を行う技術(GEEP 法)を確立した (Tanihara et al. *Sci Adv* 2016)。さらに本法を用いることで、胚発生期の脾臓形成に重要な遺伝子である Pancreas duodenum homeobox 1(PDX-1)遺伝子を改変し、生後直後からの顕著な消瘦、高血糖などを示す糖尿病モデルブタを高効率に作出することに成功した (Tanihara et al. 2020)。

### (3) 臨床試験段階での糖尿病モデル動物の不足

研究実施者らはこれまで糖尿病モデルブタの樹立を目指し、PDX1 改変ブタの作製に取り組み、系統化の前段階まで研究を進めることに成功した。作製した PDX1 改変ブタでは脾臓低形成の表現型を呈しており、疾患モデルとしての可能性を見出すことができた。しかし、いまだ根治療法が確立していない糖尿病では高確率で発症する合併症の制御が最重要課題となる。特に糖尿病性腎症による合併症は甚大であり、一つの疾患しか誘発しない PDX1 改変ブタは糖尿病モデル動物としては未だ不十分である。

## 【引用文献】

1. Paolo M et al. Role of the bradykinin B receptor in the maturation of blood 2 pressure phenotype: lesson from transgenic and knockout mice. *Immunopharmacology*, 44:9-13 (1999)
2. Tanihara F et al. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci Adv*, 2:e1600803 (2016)
3. Tanihara F et al. Generation of viable PDX1 gene-edited founder pigs as providers of nonmosaics. *Mol Reprod Dev.*, 87:471-481 (2020)

## 2. 研究の目的

本研究では、医学領域における糖尿病性腎症の発症メカニズムの解明および前臨床試験研究に使用する糖尿病性腎症モデルブタの作製を試みる。具体的には研究実施者らがこれまでに作製した PDX-1 改変糖尿病ブタの精子を用いて体外受精卵を作製し、GEEP 法により生体の血圧調整に関連する BDKRB2 遺伝子をノックアウトすることで、糖尿病と高血圧の両疾患を有する糖尿病性腎症発症モデルブタの創出を目標とした。糖尿病患者は高血圧も同時に患うケースが多く、よりヒトの病態に近いモデル動物として外挿性の高い効果的な研究が期待できる。

## 3. 研究の方法

PDX-1 改変糖尿病ブタからの精液の採取は完了し、体外受精に用いる凍結精液の作製は完了している。まず、BK2R 遺伝子を標的とするガイド RNA を複数作製し、体外受精卵に Cas9 とともに

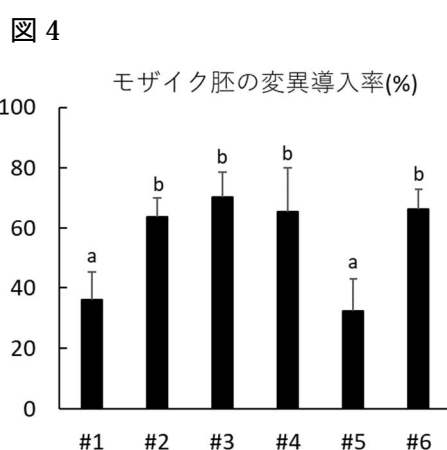
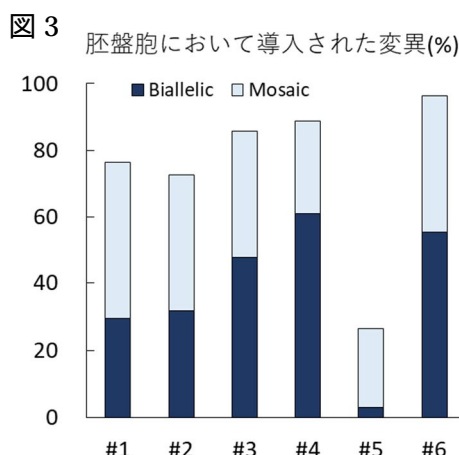
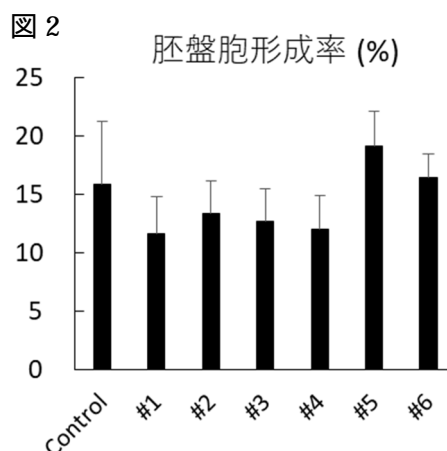
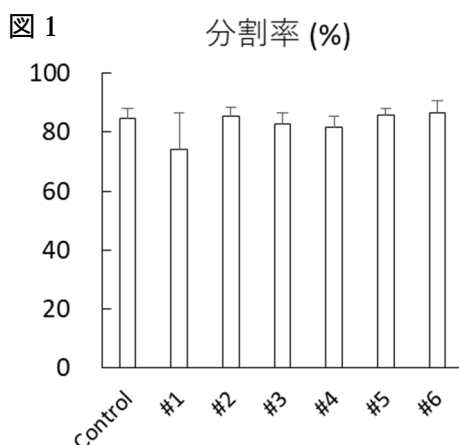
GEEP 法を用いて導入し、作製した胚盤胞のシーケンス解析により最もゲノム編集効率の高いガイドRNAを決定した。次いで、PDX-1 改変ブタ精子を用いて作製した体外受精卵に対して BDKRB2 遺伝子の改変を行い、PDX-1/ BDKRB2 改変ブタ受精卵を受胎ブタへ移植し結果を検討した。

#### 4. 研究成果

BDKRB2 遺伝子を標的とする gRNA を 6 種類作製し、エレクトロポレーションにより体外受精卵に Cas9 タンパク質とともに導入した。7 日間の体外発生培養後、胚の発生能とゲノム編集効率を評価した。エレクトロポレーションを行っていない対照区 (Control) と比較し、胚発生能 (分割率、胚盤胞形成率) に対する有意な影響は確認できなかった (図 1, 2)。作製した胚盤胞について、シーケンシングによる遺伝子解析を行い、遺伝子変異を指標に、ゲノム編集の効率を評価したところ、2 種の gRNA (#4, #6) において高いゲノム編集効率が確認された (図 3, 4)。変異導入率はサンガーシーケンスの解析結果を基に TIDE webtool (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>) を用いて算出した。gRNA#1 と #5 では、他の gRNA を使用した場合と比較し有意に低いゲノム編集効率を示した ( $p < 0.05$ )。

続いて、PDX1 改変ブタより採取・凍結した精液を用いて体外受精を行い、さらに BDKRB2 遺伝子を標的とする gRNA#4 と #6 を用いてゲノム編集を行ったゲノム編集胚を発情同期化した受胎ブタに移植を行ったが、妊娠には至らなかった。胚発生能 (分割率、胚盤胞形成率) については平均的な値を示しており、妊娠に至らなかった原因は不明であるが、これまでもゲノム編集後に高い胚盤胞形成率を示しているにも関わらず妊娠に至らなかったケースもあり、凍結精液による要因の他、gRNA による影響も示唆された。

一方、これまでに作製した PDX1 遺伝子改変ブタを野生型ブタと交配し PDX1 ヘテロノックアウトブタの作製と経過観察を行った。生後一か月齢で耐糖試験を行ったところ野生型ブタと比較し差は認められなかった。加えて、12 ヶ月齢まで飼育を行っても特に健康上の異常は認められなかった。PDX1 遺伝子単独のヘテロノックアウトでは、糖尿病を誘発するには不十分である可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanihara Fuminori, Hirata Maki, Nguyen Nhien Thi, Sawamoto Osamu, Kikuchi Takeshi, Otoi Takeshige	4. 巻 22
2. 論文標題 One-Step Generation of Multiple Gene-Edited Pigs by Electroporation of the CRISPR/Cas9 System into Zygotes to Reduce Xenoantigen Biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 Article 2249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirata Maki, Wittayarat Manita, Namula Zhao, Anh Le Quynh, Lin Qingyi, Takebayashi Koki, Thongkittidilok Chommanart, Tanihara Fuminori, Otoi Takeshige	4. 巻 11
2. 論文標題 Lipofection-Mediated Introduction of CRISPR/Cas9 System into Porcine Oocytes and Embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 Article 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani11020578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Le Quynh Anh, Tanihara Fuminori, Wittayarat Manita, Namula Zhao, Sato Yoko, Lin Qingyi, Takebayashi Koki, Hirata Maki, Otoi Takeshige	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of the effects of introducing the CRISPR/Cas9 system by microinjection and electroporation into porcine embryos at different stages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 Article 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-020-05412-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Wittayarat Manita, Hirata Maki, Namula Zhao, Sato Yoko, Nguyen Nhien T., Le Quynh A., Lin Qingyi, Takebayashi Koki, Tanihara Fuminori, Otoi Takeshige	4. 巻 92
2. 論文標題 Introduction of a point mutation in the KRAS gene of in vitro fertilized porcine zygotes via electroporation of the CRISPR/Cas9 system with single stranded oligodeoxynucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirata Maki, Wittayarat Manita, Tanihara Fuminori, Sato Yoko, Namula Zhao, Le Quynh Anh, Lin Qingyi, Takebayashi Koki, Otoi Takeshige	4. 巻 56
2. 論文標題 One-step genome editing of porcine zygotes through the electroporation of a CRISPR/Cas9 system with two guide RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 614 ~ 621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-020-00507-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanihara Fuminori, Hirata Maki, Nguyen Nhien Thi, Sawamoto Osamu, Kikuchi Takeshi, Doi Masako, Otoi Takeshige	4. 巻 20
2. 論文標題 Efficient generation of GGTA1-deficient pigs by electroporation of the CRISPR/Cas9 system into in vitro-fertilized zygotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biotechnology	6. 最初と最後の頁 Article 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12896-020-00638-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Maki, Wittayarat Manita, Namula Zhao, Le Quynh Anh, Lin Qingyi, Nguyen Nhien Thi, Takebayashi Koki, Sato Yoko, Tanihara Fuminori, Otoi Takeshige	4. 巻 47
2. 論文標題 Evaluation of multiple gene targeting in porcine embryos by the CRISPR/Cas9 system using electroporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 5073 ~ 5079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-020-05576-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanihara F, Hirata M, Thi Nguyen N, Anh Le Q, Hirano T, Otoi T.	4. 巻 87
2. 論文標題 Generation of viable PDX1 gene edited founder pigs as providers of nonmosaics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 471 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23335.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanihara F, Hirata M, Nguyen NT, Le QA, Wittayarat M, Fahrudin M, Hirano T, Otoi T	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of CD163-edited pig via electroporation of the CRISPR/Cas9 system into porcine in vitro-fertilized zygotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anim Biotechnol	6. 最初と最後の頁 147 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10495398.2019.1668801.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷原史倫、平田真樹、Nhien Thi Nguyen、Quynh Anh Le、平野隆之、音井威重
2. 発表標題 エレクトロポレーションを用いたCRISPR/Cas9システムのブタ体外受精卵への導入によるCD163遺伝子改変ブタの作製
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------