

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05988

研究課題名（和文）新規カニクイザル発生工学技術を用いた栄養膜特異的ノックアウト法の開発

研究課題名（英文）Establishment of a trophoblast-specific knockout method in cynomolgus monkey

研究代表者

岡村 永一（Okamura, Eiichi）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・助教

研究者番号：30755913

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）：本研究ではカニクイザルの胚盤胞期胚において栄養膜細胞特異的に遺伝子をノックアウトするための基盤技術の開発に成功した。具体的には、piggyBacトランスポゾン法とエレクトロポレーション/マイクロインジェクションを組み合わせ、高効率に大きなトランスジーンをマウスおよびカニクイザルのゲノムに導入する方法を確立した。また、マウスのファウンダー世代において組織特異的なノックアウトを実現する技術を開発することに成功した。これらの技術は霊長類モデルを用いた着床メカニズムの解明や不妊治療に向けた新たな基盤を提供するものであり、今後の研究と応用に大きな貢献が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規遺伝子導入技術を開発することにより、霊長類における着床の分子メカニズム解明に向けた基盤技術を確立することを目的とした。カニクイザルは世代サイクルが5年以上であることが研究のボトルネックとなっている。そのため、第1世代世代の遺伝子導入動物で組織特異的ノックアウトを効率的に実施可能であることをマウスで実証できた意義は大きい。本研究の成果を応用することで、カニクイザル胚盤胞期胚における栄養膜特異的な遺伝子ノックアウトを行うことにより、未だ謎に包まれた霊長類の着床に必須な遺伝子機能の一旦が明らかになり、ひいてはヒトの着床障害に対する治療法の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The achievement of this study lies in the successful development of a foundational technology for knocking out genes specifically in trophoblast cells of blastocyst-stage embryos in cynomolgus monkeys. Specifically, we established a method combining the piggyBac transposon system with electroporation or microinjection, enabling the high-efficiency introduction of large transgenes into the genomes of mice and cynomolgus monkeys. Additionally, we succeeded in developing a technique for achieving tissue-specific knockout in the founder generation of mice. These technologies provide a new foundation for elucidating implantation mechanisms using primate models and for advancing infertility treatments, with significant contributions expected for future research and applications.

研究分野：発生工学

キーワード：組織特異的ノックアウト piggyBac

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本では晩婚化の進行に伴い出生数の減少が認められる一方、不妊に悩む夫婦の割合は年々増加している。不妊の原因の一つに着床障害が挙げられるが、ヒトの着床現象は研究の困難さからブラックボックスとされており、その原因の解明や治療法の開発が進んでいない。ヒト受精卵は胚盤胞期に胚盤葉上層、原始内胚葉、栄養膜の三種類の細胞によって構成される。胚盤葉上層は将来の胚体、原始内胚葉は卵黄嚢、栄養膜は絨毛膜や胎盤へ分化すると考えられている。受精卵は受精 1 週間後に子宮へ着床する際、栄養膜を構成する栄養膜細胞が子宮内壁に接着し、内壁細胞を溶解する酵素を分泌しながら子宮内組織に侵入していくとされている。しかし、倫理的な制約から妊婦を対象とした研究は極めて困難であり、着床における栄養膜細胞機能を生体内で検証した研究はほとんど存在しない。

マウスを用いた研究では、着床における栄養膜細胞の役割について一定の知見が得られているが、哺乳動物の着床や妊娠のメカニズムは種間で多様性があり、必ずしもヒトに適用できるとは限らない。例えば、ヒト胚盤胞は胚盤葉上層側の動物極から子宮に着床するが、マウスは反対の植物極から着床する。このように着床機構が根本的に異なるため、ヒトの着床現象を理解するためには、ヒトに近いモデル生物を用いる必要がある。

申請者が所属する動物生命科学研究センターは長年にわたりカニクイザル発生工学技術の開発を進めており、日本初のトランスジェニックカニクイザルや、ゲノム編集技術によるノックアウトカニクイザルの作出に成功している。カニクイザルはヒトと類似した着床形態を示すことが知られており、優れたモデル動物といえる。そこで、本研究ではカニクイザルを表現型解析モデルとして用いるため、ファウンダー世代で組織特異的ノックアウトを行うための新技術を開発することにした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、カニクイザルの胚盤胞期胚において栄養膜細胞特異的に遺伝子をノックアウトするための技術を開発し、霊長類における着床の分子メカニズムを明らかにするための基盤を構築することである。具体的には、超高効率 piggyBac トランスジェニック法と Cre-loxP 相同組換え法により、組織特異的な遺伝子ノックアウト法を開発する。この技術を用いて、胚盤胞の栄養膜細胞特異的に遺伝子をノックアウトすることで、着床に関わる遺伝子機能を明らかにすることが出来ると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### トランスジーン導入技術の最適化

piggyBac トランスポゾン法による遺伝子導入をより効率的に行うために、各種材料の濃度、および、導入方法を最適化することにした。従来法では受精卵前核へ piggyBac トランスポゼース発現プラスミドベクターとドナープラスミドを顕微注入する方法が一般的であった。本研究ではまずマウス受精卵を用いた検討を行なった。具体的には、piggyBac トランスポゼースを受精後の早期に発現させるため、エレクトロポレーションを用いて piggyBac トランスポゼース mRNA を導入し、その後受精卵前核へドナープラスミドを顕微注入するという新規手法を試すことにした。ドナーベクターとしては、一般的なサイズ (約 5kb) に加え、比較的大きな (>10kbp) サイズ、さらに 100kb を超える大腸菌人工染色体 (BAC) を用いた実験を施行した。

#### 超効率的 piggyBac 法を用いて作成した Tg マウスの性状解析

最適条件にて作成した Tg マウスの性状解析のため、胎生 11.5 日胚と出生個体のゲノム解析を行なった。具体的には、一般的な Genotyping PCR に加え、ddPCR とサザンプロット法を用いたトランスジーンコピー数の解析を行なった。さらに、シングルセル RNA シーケンスを行い、遺伝子発現パターンを解析した。

#### カニクイザル胚への技術応用

マウス受精卵で確立した技術をカニクイザル受精卵に応用し、大きなトランスジーン DNA をカニクイザルゲノムに挿入するための条件を検討した。まず、カニクイザル受精卵に核酸を導入する手法の検討のため、エレクトロポレーションとマイクロインジェクションを試みた。piggyBac mRNA とドナー DNA を受精卵に導入し、胚盤胞まで培養して観察した。また、発生した胚盤胞をレシピエントカニクイザルに移植した。

#### 組織特異的ノックアウト実験と表現型解析

piggyBac トランスポゾン法を用いることでファウンダー世代において組織特異的のノックアウトを行う方法の構築を行なった。具体的には、組織特異的プロモーターに連結した Cre 遺伝子と全身性 gRNA 共発現カセットを含有するプラスミドベクターを構築した。このベクターを Cre-loxP 反応依存的に Cas9 を発現するユニットを保持するノックインマウスの受精卵へ piggyBac トランスポゾン法を用いて導入した。標的遺伝子としては Prmt1 遺伝子と Kit 遺伝子を選択し、それぞれ心臓と精巣でのノックアウトを試み、すでに知られている表現型と合致するか評価した。

#### 4. 研究成果

##### 高効率なトランスジーン導入技術の確立とその品質評価

従来法である受精卵前核への顕微注入法を用いた場合、piggyBac トランスポゾンを用いたトランスジェニックマウスの作製効率は約 50%程度であった。しかし、エレクトロポレーションを用い、至適な piggyBac mRNA とドナーDNA 濃度を用いることで、ほぼ 100%の効率でトランスジーンを導入することが可能であることを見出した(図 1)。また、この手法を用いることにより、通常サイズ(約 5kb)のトランスジーンのみならず、比較的大きな(>10kbp)トランスジーンもほぼ 100%の効率で導入可能であることを確認した。さらに、100kb を超える人工染色体も約 70%という非常に高い効率で導入可能なことを見出した。また、シングルセルレベルでトランスジーンの有無を検出可能な解析系を構築し、ほぼ全ての細胞がトランスジーンを保持していることを示すことが出来た。

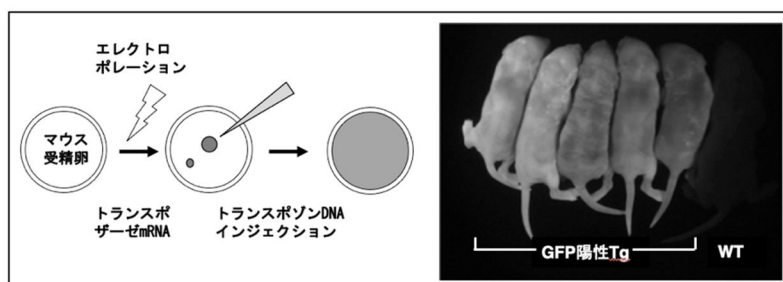


図1 トランスポザゼを用いた超効率的トランスジェニックマウス作製方法

##### 高効率な Tg カニクイザル作製技術の確立

本研究ではまず、カニクイザル受精卵に核酸を導入する手法の検討を行った。マウス同様にエレクトロポレーションを用いた場合、顕著に受精卵の発生率が低下することが確認された。そこで次に、マイクロインジェクションを試みたところ、コントロールと比較してほとんど発生率が低下せずに核酸を導入可能であることを見出した。そこで、この手法を用いて piggyBac mRNA とドナーDNA を受精卵に導入し、胚盤胞まで培養して観察した。その結果、ほぼ全ての胚が Tg となっていることを確認した(図 2)。また、一部の胚をレシピエントサルに移植したところ、着床が確認された。残念ながらこの胎子は妊娠途中で流産したものの、回収した組織を PCR 法によって解析したところ、トランスジーンがゲノムに導入されていることを確認した(図 3)。

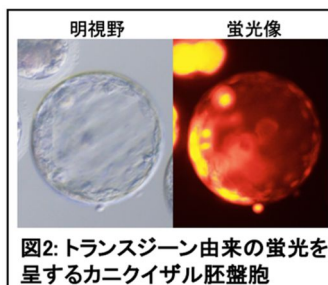


図2: トランスジーン由来の蛍光を呈するカニクイザル胚盤胞

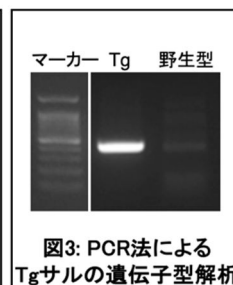


図3: PCR法による Tgサルの遺伝子型解析

##### ファウンダー世代における組織特異的のノックアウト法の確立と表現型解析

従来、重要な遺伝子の組織特異的な表現型解析には交配が必要な Cre-loxP システムを使用する必要があり、時間と労力を要していた。今回の研究では、超効率的 piggyBac 法を用いてファウンダー世代で組織的ノックアウトを行う新しい戦略を確立することに成功した。具体的には、Prmt1 遺伝子をターゲットとし、心臓特異的にノックアウトすることで、拡張型心筋症の表現型をファウンダー世代で観察することが出来た。この方法により、従来の方法に比べ、迅速かつ効率的に表現型解析を行うことが可能であることが示された。さらに、Kit 遺伝子の生殖細胞特異的のノックアウトを行うため、Ddx4 プロモーター駆動の CreERT2 を使用した実験を行った。その結果、精子を持たない表現型を示す個体を F0 世代で観察することにも成功した。この手法は、「ScKiP (single-step cKO mouse production with PiggyBac)」と名付け、今後の遺伝子機能解析において重要なツールとなることが期待される。

本研究の最終目標であったカニクイザル胚の栄養膜特異的のノックアウトの実現には至らなかったが、そのための基盤技術の構築には成功し、また、Tg マウスの品質評価系の開発など当初は計画していなかった技術の開発にも成功したことから、十分な成果が得られたと考えている。

これらの結果の一部はプレプリント論文として報告(bioRxiv 2023.12.10.570953; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.12.10.570953>)するとともに、国内学会と国際学会で発表した。今後正式な論文として発表予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eiichi Okamura
2. 発表標題 Establishment of highly efficient transgenic animal production method aiming to perform phenotyping at the founder generation
3. 学会等名 The Great Lakes Developmental Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡村 永一, 水野聖哉, 松本翔馬, 水谷英二, 増山七海, 木島佑輔, 谷本陽子, 加藤花名子, 鈴木颯, Knut Woltjen, 高橋智, 杉山文博, 谷内江望, 依馬正次
2. 発表標題 迅速な表現型解析を可能とする効率的トランスジェニックマウス作製法の確立
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第8回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三上 夏輝, 村田 知弥, 依馬 朋香, 岡村 永一, 松本 翔馬, 依馬 正次, 水野 聖哉, 杉山 文博
2. 発表標題 Hyper-speed cKO法を用いた心機能を制御する新規RNA結合タンパクの特定
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第8回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 康宇鎮, 岡村 永一, 松本 翔馬, 依馬 正次, 高橋 智, 水野聖哉
2. 発表標題 迅速なin vivo機能解析を可能とする効率的direct cKO法の確立
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第8回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡村永一, 水野聖哉, 松本翔馬, 水谷英二, 増山七海, 木島佑輔, 谷本陽子, 加藤花名子, 鈴木颯, Knut Woltjen, 高橋智, 杉山文博, 谷内江望, 依馬正次
2. 発表標題 Founder世代での表現型解析を可能とする効率的なトランスジェニック動物作製法の開発
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡村永一, 松本翔馬, 水野聖哉, 谷本陽子, 加藤花名子, 鈴木颯, 依馬正次
2. 発表標題 PiggyBACトランスポゾンを用いたトランスジェニック動物作製法の効率化
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 依馬朋香, 村田知弥, 岡村永一, 三上夏輝, 松本翔馬, 水野聖哉, 依馬正次, 杉山文博
2. 発表標題 迅速な心筋特異的ノックアウトマウスシステムの開発
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 依馬朋香, 村田知弥, 岡村永一, 三上夏輝, 松本翔馬, 水野聖哉, 依馬正次, 杉山文博
2. 発表標題 in vivo ゲノム編集を用いた迅速な心筋特異的ノックアウトマウスの作製
3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	水野 直彬  (Mizuno Naoaki)  (30815642)	東京医科歯科大学・高等研究院・プロジェクト研究員   (12602)	

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