

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700521

研究課題名(和文) コモンマーモセット受精卵へのアデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子導入法の開発

研究課題名(英文) Development of rAAV-mediated method to modify common marmoset pre-implantation stage embryo genome

研究代表者

岡田 浩典 (Okada, Hironori)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・科研費研究員

研究者番号：80416271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は霊長類において標的遺伝子座を任意に改変する技術の開発を進めた。結果は以下の通りである。1) AAV2Repタンパク質を発現するrAAV5を作製し、rAAV2ベクターゲノムの安定導入効率が上がることを確認した。2) 単独でNicking活性を持つTALEを発現するAAVベクタープラスミドを構築した。3) CRISPR/Cas9を搭載するAAVベクタープラスミドで標的遺伝子座に挿入/欠失変異を誘導出来、また、rAAVにパッケージング可能な事を確認した。4) 9型のAAVベクターがマーモセット受精卵に対し十分な感染能力を有し、特に内部細胞塊において導入遺伝子の強い発現が見られる事を確認した。

研究成果の概要(英文)：Although generation of transgenic marmosets with random insertion of lentivirus vector genome into embryo was reported, the phenotypes of such an animal would be diversified depending on the integration site. To establish more advanced method, adeno-associated virus vector (rAAV)-mediated transduction into marmoset embryo, and inclusion of several gene-editing systems into rAAV were examined. The results were as follows: 1) Enhancement of rAAV2 genome integration into a marmoset cell line due to addition of rAAV5 expressing AAV2Rep. 2) Construction of AAV vector plasmid carrying TALE with phi-Gamma catalytic domain. 3) Induction of indel mutation to HEK293 cells by transfection of AAV vector plasmid carrying CRISPR/Cas9 system, and production of rAAV from the plasmid. 4) Efficient rAAV9-mediated transduction into marmoset embryo, and consequent robust transgene expression in ICM. These resulting objects and findings would be useful for production of genome-edited non-human primate.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：アデノ随伴ウイルスベクター コモンマーモセット 受精卵 遺伝子挿入 疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

長年にわたり、遺伝子組み換えによる霊長類の疾患モデル動物作出は、大きな期待がされつつも実現が困難であった。霊長類は経済的・倫理的に多数の検討を行う事が難しい動物であり、研究開始当初では、遺伝子導入効率の高いウイルスベクターを用いた方法による受精卵へのランダムな遺伝子挿入による遺伝子導入個体作出の成功のみが報告されていた。しかし、ホストゲノム上のランダムな領域への挿入では、挿入された外来遺伝子が、挿入された周囲に存在する遺伝子発現制御領域の影響を受けるため、期待する遺伝子の発現、および表現型を得るのは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では霊長類における遺伝子改変動物作出に利用し得る、標的遺伝子座を任意に改変する技術の開発を目的とした。そのため、培養環境への不純物の混入や、温度変化に弱い受精卵に対し、高い精製度かつ体温でも安定した遺伝子導入に定評のあるアデノ随伴ウイルスの応用を目指した。

3. 研究の方法

遺伝子改変を行うための技術として、当初は野生型アデノ随伴ウイルスベクターが持つ Rep タンパク質の機能による、AAVS1 領域への AAV ベクターゲノムの特異的な遺伝子挿入について開発を進めた。一方で、研究開始後に新規技術として報告された、TALE および CRISPR/Cas9 についても開発を行った。AAV ベクターによる遺伝子導入については、実際にマモセット受精卵に対し感染させ、検証した。

4. 研究成果

研究を進めた結果、以下の成果を得た。

1) AAV2Rep タンパク質を発現する rAAV5 を作製し、AAV2 ベクターゲノムの安定導入効率が高まることを確認した。

2) 単独で Nicking 活性を持つ領域を付加した TALE を発現する AAV ベクタープラスミドを構築した。

3) rAAV に搭載可能な CRISPR/Cas9 を構築し、少なくとも AAV ベクタープラスミドではターゲット遺伝子座に挿入/欠失変異を誘導出来、また、rAAV にパッケージング可能な事を確認した。

4) 9 型の AAV ベクターがマモセット受精卵に対し十分な感染能力を有し、特に内部細胞塊において導入遺伝子の強い発現が見られる事を確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Ishibashi H, Motohashi H, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, Seki K. Effect of the size of zona pellucida opening on hatching in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) embryo. 2013 Nov;84(11):740-3. *Animal Science Journal*

査読: 有り

Doi: 10.1111/asj.12115.

2. Ishibashi H, Motohashi HH, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, Seki K. Ultrasound-guided non-surgical embryo collection in the common marmoset. 2013 Jun;13(2):139-44. *Reproductive Biology*

査読: 有り

Doi: 10.1016/j.repbio.2013.02.002.

3. Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Baba Y, Watanabe S, Takeda S, Okada T. Robust Long-term Transduction of Common Marmoset Neuromuscular Tissue With rAAV1 and rAAV9. 2013 May 28;2:e95. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*

査読: 有り

Doi: 10.1038/mtna.2013.21.

4. Ishibashi H, Motohashi HH, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, Seki K. Efficient Embryo Transfer in the Common Marmoset Monkey (*Callithrix jacchus*) with a Reduced Transfer Volume: A Non-Surgical Approach with Cryopreserved Late-Stage Embryos. 2013 May 9;88(5):115. *Biology of Reproduction*

査読: 有り

Doi: 10.1095/biolreprod.113.109165.

5. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S. Long-term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells that Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs With Duchenne Muscular Dystrophy. 2012 20(1):168-77. *Molecular Therapy*

査読: 有り

Doi: 10.1038/mt.2011.181.

査読: 有り

Doi: 10.1095/biolreprod.113.109165.

5. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S. Long-term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells that Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs With Duchenne Muscular Dystrophy. 2012 20(1):168-77. *Molecular Therapy*

2012 20(1):168-77. *Molecular Therapy*

査読: 有り

Doi: 10.1038/mt.2011.181.

[学会発表](計 16 件)

1. Okada H, Ishibashi H., Hayashita-Kinoh H., Chiyo T., Nitahara-Kasahara Y., Okada T., Takeda S. Generation of muscular dystrophy NHP model with rAAV 1 and 9-mediated transduction of common marmoset

19th Annual Meeting of JSGT, PS-6, July 4-6, 2013, Okayama

岡山コンベンションセンター

2. Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda.

Effective Transduction of Common Marmoset with rAAV1 and 9 To Generate NHP Model of Muscular Dystrophy

16th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 15-18, 2013, Salt lake city, USA

Salt Palace Convention Center

3. Yuko N. Kasahara, Hiromi H. Kinoh, Tomoko Chiyo, Hironori Okada, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda.

Engraftment of Mesenchymal Stromal Cells That Can Differentiate To Form Myogenic Cells Is Enhanced by Expressing IL-10 in Dog with Duchenne Muscular Dystrophy

16th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 15-18, 2013, Salt lake city, USA

Salt Palace Convention Center

4. Hiromi Hayashita-Kinoh, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Naoko Yugeta, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda.

Immune Tolerance Induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy with Trans-Placental rAAV9-Microdystrophin Transduction

16th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 15-18, 2013, Salt lake city, USA

Salt Palace Convention Center

5. Hayashita-Kinoh H., Okada H., Chiyo T., Nitahara-Kasahara Y., Okada T., Takeda S. Effective transfer of morpholino into muscle cells by using AAV empty capsids

18th Annual Meeting of JSGT, PO-59, June 28-30, 2012, Kumamoto

ホテル熊本テルサ

6. Chiyo T., Hayashita-Kinoh H., Nitahara-Kasahara Y., Okada H., Okada T., Takeda S. Shakuyaku-kanzo-to promotes recombinant AAV cellular uptake to enhance transduction of cultured mammalian cells

18th Annual Meeting of JSGT, PO-57, June 28-30, 2012, Kumamoto

ホテル熊本テルサ

7. Ishii A., Okada H., Hayashita-Kinoh H., Shin J-H., Okada T., Takeda S. Effective

transgene expression in non-human primate muscle with AAV type 9 vectors following immune suppression

18th Annual Meeting of JSGT, OR-31, June 28-30, 2012, Kumamoto

ホテル熊本テルサ

8. Okada H., Ishibashi H., Hayashita-Kinoh H., Chiyo T., Nitahara-Kasahara Y., Okada T., Takeda S. Strategy for efficient generation of DMD model marmoset with rAAV-mediated transduction

18th Annual Meeting of JSGT, OR-29, June 28-30, 2012, Kumamoto

ホテル熊本テルサ

9. Akiko Ishii, Hironori Okada, Hiromi Hayashita-Kinoh, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda rAAV8/9-Mediated Muscle Transduction with Tacrolimus in Non-Human Primate

15th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 16-19, 2012, Philadelphia, USA

Pennsylvania Convention Center

10. Hiromi Hayashita-Kinoh, Naoko Yugeta, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda rAAV9-Mediated Microdystrophin Gene Transfer with Immune Tolerance Induction Improves Dystrophic Phenotype of Canine X-Linked Muscular Dystrophy

15th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 16-19, 2012, Philadelphia, USA

Pennsylvania Convention Center

11. Hironori Okada, Hidetoshi Ishibashi, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda Strategy for rAAV-mediated transduction of common marmoset skeletal muscle to generate NHP DMD model

15th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 16-19, 2012, Philadelphia, USA

Pennsylvania Convention Center

12. Hironori Okada, Hiromi Hayashita-Kinoh, Tomoko Chiyo, Hirohiko Hohjoh, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda.

DISRUPTION OF COMMON MARMOSET DYSTROPHIN mRNA TO GENERATE NON-HUMAN PRIMATE DMD MODEL.

17th Annual Meeting of JSGT, OR-46, July 15-17, 2011, Fukuoka

九州大学医学部百年講堂

13. Ishii A., Okada H., Hayashita-Kinoh H., Shin J-H., Okada T., Takeda S.
Effective transgene expression in non-human primate muscle with AAV type 9 vectors following immune suppression
17th Annual Meeting of JSGT, OR-63, July 15-17, 2011, Fukuoka
九州大学医学部百年講堂

14. Hayashita-Kinoh H., Okada H., Chiyo T., Nitahara-Kasahara Y., Okada T., Takeda S.
AAV empty capsids mediate effective nuclear transportation of morpholino in the muscle cells
17th Annual Meeting of JSGT, OR-64, July 15-17, 2011, Fukuoka
九州大学医学部百年講堂

15. Hiromi Hayashita-Kinoh, Naoko Yugeta, Hironori Okada, Yuko Nitahara-Kasahara, Tomoko Chiyo, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda.
Immune Tolerance Induction in Canine X-Linked Muscular Dystrophy with rAAV9-Microdystrophin Transduction
14th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 18-21, 2011, Seattle, USA
Washington State Convention & Trade Center

16. Yuko Nitahara Kasahara, Hiromi Hayashita Kinoh, Hironori Okada, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Sachiko Ohshima Hosoyama, Michiko Wada Maeda, Akinori Nakamura, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda.
Long-Term Engraftment of Mesenchymal Stromal Cells That Can Differentiate To Form Myogenic Cells in Dog with Duchenne Muscular Dystrophy
14th American Society of Gene & Cell Therapy - May, 18-21, 2011, Seattle, USA
Washington State Convention & Trade Center

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

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(計 0 件)

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〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
岡田浩典 (OKADA, Hironori)
国立精神・神経医療研究センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 科研費研究員
研究者番号：80416271

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：