

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870884

研究課題名(和文) 遺伝子発現誘導可能な神経変性疾患モデル霊長類の家系作出と疾患バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Generation of transgenic monkey with tetracyclin-inducible gene expression system for neurodegenerative disease model.

研究代表者

富岡 郁夫 (TOMIOKA, Ikuo)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：30528196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、発現誘導可能な遺伝子システム(TET-onシステム)を持った、ポリグルタミン病モデルマーモセットの家系を作出することである。TET-onシステムを搭載した、ポリグルタミン病変異遺伝子のコンストラクトを作成し、マーモセット受精卵へと遺伝子導入をおこなった。結果、計7頭の産仔獲得に成功し、全てトランスジェニックで、Dox投与試験をおこなった結果、遺伝子発現誘導が確認された。さらに、計5頭の第二世代の獲得に成功し、1頭がトランスジェニックであった。以上より、TET-onシステムを導入したトランスジェニックマーモセットの家系を作出し、人為的な導入遺伝子の発現誘導に成功した。

研究成果の概要(英文)：Artificially controllable transgene expression system is indispensable tool for production of various disease model animals to precisely mimic human disease states. In the present study, we successfully generated transgenic marmoset line with tetracyclin-inducible gene expression system for neurodegenerative disease model. Mutant human ataxin 3 gene with 120 CAG repeats controlled by tetracycline-inducible system was introduced into marmoset embryos via lentiviral transduction. A total of seven live offspring were obtained. They and their fibroblast cells treated doxycycline revealed inducible transgene expression compared to before treatment. Moreover, a total of five second-generation (F1) offspring were obtained from founder marmosets and one was transgenic, showing successful germline transmission of transgene. In conclusion, the present study generated transgenic marmoset line having mutant human ataxin 3 gene controlled by tetracycline-inducible system.

研究分野：発生工学

キーワード：マーモセット トランスジェニック TETシステム 遺伝子改変 疾患モデル 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会に入りつつある現在、我が国ではアルツハイマー病は約 150-200 万人、パーキンソン病は約 10-15 万人、ポリグルタミン病は約 2-3 万人の患者がいると推定されており、その数は着実に増加している。これらの神経変性疾患の中でポリグルタミン病は、ポリグルタミン病は、ハンチントン病や様々な脊髄小脳失調症など 9 疾患の総称であり、原因遺伝子内のグルタミンをコードする不安定な CAG リピート配列の異常伸長が原因である。こうした知見を基に、異常遺伝子を導入した多くのトランスジェニックマウスモデルが開発され、神経変性疾患の発症分子メカニズムの解明や治療法開発研究に貢献してきた。しかしながら、ヒトとげっ歯類では脳の構造・機能や代謝経路が大きく異なり、またマウスなどの寿命内(約 2 年)では最終的な神経症状・病理像の完成にまで至らず、部位特異的な神経症状の解析や薬効・薬物動態評価、バイオマーカー開発には不向きであった。そのため、神経変性疾患の病態を再現するためには、げっ歯類より長寿命であり、かつ脳構造や代謝経路がヒトに近い霊長類モデルの開発が必要である。

我々はこれまでに、ユビキタスプロモーターである CMV プロモーター下にポリグルタミン病原因遺伝子を繋いだコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスモデルの作出に成功した(Tomioka I. et al., eNeuro, 4(2), 0250-16, 2017.)。得られた動物は、導入遺伝子の発現・原因タンパクが検出され、正常に成長し運動能力を獲得した後、進行性の症状を発症し病理像も確認された。しかしながら、遺伝子発現量を制御できなかったため、『胎仔期の死亡率が極めて高い』、『性成熟前に発症し系統維持が困難』などの問題が出てきた。さらに、本来の神経原性疾患の症状だけでなく、急性の筋原性変異が認められた。将来的に、継続的に研究にもちいることができ、より忠実にヒトの疾患病態を再現するモデルを作出するためには、遺伝子発現制御可能なシステムを用いた遺伝子改変マウスモデルの作出が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、薬剤(Dox: ドキシサイクリン)で人為的に遺伝子発現誘導可能な発現誘導可能な遺伝子システム(TET-on システム)を用いて、ヒト疾患モデル霊長類(マウス)の家系を作出する。特に、難治性神経変性疾患であるポリグルタミン病をターゲットとした。将来的にポリグルタミン病の病態と運動失調との相関を明らかにし、疾患のバイオマーカーを開発する。これにより発症前診断や治療薬候補の薬効評価、的確な薬物安全性評価など、より正確なヒト病態の解

析・理解が可能となる。本研究で得られる結果は、ポリグルタミン病のみならず同様の分子メカニズムで発症するアルツハイマー病やパーキンソン病など、他の神経変性疾患の病態解明、治療法開発にも貢献できる。

3. 研究の方法

ポリグルタミン病のうち世界的にも最も高頻度に発症する脊髄小脳失調症 3 型について、ポリグルタミン鎖をコードする CAG リピート配列を異常伸長(>120)させた変異遺伝子を合成した。この遺伝子を TET-on システムを搭載した発現ベクターに挿入し、ウイルスを介してマウス受精卵に導入した。

得られたファウンダーマウスから線維芽細胞を樹立し、ゲノム遺伝子解析をおこなった。また、細胞培養培地に Dox を添加することで遺伝子発現誘導した。さらに、個体レベルで遺伝子発現誘導解析するため、Dox を添加した飲水を与えることで遺伝子発現を誘導した。その前後で血液をサンプリングした。細胞および血液より RNA を抽出し、リアルタイム PCR によりトランスジェニックの発現量を定量した。

2 頭のファウンダーマウスより、顕微授精(ICSI)および自然交配により第二世代の作出をおこなった。得られた第二世代マウスのゲノム遺伝子解析と、遺伝子発現量解析をおこなった。

4. 研究成果

初年度に、異常伸長ポリグルタミン鎖をもつ変異遺伝子のデザインと発現ベクターの作製と変異遺伝子導入した遺伝子改変マウスの作出をおこなった。その結果、初年度から次年度にかけて、計 7 頭の産仔(TET1 ~ TET7)の獲得に成功した。

次年度に、獲得したマウスの耳より線維芽細胞を樹立し、導入遺伝子のゲノム遺伝子解析を実施した。その結果、全ての個体に導入遺伝子が確認され、トランスジェニックマウスであった。また、TET-on システムの動作確認のため、樹立した線維芽細胞を Dox 添加培地で培養し、その前後で遺伝子発現誘導解析をおこなった。その結果、Dox 添加前と比較して Dox 添加後の線維芽細胞は 3.8 倍から 5.7 倍程度の遺伝子発現誘導が確認された。さらに、個体レベルでも TET-on システムの動作を確認するためトランスジェニックマウスに Dox 添加した飲み水を与え、遺伝子発現誘導をおこなった。Dox 投与前後で血液を採取し、血液より RNA を抽出し遺伝子発現量解析に用いた。その結果、Dox 添加前と比較し 1.5 倍から 3 倍程度の遺伝子発現誘導が確認された。

最終年度に、2頭のファウンダーマーモセット(TET1とTET4)から、顕微授精(ICSI)および自然交配により第二世代の獲得をおこなった。その結果、TET1からは1頭の、TET4からは4頭の産仔作出に成功した。遺伝子解析の結果、TET4の産仔4頭のうち1頭がトランスジェニックマーモセットであることが分かった。

以上より、TET-onシステムを導入したトランスジェニックマーモセットの家系を作出し、人為的な導入遺伝子の発現誘導に成功した。本モデルは発症を人為的にコントロールできるため、進行症状の詳細な解析や疾患バイオマーカー開発のための有力なツールとなり得る。また、本モデルは、ポリグルタミン病だけでなく発症分子メカニズムが共通する様々な神経変性疾患の研究に貢献するものである。

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 2 件)

I Tomioka, H Ishibashi, EN Minakawa, H Motohashi, O Takayama, Y Saito, HA Popiel, Sandra Puentes, K Owari, T Nakatani, N Nogami, K Yamamoto, S Noguchi, T Yonekawa, Y Tanaka, N Fujita, H Suzuki, H Kikuchi, S Aizawa, S Nagano, D Yamada, I Nishino, N Ichinohe, K Wada, S Kohsaka, Y Nagai, K Seki, Transgenic monkey model of the polyglutamine diseases recapitulating progressive neurological symptoms. eNeuro, 4(2), 0250-16, 2017. doi: 10.1523/ENEURO.0250-16.2017, 査読有

富岡郁夫、非ヒト霊長類における発生工学の歴史、信州大学農学部紀要、52(9-15)、2016、査読無

[学会発表](計 5 件)

野上尚武・尾張健介・中谷輝美・小泉昌司・川野辺哲代・緒方洋輔・堀祐樹・花川隆・永井義隆・富岡郁夫・関和彦、ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化及び表現型解析(1)第二世代の作出と評価、第6回日本マーモセット研究会大会、東京大学、東京都、2016年12月12日~14日

小泉昌司・野上尚武・尾張健介・中谷輝美・川野辺哲代・永井義隆・富岡郁夫・関和彦、ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化及び表現型解析(2)行動表現型評価方法の確立、第6回日本マーモセット研究会大会、東京大学、東京都、2016年12月12日~14日

K Owari, N Nogami, T Nakatani, M Koizumi, H Ishibashi, Y Nagai, I Tomioka, K Seki. Generation of transgenic marmoset line with polyglutamine disease and behavioral phenotyping. Society for Neuroscience 46th annual meeting, San Diego, 2016/11/12-16.

富岡郁夫、マーモセットにおける遺伝子組換え動物作製の実際とその可能性について、第50回日本実験動物技術者協会総会、川越、2016年9月29日~10月1日、招待講演(シンポジウム2「実験動物における遺伝子改変技術の実際とその可能性」)

富岡郁夫、SCA3モデルマーモセットの作出、第57回日本神経学会学術大会、神戸、2016年5月20日、招待講演(ホットトピックス11シンポジウム「どこまで近づいたか、脊髄小脳変性症の治療法開発」)

[その他]

神経難病の病態解明と治療法開発へ向けた大きな一歩、-神経変性疾患の病態を再現する霊長類モデル動物の作出に成功-、厚生労働記者会記者発表、2017年3月24日、<http://www.ncnp.go.jp/press/release.html?no=341>

神経難病、サルで再現 治療、病態解明の手掛かり、新聞報道：共同通信、日経産業新聞、日刊工業新聞、日本科学新聞、47NEWS、愛媛新聞 他、2017年3月29日

神経難病、サルで再現 治療、病態解明の手掛かり、WEB ニュース：琉球新報、ORICON NEWS、カナロコ、大分合同新聞、北海道新聞、東京新聞(TOKYO Web)、中日新聞(CHUNICHI Web)、山陽新聞digital、長崎新聞ホームページ、日本海新聞、@S[アットエス]、BIGLOBE ニュース、中日新聞プラス、Web東奥、徳島新聞 Web、宮崎日日新聞社、西日本新聞、福島民報、京都新聞、デーリー東北、愛媛新聞 ONLINE、新潟日報 他、2017年3月29日

6. 研究組織

(1)研究代表者

富岡 郁夫 (TOMIOKA, Ikuo)

信州大学・学術研究院農学系・助教
研究者番号：30528196

(3)連携研究者

永井 義隆 (NAGAI, Yoshitaka)

大阪大学・医学部・教授

研究者番号：60335354

関 和彦 (SEKI, Kazuhiko)
国立精神・神経医療研究センター・部長
研究者番号：00226630