

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22363

研究課題名(和文) カニクイザルにおけるゲノム編集技術の開発と多発性嚢胞腎モデルへの応用

研究課題名(英文) Development of genome editing technique in monkey and its application to ADPKD monkey model

研究代表者

依馬 正次 (Ema, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザルPKD1エクソン4にSNP(一塩基多型)が存在することを見出し、父親側のみ認識するgRNAを用いることで、受精卵の父親ゲノムのみを効率的に切断することを確認した。これにより、PKD1ヘテロカニクイザル9頭を作出し、3頭について出産前後に病理検査を行ったところ、嚢胞が形成されていることを確認した。6頭の飼育を継続し、エコーを実施したところ、生後直後と6ヶ月齢を比較することで嚢胞が大きくなっていること、その後の経過を観察し嚢胞数・サイズが増大していることから、ヒト多発性嚢胞腎の表現型を再現していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、効率的なゲノム編集カニクイザルの作出手法が確立された。さらに、常染色体多発性嚢胞腎モデルカニクイザルが作出されたことから、今後常染色体多発性嚢胞腎の疾患機序が解明され、全く新しい治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found a SNP in the exon 4 of monkey PKD1 and succeeded to modify the paternal allele specifically by using sgRNA recognizing the SNP. In total, we generated 9 PKD1 heterozygous monkeys and 3 monkeys aborted showed renal cysts at the perinatal stage. We continued to breed 6 monkeys and found that the number and size of renal cysts increase in those monkeys, indicating the successful recapitulation of ADPKD phenotype in human patients.

研究分野：発生工学、疾患モデル動物

キーワード：ゲノム編集 多発性嚢胞腎 カニクイザル

## 1. 研究開始当初の背景

げっ歯類は解剖学的・生理学的にヒトに類似していることや、同一の遺伝的背景を有する純系が存在すること、小型かつ繁殖力が旺盛であることから、トランスジェニック、多能性幹細胞を用いた遺伝子改変技術、近年のゲノム編集技術を用いた遺伝子改変技術と相性が良く、多くの有用なヒト疾患モデルマウスが作出されてきた。一方で、マウスとヒトには相当数の遺伝的な差が認識されており、マウスとヒトゲノム間には対応がつかない相当数の遺伝子が存在している。オルソログと考えられる遺伝子でも、発現する組織が異なることもあり、機能的同一性が不明な遺伝子も多い。またパーキンソン病のようにモデルマウスがヒトと同じ病態を示さない事例が多く報告されるようになってきている。このようなことから、よりヒトに近い実験動物である非ヒト霊長類における遺伝子改変疾患モデル動物の開発が待たれていたが、効率的な霊長類胚でのゲノム編集技術の確立が課題であった。

ヒト常染色体多発性嚢胞腎は両側腎臓に多数の嚢胞が進行性に発生・増大する最も頻度の高い遺伝性嚢胞性腎疾患で、60歳代までに約半数が末期腎不全に至ることが報告されている。全世界に推定600万人の患者がいるとされる。原因遺伝子としてはPKD1が85%、PKD2が15%を占めており、ヘテロ欠損することで発症する。重要なことに、常染色体多発性嚢胞腎モデルとなるはずのPkd1ヘテロマウスは、生存期間中に殆ど嚢胞が発生しない。このため組織特異的もしくは時期特異的にPkd1を両アリルとも欠損させたマウスがモデル動物として使われてきたものの、病態を忠実に再現する新しいモデル動物が待たれていた。

## 2. 研究の目的

よりヒトに近いモデル動物であるカニクイザルにおいて(1)ゲノム編集技術を確認すること、(2)PKD1ヘテロカニクイザルを作製し、モデルとしての有用性を評価、疾患メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### カニクイザル胚の調製

雌カニクイザルにGnRH、ヒトFSHおよびヒトCGホルモンを連続投与した後で、腹腔鏡下で卵胞を回収した。

### カニクイザル受精卵へのgRNA導入

雌カニクイザルから回収した卵胞に雄から採精した精子を顕微注入し、受精卵を調製した。この受精卵に、gRNAおよびCas9 mRNA(もしくはCas9タンパク質)を微小注入もしくはエレクトロポレーションにより導入した。gRNAおよびCas9を導入した受精卵は試験管内でCMRL培地中で7日間培養し、胚盤胞を仮親カニクイザルに移植した。

### 標的配列における変異の確認

gRNAおよびCas9を導入した胚盤胞からDNAを調製しPKD1遺伝子エクソン2や4におけるin/del型変異の導入について、サンガーシーケンスにより確認した。

### PKD1胎児・産子の解析

胚盤胞の移植後30日目に、エコーにより妊娠診断を行った。流産個体が出た場合には、各種臓器を摘出し、腎臓に関してはブアン固定を行い、パラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオージン染色を行った。また、PKD1遺伝子産物に対する抗体、AQP1、AQP2、E-cadherinなどの腎尿細管マーカーを用いて抗体染色を行った。

出産した産子については出生直後、半年後にエコーを行った。

## 4. 研究成果

効率的に標的ゲノムの切断を誘導できるgRNAの候補配列を試験管内アッセイ系により選定し、その後カニクイザルの受精卵に、Cas9 mRNAおよびgRNAをインジェクションすることでゲノム改変を誘導したところ、効率的にin/del型の変異を導入することができた。しかし、複数のin/delが導入されていたことから、1細胞期のS期以降に変異が導入された可能性が考えられた。そこで、ゲノム編集効率を最適化するために、Cas9タンパク/gRNAを顕微授精後にエレクトロポレーションにより導入する実験を行ったところ、父方・母方アリルそれぞれに変異は1種類しか導入されていない均質な変異体が大部分であった。このことからCas9はmRNAよりもタンパク質で導入することが効率的な変異導入に重要であることが示唆された。

エクソン 2 をコードする両アリルに変異を導入したところ、流産個体を得られ、両側腎が顕著に拡大し、組織学的に多数の嚢胞によって占められていることが分かった。当初 Cas9 の量を加減しながら受精卵に導入することで、低確率で生じた PKD1 ヘテロ胎児を得る戦略であった。しかしながら、この方法では一義的にヘテロを得ることは困難であったため、アリル特異的遺伝子改変技術を開発し、選択的にヘテロ個体を作成することを試みた。具体的には、カニクイザル PKD1 エクソン 4 に SNP (一塩基多型: 父親側 (インドネシア産) 母親側 (中国産)) が存在することを見出した。父親側のみ認識する gRNA を用いることで、受精卵の父親ゲノムのみを効率的に切断することを確認し、この gRNA を用いてアリル特異的遺伝子改変受精卵を作製し、仮親へ移植 PKD1 ヘテロカニクイザルを出産させることに成功した。合計 6 頭の PKD1 ヘテロカニクイザルを出産させ、エコーにより各 PKD1 ヘテロカニクイザルに出生前後に腎嚢胞が生じていることを示した。

腎臓に関してはパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオージン染色を行った。また、PKD1 遺伝子産物に対する抗体、AQP1、AQP2、E-cadherin などの腎尿細管マーカーを用いて抗体染色を行ったところ、PKD1 ノックアウトカニクイザル腎においては AQP2 陽性の大型の嚢胞が多数見られたのに対して、PKD1 ヘテロカニクイザル腎においては AQP2 陽性の大型の嚢胞は少数皮質で認められたものの、大部分は E-cadherin 陽性の小型の嚢胞であった。この小型の嚢胞は他の尿細管マーカー (AQP1、AQP2) では染色されなかったため、遠位尿細管の一部を表していると解釈された。以上の結果から、これまでのげっ歯類モデルとは異なり、カニクイザルはヘテロでも嚢胞が出生前後に発生していることが示され、ヒト病態を再現していることが示された。

現在 ADPKD の根治療法が存在しないため、小児への治療介入は行われていない。しかし、マウスの時期特異的 Pkd1 ノックアウトマウスの先行研究 (Piontek et al., *Nat. Med.* 2008) によれば、Pkd1 両アリルを欠失させるという人工的な系ではあるものの、生後から若年期における Pkd1 の機能が嚢胞の増大に決定的に重要であることが示されており、ヒトでも若年期の嚢胞発生を抑制することが根治療法の開発に繋がる可能性がある。そこで、生後腎嚢胞の発生が再現できている PKD1 ヘテロカニクイザルの若年齢個体における嚢胞の体細胞変異および遺伝子発現を調べることで、これまで全く知見が無かった嚢胞発生の初期相における分子機序を明らかにすることは医学的意義が高いと考えている。また、この嚢胞発生の機序は霊長類特異的であることが推察され、生物学的意義も高いと考えられ、今後も研究を継続していく予定である。

Tsukiyama T\*, Kobayashi K, Nakaya M, Iwatani C, Seita Y, Tsuchiya H, Matsushita J, Kitajima K, Kawamoto I, Nakagawa T, Fukuda K, Iwakiri T, Izumi H, Itagaki I, Kume S, Maegawa H, Nishinakamura R, Nishio, Nakamura S, Kawauchi A, Emma M\*, Monkeys mutant for *PKD1* recapitulate human autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nat. Commun* 2019, 10(1):5517.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukiyama T, Kobayashi K, Nakaya M, Iwatani C, Seita Y, Tsuchiya H, Matsushita J, Kitajima K, Kawamoto I, Nakagawa T, Fukuda K, Iwakiri T, Izumi H, Itagaki I, Kume S, Maegawa H, Nishinakamura R, Nishio, Nakamura S, Kawauchi A, Ema M	4. 巻 10 (1)
2. 論文標題 Monkeys mutant for PKD1 recapitulate human autosomal dominant polycystic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13398-6.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依馬 正次
2. 発表標題 Genetically Modified Cynomolgus Monkeys for Human Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Modeling
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
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
---------	---------