

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22240053

研究課題名(和文) 標的遺伝子ノックダウンによる霊長類ヒト疾患モデルの作出

研究課題名(英文) Generation of non-human primate disease model by loss-of-gene function

研究代表者

佐々木 えりか (sasaki, erika)

公益財団法人実験動物中央研究所・その他部局等・その他

研究者番号：70390739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,400,000円

研究成果の概要(和文)：コモンマーモセットは霊長類で唯一導入遺伝子が次世代へ伝達する遺伝子改変個体の作出が可能であるが、より多くの疾患モデル作製のためには機能欠損型の遺伝子改変マーモセットの作出が求められる。本研究は、機能欠損型の遺伝子改変マーモセットの作出技術基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is the only primate that has been used to generate transgenic animals with germline transmission of the transgene to their offspring. However, transgenic non-human primates that show loss-of-gene function are required to create various disease models. In this study, we tried generation of loss-of-gene function transgenic marmoset disease models.

研究分野： 発生学、幹細胞学、繁殖生理学

キーワード： ノックダウン II型糖尿病 インスリンレセプター マーモセット

1. 研究開始当初の背景

トランスジェニック Tg マウスは実験動物としてバイオメディカル研究に多大な貢献をしている。しかしながら、マウスとヒトとは系統発生的に距離があるため、マウスで得られた研究結果を直接ヒトに外挿できないことが多々ある。そこで基礎的研究成果を臨床へ応用する際の有効性・安全性の検証には、マウスよりも系統発生的にヒトに近い非ヒト霊長類の実験動物を用いた前臨床研究が重要となる。

非ヒト霊長類のヒト疾患モデルの作出は技術的な問題から、現在まで施術によるもの、薬物投与によるもの、自然発症によるものに限られている。非ヒト霊長類においてもマウスと同様に tg によるヒト疾患モデルの作出が可能になれば、より多くの疾患の治療法および病態発症の機構の解明の研究を行う事が可能になる。

そのような背景のもと、2001年に Chan (Chan et al., Science 2000)らおよび Wolfgang (Wolfgang et al., PNAS 2001)らはそれぞれ独自にウイルスベクターを用いた tg 霊長類の作出を行い、両グループとも産仔を得たものの、いずれの産仔も体細胞での導入遺伝子の発現は認められず、次世代への伝達も認められなかった。更に 2008年に Yang (Yang et al., Nature 2008)らは、ハンチントン舞踏病の原因遺伝子をレンチウイルスベクターにより導入したアカゲザルの作出を行ったが、導入遺伝子遺伝子を発現した個体は生後すぐに死亡したため、ヒト疾患モデル霊長類の作出には至っていない。2009年、我々は小型霊長類コモンマーマーモセット(以下マーマーモセットと略す)を用いて、受精卵に緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein: GFP) 遺伝子をレンチウイルスベクターによる導入を行い、GFPを発現した受精卵を仮親の子宮に移植することにより、5匹の tg マーマーモセットの作出に成功した(Sasaki et al., Nature 2009)。これら5匹の tg マーマーモセットのうち4匹は毛・皮膚・血液などの様々な体細胞において導入遺伝子の発現が認められ、残りの1匹は胎盤において導入遺伝子の発現が認められ、得られた産仔すべてが tg 個体となる高効率の tg 技術を確立した。更に、体細胞において導入遺伝子が認められた4匹は生殖細胞にも導入遺伝子が挿入されており、次世代への導入遺伝子の伝達も確認されている。tg 技術によるヒト疾患モデルの確立では、tg 動物を作出することも重要なが、これらの動物を繁殖させてヒト疾患モデル動物としての動物コロニーを確立することが非常に重要な課題となる。この点、マーマーモセットは約1年半と霊長類の中では非常に短い時間で性成熟に達すること、一匹の雌の一年の産仔数が4~6匹であることなど高い繁殖効率を持つため、tg 技術によるヒト疾患モデル動物を作出するには霊長類の中で最も適した動物である。

我々はその後、種々の病因遺伝子を導入した tg マーマーモセットの作出にも成功しており、我々が確立した tg マーマーモセット作出技術は実用可能な技術であることが示されている。

一方、今後より多くのヒト疾患に対応したヒト疾患モデルマーマーモセットを作出するためには、標的遺伝子を破壊することにより遺伝子の機能を失わせた、標的遺伝子ノックアウト (KO) マーマーモセットの作出が重要な課題となっている。マウスでは、多くの KO マウスが作出されているが、KO 動物の作製には、生殖系列キメラを作出できる胚性幹 (ES) 細胞の存在が必須となっている。我々は、現在までに4株のマーマーモセット ES 細胞株を樹立したが、ヒト ES 細胞やマーマーモセットを含む霊長類の ES 細胞はその細胞の性質からキメラ個体が作出できないことが最近明らかにされた。そこで本研究では ES 細胞を介さずに標的の遺伝子の発現を制御し、かつ KO 技術では不可能な胎生致死を回避できるマーマーモセット遺伝子改変個体作出技術を確立する。この目的の遺伝子機能を消失させる方法の開発は、tg 技術による様々なヒト疾患モデルマーマーモセットの作出を可能にするものである。

本研究成果は、特許取得申請のため、現段階では公表可能部分のみを公開し、特許取得後、全成果を公表する。

2. 研究の目的

本研究では、発現遺伝子を制御し、目的の遺伝子のみを抑制的かつ可逆的に制御する遺伝子改変マーマーモセットの作出法を確立し、ヒト疾患モデル動物としての有効性を明らかにする。我々は霊長類で初めての tg 動物の作出とその次世代への伝達を証明・報告し、tg 技術を用いた霊長類によるヒト疾患モデル動物作出の端緒を拓いた。しかしながら、多くの疾患が遺伝子の機能不全に起因することを考えると、マウスで多用されている遺伝子 KO 動物作出が望まれるが、マウス以外の ES 細胞はキメラ動物を作製できないため、霊長類での遺伝子 KO 動物の作製は現在のところ不可能である。本研究では、既に我々が確立した遺伝子導入マーマーモセット作製法を発展させ、KO 手法が応用できないマーマーモセットにおいて、遺伝子機能喪失によるモデル作製の基盤を造り上げる。

3. 研究の方法

マーマーモセット INSR 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

マーマーモセット INSR 遺伝子を制御するための発現ベクターを構築するには、マーマーモセット INSR の遺伝子配列情報が必要であるため、他の動物種において INSR の発現が確認されている脳、肝臓、より RNA を抽出し cDNA を作

製した。さらに INSR 遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定した。

4. 研究成果

マーモセット INSR 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

マーモセット肝臓、脳より抽出した total RNA より作製した cDNA から、INSR 遺伝子を PCR により増幅し、クローニングした。この全塩基配列を解読し、アミノ酸配列を決定したところ、マーモセット INSR のアミノ酸配列はヒトと 93.7%、マウスと 90.7%の相同性を示した。また、ヒトやアカゲザルでも報告されている通り、マーモセット INSR においても Exon11 の 12 アミノ酸が Alternative splicing により欠如した Exon 11 - と欠如していない Exon 11 + が存在した(図 1)。

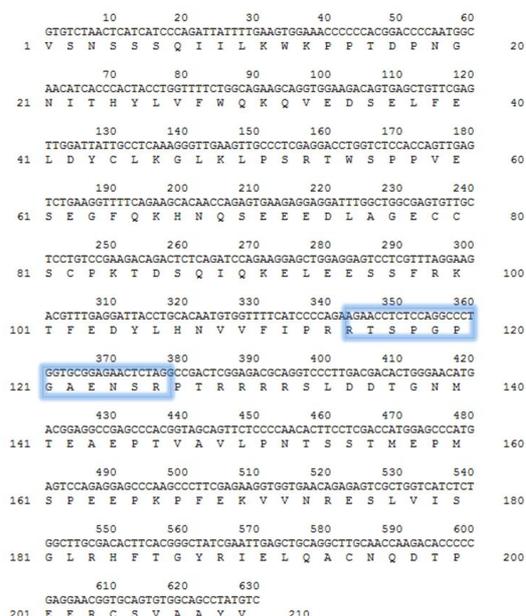


図 1. INSR 遺伝子の isoform 塩基配列とアミノ酸配列

マーモセット INSR 遺伝子の Exon9 から Exon12 を示している。青枠で囲った配列が Alternative splicing が生じる Exon11。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Takahashi T., Hanazawa K., Inoue T., Sato K., Sedohara A., Okahara J., Suemizu H., Yagihashi C., Eto T., Konno Y., Okano H., Suematsu M., Sasaki E. (2014) Birth of Healthy Offspring Following ICSI in In Vitro-Matured Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Oocytes. *PLoS One*. 9 :e95560
doi: 10.1371/journal.pone.0095560.
査読有

Kishi N., Sato K., Sasaki E., Okano H. (2014) Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology. *Dev Growth Differ*. 56(1):53-62. doi: 10.1111/dgd.12109.
査読有

Imamura, M., Okuno, H., Tomioka, I., Kawamura, Y., Lin, ZY., Nakajima, R., Akamatsu, W., Okano, HJ., Matsuzaki, Y., Sasaki, E., Okano, H.(2012) Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in Mammalian species. *Methods Mol Biol*. 925:21-48.
doi: 10.1007/978-1-62703-011-3_2. 査読有

Hanazawa, K., Mueller, T., Becker, T., Heistermann, M., Behr, R., Sasaki, E. (2012) Minimally invasive transabdominal collection of preimplantation embryos from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology*, 78(4):811-816, doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.029
査読有

Shiozawa, S., Kawai, K., Okada, Y., Tomioka, I., Maeda, T., Kanda, A., Shinohara, H., Suemizu, H., Okano, H.J., Sotomaru, Y., Sasaki, E., Okano, H. (2011) Gene targeting and subsequent site-specific transgenesis at the β -actin (ACTB) locus in common marmoset embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 20(9): 1587-1599. doi: 10.1089/scd.2010.0351. 査読有

Lin, ZY., Imamura, M., Sano, C., Nakajima, R., Suzuki, T., Yamadera, R., Takehara, Y., Okano, HJ., Sasaki, E., Okano, H. (2012) Molecular signatures to define spermatogenic cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Reproduction*, 143(5):597-609, doi: 10.1530/REP-11-0215. 査読有

[学会発表](計 46 件)

高橋司, 前田拓志, 久下壮, 佐藤賢哉, 井上慎一, 伊藤亮二, 佐々木えりか: 標的遺伝子ノックダウンによる II 型糖尿病モデルマーモセット作出の試み、第 3 回日本マーモセット研究会大会、2013 年 12 月 12 日・13 日(12)(福岡

県福岡市、九州大学百年講堂)

高橋司、前田拓志、久下壮、佐藤賢哉、
佐々木えりか：標的遺伝子ノックダウンによる II 型糖尿病モデルマーマーモセット作出の試み、第 60 回日本実験動物学会総会、2013 年 05 月 15 日-17 日 (茨城県つくば市、つくば国際会議場)

Erika Sasaki: “Transgenic non-human primate: a novel approach towards human disease models”, WTCSCR Open Seminar, 2012/04/19 (Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, University of Cambridge, UK) (招待講演)

佐々木えりか：ヒト疾患モデルとしてのコモンマーマーモセットの可能性、第 15 回循環器再生医療研究会、2011 年 11 月 19 日 (東京都中央区、武田薬品工業株式会社東京本社) (招待講演)

Erika Sasaki: “Establishment of non human primate preclinical study system for regenerative medicine”, CAS International Symposium on Animal Models of Diseases, 2011/05/11-13 (Beijing, China) (招待講演)

佐々木えりか：バイオメディカル研究における遺伝子改変霊長類、第 58 回日本実験動物学会総会、シンポジウム、2011 年 5 月 25 日-27 日 (東京都江戸川区、タワーホール船堀) (招待講演)

〔図書〕(計 6 件)

佐々木えりか：最新疾患モデルと病態解明、創薬応用研究、細胞医薬創製研究の最前線 (最新疾患モデル動物、ヒト化マウス、モデル細胞、ES・iPS 細胞を利用した病態解明から創薬まで) 「トランスジェニックマーマーモセットの開発と iPS 細胞治療薬前臨床モデル確立への試み」遺伝子医学 MOOK22 号 (株式会社メディカルドゥ)、2012 年 07 月 25 日発行、52~57 ページ

佐々木えりか：変わりゆく発生工学の今：核移植クローン・遺伝子改変の技術革新からヒト化実験動物の開発まで 「遺伝子改変非ヒト霊長類」月刊細胞工学 (学研メディカル秀潤社)、Vol.31 No.3 2012 年 3 月号、2012 年 2 月 22 日発行、331~336 ページ

佐々木えりか：in vivo 実験医学によるヒト疾患解明の最前線「トランスジェ

ニックマーマーモセット作出と今後の実用化」実験医学増刊号 (羊土社)、Vol.30 No.2、2012 年 1 月発行、148 (294) ~ 153 (299) ページ

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

公益財団法人実験動物中央研究所 (応用発生学研究部) ホームページ
<http://www.ciea.or.jp/division5.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐々木 えりか (SASAKI, Erika)
公益財団法人実験動物中央研究所 応用発生学研究センター・センター長
研究者番号：70390739

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
富岡 郁夫 (TOMIOKA, Ikuo)
現 信州大学農学部 先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所
研究者番号：30528196

高橋 司 (TAKAHASHI, Tsukasa)
公益財団法人実験動物中央研究所 マーマーモセット研究部
研究者番号：90571175

井上 貴史 (INOUE, Takashi)
公益財団法人実験動物中央研究所 マーマーモセット研究部 疾患モデル研究室・室長
研究者番号：60465937

前田 卓志 (MAEDA, Tkuji)
現 名古屋大学 医学系研究科・特任助教
研究者番号：40420822

岡原 純子 (OKAHARA, Junko)
公益財団法人実験動物中央研究所 マーモ
セット研究部 分子発生学研究室・室長
研究者番号：20464175