

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06462

研究課題名(和文)新規に作出したc-kit変異マーモセットの表現型解析

研究課題名(英文)Phenotypic analysis of newly generated c-kit mutant marmosets

研究代表者

汲田 和歌子(Kumita, Wakako)

公益財団法人実験動物中央研究所・マーモセット医学生物学研究部・研究員

研究者番号：50549128

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)：ゲノム編集技術と小型霊長類コモンマーモセットをもちいて作出したc-kit遺伝子改変マーモセットの有用性評価のため、c-kit遺伝子が関与する表現型解析を実施した。造血機能解析では野生型マーモセットと差はなかったが、変異個体が示す変異c-Kitのリン酸化能解析では、一部リン酸化能の欠如が示唆された。生殖機能解析では、オスc-kit変異個体の射出精子で改変c-kit遺伝子が検出されたが、メスc-kit変異個体はホルモン値測定により不妊の可能性が示唆された。本検討によりc-kitマーモセットは生殖学分野等で有用である可能性が示され、今後のc-kit変異霊長類モデルの確立に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

c-kitマーモセットをもちいた本研究の結果から、c-kit変異マウスとは違う表現型が確認された。これは、霊長類ならではの表現型を見出した可能性が考えられ、ヒトへの応用が期待できる。また不妊のc-kitマーモセットは人工樹立した生殖細胞や、幼若生殖細胞の移植レシピエントに使用できると考えられ、不妊症の原因究明や治療法開発の研究や、霊長類実験動物の問題点である世代時間を短縮する研究などに貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Phenotypic analyses of c-kit gene-modified common marmosets (c-kit marmosets), generated by gene-editing technology, were performed. Hematopoietic function analysis showed no difference between c-kit and wild-type marmosets. To clarify the phosphorylation ability of mutant c-kit exhibited by the c-kit marmoset, we performed a phosphorylation assay using a mutant c-kit expression vector and a phosphorylated c-kit antibody. The results showed that one mutant c-kit shown by males and all mutant c-kit proteins shown by females lacked phosphorylation ability. For reproductive function analysis, semen was obtained from a male c-kit marmoset and analyzed, and the mutant c-kit gene was detected. In female c-kit marmosets, urinary progesterone levels were measured, suggesting possible infertility. This study indicates that the c-kit marmoset may be a helpful model in reproductive research. It is expected to contribute to establishing c-kit mutant primate models in the future.

研究分野：実験動物

キーワード：コモンマーモセット c-kit遺伝子 ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

c-kit 遺伝子は生殖細胞、血液細胞、肥満細胞、色素細胞、腸管細胞の分化・増殖に関与している。c-kit 遺伝子に変異をもつ c-kit 変異モデル動物は、造血、生殖の機能解析や、消化管腫瘍や白血病といった c-kit 遺伝子関連疾患の研究などで用いられるが、これまでに確立されている c-kit 変異モデルはマウス等げっ歯類のみである (Russell ES. et al., 1979, Yarden Y. et al., 1987)。げっ歯類は動物実験に不可欠な存在であるが、ヒトで報告される遺伝子変異を再現しても、マウスでは期待する表現型が出ない場合がある。また c-kit 遺伝子は胎児期生殖細胞の発生段階に深く関与しているが、霊長類とげっ歯類では生殖細胞の発生機序が違うことが明らかになっている (Sasaki K. et al., 2016)。このような背景から、ヒトに近い霊長類動物での c-kit 変異モデルが有用であると考え、小型霊長類コモンマーモセットとゲノム編集技術をもちいて c-kit 変異マーモセットを作出した (c-kit マーモセット、2018 年 8 月出生、未発表)。マーモセットはヒトに近縁な真猿類で、繁殖効率が良い実験用霊長類であり、c-kit 変異マーモセットは自然突然変異体も含めて未だ報告されていない。作出した c-kit 変異マーモセットは毛色異常を示しており、体細胞ゲノム DNA を解析した結果、標的 c-kit 遺伝子部位で翻訳フレームシフトを引き起こす変化が認められた。そこで本研究では、c-kit 変異モデルとしての有用性を見出すため、表現型解析を行った。

## 2. 研究の目的

ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 をもちいて作出した c-kit 変異マーモセットの表現型の詳細を解析し、モデルとしての有用性を確認することを目的とする。作出した遺伝子改変マーモセットは c-kit 遺伝子に変異を有し、出生時より明らかな毛色異常を示すなど、c-kit 変異マウスと同様の表現型が確認できている。本研究ではさらに c-kit 遺伝子が関連する生体機能である造血機能、生殖機能を解析し、げっ歯類モデルとの違いを明らかにする。また作出した c-kit 変異マーモセットの示す変異 c-Kit の機能評価を行うことで、c-kit 変異霊長類モデルとしての有用性を見出す。

## 3. 研究の方法

3.1 血液解析：c-kit マーモセットおよび野生型マーモセットの血液を抗マーモセット血液細胞抗体で染色し、フローサイトメトリーをもちいて解析する。

3.2 変異 c-Kit タンパクのリン酸化能解析：c-kit マーモセットが示す変異 c-Kit 発現ベクターを作製し、細胞へ遺伝子導入して SCF 刺激したサンプルを作成し、抗リン酸化チロシン抗体をもちいてリン酸化チロシンシグナルを確認する。

3.3 c-kit 変異マーモセット体細胞からの生殖細胞分化誘導実験：c-kit マーモセットの始原生殖細胞 (PGC) 発生能を検討することで生殖機能を評価する。PGC 様細胞が得られた場合は PGC 特異的遺伝子発現量を RT-PCR 法で確認し、野生型由来 PGC と比較する。PGC 樹立実験が困難な場合は直接的な配偶子採取と解析を試みる。

## 4. 研究成果

### 4.1 血液解析

安全に採血が可能と判断された生後 1.5 歳齢で大腿部静脈採血を実施し、得られた末梢血は溶血液で 2~3 回洗浄してリンパ球を色素標識 CD2, 3, 4, 8, 20, 45 抗体で染色した。染色したリンパ球をフローサイトメトリーで解析した結果、同年代の野生型マーモセットの

血液像と大きな差は認められなかった。またげっ歯類では c-kit 遺伝子変異の内容によって造血機能異常による貧血が認められる場合があるが、c-kit マーモセットでは認められなかった。

#### 4.2 変異 c-Kit タンパクのリン酸化能解析

c-kit 変異体が示す変異 c-Kit タンパクについて、オス c-kit マーモセットが示す 2 種類と、メス c-kit マーモセットが示す 2 種類の、合計 4 種類の各変異 c-Kit 発現するベクターをそれぞれ構築して培養細胞へ導入した。その細胞融解液とリン酸化 c-Kit 抗体をもちいて、イムノブロット法によるリン酸化アッセイを実施した。その結果、オス c-kit マーモセットが示す変異 c-Kit の一つでリン酸化 c-Kit シグナルが検出された。オス c-kit マーモセットが示すもう一つの変異 c-Kit、およびメス c-kit マーモセットが示す変異 c-Kit に関しては、SCF 刺激によって特異的に増強されるシグナルは検出されなかった (図 1)。

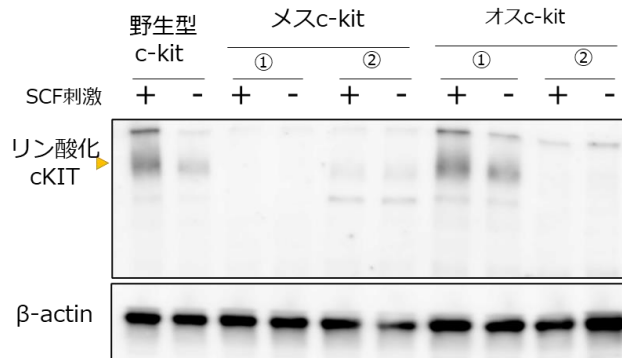


図1. 変異c-Kitのリン酸化能解析  
黄矢頭：リン酸化c-Kitシグナル

#### 4.3 c-kit 変異マーモセット体細胞からの生殖細胞分化誘導実験

c-kit マーモセットの体細胞由来 PGC の発生能を検討することで生殖機能を評価する計画だったが、PGC 樹立が困難であったことから、直接的な c-kit マーモセットの配偶子形成の解析および推定を行った。オス c-kit マーモセットは 2 歳齢ごろより、バイブレーター刺激による射出精液の採取を試みた。射出精液が獲得できたことから、精液からゲノムを抽出し、c-kit 遺伝子部位の PCR 産物からサブクローンを作製してシーケンス解析した。サブクローン 50 個を解析した結果、c-kit 遺伝子変異が確認され、2 種類の変異のうち 1 種類が 71.6%、もう 1 種類が 28.4%の割合で検出された (図 2)。また野生型メスマーモセットの卵子をもちいた体外受精を行い、得られた受精卵を解析した結果、オスが示す改変 c-kit 遺伝子を持つ受精卵が認められた。メス c-kit マーモセット に関しては、2 歳齢ごろより野生型オスマーモセットとペアリングを開始し、非侵襲的に得られる生体材料を用いてプロゲステロン値を測定し、その動向をモニターすることで性周期が動いているかを検討した。約 1 年間モニターした結果、プロゲステロン値に変化が見られず性周期が動いていないことが判った。このことから、オス c-kit マーモセットは生殖機能を有しており、一部リン酸化能が残存していることが影響することが考えられた。またメス c-kit マーモセットは生殖機能が不完全である可能性があり、リン酸化能を有していないことなどからも不妊である可能性も示唆された。

	精子濃度 ( $\times 10^7/\text{ml}$ )	総精子数 ( $\times 10^9$ )	精子運動率 (%)	運動精子濃度 ( $\times 10^7/\text{ml}$ )	総運動精子数 ( $\times 10^9$ )
オスc-kit	21.029	21.029	84.787	17.889	17.889
同年齢WT	5.551	5.551	77.710	3.984	3.984

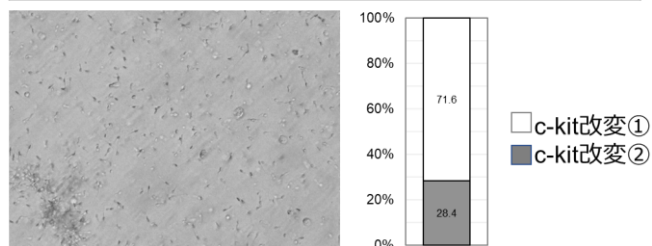


図2. オスc-kitの精子解析  
(上) 獲得した射出精液の運動性解析結果  
(左) 射出精子写真、(右) 精液由来ゲノムDNAのサブクローン解析結果

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakako Kumita, Kenya Sato, Yasuhiro Suzuki, Yoko Kurotaki, Takeshi Harada, Yang Zhou, Noriyuki Kishi, Kengo Sato, Atsu Aiba, Yasubumi Sakakibara, Guoping Feng, Hideyuki Okano & Erika Sasaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Efficient generation of Knock-in/Knock-out marmoset embryo via CRISPR/Cas9 gene editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49110-3	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計3件

1. 著者名 汲田和歌子, 佐々木えりか	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

1. 著者名 汲田和歌子, 佐々木えりか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 232
3. 書名 週刊医学のあゆみ Vol.273 No.9	

1. 著者名 佐々木えりか, 佐藤賢哉, 汲田和歌子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 386
3. 書名 実験医学別冊ゲノム編集実験スタンダード	

〔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
---------	---------