

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16023

研究課題名（和文）非ヒト霊長類における革新的遺伝子改変技術の開発

研究課題名（英文）Development of innovative gene editing technology in non-human primates

研究代表者

中家 雅隆（Nakaya, Masataka）

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任助教

研究者番号：90805459

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カニクイザルにおいて効率的に疾患モデルを作出するために、下記について検討を行った。1)常染色体優性多発性嚢胞腎モデルサル作出を目的に、その原因であるPKD1遺伝子について、CRISPR/Cas9法による変異誘導(KO)の検討を行い、ヒト病態を再現するPKD1 KOカニクイザルの作出に成功した。2)マウス及びカニクイザル受精卵において、導入遺伝子の発現モザイク性を極力抑えたpiggyBacトランスポゾンシステムの導入条件を見出した。3)相同組換え関連因子を発現するベクターシステムを構築し、KIへの応用を試みた。しかし有意な改善は認められず、さらなる技術開発の検討が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、小型げっ歯類では再現が困難であった疾患について、ヒトへの外挿性が高いカニクイザルにおいて、ノックアウト技術を用いた疾患モデル動物の作出が可能となった。またトランスジェニック技術においては、胚レベルではあるもののレポーター遺伝子の発現が認められたことから、導入遺伝子の過剰発現によるモデルサル作出の実現可能性が示唆された。これらの結果から、基礎医学研究に資するモデルカニクイザルリソースの開発が飛躍的に効率化することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated genome editing techniques, transgenic techniques, and knock-in (KI) techniques to efficiently create disease models in Cynomolgus monkeys. (1) With the aim of creating a model for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), we examined mutation induction (KO) of the PKD1 gene, the causative gene of the disease, using the CRISPR/Cas9 method. We successfully generated PKD1 KO Cynomolgus monkeys that replicate the human disease phenotype. (2) We identified the introduction conditions of the piggyBac transposon system that minimize mosaicism of reporter gene expression in both mouse and Cynomolgus monkey embryos. (3) We constructed a vector system expressing homologous recombination-related factors and attempted its application to KI. However, we did not observe significant improvements and further technological development needs to be considered.

研究分野：生殖工学

キーワード：非ヒト霊長類 カニクイザル 生殖工学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

疾患モデル動物の作出には遺伝子改変が比較的容易に行える小型げっ歯類が汎用されてきた。一方で、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経難病、インフルエンザなどの感染症、循環器疾患、ガンなどについて、げっ歯類ではヒト病態を忠実に再現できない疾患が多く存在する(Blesa and Pizedborski, 2014)。近年開発されたゲノム編集技術により、これまで遺伝子改変が困難であった動物種であっても受精卵において、標的遺伝子領域に変異を導入することが可能となった。これらのことから、ヒトへの外挿性が高い非ヒト霊長類のカニクイザルにおいて、忠実にヒト病態を再現できるモデルザルの作出が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出では、卵割期以降への Nuclease の残存により、モザイク変異を持った動物が産まれてくる。モザイク変異の頻度によって病態の表現型が個体毎に大きくばらつくことから、再現性ある疾患モデル作出において大きな障壁となっている。特に単胎妊娠であり世代交代に約 5 年を有するカニクイザルにおいては、マウスのように世代交代を経てモザイク性を解消するモデル系統化は困難である。また、常染色体優性の遺伝疾患は片アレル変異で発病することから、ヒトへの外挿を正確に実施するためには“限定的に片側アレルのみに変異を誘導する”ことが必要であった。さらに、より詳細な分子メカニズムの解析や表現型を再現するためには、遺伝子破壊(KO)によるモデルサル作出技術だけでなく、GFP 等のレポーター遺伝子を発現するトランスジェニック(Tg)やノックイン(KI)などの遺伝子挿入、置換技術も必要不可欠である。このため、本研究はカニクイザルにおいて、F0 世代で再現性ある疾患モデルを作出する高度な生殖工学基盤技術の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)非ヒト霊長類における ADPKD モデルサルの作出。

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の原因である PKD1 遺伝子をターゲットとし、カニクイザル受精卵において、CRISPR/Cas9 法による変異導入について検討した。カニクイザル PKD1 遺伝子特異的な gRNA を設計し、Cas9(mRNA もしくはタンパク質)とカニクイザル精子と共に成熟卵子に注入した。受精確認後、胚盤胞期胚まで培養を行い、一部をサンプリングし変異導入効率を検討した。さらに胚移植を行い、PKD1 遺伝子を欠損した遺伝子改変カニクイザルの作出を試みた。

#### (2)非ヒト霊長類における piggyBac トランスジェニック技術の最適化。

カニクイザルへの応用を念頭に、piggyBac トランスポゾンシステムについてマウス卵子を用い、蛍光レポーター遺伝子を発現するトランスジェニック(Tg)動物の作出を検討した。ベクター由来のトランジェントなレポーター発現があることから、偽陽性の発現が観察されない最小限のベクター濃度の検討やベクターの改良を行った。マウスにおいて設定した piggyBac 最適条件について、カニクイザル受精卵へ応用し、蛍光レポーターを発現する Tg カニクイザルの作出を試みた。

#### (3)非ヒト霊長類に応用可能なノックイン技術の開発。

DNA の二本鎖切断と同時に複数の相同組換え関連因子を発現するベクターシステムを構築し、人為的に内在性相同組換え環境の再現を試みた。構築したベクターシステムを評価するために、マウス ES 細胞において ROSA26 遺伝子座へ、IRES-Neor もしくは IRES-Zeor の遺伝子挿入の検討、薬剤選抜による評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)非ヒト霊長類における ADPKD モデルサルの作出。

カニクイザル受精卵において、高効率に目的の変異が誘導できる CRISPR/Cas9 法の操作条件を決定した。最適条件下で作出した胚盤胞期胚を胚移植レシピエントサルに移植したところ、PKD1 遺伝子に変異を持った PKD1 ノックアウト(KO)ザルの作出に成功した。また、流産した KO 個体の腎臓について免疫組織化学的解析を行った結果、遠位尿管由来の嚢胞が認められ、この種の嚢胞が最初期に現れることが再現された。さらにより詳細な CRISPR/Cas9 法の条件を設定することで、約 80%の効率でヘテロ接合体変異を持つ個体の選択的作出を可能とする「アレル特異的タ

「ゲティング法」の開発、「Floxed allele ノックインサル胚」の作出にも成功した。これらの成果を論文にまとめ、報告した (Nature Communications, 2019)。

(2)非ヒト霊長類における piggyBac トランスジェニック技術の最適化。

マウス受精卵において、モザイク発現を極力抑えた piggyBac Tg の条件を決定した。最適化した条件下で作出したマウス胚盤胞期胚について、蛍光が認められた胚をレシピエントマウスに移植したところ、獲得した全ての産子について、全身に蛍光レポーター遺伝子を強く発現していることを確認した。カニクイザルについても同様の条件で検討を行い、胚盤胞期胚においてレポーター遺伝子の発現が確認されている。現在、レポーター発現が認められた胚盤胞期胚について、レシピエントサルへの胚移植移植を実施しており、Tg カニクイザル産子の獲得を試みている。

(3)非ヒト霊長類に応用可能なノックイン技術の開発。

構築したベクターシステムを評価するために、マウス ES 細胞において ROSA26 遺伝子座へ、IRES-Neor もしくは IRES-Zeor の遺伝子挿入の検討、薬剤選抜による評価を行った。結果、ノックイン効率は既存の方法と比較し有意な差は認められなかった。このことから、構築したベクターシステム以外の因子が人為的な内在性の相同組換え活性化に必要である、または相同組換え複合体のコンフォメーションに融合タンパクが干渉しているのではないかと考えられた。引き続き、相同組換え誘導ベクターの改良を行っていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Nakakita Baku, Kishine Aoi, Nosaka Yoshiaki, Saito Saki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Kawamoto Ikuo, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nagano Masahiro, Kojima Yoji, Nakamura Tomonori, Yabuta Yukihiro, Horie Akihito, Mandai Masaki, Ohta Hiroshi, Saitou Mitinori	4. 巻 41
2. 論文標題 <i>Ex vivo</i> reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	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） 10.15252/embj.2022110815	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 -

1. 著者名 Jayakumar Vasanthan, Nishimura Osamu, Kadota Mitsutaka, Hirose Naoki, Sano Hiromi, Murakawa Yasuhiro, Yamamoto Yumiko, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Seita Yasunari, Nakamura Shinichiro, Kawai Jun, Sasaki Erika, Ema Masatsugu, Kuraku Shigehiro, Kawaji Hideya, Sakakibara Yasubumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Chromosomal-scale de novo genome assemblies of Cynomolgus Macaque and Common Marmoset	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41597-021-00935-6	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 -

1. 著者名 Kojima Yoji, Yamashiro Chika, Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Okamoto Ikuhiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 4
2. 論文標題 GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000974
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000974	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 -

1. 著者名 Seita Yasunari, Morimura Toshifumi, Watanabe Naoki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakamura Shinichiro, Suzuki Toshiharu, Yanagisawa Daijiro, Tsukiyama Tomoyuki, Nakaya Masataka, Okamura Eiichi, Muto Masanaga, Ema Masatsugu, Nishimura Masaki, Tooyama Ikuo	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-191081	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 -

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 S, Nakamura S, Kawauchi A, Ema M	4. 巻 10
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 -
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 -

1. 著者名 Kobayashi Kenichi, Tsukiyama Tomoyuki, Nakaya Masataka, Kageyama Susumu, Tomita Keiji, Murai Ryosuke, Yoshida Tetsuya, Narita Mitsuhiro, Kawauchi Akihiro, Ema Masatsugu	4. 巻 37
2. 論文標題 Generation of an OCT3/4 reporter cynomolgus monkey ES cell line using CRISPR/Cas9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101439 ~ 101439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2019.101439	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中家 雅隆, 築山 智之
2. 発表標題 piggyBacトランスポゾンシステムを利用したトランスジェニックカニクイザルの作出
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中康平, 岡崎祐樹, 妻木孝憲, 杉浦麻妃瑠, 大下莉奈, 大矢部和胡, 山本真穂子, 種子田妃良, 和田奈那美, 曾炫凱, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡
2. 発表標題 マウス受精卵におけるCyclin T1, T2の過剰発現が転写活性に及ぼす影響.
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦麻妃瑠, 岡崎祐樹, 山中康平, 妻木孝憲, 大下莉奈, 大矢部和胡, 山本真穂子, 種子田妃良, 和田菜那美, 曾炫凱, 黒坂哲, 中家雅隆, 三谷匡
2. 発表標題 マウス受精卵におけるCyclin T2a, T2bの発現解析.
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中家 雅隆, 築山 智之, 小林 憲市, 岩谷 千鶴, 土屋 英明, 清田 弥寿成, 松下 淳, 北島 郁, 河本 育士, 中川 孝博, 福田 浩司, 岩切 哲平, 和泉 博之, 板垣 伊織, 中村 紳一朗, 河内 明宏, 依馬 正次
2. 発表標題 ゲノム編集による遺伝性腎疾患モデルカニクイザルの作出
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.rcals.jp/>

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
---------	---------