

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03177

研究課題名(和文) 様々なタイプの遺伝子改変マーマセット作製に向けた新規発生工学技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel techniques for generation of genome engineering marmosets

研究代表者

渡部 聡朗 (Watanabe, Toshiaki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・専門職

研究者番号：40715405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では霊長類でも様々なタイプの遺伝子改変を可能にするために二つの新規生殖工学技術の開発を行った。第一は、受精卵への injection によってレポーター遺伝子のノックインが起こった胚を移植前に選抜する方法の開発である。高感度な化学発光を起こす NanoLuc を用いてノックイン胚を選抜することを可能にした。第二は、生殖細胞移植のためのホスト動物の開発である。HSV-TK系を利用することで、現状による方法よりも3Rにより適した、薬物を少量投与するだけで生殖細胞を除去できる方法を開発した。本研究の成果は、霊長類に適した発生工学技術を確立していくために重要な基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非ヒト霊長類を使った研究は、マウスでは明らかにすることができない霊長類に特有なメカニズム・現象を理解する上で必要である。遺伝子改変霊長類はそのような研究を進める上でたいへん役に立つ。霊長類とマウスでは飼育の費用、得られる産子の数、妊娠・性成熟期間など大きく異なる。そのため、発生工学技術に関してもマウスとは異なる霊長類に適した戦略が必要になる。本研究で得られた成果は、これまで知られていなかった霊長類特有の生物学的知見を産み出すとともに病態モデルの作製を通じた医学の発展に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Genetically modified primates are very useful for research understanding primate-specific mechanisms and phenomena. Since primates and mice differ greatly, techniques for the generation of genetically modified primates need to be adapted to primates. Currently, in marmosets, only simple knockout or transgenic animals can be generated. In this study, I developed two novel techniques for the generation of genetically modified marmosets. First, I developed a method to select embryos with the desired reporter gene knock-in before the transplantation. Using NanoLuc, which produces highly sensitive chemiluminescence, knock-in embryos were selected before transplantation. The second is the development of host animals for germline transplantation. By using the HSV-TK system, we developed a more 3R-compatible method than the current method. The results of this study will provide a basis for making various types of genetically engineered animals in a way that is suitable for primates.

研究分野：霊長類生殖生物学

キーワード：マーマセット 生殖細胞 精子幹細胞 初期胚 ノックイン 移植前選抜

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の実験動物としてマウスが良く用いられる。ヒトとマウスでは進化的に大きく離れており、マウにおける知見だけではヒトで働く機構を完全には理解できない。コモンマーマーモセットはブラジル原産の小型のサルであり扱いやすく、霊長類のモデル動物として期待されている。遺伝子改変マーマーモセットを使用することで、霊長類の生物学や医学研究が大きく進展することが期待されている。マーマーモセットにおける遺伝子改変個体作製は受精卵の遺伝子改変によって行われる。しかし、次のような大きな課題がある。多くの産子を得ることができないため長鎖 DNA のノックインなど低頻度で起こる遺伝子改変は困難、妊娠期間が長いにも関わらず産まれるまで目的の遺伝子改変がなされているか分からない。より多様な遺伝子改変を可能にし、作製にかかる時間・コストを削減するためには霊長類に適した新たな系を確立する必要がある。

2. 研究の目的

ノックインを始めとする複雑な遺伝子改変マーマーモセットを作出するための基盤を創出する。第一に受精卵ベースの方法の改良・効率化を進めるとともに、第二に目的の変異を持った細胞をあらかじめ選抜できる細胞ベースの個体作製法の開発を進める。

本研究では、第一にレポーター遺伝子をノックインしたマーマーモセットを受精卵における遺伝子改変によって効率的に作製する方法を検討する。第二に、細胞ベースの個体作製法を開発す。他の研究において(学術変革領域研究 B) iPS 細胞からの生殖細胞の誘導に取り組んでおり、本研究ではその誘導した生殖細胞を移植するためのホスト動物を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

研究 1 :レポーター遺伝子のノックインが起こったマーマーモセット初期胚を選抜する方法の開発

効率的に遺伝子改変動物を作出するためには動物種の特性に合わせた戦略が必要になる。たくさんの産仔を獲得できるマウスに比べて、少数の産仔しか得られないマーマーモセットにおいては目的の遺伝子改変が起こった産仔を高頻度で得ることが重要になる。本研究ではレポーター遺伝子のノックインマーマーモセットを効率的に作出するために、そのような改変を起こした胚を移植前に選抜する方法の開発を目指した。

研究代表者は霊長類の精子幹細胞の研究を行っており、精子幹細胞で特異的にレポーター遺伝子を発現する動物の作出を想定し系の確立を行った。初期胚における選抜を可能にするために、精子幹細胞で発現するとともに初期胚でも発現している Dppa4 遺伝子に着目した。その Dppa4 遺伝子の C 末端に、EGFP と超高感度の発光遺伝子である Nluc の融合タンパク質である GpNluc をノックインした。そして、Nluc の発光を用いてノックインが起こった胚を選抜できるのかを検討した

研究 2 :生殖細胞を移植するホスト動物の開発

マウスでは生殖細胞を移植するためのホスト個体として次の二種類がよく用いられる。一つ目は生殖細胞形成に関わる遺伝子に変異を持ち、生殖細胞を欠損した変異体(例:c-kit 変異体)である。ただ、その作製のためにはヘテロ同土を掛け合わせてホモを得る必要がある。そ

のため、実験に利用できない個体が多く生じてしまうので霊長類への応用は難しい。第二に、抗がん剤(Busulfan)を投与して精子幹細胞を欠損させるような方法も用いられる。しかし、この方法は動物へのダメージが大きい。特に3Rの順守が重要である霊長類においては動物への負担が少ない方法が理想である。本研究では生殖細胞移植のための新しいタイプのホストを開発する。本研究ではマウスを用い、開発する方法が実際に生殖細胞の移植に有用であることを実証する。そして次のステップでマーマセットを作出して、将来的にマーマセットの初期生殖細胞や精子幹細胞の移植に応用することを想定している。

本研究では自殺遺伝子として知られる単純ヘルペスウイルス(HSV)のチミジンキナーゼ(TK)を用いて生殖細胞を死滅させるシステムを構築する。しかし、通常の HSV-TK はたとえガンシクロビル非存在下でも雄性不妊を引き起こし繁殖に利用できないという問題がある(HSV-TKの配列内に精巣特異的な promoter が存在して、精巣において N 末を欠いた HSV-TK が発現するため)。本研究では、雄性不妊にならないことが知られる変異型の HSV-mutTK を利用しこの問題の解決を試みた。本研究では生殖細胞特異的な Vasa プロモーターから HSV-mutTK を発現するマウスを作製した。

4. 研究成果

研究1：レポーター遺伝子のノックインが起こったマーマセット初期胚を選抜する方法の開発

精子幹細胞でレポーターを発現するマーマセットを作製することを想定して、精巣内で精子幹細胞特異的に発現するとともに初期胚においても発現する遺伝子を探索した。初期胚の遺伝子発現データは、Cambridge 大学の Thorsten 博士より scRNA-seq のデータを入手し、精子幹細胞の発現データは自らの成体精巣の scRNA-seq のデータを利用した。両方の細胞である程度以上発現する遺伝子として Dppa4 を同定した。Dppa4 領域にノックインを行うために、GFP と Nluc の融合タンパク質である GpNluc をノックインする long ssDNA Donor を作製した(図1)。それを Cas9-gRNA とともに GV 卵子核に injection し、受精・発生を進めた。マーマセットの胚性ゲノムの活性化は 8-cell で起こるため、想定したノックインが起こった胚は 8-cell 以降に Nluc の発光が観察されるはずである。受精後 4 日目に 8-cell 以降に発生が進んだ胚 8 個のうち一つでモザイク状に Nluc

の発光が観察され、また、Genotyping PCR も同時に行ったところ、発光が見られた胚のみで positive なバンドが観察された。次に、より高率でノックインが起こることを目指し、受精卵の前核に injection を行った。Injection 後に生存した胚 7 個のうち 2 個でノックインに由来するバンドが PCR で検出された(図1)。二個のうち一つ(#1)は 3-cell で発生が止まってしまったせいか発光が観察されなかったが、もう一つ(#2)の胚に関しては全割球において発光が観察された。

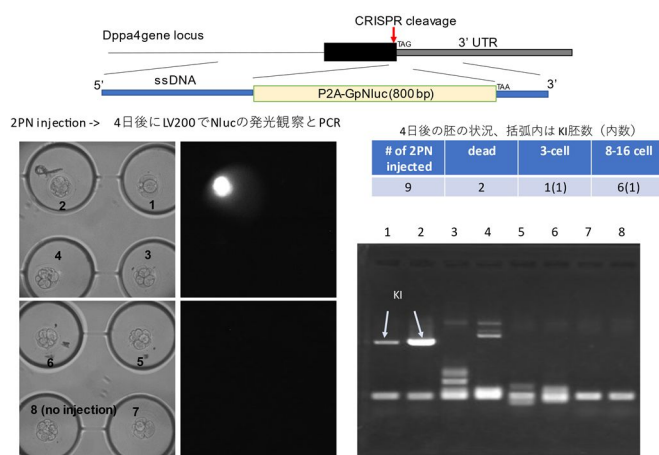


図1. 胚1と2は、シーケンスでKIを確認。1で発光が見られないのは発生が3 cellでstopしたためと思われる。2では、発光が全細胞で観察された。

本研究により Nluc による発光を用いて、目的のノックインが起こった胚を移植前に選抜する

ことが可能であることが分かった。技術的にはより難しいが、GV 核よりも受精卵の前核に injection を行うことでより効率的にノックインを引き起こすことができた。本研究により、Nluc を用いることで移植前に目的の遺伝子改変を持つ胚を選抜できることが示された。ノックインマーマーセットを効率的に産生するための基盤が構築された。

研究 2 :生殖細胞を移植するホスト動物の開発

マウス *Vasa* ロークラスへ HSV-mutTK をノックインするためのドナー-ssDNA を Cas9-gRNA と共に BDF1 マウス前核にインジェクションした。その結果得られた 31 匹の産子のうち 3 匹で目的の改変が見られた。そのうちの 1 匹からマウスコロニーを形成した。ノックインマウスに様々な濃度 (0.5, 2, 5, 15, 150, 400, 1000 mg/kg) のガンシクロピルを投与し 6 週間後に精巣を観察した。そうしたところ、15 mg/kg 以上の濃度で投与すると精子形成が起こらなくなった (図 2A, B)。1000 mg/kg の濃度で投与した場合死亡する個体がみられたため、15 mg/kg もしくは 150 mg/kg の濃度で処置したマウスを移植実験に用いることにした。

生殖細胞移植のホスト動物として利用できるかを検討するために、ガンシクロピル処置を行った後に培養精子幹細胞を移植した。培養精子幹細胞はホストの精巣に生着したが、移植に用いた精子幹細胞に染色体異常が存在したため、精子形成が精母細胞の段階で停止していた (図 2C)。本研究で開発したマウスが生殖細胞移植のホストとして有用であることを確認することを目的に、今後正常な核型を持つ培養精子幹細胞を移植し、移植した細胞からの精子産生を調べ、それからの次世代産生を試みる予定である。

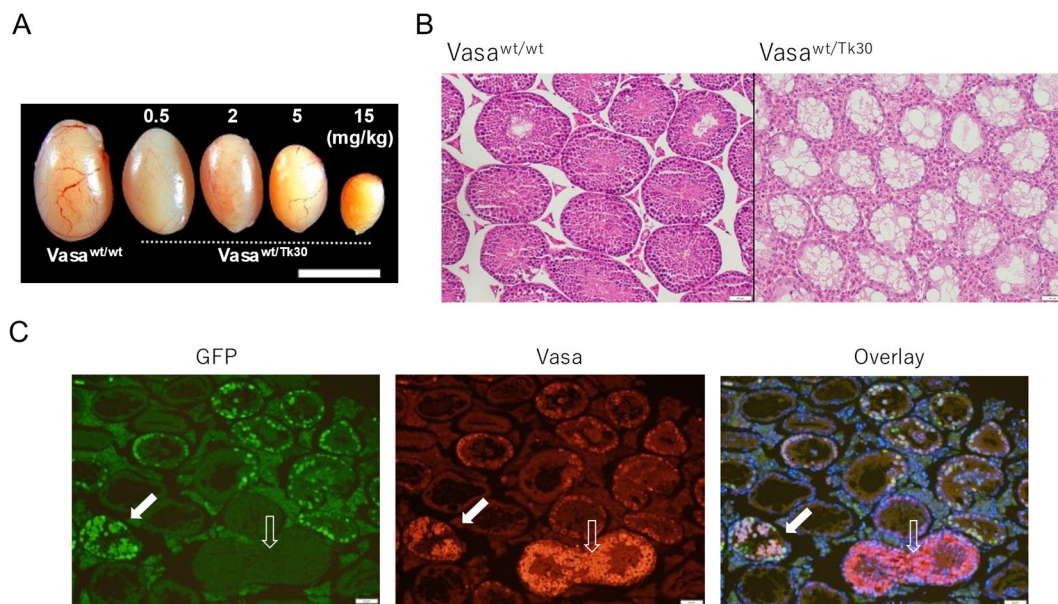


図 2. A. 異なる濃度のガンシクロピルを投与し 6 週間後に採取した精巣。濃度依存的に精巣の委縮が見られる。B. 15 mg/kg でガンシクロピルを投与して 6 週間後に採取した精巣の HE 像。ノックイン個体においては精細管内の生殖細胞が失われている。C. ガンシクロピルを投与して生殖細胞を除去したマーマーセットに GFP を発現している精子幹細胞を移植した。その 3 か月後に観察を行った。内在性の精子幹細胞からの精子形成 (矢印 空洞) および移植した精子幹細胞からの精子形成 (白矢印) が観察される。内在性の細胞からはそれに由来する精子細胞が同じ精細管内で見られるが (矢印 空洞)、移植した細胞からは核型異常のため精母までしか産生されておらず精子細胞は見られない (白矢印)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Kubiura-Ichimarū Musashi, Penfold Christopher, Kojima Kazuaki, Dollet Constance, Yabukami Haruka, Semi Katsunori, Takashima Yasuhiro, Boroviak Thorsten, Kawaji Hideya, Woltjen Knut, Minoda Aki, Sasaki Erika, Watanabe Toshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 mRNA-based generation of marmoset PGCLCs capable of differentiation into gonocyte-like cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	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） 10.1101/2022.09.20.508677	査読の有無 無
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

1. 著者名 Eto Tomoo, Ueda Hiroki, Ito Ryoji, Takahashi Tsukasa, Watanabe Toshiaki, Goto Motohito, Sotomaru Yusuke, Tanaka Nobuaki, Takahashi Riichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of an integrated automated embryonic manipulation system for producing genetically modified mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91148-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshiaki Watanabe and Erika Sasaki	4. 巻 27 March 2021 on line
2. 論文標題 Efficient Induction of Primate iPS Cells Using a Combination of RNA Transfection and Chemical Compounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/7651_2021_373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshiaki Watanabe
2. 発表標題 Marmoset germ cell differentiation from pluripotent cells
3. 学会等名 55th Society for the Study of Reproduction annual conference（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部 聡朗
2. 発表標題 多能性幹細胞からのマーモセット初期生殖細胞発生系の構築
3. 学会等名 マーモセット研究会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小島一晃、近藤洋介、小原実穂、Dollet Constance、山海直、仲木竜、渡部 聡朗
2. 発表標題 霊長類コモンマーモセット及びカニクイザルの雄性生殖細胞における DNA メチル化確立過程のシングルセル解析
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kubiura-Ichimarū M. and Watanabe T.
2. 発表標題 mRNA-based generation of marmoset PGCLCs capable of differentiation into gonocyte-like cells
3. 学会等名 Totipotency and germ cell development
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部 聡朗
2. 発表標題 Genomic and epigenomic integrity controls during primate male germ cell development
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部 聡朗
2. 発表標題 Primates have a distinct spermatogonial stem cell system to maintain the genomic integrity
3. 学会等名 日本マーモセット研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島 一晃, 近藤 洋介, 垪本 晃海, 向笠 圭亮, 井上 貴史, 黒滝 陽子, 佐々木 えりか, 仲木 竜, 渡部 聡朗
2. 発表標題 霊長類マーモセット雄性生殖細胞におけるDNAメチル化確立過程のシングルセル解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部 聡朗, Christopher Penfold, 蝉克憲, 岩崎師壽江, 篠原晴香, 高島康弘, Thorsten Boroviak, Knut Woltjen, 佐々木えりか
2. 発表標題 マーモセット iPS 細胞からの始原生殖細胞様細胞の誘導
3. 学会等名 日本マーモセット研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島一晃, 藪上春香, 垪本晃海, 峰重隆幸, 井上貴史, 喜多善亮, 黒滝陽子, 下郡智美, 川路英哉, 蓑田亜希子, 佐々木えりか, 渡部聡朗
2. 発表標題 霊長類マーモセット雄性生殖幹細胞におけるPIWI-piRNA機構の解析
3. 学会等名 日本マーモセット研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島一晃, 藪上春香, 坂本晃海, 峰重隆幸, 井上貴史, 喜多善亮, 黒滝陽子, 下郡智美, 川路英哉, 蓑田亜希子, 佐々木えりか, 渡部聡朗
2. 発表標題 Analysis of PIWI-piRNA mechanism in primate marmosets male germline stem cells
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	山海 直 (Sankai Tadashi) (80300937)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・再雇用職員 (84420)	

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		
英国	ケンブリッジ大学		