

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660074

研究課題名(和文) 高度な社会行動評価系樹立を目指したハタネズミ遺伝子変換系の開発

研究課題名(英文) Technological development for gene engineering of prairie vole, aiming establishment of a higher evaluating system of social behaviors

研究代表者

西森 克彦 (Nishimori, Katsuhiko)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10164609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オキシトシン(OXT)とオキシトシン受容体(OXTR)は病理生理学的に自閉症(ASD)と密接な関わりを持ち、多くの臨床研究はOXTが有効なASD治療薬で有る可能性を示している。ASD関連の神経薬理学研究には適切な新規動物モデルの開発が待たれており、社会性の高い平原ハタネズミをこうした研究に適合させるため遺伝子KOやKI技術の開発が待たれていた。

そこで遺伝子KOやKI平原ハタネズミ開発をふまえ、受精卵の安定的調製技術、IVF(体外受精)技術、胚盤胞までの体外培養技術等を開発した。これらはOXTR遺伝子のKO平原ハタネズミ開発などを通じて脳科学、精神薬理学や行動神経科学領に貢献するだろう。

研究成果の概要(英文)：Oxytocin (OXT) and oxytocin receptor (OXTR) were pathophysiologically related to ASD (Autistic Spectrum Disorders), and plural groups reported significant curing effects by administration of OXT to the patients. Biologically, physiologically and pharmacologically adequate model animal than mice or rats is now desired. Prairie vole is a suitable candidate animal for these studies, but no appropriate techniques have been developed to generate gene knockout or gene knockin prairie vole. In this study, we established techniques to facilitate generation of real gene knockout and gene knockin prairie vole, such as development of optimum conditions to stably prepare fertilized eggs from this specie, the establishment of technique for IVF with vole's eggs, and the establishment of conditions to culture one-cell embryos to grow blastocysts in vitro. These would be a great help to generate prairie real genes KO prairie voles. and expand the usefulness of this specie in neuroscience.

研究分野：行動神経科学、大脳生理学

キーワード：組み替え動物 発生工学 生殖工学 平原ハタネズミ オキシトシン オキシトシン受容体 I.V.F. 自閉症スペクトラム障害

1. 研究開始当初の背景

全長9アミノ酸のペプチドホルモン、オキシトシン(OXT)は分娩・射乳などの生殖に係わるホルモンとして知られる。OXTとGタンパク共役型受容体のOXT受容体(OXTR)からなるホルモン・受容体システムは分娩や射乳に必須の機能を持つとされていたが、研究代表者、西森により1996年に世界で初めてOXTの遺伝子KOマウスが作出され(a)、引き続き2005年には研究代表者は唯一のOXTR遺伝子のKOマウスを作出(b)、それらの解析結果から脳内のOXT/OXTR系が母性行動や社会的認知行動などの社会行動、向社会行動等に不可欠である事が明らかになってきた。精神医学分野ではOXT系の異常が自閉症の原因である可能性(c)や、高機能自閉症患者を対象とした臨床試験で治療薬としてのOXTの効能が示唆され(d)、ヒトの社会行動・精神活動に於けるOXT系の重要性について広汎な分野で研究が進展しつつあった。

先に触れた様に、出生100人に一人と言われる高頻度出現性の神経疾患、自閉症(Autistic Spectrum Disorders, ASD、自閉症スペクトラム障害)はその1部がOXT受容体(OXTR)の遺伝子異常と強い相関性を持つことが示唆され(c)、発症メカニズムに占めるOXT・受容体系の役割や、治療薬としてのOXT(d)に注目が集まっていた。

OXTとその受容体に関して、我々はこれまで扱いやすい齧歯類であるマウスを用いて研究を行って来たが、マウスの社会行動は、ヒトや高度な社会性を示す類人猿などに比べ単純であり、今後ASDや鬱、或いは統合失調症等へのOXT、そして同等、ないしそれ以上の効果が期待される新たな合成OXTRアゴニストの期待される登場に対し、様々な行動神経学・精神医学的な薬理実験を考えた場合、役不足の感が否めない。その為、よりヒトに近い高度な知性や高い社会性を持つ類人猿などが、こうした目的には最適であるものの、類人猿は全てが希少動物・絶滅危惧種であり、動物倫理の点からも、マウス並みの自由度の高い実験は不可能である。類人猿に比べ比較的实验動物として扱い易いマーモセットは、こうした点から注目を浴び、遺伝子組み替えマーモセット開発の努力なども続けられているが、飼育にかかる高額な経費、繁殖を左右する性的成熟に要する期間の長さ等から、齧歯類並みの扱い易い実験動物としては期待できない。この様な背景下、ハタネズミ(prairie vole; 平原ハタネズミ)に我々は注目し、本申請を行った。

北米原産の平原ハタネズミ(*Microtus ochrogaster*: prairie vole)は、ヒトの社会性とその破綻から生じると考えられる自閉症を理解する為、多くの、特に米国研究者により自閉症の背景を成す社会性を支える神経基盤や遺伝子基盤解析などに以前から広く用いられてきた齧歯類モデル動物である。平原ハタネズミは北米原産の齧歯類であり、雌雄で

つがいを形成する一夫一妻性を取り、夫婦で子育てを行い、同腹子間での交配は行わないなど特徴的な社会行動を示すことが知られている。ハタネズミのパートナー嗜好性や家族の絆は、実験動物として広く用いられているマウスやラットに比べて強固であり、同じく社会的な動物である人の社会性を支える脳神経メカニズムやその破綻病態を研究する為のモデル動物として、注目されている。これを使ったこれまでの研究により、動物の社会性への下垂体後葉ホルモン系の大きな寄与が明らかにされ、またそのメカニズム解明に貢献してきた、比較的新規の実験モデル動物である。ハタネズミの特徴は、強い夫婦間の絆や雄の積極的子育てなど、マウスに比べ極めて高い社会性にある。精神疾患研究にとっても、今や遺伝子进行操作したモデル病態動物棟の開発は極めて重要であり、平原ハタネズミについても、野性型動物を用いた多くの実験が行われてきたが、これより更に一歩進み、様々な遺伝子を修飾、或いは抑制・欠損させた上での解析が期待されるに至っている。しかし、本研究費申請時はもとより、この報告書執筆時に於いても、TGハタネズミ報告は僅か数報しかなく、まして導入組み替え遺伝子が生殖系列にまで至ったケースは未だ2例しか無い。その系を継承するグループは皆無である。

2015年4月に、shRNAを発現するアデノ随伴ウイルスベクターの研究が1つ報告された(e)が、これも体細胞(脳神経細胞)へのshRNA発現ベクター導入を行った研究で、遺伝子組み替えハタネズミの創成・育種を基盤とした研究報告ではない。我々は、この様な背景下、北米原産の平原ハタネズミを用いた行動神経科学研究者として著名なYoung博士(Georgia州エモリー大学)よりハタネズミを譲り受け、本挑戦的萌芽研究による研究費によりハタネズミの生殖・発生工学樹立をベースに、ハタネズミiPS細胞、又はES細胞を用いた発生工学の樹立を目指し、まずはマウスとの種間キメラ形成を目指し、遺伝子組み替えハタネズミ作成をゴールとする他の方法の試行も併せて検討・実験を続けてきた。

2. 研究の目的

背景で前述した様に、自閉症を中心とした社会性の障害を伴う精神疾患における神経回路異常と遺伝子異常の基盤的研究、そしてこうしたヒトの神経疾患に対する新規医薬品開発とその薬理学的研究や安全性の評価、或いは食品や天然物中に存在していると期待される、OXTRアゴニスト物質検索と、依り容易な物性の解析(薬理学的解析、ないし食品科学的な解析)研究の加速の為、より使いやすく、又生理的にヒトに近い新規モデル疾患動物開発を目標として、ハタネズミを用いたその遺伝子変換系の樹立が本研究課題の最終目的である。

その為、申請した研究計画では、これまでに樹立していたハタネズミ由来のiPS細胞を

用い、これをマウス胚盤胞に injection して種間キメラを形成させ、一定の割合で得られることが期待されるハタネズミ精子を、別個にハタネズミより得た未受精卵との間で IVF (in vitro fertilization) を行って体外受精させ、最終的に遺伝子組み換え体ハタネズミを作成するシステムの構築を目的として実験を行った。また、当研究室で既に得ていた Dmrt7 遺伝子 KO マウス (雄) を用いて、種間キメラでありながら実質精巢中で生産される精子は全てハタネズミ iPS 細胞由来、と言う、挑戦的な系樹立にも挑戦することを目的とした。

本研究計画は、あくまで“ハタネズミ遺伝子変換系の開発”が最終ゴールである。当初、iPS 細胞、又は ES 細胞の遺伝子変換は、常法であるノックアウトベクター、又はノックインベクターの細胞への導入による相同組み換えによって行う計画であった。しかし、申請が採択された 2013 年になり、極めて簡便な方法、Crispr/Cas 法 (f) が報告され、この方法により受精卵を対象に特定の遺伝子配列を標的として遺伝子破壊や遺伝子ノックインが行える事が明らかとなった。そこで、本課題の開始後、本計画中にハタネズミ由来細胞、又はハタネズミ受精卵の遺伝子を Crispr/Cas9 法を導入して破壊することを目的として加えた。Crispr/Cas9 法は、特定の遺伝子配列を標的として破壊したり、この配列特異的な破壊を利用した高効率の相同組み換え誘引法として、今日、遺伝子破壊のスタンダード法として認知されるに至っている。

3. 研究の方法

(1). 既に得ていた iPS 細胞を野性型マウス胚盤胞への打ち込みと種間キメラ形成の試み

以前、東大医科学研究所中内 啓光博士、小林俊寛博士との共同研究で、ハタネズミ繊維芽細胞より iPS 細胞を樹立しており、これをマウス胚盤胞へ導入、種間キメラ形成を試みた。

(2). Dmrt7(-/-) マウス胚盤胞へ iPS 細胞を打ち込むことに依る種間キメラ形成とハタネズミ精子の排他的造成

Dmrt7(-/-) 雄マウスは他の生理機能に異常は無いが、雄のみ、精原細胞以降の減数分裂等に異常を来し、精子形成が出来ない。一方雌ではホモ欠損でも、生殖能力を含んで異常は無い。そこで、Dmrt7(+/-) 雌 x Dmrt(+/-) 雄の掛け合わせにより得た受精卵 (胚盤胞) に、ハタネズミ iPS 細胞を導入し、1/4 の確率で生まれるホモ接合体雄の精巢内で、ハタネズミ iPS 細胞に由来する精子が形成することを期待し、この遺伝子型の掛け合わせで生産したマウス由来受精卵へのハタネズミ iPS 細胞導入と、偽妊娠マウス子宮への胚移植実験を行った。

(3). 新たなハタネズミ iPS 細胞の取得

生殖系列への移行が可能な Vole iPS (v. iPS) 細胞の樹立を目指すために、新たに iPS 細胞の誘導を行った。まずハタネズミ

胎児由来の線維芽細胞 (VEF) を調製し、これに新たに開発した PiggyBac ベクターに Oct-Sox2-Klf4-c-myc-Nanog-Lin28 の 6 因子を搭載したベクターを感染させた。なお、この実験は東北大学農学研究所・動物遺伝育種学研究室の福田 智一准教授、大学院生片山 雅史君、及び順天堂大学医学研究科大学院生、平山貴士君との共同研究として行った。

これまでに得ている数クローンの v. iPS 細胞については、染色体数 (カリオタイプ) の確認を行った。

更にこれまでに得ているハタネズミ iPS 細胞様株、及び今回新たに得られたハタネズミ iPS 細胞株については、3 胚葉への分化能を検定した (三胚葉分化能の確認)。この為、SCID (重度複合免疫不全) マウスを購入、その腎被膜下に取得 iPS 細胞株を移植してこれを検定する事とした。

(4). ハタネズミ生殖工学の整備

遺伝子組み換えハタネズミを作成する場合に、必須の技術・知識がハタネズミに於ける生殖生物学領域と、ハタネズミの発生工学 (ES 細胞、又は iPS 細胞の樹立) 領域の物である。これらは著しく未整備であり、過排卵条件、発生初期卵の体外培養法、及び in vitro fertilization 法の検討と樹立を図った。

①. ハタネズミ過排卵条件の検討

ハタネズミの過排卵処理を含む受精卵取得やその他の発生工学的な手法に関する論文は極めて少ない (g, h)。これらの論文を参考に、及びマウス受精卵調製の際に行われる過排卵処理を参考に、PMSG、及び hCG に関しその投与単位を変動させるなどして、最も効率よくハタネズミ受精卵が採取できる条件を検討した。

②. ハタネズミ受精卵の in vitro 培養の検討

マウスもそうであるが、受精卵を採取する場合、まだ受精後一日ほどしか経っていない卵管 (膨大部) に集積している 1cell embryo の方が、子宮灌流によって得られる 3.5 日胚の胚盤胞よりも多数の初期胚として得ることが出来る。一方、iPS 細胞や ES 細胞からキメラ形成を経て遺伝子変換型ハタネズミを得ようとする場合、胚盤胞へのこれら万能細胞 (既に遺伝子を操作してある) の移植を行う必要がある。この為、多数の初期胚を取得調製することが困難なハタネズミに対し、キメラ形成用、あるいは保存のための多数の胚盤胞を効率よく得るため、1cell embryo で調製した後、体外培養 (in vitro 培養) により、胚盤胞にまで誘導することを図った。そのため、様々な培地の検討を含めた、ハタネズミ受精卵の体外培養法について検討した。

③. ハタネズミ成熟卵の IVF (in vitro fertilization) による受精の検討

遺伝子組み換えハタネズミが作成できた場合、そのラインの海外輸送や知財としての長期保存が必用となる。この場合、精子の凍結保存、及び、解凍精子による in vitro fertilization 技術の開発が重要である。また、微生物汚染事故に対する生物的クリーニングなどにも in vitro fertilization 技術は重要である。この為、マウスで行われてい

る in vitro fertilization の資材・条件をハタネズミに適用し、in vitro fertilization を試みた。

④. Crispr/Cas9 法のハタネズミ受精卵への適応による遺伝子破壊の検討

現在実用化しているゲノム編集技術、zincfinger nuclease 法、TALEN 法、そして Crispr/Cas 法の中で、最も最近に実用化されながら急速な勢いでゲノム編集技術の中心となりつつある Crispr/Cas 法を平原ハタネズミ受精卵に適用することを試み、まず平原ハタネズミの OXTR 遺伝子の破壊のための準備実験を行った。

<References>

- a. Nishimori, K. et al., PNAS, 93, 11699 (1996)
- b. Takayanagi, Y. et al., PNAS, 102, 16096 (2005)
- c. Suma Jacob, S. et al., Neuroscience Lett. 417, 6 (2007)
- d. Andaria, E. et al., PNAS 107, 4389 (2010)
- e. Keebaugh, A. C., et al., Soc Neurosci (2015)
- f. Cong, L et al., Science 339, 819 (2013)
- g. Keebaugh, A. C. et al., Reprod Biol Endocrinol 54, 1-9 (2012)
- h. Donaldson, Z. R. et al., Biol Reprod 81:1189 (2009)

4. 研究成果

(1). 既に得ていた iPS 細胞を野性型マウス胚盤胞への打ち込みと種間キメラ形成の試み

以前、東大医科学研究所の中内 啓光博士、小林俊寛博士らと共同開発したハタネズミ iPS 細胞を、マウス胚盤胞へ注入し、偽妊娠マウス子宮へ移植する実験を1年弱ほど続行したが、着床杯は得られなかった。一方、新たに東北大学農学研究科内で、不死化ハタネズミ繊維芽細胞より樹立した iPS 様細胞 1 クローンについては、3 胚葉分化能を保持していた。しかし、その後のカリオタイプ確認実験（外注）により、染色体型に異常を来していることが判明し、今後の発生工学的実験には不相当であることが判明した。

(2). Dmrt7(-/-) マウス胚盤胞へ iPS 細胞を打ち込むことに依る種間キメラ形成とハタネズミ精子の排他的造成

Dmrt7(-/-) 雌マウスと Dmrt7(+/-) 雄マウスを増産しこれを掛け合わせて、Dmrt7(-/-) マウス胚盤胞へ平原ハタネズミ iPS 細胞を injection する実験を行った。しかし、樹立時にはマウス胚盤胞で平原ハタネズミ/マウスの種間キメラを形成したと、2012 年当時、東京大学医科学研究所の中内 啓光博士らの研究グループから報告されていた iPS 細胞を用いたものの、着症例が少なく、また着床したケースでは着床痕を残すものの、出産に至らないケースばかりで、種間キメラの形成は確認できなかった。iPS 細胞の培養中に、何らかの変化が起き、発生に貢献できなくなってしまった可能性などが考えられ、今後の検討課題として精査が必用である。

(3). 新たなハタネズミ iPS 細胞の取得

不死化した平原ハタネズミ繊維芽細胞にウイルスベクターにより 3 因子を導入して得た Vole iPS (v. iPS) 細胞は、その後、染色体型(カリオタイプ)の検定を行ったところ、染色体異常が見出され、生殖系列への移行は

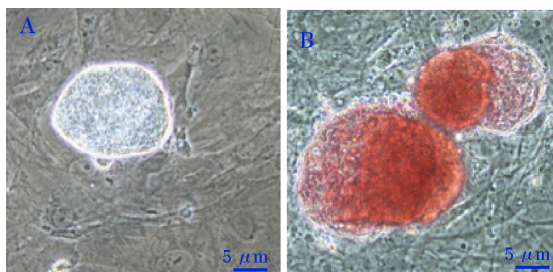


図1. 平原ハタネズミ繊維芽細胞に6因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc, Nanog, Lin28)をPiggyBacベクターによって導入し、樹立したiPS様細胞。A.明視野におけるコロナ形状 B. ALP染色

不可能と判断された。この為、新たに生殖系列への移行・貢献が可能な v. iPS 細胞の樹立を目指すために、新たにハタネズミ胎児由来の線維芽細胞細胞 (VEF) を調製し、これに新たに開発した PiggyBac ベクターに Oct-Sox2-Klf4-c-myc-Nanog-Lin28 の6因子を搭載したベクターを感染させ、iPS 細胞の樹立を図った。得られた株は、形態的に生殖系列への貢献能力を持つ、primed-type の形状を見せ、ES 様細胞の特徴で有る ALP を発現していた (図1)。更に、この株はマウス初

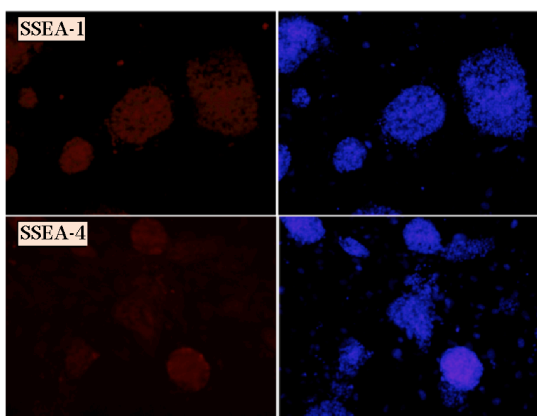


図2. 6因子によって誘導したハタネズミ由来iPS様細胞の初期胚マーカー (SSEA-1 & SSEA-4) 発現

期胚マーカーの SSEA-1 と SSEA-4 を発現して

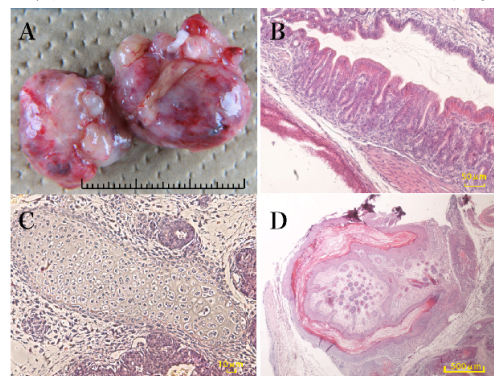


図3. テラトーマ誘導による平原ハタネズミ由来iPS様細胞の三胚葉分化能の確認。A.スキッドマウス中でv.iPS細胞より誘導されたテラトーマ; B.テラトーマ内に誘導形成された消化管様組織(内胚葉); C.同じく軟骨様組織(中胚葉); D.毛胞様組織(外胚葉)

いた (図2)。

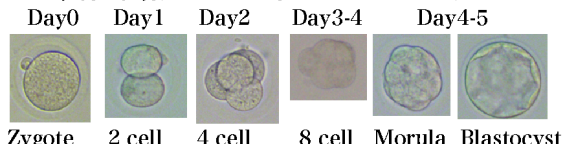
又、これまで得ているハタネズミiPS細胞株、及び新たに得られるハタネズミiPS細胞株について、3胚葉への分化能を検定下結果、三胚葉分化能を維持していたことが確認された (図3)。

(4). ハタネズミ生殖工学の整備

①. ハタネズミ過排卵条件の検討

先行研究(g)を参照し、平原ハタネズミの過排卵条件の検討を行った。PMSG/hCGの投与はそれぞれ異なる3つの投下用量の組み

図4, 体外培養による平原ハタネズミ胚の生育



合わせで行った。この結果、60 IU/60IU で用いたときに平均で5.6 卵/匹の、比較的良好な受精卵調製数を達成し、ハタネズミの採卵条件を確立した。

②. ハタネズミ受精卵の in vitro 培養の検討

受精卵をマウス胚培養培地で培養した場合、発生は2細胞期胚で止まってしまうが、胚培養培地の改良により78.9%が胚盤胞期胚まで発生した (図4)。

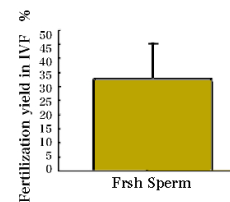
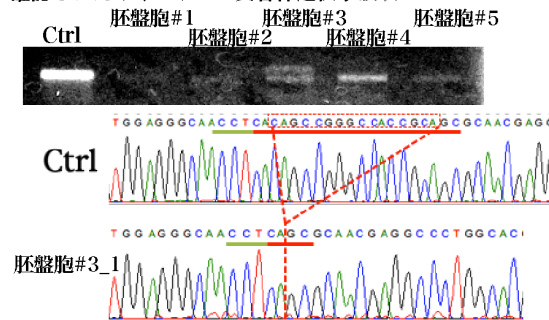


図5, 新鮮な平原ハタネズミ精子によるIVF(in vitro fertilization)

③. ハタネズミ成熟卵の IVF (in vitro fertilization) による受精の検討

10 週前後の雄ハタネズミの精巣上体より精液を調製し、Fertiup 溶液 (コスモバイオ kk) と混ぜ懸濁しインキュベーター中に静置した後未受精卵を加え、五時間培養した。その後、卵はG-1 PLUS 培地で三回洗浄し、インキュベーター中に静置した。翌日、2cell 胚の発生頻度より、IVF の効率を評価した (図5)。

図6, CRISPR/Cas9法による平原平原ハタネズミ胚盤胞で確認されたオキシトシン受容体遺伝子破壊



④. Crispr/Cas9 法のハタネズミ受精卵への適応による遺伝子破壊の検討

前核期胚での OXTR 遺伝子への変異導入を目指し、まず CRISPR/Cas の条件検討を行った。

HEK293T 細胞に OXTR 遺伝子を標的とした pX330 ベクターとそれに対応した pGL4-SSA ベクターをコトランスフェクションし、single

図7, オキシトシン受容体遺伝子KO平原ハタネズミに関する最新状況

ID	Transfer date	No. of transferred embryos	D.O.B. (Estimated D.O.B.)	No. of Babies
1 (Oviduct)	2015/01/10	6(Not Injected)-		-
2 (Oviduct)	2015/01/10	4(Injected)	2015/02/02	2
3 (Oviduct)	2015/02/06	9(Injected)	(2015/02/28)	-
4 (Uterus)	2015/02/09	6(Injected)	(2015/02/28)	-

guide RNA (sgRNA) の切断活性をルシフェラーゼアッセイにより検証した。その結果より、切断活性の高い sgRNA を選択し、Cas9 RNA : sgRNA = 100 : 50 (ng/μl) の比で平原ハタネズミの前核期胚にインジェクションした。ハタネズミ前核期胚を胚盤胞期胚まで体外培養しゲノムを回収後、PCR により標的配列付近を増幅しシーケンス解析を行った。その結果、胚盤胞 # 4 で見られた 16 bp の欠失 (図6) を始めとする、両アレルにまたがる様々な変異を確認した。胚盤胞期胚での変異導入効率は 50%程度であり、ハタネズミにおいて CRISPR/Cas が効率的に働くことを確認した。

2015 年 3 月末まで、図7に示すように Crispr/Cas9 処理した胚盤胞の子宮移植による遺伝子 KO 平原ハタネズミ取得の試みを継続した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 堀江 謙吾, 平山 貴士, 平岡 優一, 日出間 志寿, 福田 智一, 西森 克彦, "ハタネズミ受精卵におけるCRISPR/Casシステムを用いた遺伝子組み換え", 日本農芸化学会 2015 大会, 2015年3月26日-29日, 岡山市

(2) 堀江 謙吾, 平山 貴士, 片山 雅史, 日出間 志寿, 福田 智一, 西森 克彦 『Methodological advance in developmental engineering and reproductive technology, to generate genetically modified Prairie vole using CRISPR/Cas9』 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日-27日, 横浜

(3) 堀江謙吾, 片山雅史, 福田智一, 西森克彦, 『CRISPR/Cas9を用いたPrairie vole不死化線維芽細胞へのKIベクター導入』 第21回日本行動神経内分泌研究会, 2014年9月03日-05日, 秩父市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<<http://www.biochem.tohoku.ac.jp/bunsi/index-j.html>>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西森 克彦 (NISHIMORI KATSUHIKO)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10164609

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し