

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670742

研究課題名(和文) 遺伝子改変眼疾患カニクイザルの作製とその病理学的解析

研究課題名(英文) Development and pathological characterization of genetically modified macaque monkey with eye disease.

研究代表者

岩田 岳 (Iwata, Takeshi)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・部長

研究者番号：90374157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの眼疾患は高等霊長類に特徴的な眼球構造が強く影響していると考えられる。緑内障、加齢黄斑変性、黄斑ジストロフィーなどの眼疾患をより忠実に実験動物において再現するには霊長類を用いることが望ましい。これまで技術的な問題から遺伝子改変霊長類を作製することは困難であった。本研究ではこの技術的な問題を克服したZinc Finger Nuclease遺伝子改変技術を用いて、眼疾患原因遺伝子に関連するノックアウトあるいはノックイン・カニクイザルの作製を目的とする。この研究によって、より患者の病態に近い眼疾患モデル動物の作製が期待される。

研究成果の概要(英文)：The structural and molecular characteristic of human eye is very unique to primate and different from other species. Development of animal model, which completely mimic the human eye diseases such as glaucoma, age-related macular degeneration and macular dystrophies has been difficult due to technical issues. In this research project we used the zinc finger nuclease (ZFN) technology to develop knockout or knockin macaque monkey. Developed monkeys will be maintained for pathological and visual function examination to understand the progression of the disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：霊長類 ノックアウト 遺伝子改変 疾患モデル動物

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの眼疾患を忠実に再現するモデル動物は医学研究において欠かせない実験材料である。モデル動物は病態機序についての貴重な基礎的情報をもたらすし、新薬の評価にも利用されている。特にマウスについては遺伝子改変技術が進歩し、眼疾患関連遺伝子のノックアウト・マウスやノックイン・マウスが多数作製されている。しかしながらヒトの眼球構造は高等霊長類にのみ共通なものであり、マウスでは異なる。マウスには黄斑は存在せず、視神経乳頭の構造も大きく異なる。我々はこれまでに複数の眼科疾患モデル動物の作製を行った。黄斑変性カニクイザル (Umeda, Iwata et al, FASEB J 2005, IOVS 2005) や緑内障遺伝子 Optineurin (Chi, Iwata et al, Hum Mol Genet 2010)、WDR36 (Chi, Iwata et al, Hum Mol Genet 2010) の変異体を発現するマウス、さらに Vav2/Vav3 ダブルノックアウトによる閉塞緑内障マウス等の作製である。常にサルとマウスの眼球を研究材料としてきた我々にとって、カニクイザルを用いた遺伝子改変技術の到来を待っていた。2009年、実験動物中央研究所の佐々木らによって世界で初めてのトランスジェニック・マーマセットが報告され (Sasaki et al, Nature 2009)、遺伝子改変によって GFP 遺伝子を生殖細胞で発現し、次の世代へ受け継がれた初めての霊長類が作製された。しかしながらマーマセットは新世界ザルに属し、下等霊長類に分類され、眼球構造もヒトとは異なる。また、ノックアウトやノックインの技術は確立されていない。

2007年、Sangoma BioSciences の Miller らによって zinc finger nuclease (ZFN) によるゲノム改変技術が発表された (Miller et al, Nat Biotechnol 2007)。ZFN は DNA 配列を認識して切断し、切断面を分解する酵素であるが、この認識部位を改変することによって、ゲノム上の任意の場所を特異的に切断し、分解する酵素を作製することができる。この技術を応用して、ZFN mRNA を受精卵に注入し、これを発現させることによって目的とする複数の遺伝子をターゲットにこれを切断・分解することができる。

## 2. 研究の目的

ヒトの眼疾患は高等霊長類に特徴的な眼球構造が強く影響していると考えられる。緑内障、加齢黄斑変性、黄斑ジストロフィーなどの眼疾患をより忠実に実験動物において再現するには霊長類を用いることが望ましい。これまで技術的な問題から遺伝子改変霊長類を作製することは困難であった。本研究ではこの技術的な問題を克服した Zinc Finger Nuclease 遺伝子改変技術を用いて、

眼疾患原因遺伝子に関連するノックアウトあるいはノックイン・カニクイザルの作製を目的とする。この研究によって、より患者の病態に近い眼疾患モデル動物の作製が期待される。研究対象の遺伝子は優性遺伝の眼疾患原因遺伝子を対象とする。作製された個体については、病理学的、視覚機能の解析を行い、疾患個体の繁殖による量産をめざす。

## 3. 研究の方法

本研究はゲノム上の任意の配列を認識し、切断・分解する Zinc Finger Nuclease (ZFN) の特徴を利用して、眼疾患原因遺伝子をターゲットにこれを欠損あるいは遺伝子変異を挿入し、遺伝子改変カニクイザルを作製する。この方法によって複数のターゲット遺伝子を同時に改変することが可能である。繁殖能力や他臓器への影響を最小限にするために、眼での発現が優位な眼疾患原因遺伝子を選別する。初年度は受精卵から分裂過程における ZFN の特異的切断・分解能力を確認し、ZFN mRNA の適正注入量を検討する。また注入方法を改善して、より確実に F0 の段階で遺伝子改変のホモ個体が作製できるように検討する。ZFN mRNA のみを注入して作製するノックアウトから次年度以降は外来遺伝子ベクターを用いたノックインの実験を試みる。遺伝子改変動物は複数の方法によって総合的に評価される。

1) ZFN の設計およびカニクイザル由来の培養細胞を用いたノックアウト、ノックインの確認実験：繁殖能力や他臓器への影響を最小限にするために、眼での発現が優位な眼疾患原因遺伝子を選別する。ノックアウトの対象としては緑内障原因遺伝子オプチニューリン (OPTN)、加齢黄斑変性感受性遺伝子 HtrA1、網膜色素変性原因遺伝子 Rhodopsin、RPE65、RP1、RP2、黄斑ジストロフィー原因遺伝子 ABCA4、RP1L1、ELOVL4 などとし、また遺伝子変異のノックインの対象としては緑内障原因遺伝子ミオシリン (MYOC)、オプチニューリン (OPTN)、網膜色素変性原因遺伝子 Rhodopsin、RPE65、RP1、RP2、加齢黄斑変性感受性遺伝子 Complement Factor H などとする。カニクイザル用にカスタム設計された ZFN の特異的切断能力を調べるためにカニクイザル由来の網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞)、毛様体上皮細胞、アストロサイトに ZFN のプラスミドをトランスフェクションして、その作用を検証する。また、ノックインについては、8Kbp 以下の DNA を前後 800bp の相同的配列で囲むことによって、任意のゲノム上に挿入することができる。挿入する配列を変異体にするによってノックインやトランスジェニックを作製可能である。目的の機能が確認された

ZFN については mRNA を作製し、受精卵のインジェクションに利用する。

2) 受精卵を用いた ZFN によるノックアウト、ノックインの実験：カニクイザルの受精卵から分裂過程における ZFN の発現量や対象遺伝子の切断・分解を確認し、受精卵への ZFN mRNA の適正注入量を検討する。また注入方法を改善して、精子と卵子由来の両核に ZFN mRNA を注入し、確実に F0 の段階で遺伝子改変のホモ個体が作製できるように検討する。初年度は ZFN mRNA のみを注入して遺伝子を破壊する実験を行う予定であるが、一度諸条件が確立されれば 2 年目以降に外来遺伝子ベクターを用いたノックインの実験を試みる。

3) ZFN を用いたノックアウト、ノックイン・カニクイザルの作製：トランスジェニック・マウスの作製に準じた方法で、サル前核期受精卵へ Zinc Finger Nuclease (ZFN) mRNA (ノックインの場合 ZFN mRNA+ プラスミド) を注入し、その受精卵を仮腹の雌ザルへ移植することで遺伝子操作ザルを作製する。この一連の操作において、重要となる卵は卵胞発育を人為的に刺激し、過剰な発育を誘起する必要がある。マウスや家畜では確立している技術であるがカニクイザルにおいては確立しておらず、採取される卵の内、実験に使用できる成熟卵の数は制限される。そこで、効率的な卵胞発育誘起法の検討も平行して実施する。この過程で採取された成熟卵は、雄から採取した精子を顕微注入(顕微授精)し、受精卵を作出する。雌雄前核を有する受精卵に対して、本研究において、肝となる遺伝子改変を誘導する ZFN mRNA を前核へ注入し、受精卵の DNA の切断・分解を行う。ZFN mRNA (ノックインの場合 ZFN mRNA+ プラスミド) を注入した受精卵から個体を作製するために、母体への移植(胚移植)が必要となる。移植する母体は排卵が確認された個体で有ること、且つ卵の発生ステージをある程度同調させる必要がある。そこで、母体への負担が少ない採血を行い、血中エストロジオール(E2)を測定する。E2 値を排卵が行われると予想される月経出血確認から 9 日目以降に測定を開始し、その値の急激な上昇および急激な値の低下を確認し、排卵日を特定する。卵の発生ステージとほぼ同調する母体の卵管あるいは子宮内へ胚移植を行う。胚移植後約 35 日に最初の妊娠診断を行う。胚移植からおよそ 165 日で出産あるいは帝王切開により産子を得た際には、胎盤等の胎児付属臓器を採取して解析を行い、目的遺伝子の欠損を調べる。遺伝子改変カニクイザルの存在が確認されれば、性成熟後安定した時期となる 3 才以降には、別性の個体との同居、繁殖を行い、繁殖能力の有無および操作遺伝子の伝達を

確認する。遺伝子改変カニクイザルが雄である場合には、非侵襲的に精子を採取し、複数の雌から採取した卵へ顕微授精を行い発生工学的な手法による子孫の作出(継代)も平行して実施する。

4) 遺伝子改変カニクイザルの診断：出産直後に DNA 検査を行い、目的とする遺伝子改変を確認し、定期的に視機能を検査して目的とする疾患が発症するか診断を行う。緑内障の診断としては眼底撮影、眼圧、光干渉断層計(OCT)による視神経乳頭の観察を行い、網膜色素変性の診断としては眼底撮影、網膜電図、光干渉断層計による観察、そして黄斑ジストロフィーと加齢黄斑変性の診断としては眼底撮影、網膜電図、蛍光眼底造影(FA, ICG)、光干渉断層計による観察を行う。この診断は 3 か月間隔で行う。緑内障、網膜色素変性、黄斑ジストロフィーの原因遺伝子および加齢黄斑変性感受性遺伝子による遺伝子改変カニクイザルについては電気生理学的に視機能検査を行い、共焦点レーザー走査型眼底検査装置(HRA)とスペクトラルドメイン OCT が融合したハイデルベルグ・スペクトラリス(ハイデルベルグエンジニアリング社)を用いて視神経乳頭、黄斑部の網膜から脈絡膜の断層像、蛍光造影(FA, ICG)による網膜血管および脈絡膜血管の状態を観察する。

#### 4. 研究成果

非ヒト霊長類における眼疾患モデル動物の作成のために、カニクイザル受精卵への CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術を検討した。既報に従って、ホルモン剤を雌ザルに投与し、成熟卵子を回収した。また、精子は採取した射出精液を洗浄し、回収した。成熟卵子の細胞質中に精子を直接注入する顕微授精法を実施し、雌雄前核を持つ受精卵を作出した。この前核に目的の眼疾患原因遺伝子を誘導するように構築した CRISPR/Cas9 発現ベクターを注入した。ベクター注入受精卵は、10%FBS 加 CMRL-1066 培養液とマウス胎児線維芽細胞(MEF)の単層上で培養した。通常の顕微授精卵と同様に分裂が生じ、一部は発生を継続し、胚盤胞への発生が確認できた。これはベクターを注入しても受精卵は体外で発生を継続できることを示している。この胚盤胞から ES 細胞を樹立するために、胚盤胞の内部細胞塊部位を摘出し、既報通りに MEF の単層上で培養後、小さいながらも内部細胞塊由来と思われる細胞塊を形成した。しかし、継代後新たな細胞塊の形成は確認できなかった。また、胚移植には、正常な形態を示す初期分割胚を卵管に移植した。妊娠が成立しない個体があったが、更に胚移植を行い、現在妊娠の成立を待っているところである。カニクイザルからの採取される卵は

マウスのように均一な良質の状態であるとは限らず、その発生を制限する原因となっている。そのため、卵を採取するサル年齢、卵の採取時間や投与するホルモンの検討を行い、良質な卵を使用した受精卵の作出が本研究を成功させる重要な要因である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Katagiri S, Yoshitake K, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T. Whole-exome sequencing identifies a novel *ALMS1* mutation (p.Q2051X) in two Japanese brothers with Alstrom Syndrome. *Molecular Vision* 2013;19:2393-406

Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Shimomura Y. Two siblings with late-onset cone-rod dystrophy and no visible macular degeneration. *Journal of Clinical Ophthalmology*. 2013;7:1703-11

Nakamura N, Tsunoda K, Fujinami K, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. [Long-term observation over ten years of four cases of cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2013;117:629-40

Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura N, Kato Y, Noda T, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Ozawa Y, Tsubota K, Miyake Y. Molecular characteristics of four Japanese cases with *KCNV2* retinopathy: report of novel disease-causing variants. *Molecular Vision* 2013;19:1580-90

Minegishi Y, Iejima D, Kobayashi H, Chi Z-L, Kawase K, Yamamoto T, Seki T, Yuasa S, Fukuda K, Iwata T. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics* 2013;22:3559-67

[学会発表](計16件)

第17回眼科分子生物学研究会主催(会長:岩田岳、開催準備:分子細胞生物学研究部) 2013年2月静岡県焼津市

Iwata T.  
National Eye Institute Audacious Goal Meeting, Potomac, Maryland, USA 2013年2月

International Society for Eye Research (ISER) Sarasota Symposium 主催(世話人: Ernst Tamm, MD - Program Chair, Tailoi Chan-Ling, PhD, Mike Fautsch, PhD, Takeshi Iwata, PhD, Rob Nickells, PhD, Dan Stamer, PhD)

Iwata T.  
Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open angle glaucoma. ISER Sarasota Symposium, Sarasota, Florida, USA 2013年9月

University of Florida Gainesville, Department of Ophthalmology 招待講演  
Iwata T. Animal models for glaucoma and age-related macular degeneration. Gainesville, Florida, USA 2013年9月

Iwata T.  
Molecular mechanism of POAG by optineurin E50K mutation. Asia ARVO 2013, New Delhi, India 2013年10月

Iwata T.  
Characterization of early-onset drusen forming cynomolgus monkeys. Asia ARVO 2013, New Delhi, India 2013年10月

第6回 Retina Research Meeting (RRM)主催(世話人:村上晶、岩田岳、溝田淳、渡辺すみ子) JPタワー東京 2013年11月

峯岸ゆり子、家島大輔、小林宏明、池在龍、川瀬和秀、山本哲也、関倫久、湯浅慎介、福田恵一、岩田岳。緑内障原因遺伝子オプテニューリンとE50K変異によるタンパクの不溶化と病態発症との関連。第17回眼科分子生物学研究会。静岡。2013年2月

Nakayama M, Iejima D, Akahori M, Kamei J, Iwata T.

Overexpression of HtrA1 and Smoking Evokes Choroidal Neovascularization and Retinal Deposit in Aged Mice.

ARVO Annual Meeting 2013

Seattle, WA, USA.

2013年5月

Iejima D, Noda T, Mizota A, Iwata T. Characterization of *HtrA1* Promoter in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration.

ARVO Annual Meeting 2013

Seattle, WA, USA.

2013年5月

家島大輔, 板橋剛, 川村雄一, 野田徹, 湯浅慎介, 岡千緒, 福田恵一, 岩田岳  
滲出型加齢黄斑変性感受性遺伝子  
*ARMS2-HtrA1*のプロモーターの解析

Retina Research Meeting (RRM)

東京 2014年11月

中山真央<sup>1</sup>, 家島大輔<sup>1</sup>, 亀井淳三<sup>2</sup>, 岩田岳<sup>1</sup>  
加齢黄斑変性感受性遺伝子 *HtrA1* のトランス  
ジェニックマウスの病態と習慣因子 (喫煙)  
の影響 Retina Research Meeting (RRM)

東京 2014年11月

赤堀正和, 岩田岳  
網膜疾患における Exome 解析  
NGS 現場の会 (第三回)

大阪

2013年8月

片桐 聡, 林 孝彰, 月花 環, 青柳 蘭  
子, 伊藤 直子, 大熊 康弘, 常岡 寛  
慢性甲状腺炎に発症した片眼性の急性後部  
多発性斑状色素上皮症の1例

第30回日本眼循環学会

東京

2013年7月

片桐 聡, 林 孝彰, 月花 環, 伊藤 直  
子, 岩田 岳, 常岡 寛  
Alström 症候群の兄弟例

第61回日本臨床視覚電気生理学学会

大阪

2013年10月

Katagiri S, Hayashi T, Gekka T, Yamada H, Iwata T, Tsuneoka H

A novel *CYP4V2* mutation (S121Y) in choroideremia-like phenotype

The 8th APVRS Congress & 第52回日本網膜硝子体学会総会

名古屋

2013年12月

〔図書〕(計3件)

岩田岳, 古野正朗, 池尾一穂, 全エクソーム  
解析による遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝  
子探索、エクソーム解析 成果と将来  
(編集: 松本直道)、医学のあゆみ、医歯薬  
出版株式会社 2013;245:401-407

岩田岳, Optineurin と正常眼圧緑内障、  
Digest シリーズ (編集: 本庶佑)、Medical  
Science Digest、ニューサイエンス社  
2013;39:2-4

岩田岳, 緑内障の遺伝子とその機能解析、緑  
内障の病態と疫学、高齢者の視覚障害とその  
ケア (編集: 小口芳久)、公益財団法人長寿  
科学振興財団、2013;107-118

〔産業財産権〕

出願状況 (無し)

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（無し）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ  
<http://www.eye.go.jp>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岩田 岳 (IWATA, Takeshi)  
国立病院機構東京医療センター・臨床研究センター・部長  
研究者番号：90374157

### (2)研究分担者

下澤律浩 (SHIMOZAWA, Nobuhiro)  
医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・主任研究員  
研究者番号：50300786