

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640053

研究課題名(和文) 早老症候群霊長類モデルの開発

研究課題名(英文) Development of a premature aging syndrome non-human primate model

研究代表者

伊藤 靖 (Itoh, Yasushi)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

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)：早期老化症候群の病態解明と治療法開発のために、早期老化症候群霊長類モデルの作製を行なった。レンチウイルスベクターを用いた遺伝子改変ではGFPを全身に発現するカニクイザルの作出に成功した。CRISPR/Cas9ゲノム編集法と顕微受精により、ウェルナー症候群の原因遺伝子に変異のあるカニクイザルが誕生した。今後、出生したサルの子の症状の観察と病態の解明を継続する。

研究成果の概要(英文)：We established genetically modified cynomolgus monkeys to reveal pathogenicity of a premature aging syndrome. Using a lentivirus vector, we obtained cynomolgus macaques that express GFP in the whole body. Next, we made plasmid vectors to examine gene modification in the cultured cells of cynomolgus macaques using CRISPR/Cas9 genome editing technology. We confirmed the high efficiency of genome editing in the Werner DNA helicase gene with the CRISPR/Cas9 system in vitro. Thereafter, using the CRISPR/Cas9 system and in vitro microfertilization, we have obtained a cynomolgus macaque that carries gene mutation in the Werner DNA helicase gene. We continue observation of this macaque and examination of disease pathogenesis.

研究分野：病理学

キーワード：老化 癌 トランスレーショナルリサーチ 病理学 霊長類モデル ゲノム編集 レンチウイルスベクター

### 1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群は日本に多い早老症候群の1つで、RecQ型DNAヘリカーゼ(WRNヘリカーゼ)の変異により白内障、動脈硬化、悪性腫瘍等が早期に発生する疾患である。WRNヘリカーゼ機能の解析のために、WRNヘリカーゼ遺伝子ノックアウトマウスが作製されたが、マウスに異常は見られなかった。これはマウスと人ではWRNヘリカーゼの構造、機能が異なるため、あるいは他の遺伝子変異の蓄積が寿命の短いマウスでは発症閾値に達しないためと考えられる。従って、より人に近い実験動物がWRNヘリカーゼの機能とウェルナー症候群の病因の解明に必要である。そこで本計画では、人に代謝等とWRNヘリカーゼ遺伝子の類似するカニクイザルを用いて、モデルを開発することを着想した。

### 2. 研究の目的

マウスでは機能解析の困難なDNAヘリカーゼ遺伝子の解析を、カニクイザルを用いて行うことが本研究の目的である。ウェルナー症候群はDNAヘリカーゼの異常による疾患で、早期に老化に伴う疾患が生じる。この遺伝子のノックアウトマウスは症状を呈さず、ウェルナー症候群の病態解明、治療法開発には利用できない。そこで、本計画ではヒトにより近いDNAヘリカーゼを持つカニクイザルを用いて、ウェルナー症候群型変異を持つDNAヘリカーゼを有する霊長類モデルを樹立する。顕微授精を用いた人工繁殖法にレンチウイルスあるいはゲノム編集を組み合わせて、カニクイザル胚にウェルナー症候群型変異DNAヘリカーゼを導入する。このサルは従来長期間飼育しないと検出できないような老化現象、遺伝子異常が早期に生ずることが予測される。そのため、変性疾患、悪性腫瘍の霊長類モデルにもなると考えられ、再生医療、抗癌剤の開発に有用である。

### 3. 研究の方法

(1) 変異WRNヘリカーゼ導入ベクター作製と試験管内での機能の解析

①レンチウイルスベクター用プラスミドにWRNヘリカーゼ遺伝子miRNAをクローニングし、ウイルスパッケージ細胞にトランスフェクトし、レンチウイルスを得る。

②CRISPR/Cas9ベクターにカニクイザルWRNヘリカーゼ遺伝子のガイドRNA配列をクローニングする。In vitro translationによりガイドRNAとCas9 mRNAを作製する。

カニクイザル培養細胞に上記のベクターをトランスフェクトし、作製したベクターが機能することを確認する。すなわち、蛍光顕微鏡及びフローサイトメーターを用いて蛍光タンパク質の発現を、PCRを用いて遺伝子導入部位を確認する。

(2) カニクイザル受精卵のWRNヘリカーゼ遺伝子のCRISPR/Cas9によるゲノム編集

カニクイザルメスにホルモン剤(GnRHアン

タゴニスト、卵胞刺激ホルモン、性腺刺激ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン)を投与し、排卵を誘発する。腹腔鏡を用いて、卵胞の発育を確認後、卵胞を吸引、回収する。オスより採取した精子を顕微鏡下にマイクロマニピュレーターを用いて、卵細胞に導入する。発生を確認後、(1)により変異が導入可能であることを確認したCRISPR/Cas9ガイドRNAとCas9mRNAを、カニクイザル受精卵へ導入する。

顕微授精、遺伝子導入後、桑実胚期まで培養を行う。一部の胚を回収、全ゲノムを増幅後、PCRにて標的配列の塩基配列を決定する。

(3) 変異WRNヘリカーゼ遺伝子の導入胚の仮親への移植

顕微授精、桑実胚期まで発生が確認された胚を仮親へ移植する。仮親の性周期に合わせて、腹腔鏡を用いて、卵胞の発育を確認する。排卵から1ないし6日後に腹腔鏡を用いて、卵管采に遺伝子導入胚を移植する。妊娠の成立は腹部超音波エコー検査で確認する。その後、妊娠中は適時腹部エコー検査で、胎児の発育を計測する。

出産予定日までに自然分娩が見られない場合は、帝王切開により娩出する。出生後、症状を観察する。

### 4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9ベクターを用いたカニクイザルWRNヘリカーゼ遺伝子の編集

WRNヘリカーゼ遺伝子miRNA発現用レンチウイルスベクターとWRNヘリカーゼ遺伝子編集CRISPR/Cas9ベクターを作製した。

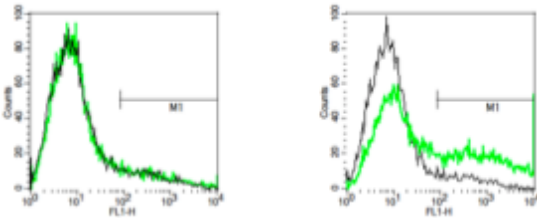
①レンチウイルスベクターにWRNヘリカーゼ遺伝子配列からmiRNAに適した配列を3か所選び、プラスミドベクターを作製した。他のレンチウイルス作製用プラスミドとともに293T細胞にトランスフェクトし、レンチウイルスを回収した。

②ウェルナー症候群の患者に多く見られる変異部分を含むWRNヘリカーゼゲノム遺伝子の一部をオリゴDNAとPCRで増幅し、EGxxFPベクターと大腸菌を用いてクローニングした。CRISPR/Cas9系のガイド配列を推測するWebサイトを参照し、WRNヘリカーゼ遺伝子を編集するための配列を選択し、オリゴDNA合成した。このオリゴDNAをpx330プラスミドベクターと大腸菌を用いてクローニングした。

WRNヘリカーゼ遺伝子を含むEGxxFP及び標的配列を含むpx330ベクターを293T細胞にトランスフェクトし、EGFPの発現を元にフローサイトメーターを用いてCRISPR/Cas9系によるWRNヘリカーゼ遺伝子の切断、編集効率を測定した。この中から編集効率の高い2か所の標的配列を決定した(下図)。

図 ゲノム編集に伴うEGFPの発現

左: WRNヘリカーゼ遺伝子の切断の起きない場合の細胞、右: WRNヘリカーゼ遺伝子が切



断され、EGFP が発現した細胞

## (2) カニクイザル胚における WRN ヘリカーゼ遺伝子編集

カニクイザル胚における CRISPR/Cas9 によりゲノム編集効率を確認した。

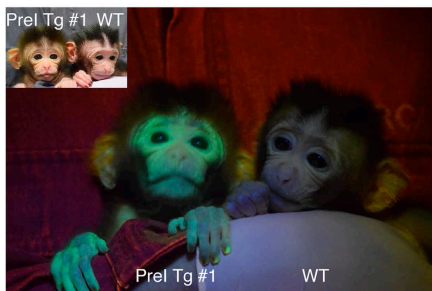
上記の編集効率の高い標的配列を含む px330 ベクターを鋳型として、ガイド RNA と Cas9 の mRNA を作製した。

カニクイザルメスにホルモン剤を投与し、排卵を誘発した。腹腔鏡を用いて、卵胞の発育を確認後、卵胞を吸引、回収した。オスより採取した精子を顕微鏡下にマイクロマニピュレーターを用いて、卵細胞に導入し培養した。発生が確認された受精卵に WRN ヘリカーゼ遺伝子ガイド RNA と Cas9mRNA を顕微鏡下にマイクロマニピュレーターを用いて注入した。

受精卵の培養を継続し、桑実胚になった時点で、胚を回収、全ゲノムを増幅した。PCR を用いて、標的配列周辺のゲノムを増幅、プラスミドと大腸菌を用いてクローニング後、塩基配列を決定した。その結果、高率に変異が生じていることが判明した。

## (3) カニクイザル胚移植と出産

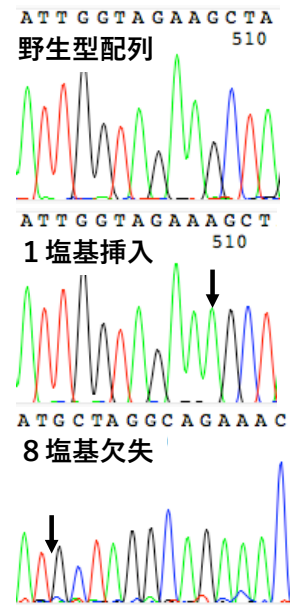
上記の同様の排卵誘発、顕微授精を行った。遺伝子導入、胚移植の試験として、GFP 遺伝子をもつレンチウイルスをマイクロマニピュレーターを用いて受精卵に注入、仮親への胚移植を行った。その結果、GFP を全身に発現するカニクイザルが誕生した (下図)。



WRN ヘリカーゼ遺伝子ガイド RNA と Cas9mRNA を顕微鏡下に注入した受精卵を桑実胚まで培養後、仮親への胚移植を行った。移植から 1 か月後に超音波診断により妊娠を確認した。その後、数頭が原因不明の流産、1 頭が胎盤早期剥離により流産した。これらの胎児組織からゲノム DNA を採取した。PCR 後 WRN ヘリカーゼ遺伝子の塩基配列を決定し、変異の導入を確認した。

現時点で、1 頭のサルが自然分娩により誕

生し、飼育中である。胎盤組織を回収、ゲノム DNA を精製し、PCR により標的遺伝子を増幅し、塩基配列を調べた。その結果、2 種類の変異配列が確認され、両染色体とも変異が導入されたと考えられた (右図)。現在、他に十数頭の仮親が妊娠中である。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Nakayama N, Ito Y (他 7 名、2 番目), Ogasawara K. Potential Risk of Repeated Nasal Vaccination that Induces Allergic Reaction with Mucosal IgE and Airway Eosinophilic Infiltration in Cynomolgus Macaques infected with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Vaccine* 35: 1008-1017, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.01.008
2. Yasui F, Ito Y (他 11 名、2 番目), Ogasawara K. Sensitization with vaccinia virus encoding H5N1 hemagglutinin restores immune potential against H5N1 influenza virus. *Sci Rep* 28:6:37915, 2016. 査読有 DOI: 10.1038/srep37915
3. Obara H, Tsuchiya H, Ito Y (他 20 名、17 番目), Ogasawara K. Surgical technique for allogeneic uterus transplantation in macaques. *Sci Rep* 27: 35989. 査読有 DOI: 10.1038/srep35989.
4. Nakayama M, Ito Y (他 7 名、3 番目), Tsuchiya H, Ogasawara K. Vaccination against H9N2 avian influenza virus reduces bronchus-associated lymphoid tissue formation in cynomolgus macaques after intranasal virus challenge infection. *Pathol Int* 66: 678-686, 2016. 査読有 DOI:10.1111/pin.12472
5. Ito Y. Translational research on influenza virus infection using a nonhuman primate model. *Pathol Int* 66: 132-141, 2016. 査読有 DOI: 10.1111/pin.12385
6. Shichinohe S, Ito Y (他 7 名、2 番目), Ogasawara K. Comparison of pathogenicities of H7 avian influenza viruses via intranasal and conjunctival

- inoculation in cynomolgus macaques. *Virology* 493:31-38, 2016. 査読有 DOI: 10.1016/j.virol.2016.03.007.
7. Seita Y, Tsuchiya H, Itoh Y (他 13 名、11 番目), Ogasawara K, Sasaki E, Emm M. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. *Sci Rep* 6: 24868, 2016. 査読有 DOI: 10.1038/srep24868.
8. Kitano M, Itoh Y (他 12 名、2 番目), Tsuchiya H, Ogasawara K. Efficacy of repeated intravenous administration of peramivir against highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in cynomolgus macaques. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 4795-4803, 2014. 査読有 DOI:10.1128/AAC.02817-14
9. Itoh Y (他 23 名、1 番目), Ogasawara K, Tsuchiya H. Protective Efficacy of Passive Immunization with Monoclonal Antibodies in Animal Models of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection. *PLoS Pathogens* 10: e1004192, 2014. 査読有 DOI:10.1371/journal.ppat.1004192.
10. Muramoto Y, Itoh Y (他 18 名、4 番目), Ogasawara K. Disease severity is associated with differential gene expression at the early and late phases of infection in non-human primates infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *J Virol* 88: 8981-8997, 2014. 査読有 DOI: 10.1128/JVI.00907-14

[学会発表] (計 1 件)

伊藤 靖「霊長類モデルを用いたインフルエンザウイルスの病原性の解明と予防・治療法の開発」第60回日本病理学会秋期特別総会A演説(平成26年11月21日)、国立劇場おきなわ、沖縄県浦添市

[その他]

ホームページ等

<https://www.shiga-med.ac.jp/research-and-collaboration/priority-projects-and-research-results/monkeys>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 靖 (ITO, Yasushi)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

### (2) 研究分担者

小笠原 一誠 (OGASAWARA, Kazumasa)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169163

依馬 正次 (EMA, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

佐々木 えりか (SASAKI, Erika)

公益財団法人実験動物中央研究所・応用発生学研究所センター・センター長

研究者番号：70390739

土屋 英明 (TSUCHIYA, Hideaki)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・技術専門職員

研究者番号：10378440