平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		脳科学研究戦略推進プログラム
研究開発課題名		遺伝子改変マーマセットの汎用性拡大および作出技術の高度化とその脳科学への応用
機関名		公益財団法人実験動物中央研究所
研究開発 担当者	所属 役職	マーマセット研究部・応用発生学研究センター（兼任）部長・センター長（兼任）
	氏名	佐々木 えりか

2. 研究開発成果の内容

①遺伝子改変マーマセットの汎用性拡大及び作出技術の高度化とその脳科学への応用

1) 遺伝子改変マーマセット作製技術の高度化

A. 内在性標的遺伝子へのノックイン(KI)マーマセット作出技術確立

内在性標的遺伝子へのノックイン(KI)マーマセット作出技術の確立を目指し、作製した人工ヌクレアーゼのコンストラクトの中で高い改変効率が確認された人工ヌクレアーゼとドナー遺伝子の組み合わせを用いて受精卵に注入し、*in vivo*における条件の最適化によるゲノム改変効率を検討した。注入する人工ヌクレアーゼの切断活性最大化を検討し、注入胚の 70%以上が切断される条件を見出した。KI ドナー遺伝子に関しては、平成 26 年度までのマーマセット繊維芽細胞を用いた検討結果から、効率的に宿主ゲノムへ取り込まれるドナー遺伝子の再設計が必要であることが分かったため着手し、構築されたドナー遺伝子を用いてマーマセット細胞での検討を行ったが、効率的な KI 現象は認められなかった。効率の良い相同組み換え条件を見出すことはできなかったが、受精卵における相同組み換え効率は細胞の場合と異なることも予想されたため、マーマセット受精卵 63 個を用い、人工ヌクレアーゼと ssODN を共注入することによる KI を検討した。その結果、CRISPR/Cas9 による標的部位の遺伝子改変はほとんどの胚で見られたが、標的部位をシーケンス解析した結果、標的遺伝子の KO 改変は認められたものの KI は認められなかった。

B. 8kb 以上の遺伝子導入技術確立

8kb 以上の遺伝子改変個体作出技術確立については、マーマセットの受精卵 73 個の核内もしくは細胞質内へ遺伝子導入を行い、*in vitro*での胚発生能と遺伝子導入の有無の指標となる蛍光発現の評価、また、選別した胚を移植して *in vivo*での個体発生能を見た。細胞質注入区において、*in vitro*での胚発生能が低下しないこと、さらには蛍光発現が確認された胚 20 個を 8 個体に移植し 3 匹(37.5%) が妊娠し、着床率が高いことが明らかとなった。しかしながら、胎児心拍確認後に 2 匹が流産したため、注入核酸濃度と移植条件を再検討し、移植実験を継続している。また、これまでは注入条件の検討のため、色のみ単純なコンストラクトを用いていたが、新たに α シヌクレイン遺伝子を導入する方法の評価を行い、遺伝子導入効率は低下するものの、同様に遺伝子導入の判別可能であることを明らか

にした。

2) 遺伝子改変マーマセツト作出技術の低侵襲化

A. FSH 投与の動物への負担軽減技術

性腺刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone ;FSH) 投与の動物への負担軽減技術の開発においては、9 日間の FSH の投与が必要な卵巣刺激法について、平成 26 年度までに達成した投与回数の軽減のさらなる FSH 投与の低侵襲化を目指すために、FSH 徐放化剤の水解性有機ポリマーと FSH の安定化剤タンパクの材質と混合量を検討した。その結果、ゼラチン含有 200 μ g シートにおいて約 4 日間に緩やかなゼラチンタンパクの徐放が確認され、安定化剤としてゼラチン 200 μ g 以上が適切であると考えられた。また、徐放化剤から放出された FSH の生物活性の評価系について、卵巣顆粒膜細胞種から株化された培養細胞を用いた FSH の活性評価法を構築した。

B. 未受精採卵技術の低侵襲化技術の開発

腹腔鏡手術での未受精卵採卵における個体への低侵襲化を進めた。改善前は体格や脂肪量の関係で腹腔鏡手術を施術できない個体が多かったが、利尿作用の多い少ない導入麻酔にすることで、全ての個体で腹腔鏡手術が可能となった。さらに、腹腔鏡での採卵を実用化レベルに引き上げるため、手術時間の短縮 (最大 2 時間から最短 30 分に引き下げ)、採卵個数の安定化 (5 個未満から 15 個以上の引き上げ) を達成した。これらの結果から、今後は開腹による未受精卵採卵手術時に 1 個体を腹腔鏡手術として組み入れていることが可能なレベルに達した。また、腹腔鏡採卵個体 (3 頭) と開腹採卵個体それぞれの癒着状態を比較した結果、腹腔鏡手術個体では卵巣の癒着がほとんど見られなかった。

C. 性周期管理の低侵襲化技術の開発

平成 26 年度に開発した尿サンプルによるプロゲステロン値測定法の定常業務化を目指して評価・検討を継続した。採血から採尿に変更することで動物への負担が軽減されるかどうかを検証するため、ストレスマーカーであるコルチゾールを指標として評価を行い、採血から採尿への切り替えの前後における尿中コルチゾール値の低下を確認した。また、定常業務化に必要な測定機器メーカーの試薬変更への対応のために新試薬を用いて測定法の再検討を行い、尿プロゲステロン測定による排卵日推定が実用可能であることを確認した。また、採血から採尿への切り替えの前後で尿中コルチゾールの低下傾向が認められ、動物のストレス状態が軽減されていることが示唆された。定常業務化の一環として、バイオバブルで飼育中のメスの免疫不全マーマセツトの尿中プロゲステロン測定による性周期管理を開始した。

3) マーマセツト需要拡大に向けた戦略推進

マーマセツトの普及、需要拡大のため、新規ユーザーやマーマセツトを使用していない研究者へのマーマセツト臓器・組織の提供、マーマセツトの飼育、取り扱い、動物実験技術の講習を行った。平成 27 年度は 16 機関 (大学および公的研究機関) の 20 名の研究者にマーマセツトの臓器・組織提供を行い、海外 3 機関を含む 6 機関の対象者に飼育・取り扱いおよび発生工学技術研修を実施した。また、国内外におけるマーマセツトの研究動向と遺伝子改変マーマセツトの需要調査・将来市場分析および学会での情報収集を委託調査により実施した。平成 27 年度はこれまでの日本、欧米に加えて

アジア地域まで調査範囲を拡大するとともに受託試験を獲得するための研究の方向性の改善点について分析した。調査の結果、国内におけるマーマセットの使用増加、中国における遺伝子改変霊長類開発の進捗、欧州における創薬分野でのマーマセット利用促進の動きなど、マーマセットの世界的需要の高まりが確認された。また受託試験事業の需要として海外大手製薬企業から遺伝子改変マーマセットの受託試験や共同研究の打診、国内製薬企業からのマーマセットを用いた薬効試験の受託打診、国内 CRO における安全性試験実施検討などが確認された。受託試験獲得のための研究の方向性の改善点の分析としては、精神神経疾患治療薬や免疫システムを介した創薬のニーズが高まっており、精神神経疾患モデル開発のための標的遺伝子ノックアウト・ノックイン技術確立に加えて、免疫系解析のための抗体整備やマーマセット免疫系の研究の重要性が見出された。

②神経細胞の移植を可能とする免疫不全マーマセットの開発と飼育管理技術確立

平成 26 年度中に整備を完了したクリーン飼育施設において免疫不全関連遺伝子である **Interleukin 2 receptor common gamma (IL2R γ)** 鎖遺伝子をノックアウトした免疫不全マーマセットの飼育維持を開始した。平成 26 年度に投稿した、既存の免疫不全マーマセットの血液解析および詳細な免疫不全状態の解析を終了した。また修正論文を投稿し、近日中に受理される予定である。平成 27 年度は、平成 26 年度に実施した個体作出実験での妊娠個体からファウンダー雌 1 個体を獲得し、更に **IL2R γ** 鎖遺伝子に対する人工ヌクレアーゼを 81 個の受精卵へ注入して正常な発生が見られた 27 個の胚を仮親の子宮へ移植した結果、ファウンダー雄 1 個体を獲得した。平成 27 年度に得られた 2 個体は遺伝子解析の結果、全身性の **IL2R γ** ノックアウトであることが推定され、クリーン飼育室内での飼育維持および血液サンプルを対象としたフェノタイプ解析を実施した。クリーン飼育についての将来的な技術移管を目的とした飼育法、および、新規に開発したケージの実地検討は、年度内に得られた 2 個体を対象として、出生半年以内の幼若免疫不全個体の維持に関する哺育成績や離乳後のケージ飼育データを評価した。この結果、幼若免疫不全個体を適正に離乳まで維持可能となるプロトコルを確定した。また免疫不全動物では、外傷による細菌感染などが致命傷となりえるため、ケージ構造に起因する外傷は回避しなければならない。そこで新規開発したケージ内で免疫不全動物が負傷しないなど安全性に関する初期検討を終了した。

③プロジェクトの総合的推進

プロジェクト推進のため、中核・参画機関とのミーティング、霊長類モデル分科会等を開催するとともに、PS、POとの打ち合わせを行い、課題内の情報共有を密にして互いの問題解決のための検討を行って業務を実施し、プロジェクト全体の進捗状況を確認しつつ、当該プロジェクトの後半計画の合理化を行った。免疫不全マーマセット、パーキンソン病モデル、受精卵クローン個体作製についてもプロジェクト全体が円滑に推進するように統括を行い、産仔、F1 などを得ることに成功した。また、「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明」や脳プロ「BMI 技術」の他の課題とも積極的に連携して業務を推進し、遺伝子改変マーマセットの普及に努めた。

④革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトとの連携

i) 自閉症モデルマーマセットの作製と解析

シナプス関連タンパク質を標的とした自閉症モデルマーマセットのファウンダー作製に向け、平成

27年度は、8細胞期における各割球をテンプレートとした変異遺伝子改変試験を実施し、胚内のモザイク様改変について検討した。Single-guide RNA mRNA 50ng/μl、Cas9 mRNA 100ng/μl の濃度で1細胞期のマーモセット受精卵9個にCRISPR/Cas9を注入し、人工培養4日目に8細胞期胚1個、4細胞期2個を得た。PCR反応が成功した8細胞期胚1個、4細胞期1個について変異遺伝子検出試験を実施した結果、8細胞期胚では8割球中6つの割球(75%)において改変が示唆され、4細胞期胚の1つではすべての割球で改変が示唆された。このことから、4細胞期胚では均質な改変、8細胞期胚では不均質な改変が起きていたことが示唆された。また、MeCP2ノックアウトによる自閉症モデルマーモセットの作出に関しては、40個の受精卵へのゲノム人工ヌクレアーゼ(MeCP2-ZFN)の注入を実施した。そのうち、正常な発生が認められた23個の胚を仮親への子宮へ移植し、年度内に4匹の妊娠個体を得た。TSC2ノックアウトモデルマーモセットの作出については、80個の受精卵への人工ヌクレアーゼ(TSC2-TALEN)の注入を実施し、正常な発生が見られた35個の胚を仮親の子宮に移植を行った。

ii) アルツハイマー病モデルマーモセットの作製と解析

変異型 APP(sw/in)トランスジェニックマーモセットの繁殖では、作成した2個体のEF1 α -APP-KOマーモセットに関して受精卵採卵をおこなったが、クサビラオレンジの蛍光が検出できずに凍結保存をおこなった。また、実験動物中央研究所において、Tet-ドライバーを用いたTRE-APP tg遺伝子導入アルツハイマーモデルマーモセット作出を試みたが、正常な発生が確認できなかったため、胚移植には至らなかった。さらなるアルツハイマー病モデルマーモセットの作製については、CAGプロモーターを用いた新規コンストラクトのインジェクションを行ったが、クサビラオレンジの蛍光が胚で検出できず移植には至らなかった。

iii) ヒト脳皮質形成異常症の関連因子 GPR56 のマーモセットでの可視化

既存の Gpr56-EGFP Tg マーモセットについては、飼育維持および解析用 F1 胎児の作製のための受精卵採卵を行った。Gpr56-EGFP Tg マーモセットのオスと同居しているメス1頭および野生型マーモセットと同居しているメスの Gpr56-EGFP Tg マーモセット、計2頭のマーモセットを用いて採卵を行った。それぞれのペアより合計32回の採卵を実施し、正常胚28個、未受精卵9個、変性胚3個が得られ、そのうちの正常に発生している胚28個に対して凍結保存を実施した。革新脳中核拠点(参画機関学校法人慶應義塾)で、初期胚で遺伝子改変を示すレポーター遺伝子も挿入した新規 Gpr56-ffLuc-ins-EOS-hK01 発現レンチウイルスベクターが作製された。新規ベクターをマーモセット胎児脳初代培養系および生体マウス子宮内胎児脳に導入し、蛍光・発光ともに発現を検証できた。特に、ルシフェリン発光は十分であったが、蛍光タンパク質の発現効率が低く、遺伝子改変個体を作製には適していないと考えられた。マーモセット授受精卵への注入は延期し、個体作出に適した導入遺伝子発現効率を確保するベクター作成を目的として、トランスポゾンベクターを骨格としたベクターの作成に着手した。

iv) 組織特異的に目的遺伝子を発現するマーモセット作製技術開発

革新脳中核拠点(参画機関学校法人慶應義塾)において human Orexin promoter の下流に Cre リコンビナーゼを発現するレンチウイルスベクターの構築が完了した。同ウイルスベクターの有効性を確認するため、マーモセット受精卵47個へ注入したが、染色体への挿入を示す蛍光タンパク質の発現

が認められなかった。このことから同ベクターは遺伝子改変マーマセットを作製するには適しておらず、個体作出のための **Orexin-cre** 発現ベクターとしては有効ではない事がわかった。そこで個体作出のための新たなアプローチとして、トランスポゾンベクターを骨格とした **Orexin-Cre** ベクターの作製に着手した。

v) 中核拠点代表機関の国立研究開発法人理化学研究所において、遺伝子改変マーマセットの作製技術の技術移転を完了し、妊娠個体獲得を目指す。

中核拠点代表機関の国立研究開発法人理化学研究所において、メスマーマセットの性周期管理、未受精卵採卵、体外受精、胚移植という一連の技術移転を完了した。理化学研究所における遺伝子改変マーマセットの作製の実施として、自閉症モデル作製のために **MeCP2** 遺伝子をターゲットとした **ZFNs** の卵細胞質への注入、および、アルツハイマー病モデルマーマセット作製のため **CAG-tau-hKO**、**CAG-APP-hKO** レンチウイルスベクターを卵卵腔へインジェクションし、正常な胚発生/蛍光発現の確認できた受精卵を仮親の子宮へ移植を行った。