

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（キメラ形成能を持つマーマセット ES 細胞を用いた新たな遺伝子改変技術の開発とマーマセットゲノム情報基盤の確立）
機関名		学校法人慶應義塾
研究開発	所属 役職	慶應義塾大学医学部 教授
担当者	氏名	岡野 栄之

2. 研究開発成果の内容

①キメラ形成能を有するマーマセット ES 細胞を利用した新たな遺伝子改変技術の開発

作出したナীব型マーマセット ES 細胞の個体発生能を検討するため、初期胚とのキメラ胚作成を行った。国立大学法人広島大学・外丸らと共同で、マウス及びマーマセット 4 倍体胚を作成した。マウス 4 倍体胚とのキメラ胚について、偽妊娠マウス子宮へ移植を行い、着床後胚を解析した。その結果、一部の胚において EGFP 陽性の細胞を含む胚が得られた。マーマセット 4 倍体胚とのキメラ胚においては、その培養条件を検討した。

また、ナীব型マーマセット ES 細胞の in vitro における性状解析として、 β -catenin シグナルがナীব状態維持に及ぼす影響の解析を行い、培養に添加する低分子化合物の最適化を行った。

遺伝性ミエリン形成不全症のペリツェウス・メルツバッハー病 (Pelizaues-Merzbacher disease, PMD) モデルマーマセット作製に向け、原因遺伝子である PLP1 遺伝子に null 型変異を挿入したマーマセット ES 細胞株の Naίve 化を行った。更に、null 型変異よりも重篤な症状を示すことが知られる点突然変異を導入したマーマセット ES 細胞株の樹立を行った。本成果の一部を、世界最大の幹細胞学会である ISSCR において発表を行った。

②神経変性疾患モデルマーマセットの病態解析

平成 27 年度は、平成 26 年度に引き続きパーキンソン病 (PD) モデルマーマセットの病理・行動解析を行うとともに、脳画像解析により非侵襲的に継時的変化を捉えることを目的とした。国立研究開発法人理化学研究所との連携研究により PET によるドーパミン・トランスポーターの増減を解析し、更に公益財団法人実験動物中央研究所（実中研）との共同研究で MRI による Voxel Based Morphometry (VBM) 解析および diffusion tensor imaging (DTI) 解析を行った。その結果、PET 解析では一部の個体でドーパミン・トランスポーターの低下を認め、野生型マーマセットと比べ明らかに低い値を示した。MRI 解析では現在までに明瞭な変化は認めていないが、引き続き定期的に撮像を行う。これに加え、PET 解析で特に変化を認めた個体について PD との関連性を検証するために、Catwalk

(歩行機能解析システム)を用いた運動機能解析を行ったところ、歩幅・歩行スピードともに野生型に比べ低い値を示した。これが PD 患者と同様にドパミンの低下に起因する現象なのかを検証するために、L-dopa 投与による一過性回復実験を試みたところ、同様の歩行解析で歩幅及び歩行スピードの改善を認めたことから、歩行異常の少なくとも一部は、ドパミン低下に起因する可能性が示唆された。今回いくつかの表現型を認めた家系を適切ラインとして考慮するとともに、平成28年度は他のラインについても同様の方法により検証を行う。また、組織学的解析においても transgene の発現状態等について既にラインごとに解析を行っており、Founder または F1 個体の結果から、各ラインの神経細胞での transgene 発現パターンをある程度予測出来るため、リプログラミング技術による神経細胞分化誘導に関しては組織解析による評価を優先している。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマーマモセットについても MRI 解析を定期的に行っており、現在までのところ明確な変化は認めていないが、PD マーマモセットの運動症状発症が3歳であったことから、引き続き継続的な解析を行う。

③マーマモセットゲノム情報基盤の確立

平成26年度までにリシーケンスを行うことにより大幅に改良した実中研マーマモセットゲノム配列改訂版、マーマモセットとヒト cDNA を用いた遺伝子コード領域の再アノテーション、RNA-seq による遺伝子発現プロファイル、米国でシーケンスされた9個体の多型情報も含む多型解析データ、BAC 配列地図をすべて統合したマーマモセット統合ゲノムブラウザの作成をほぼ完了し、次の URL 上に公開した。

“コモンマーマモセットゲノムブラウザ <http://marmoset.dna.bio.keio.ac.jp/>”

一方、マウスのゲノム情報基盤に匹敵するマーマモセットのゲノム情報基盤を整備することを目的として、トランスクリプトームシーケンスによるマーマモセット版 BodyMap の作成を行っている。平成26年度は、脳・脊髄・肝臓・脾臓・精巣の5臓器のトランスクリプトーム解析を次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により行った結果について報告した。さらに平成27年度は、コモンマーマモセットの左脳から、前頭前野(PFC)、一次運動野(PMC)、体性感覚野(SSA)、上側頭回(STG)、ブローカ野(BrA)、ウェルニッケ野(WeA)、海馬(HIP)、小脳(CER)の8部位を採材し、Total RNA を抽出した。ここから mRNA のみを選択し、次世代シーケンサーによる RNA-seq を行った。得られたペアエンドリード情報をクオリティに基づいて適切に処理した後、コモンマーマモセットのドラフトゲノムに対してマッピングし、遺伝子の発現量を定量した。各遺伝子の発現量差を部位間で検定し、部位特異的な発現が認められる遺伝子を特定した。小脳特異的な高発現遺伝子を39個、海馬で9個特定した。さらに、大脳新皮質全体の高発現遺伝子を7個特定した。以上のように、マーマモセット左脳における脳部位での遺伝子発現地図を作成した。また、ヒトの脳の遺伝子発現データベースから各部位の高発現遺伝子を取り出し、本研究で得た発現データと比較したところ、対応する部位で高発現とならない遺伝子が存在した。こうした遺伝子は、マーマモセットとヒトの間での認識機能や言語能力の差異に関連している可能性がある。コモンマーマモセットのゲノム解読と脳部位のトランスクリプトーム解析の研究成果に関しては、The Organization for Human Brain Mapping 2015 および第5回マーマモセット研究会大会において発表を行った。