

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究

開発課題名： (日本語) キメラ形成能を持つマーモセット ES 細胞を用いた新たな遺伝子改変技術の開発とマーモセットゲノム情報基盤の確立
(英語) Development of gene targeting technology and establishment of genome information infrastructure in common marmoset

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 特任講師 塩澤 誠司

所属 役職 氏名： (英語) Keio University school of medicine, Project assistant professor,
Seiji Shiozawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

①キメラ形成能を有するマーモセット ES 細胞を利用した新たな遺伝子改変技術の開発
ナイーブ型マーモセット ES 細胞の培養条件及び誘導条件の最適化を行った。この ES 細胞の個体発生能を検討するため、マイクロインジェクションによりマーモセット胚とのキメラ胚を作成し、解析を行った。その結果、内部細胞塊(ICM)において ES 細胞由来の EGFP 陽性細胞が取り込まれている像が確認された。しかしながら、インジェクション後の ES 細胞の生存性が低かったため、現在さらに改良を進めている。また、広島大学・外丸グループとの共同によりマウス 4 倍体胚とナイーブ型 ES 細胞とのキメラ胚の作出を行い、マウス子宮への移植実験を行った。
更に、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 (PMD) モデルマーモセット作製に向け、マーモセット ES 細胞において確立した相同組換え技術を応用し、受精卵でのゲノム編集及びノックインを行った。

② 神経変性疾患モデルマーモセットの病態解析

昨年度までの解析により運動機能障害に関連する結果が得られていたが、平成 28 年度は PD 症状の中で近年重要視されている非運動症状についても評価を行った。特に注目したのは睡眠障害であり、脳波・

筋電図を用いた詳細な解析を行った。測定は終了し、現在 WT 個体含め解析を行っている。更に、進行ステージの予測を目的として後期症状として知られている症状についても解析を行った。既に運動症状が出現している個体についても解析を行ったが、これまでの結果では WT と Tg 間で大きな差は認めていないことから、Tg モデルが PD 後期のステージまでには進行していないことが予測される。また、繁殖についても F2 個体獲得まで至っており、引き続きライン化を目的として繁殖を続ける。

③ マーモセットゲノム情報基盤の確立

マーモセット脳の遺伝子発現地図の作成に関しては、平成 28 年度に左脳 8 部位の非コード RNA の発現プロファイルを作成し、マーモセット脳の遺伝子発現地図をほぼ完成した。次に、今年度、PacBio のロングリードシーケンスを実行した。シーケンスされたリード量は約 50 カバレッジに達し、リードの平均長は数 Kb と、十分なシーケンスを行うことができた。簡単なアセンブリを行ったところ、アセンブリでつながった長さの指標である N50 は、約 3.4Mb と従来の N50 より二桁高く、非常に期待できる結果となった。さらに、scaffold にまとめたところ、gap 数では約 89%減少、gap 領域の長さは約 78%減少となり、より多くの gap 領域を埋めることができた。埋まっていない gap 領域はゲノム全体の 0.009% と非常にわずかな領域である。

1) Development of gene targeting technology

In this fiscal year, we optimized naïve induction and culture methods in common marmoset ES cells. We are currently injecting the cells into marmoset embryos to investigate their developmental capacity. As a result, although ESC-derived EGFP positive cells were found in the ICM of marmoset embryos, the cell viability after injection was low. To solve this problem, we further optimized cell culture conditions and the injection method. In addition, in collaboration with Prof. Sotomaru, we performed injection of marmoset ESCs into mouse tetraploid embryo.

In addition, we are in the process of generating a dysmyelinating disease (Pelizaeus-Merzbacher disease) marmoset model. We are currently developing knock-in technology in common marmoset embryo for application in generating disease models.

2) Analysis of neurodegenerative disease model marmosets

So far, we have shown that the transgenic marmoset harboring mutant alpha-Synuclein have developed Parkinson's disease (PD) -like motor dysfunction. In this fiscal year, we evaluated non-motor symptoms that were considered to be important symptoms seen in very early PD. Among non-motor PD symptoms, we particularly focused on sleep disturbance. Therefore, detailed sleep analysis was performed using electroencephalogram / electromyogram. Furthermore, in order to predict which disease stage these transgenic marmosets are currently in, we also analyzed the late stage symptoms. Unfortunately, compared with wild-type marmosets, no significant difference was observed in the transgenic marmosets. Therefore, it is thought that they are not in late PD stage yet. In addition to phenotype analysis of transgenic marmosets, we are in the process of breeding additional transgenic marmosets. This year, we obtained pups in the F2 generation. We will continue breeding for further establishment of transgenic marmoset lines.

3) Establishment of genome information infrastructure

Regarding the construction of gene expression maps of marmoset brains, the expression profiles of non-coding RNAs in the left brain 8 sites were obtained, and therefore the gene expression map of Marmoset brain was nearly completed. Next, we performed a long read re-sequence using PacBio for the Marmoset genome. The sequenced read amount reached about 50 coverage and the average length of reads was several Kb, which enabled a sufficient sequence. As a result of a simple assembly, the N50 which is the index for the quality of the assembly was about 3.4 Mb which is two orders of magnitude higher than the previous N50, which is very promising result. Furthermore, when assembled in the scaffold, the number of gaps was reduced by about 89%, the gap region length was reduced by about 78%, and hence more gap region could be filled. The remained unfilled gap region is a very small region of 0.009% in the entire Marmoset genome.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国際誌6件）

1. Hikishima K, Komaki Y, Seki F, Ohnishi Y, Okano HJ, Okano H. In vivo microscopic voxel-based morphometry with a brain template to characterize strain-specific structures in the mouse brain. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):85. doi: 10.1038/s41598-017-00148-1. Epub 2017 Mar 7.
2. Komaki Y, Hikishima K, Shibata S, Konomi T, Seki F, Yamada M, Miyasaka N, Fujiyoshi K, Okano HJ, Nakamura M, Okano H. Functional brain mapping using specific sensory-circuit stimulation and a theoretical graph network analysis in mice with neuropathic allodynia. *Sci Rep*. 2016 Nov 29;6:37802. doi: 10.1038/srep37802.
3. Okano H, Sasaki E, Yamamori T, Iriki A, Shimogori T, Yamaguchi Y, Kasai K, Miyawaki A. Brain/MINDS: A Japanese National Brain Project for Marmoset Neuroscience. *Neuron*. 2016 Nov 2;92(3):582-590. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.018.
4. Imamura T, Fujita K, Tagawa K, Ikura T, Chen X, Homma H, Tamura T, Mao Y, Taniguchi JB, Motoki K, Nakabayashi M, Ito N, Yamada K, Tomii K, Okano H, Kaye J, Finkbeiner S, Okazawa H. Identification of hepta-histidine as a candidate drug for Huntington's disease by in silico-in vitro- in vivo-integrated screens of chemical libraries. *Sci Rep*. 2016 Sep 22;6:33861. doi: 10.1038/srep33861.
5. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata JI, Okano

H, Sasaki E. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*. 2016 Jun 29. pii: S1934-5909(16)30153-9. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.003

6. Tsuchiya, M., Amano, K., Abe, M., Seki, M., Hase, S., Sato, K., and Sakakibara, Y. SHARAKU: An algorithm for aligning and clustering read mapping profiles of deep sequencing in non-coding RNA processing. *Bioinformatics*. 32(12), i369-i377, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Hideyuki Okano : Modeling Psychiatric/Neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates. : International Symposium on Cell Physiology and Aging Research, 2016.4.12 *2016.4.12 (Kaohsiung Medical University (KMU), Kaohsiung, Taiwan) 招待講演、国外
2. Hideyuki Okano : Modeling Human Psychiatric/Neurological Disorders using Transgenic technologies and Genome-Editing in Non-human Primates. : Genome Editing in Neurosciences (24 th annual Colloque Médecine et Recherche in the Neurosciences series), 2016.4.22 *2016.4.22 (#Cloud, Paris, France) 招待講演、国外
3. Hideyuki Okano : Brain Mapping and Modeling Human Psychiatric/Neurological Disorders. : INSERM&AMED International Workshop "Scientific meeting on animal models of neurodegenerative disorders", 2016.5.3 *2016.5.3 (Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Paris, France) 招待講演、国外
4. Hideyuki Okano : Disease Modeling and Brain Mapping Using Transgenic Marmosets. : Keystone Symposia Conference "State of the Brain(R1)", 2016.5.26 *2016.5.22-26 (Alpbach Congress Centrum, Alpbach, Austria) 招待講演、国外
5. Hideyuki Okano : Brain Mapping and Modeling Human Psychiatric/Neurological Disorders using Transgenic technologies and Genome-Editing in Non-human Primates. : The Brain Forum 2016, 2016.5.27 *2016.5.26-27 (SwissTech Convention Center, Ecublens, Swiss Confederation) 招待講演、国外
6. Hideyuki Okano : Modelling human neurological diseases using iPS cells and transgenic non-human primates.: 11th International Conference for Neurons and Brain Disease, 2016.7.16 *2016.7.14-16 (Sheraton Vancouver Wall Centre Hotel, Vancouver, Canada) 招待講演、国外
7. Hideyuki Okano : Modeling Human Neurological/ Psychiatric Disorders using iPS Cells and Transgenic Non-human Primates.: Joint Symposium on Regenerative Medicine and Longevity,

Washington University in St. Louis and Keio University, 2016.8.20 *2016.8.20 (Large Conference Room, 11F, Building 2, Keio University Hospital, Tokyo, Japan) 招待講演、国外

8. Hideyuki Okano : Structural and Functional Mapping of Marmoset Brains and Disease Modeling using GM Marmoset.: Decode Summit 2016, 2016.9.28 *2016.9.28 (Four Seasons Hotel Silicon Valley, East Palo Alto, CA, USA) 招待講演、国外
9. Hideyuki Okano : Modeling of Human Neurological/Psychiatric Disorders using IPS cells and Transgenic Non-Human Primates. : Special Gus Gurley Seminar, 2016.10.6 *2016.10.6 (Rathmann Auditorium, Neuroscience Research Institute • [University of California, Santa Barbara](http://www.ucsb.edu/), Santa Barbara, California, USA) 招待講演、国外
10. Hideyuki Okano : MRI-based structural and functional mapping of marmoset brains.: Neuroscience 2016, Nanosymposium, 2016.11.14 *2016.11.12-16 (San Diego Convention Center, San Diego, California, USA) 招待講演、国外
11. Hideyuki Okano : New Insights from the Brain Mapping Project in Japan: Modeling Human Diseases with iPS cells and Transgenic Non-Human Primates.: UC San Diego Medical Education & Telemedicine Building Learning Center Seminar, 2016.11.16*2016.11.16 (UC San Diego Medical Education & Telemedicine Building Learning Center, San Diego, California, USA) 招待講演、国外
12. Hideyuki Okano : Structural and functional mapping of marmoset brain.: NSF-AMED Workshop, Comparative Principles of Brain Architecture and Functions, 2016.11.18*2016.11.17-18 (Marriott Marquis San Diego Marina, San Diego, California, USA) 招待講演、国外
13. Hideyuki Okano : Brain/MINDS: Brain Mapping Projects in Japan.: 3rd Annual Brain Initiative R Investigators Meeting, 2016.12.12 *2016.12.12-14 (Bethesda North Marriott Hotel & Conference Center, Bethesda, Maryland, USA) 招待講演、国外
14. Hideyuki Okano : Brain Science using common marmoset : French-Japanese Scientific Meeting on Neurobiology of Diseases and Ageing, 2017.3.24 *2017.3.24 (French Embassy, Tokyo, Japan) 招待講演、国内
15. 岡野栄之 : 遺伝子改変マーマセットを用いた疾患研究 : 第 57 回日本神経学会学術大会・ホットトピックス、2016. 5. 18 *2016. 5. 18-21 (神戸国際会議場、神戸) 招待講演、国内
16. 岡野栄之 : iPS 細胞技術と遺伝子改変霊長類による革新的医療の開発 : 第 36 回東邦耳鼻咽喉科会総会・特別講演、2016. 6. 11 *2016. 6. 11 (大森 REI ホテル、東京) 招待講演、国内
17. 岡野栄之 : iPS 細胞技術を用いた神経疾患病態解明と創薬研究 : 第 37 回日本炎症・再生医学会・シンポジウム、2016. 6. 16*2016. 6. 16-17 (京都市勧業館みやこめっせ、京都) 招待講演、国内

18. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患研究：第 14 回鹿児島ニューロフォーラム・特別講演、2016. 7. 5*2016. 7. 5（鹿児島大学鶴陵会館中会議室、鹿児島）招待講演、国内
19. 岡野栄之：Modeling Human Psychiatric/Neurological Disorders using Transgenic technologies and GenomeEditing in Non-human Primates.：第 39 回日本神経科学大会・シンポジウム、2016. 7. 21 *2016. 7. 20-22（パシフィコ横浜・横浜）招待講演、国内
20. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた神経疾患病態解明と創薬研究：第 27 回日本抹消神経学会学術集会・特別講演、2016. 8. 26 *2016. 8. 26-27（大阪国際会議場・グランキューブ大阪、大阪）招待講演、国内
21. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた神経疾患病態解明と創薬研究：第 3 回包括的緩和医療科学学術研究会・第 4 回 Tokyo 疼痛緩和次世代研究会・合同研究会、2016. 8. 28 *2016. 8. 28（TKP ガーデンシティー永田町、東京）招待講演、国内
22. 岡野栄之：iPS 細胞技術と遺伝子改変霊長類を用いた神経疾患病態解明と創薬研究：第 5 回実験動物科学・シンポジウム、2016. 10. 21*2016. 10. 21（信州大学、松本）招待講演、国内
23. Mutated α -Synuclein transgenic marmosets as a novel non-human primate model of Parkinson's disease, Reona Kobayashi, Seiji Shiozawa, Junko Okahara, Chihiro Yokoyama, Takahiro Kondo, Junko Takahashi-Fujigasaki, Takashi Inoue, Chikako Hara-Miyauchi, Takuji Maeda, Hirotaka James Okano, Erika Sasaki, Hideyuki Okano, 46th Society for Neuroscience annual Meeting, 2016/11/12-16, ポスター, 国外
24. 岡野栄之：革新的技術を用いた脳科学研究：その光と影：【JST-RISTEX】 科学技術と知の精神文化 第 42 回研究会、2016. 11. 28 *2016. 11. 28（JST 東京本部内会議室、東京）招待講演、国内
25. ナイーブ型マーマセット ES 細胞の作出, 塩澤誠司, 岡原純子, 佐々木えりか, 岡野栄之, 第 6 回日本マーマセット研究会大会, 2016/12/12-14, ポスター, 国内.
26. Mutated α -Synuclein transgenic marmosets as a novel non-human primate model of Parkinson's disease, Reona Kobayashi, Seiji Shiozawa, Junko Okahara, Chihiro Yokoyama, Takahiro Kondo, Junko Takahashi-Fujigasaki, Takashi Inoue, Chikako Hara-Miyauchi, Takuji Maeda, Hirotaka Onoe, Erika Sasaki, Hideyuki Okano, 第 6 回日本マーマセット研究会大会, 2016/12/12-14, ポスター, 国内.
27. 岡野栄之：再生医療と先制医療で健康寿命を延ばす！：第 20 回・生命科学シンポジウム『高齢社会を科学する』, 2016. 12. 17 *2016. 12. 17（学習院大学、東京）招待講演、国内

28. 岡野栄之：ヒト iPS 細胞と霊長類モデルを用いた治療開発の基盤整備：次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム 『脳タンパク質老化公開シンポジウムー脳タンパク質の老化と神経変性ー』， 2016. 12. 19*2016. 12. 19（一橋講堂、東京）招待講演、国内
29. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた精神・神経疾患の病態解明と創薬研究：MAC メディカル賀詞交換会，2017. 1. 25*2017. 1. 25（ホテルニューオータニ東京、東京）招待講演、国内
30. 岡野栄之：iPS 細胞技術と遺伝子改変霊長類を用いた精神・神経疾患の病態解析と創薬研究：第 90 回日本薬理学会年会・ランチョンセミナー，2017. 3. 16 *2017. 3. 15-17（長崎ブリックホール、長崎）招待講演、国内
31. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた精神・神経疾患研究，立教大学 ブランディング事業シンポジウム，2017. 3. 23 *2017. 3. 23（立教大学、東京）招待講演、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 岡野栄之：再生医療と脳科学の最先端：2016 東進大学学部研究会、2016. 8. 5 *2016. 8. 5（TKP ガーデンシティ品川、東京）
2. 岡野栄之：iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた未来の医療の開発：第 58 回歯科基礎医学会・ロッテ基金特別講演（市民公開講座）、2016. 8. 25 *2016. 8. 24-26（札幌コンベンションセンター、札幌）
3. 岡野栄之：iPS 細胞研究 10 年のあゆみ：Walk Again 2016、2016. 10. 1 *2016. 10. 1（秋葉原コンベンションホール、東京）

(4) 特許出願