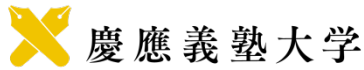


平成 28 年 7 月 1 日



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

公益財団法人 実験動物中央研究所
慶應義塾大学 医学部
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

ゲノム編集技術により免疫不全霊長類の作出に成功 (霊長類を用いた自閉症、統合失調症などの精神神経疾患研究も可能に)

日本医療研究開発機構・脳科学研究戦略推進プログラムの一環として、(公益財団法人) 実験動物中央研究所(実中研) マーモセット研究部の佐々木 えりか部長(慶應義塾大学先導研究センター特任教授兼務)と慶應義塾大学(慶應大) 医学部生理学教室の岡野 栄之教授らは、ゲノム編集^{注1)}という技術を用いて、世界に先駆けて目的の形質を示す霊長類のモデル動物の作製に成功しました。これまで、遺伝子改変マウスはライフサイエンス研究に貢献してきましたが、ヒト疾患の治療法開発研究のためにはマウスよりヒトと解剖学的、生理学的に類似している霊長類のモデル動物が重要となります。本研究グループは2009年に小型で繁殖力の高い霊長類であるコモンマーモセット(以下、マーモセット)を用いて、世界初のトランスジェニック^{注2)}マーモセットの作製に成功し、ヒト疾患モデル動物の開発・研究を大きく進展させてきました。しかしながら多くのヒト疾患モデルマウスが作製されてきた標的遺伝子ノックアウト技術^{注3)}はマーモセットを含む霊長類には適用できませんでした。一方、近年、開発されたゲノム編集技術により、霊長類を含む様々な動物種で受精卵の遺伝子を直接改変できるようになり、本研究によって霊長類であるマーモセットでもゲノム編集を用いてヒト病態モデルの作成が可能である事を示しました。

今回の研究では、ゲノム編集によりマーモセット受精卵の IL2rg 遺伝子の機能を失活させて先天性免疫不全マーモセットを作成しました。具体的にはマーモセット受精卵内の IL2rg 遺伝子を標的とした人工ヌクレアーゼをコードする mRNA^{注4)}を注入し、正常に発生した胚を仮親マーモセット子宮内に移植し胎仔を得ました。種々の免疫学的解析の結果、産出された胎仔には正常の免疫機能が認められず、狙い通り免疫不全マーモセットになることが証明されました。このようにして得られた免疫不全マーモセットは、高度に衛生が管理されたクリーン飼育室では長期間(1年以上)生存させることが可能であり、ヒトの重症先天性免疫不全症と近似した特徴を示すことが明らかになりました。今後、免疫不全マーモセットはヒト免疫不全症の病態解明ならびに治療法開発モデルとして、また、ヒト iPS 細胞を用いた様々な臓器再生医療における新たな治療法の有効性・安全性の検証にも貢献すると期待されます。さらに、今回開発したゲノム編集を用いたヒト疾患のマーモセットモデル作製技術は自閉症、統合失調症などのヒト精神・神経疾患をはじめとした様々な疾患の発症メカニズム、病態解明に貢献するものと期待されます。

本研究成果は、2016年6月30日(米国東部標準時正午)発行の科学雑誌 Cell Stem Cell 誌に掲載されました。

本成果は、主に以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

日本医療研究開発機構（AMED）脳科学研究戦略推進プログラム（平成 27 年度より文部科学省より移管）

研究課題名：「遺伝子改変マーモ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」

研究代表者：佐々木 えりか（（公財）実験動物中央研究所 マーモセット研究部 部長）

研究期間：平成 26 年 4 月～平成 30 年 3 月

最先端研究開発支援プログラム（FIRST）

研究課題名：「心を生み出す神経基盤の遺伝学的解析の戦略的展開」

研究代表者：岡野 栄之（慶應義塾大学 医学部 生理学教室 教授）

研究期間：平成 22 年 3 月～平成 26 年 3 月

<研究の背景と経緯>

遺伝子改変マウスは、遺伝子機能の解析やさまざまな疾患が発症するメカニズムの解明などライフサイエンス研究分野に多くの貢献をしてきましたが、マウスとヒトは解剖学的、生理学的な相違が多く、マウスで得られた研究成果を直接ヒトに当てはめることができない場合も少なくありません。今回、本研究グループは、よりヒトに近い霊長類を用いた新たな遺伝子改変技術を開発すると共に、疾患モデルの作成に成功しました。既に、同研究グループでは小型霊長類であるマーモセットを用いてトランスジェニック技術により組み込んだ遺伝子が次世代の個体までに遺伝し、機能することを明かにしており、2009 年に Nature 誌に発表いたしました。

今回の研究は、今まで霊長類では成功していなかった特定の遺伝子を破壊して、機能できなくした標的遺伝子ノックアウトモデル動物の作製を試みたものです。具体的には、受精卵の中にある標的遺伝子を直接編集する事が可能なゲノム編集という技術を用いて、霊長類の一種であるマーモセットの標的遺伝子ノックアウトを試みたものです。従来は編集された遺伝子による遺伝子発現の変化が科学的に証明されていなかったためライフサイエンス研究に有用な霊長類モデルの作製が可能であるか不明でした。

今回の研究は、ゲノム編集による免疫不全マーモセットの作製に成功し、霊長類でも個体レベルで遺伝子をノックアウトすることによって動物の生理的性質（表現型）が変化したモデル動物作製が可能であることを世界で初めて明らかにしたものです。

<研究の内容>

本研究グループは、実中研が研究を続けてきたマーモセット発生工学技術を用いて、ゲノム編集技術により IL2rg 遺伝子をゲノム編集により人為的に変異させ、免疫不全マーモセットを作製することに初めて成功しました。

まず、この免疫不全マーモセットを作製するため、標的となるマーモセット IL2rg 遺伝子に特異的に結合して切断する人工ヌクレアーゼ（Zinc Finger Nuclease もしくは TALEN）を作製し、これを体外授精させた前核期の受精卵に注入した後、この胚でゲノム編集が成されているかについて新たな解析法を開発し、十分な検討を行いました（図 1A）。今回、本研究グループが新たに考案した解析法は、作製したゲノム編集の人工ヌクレアーゼが目的の遺伝子のゲノム編集を行い、さらにゲノム編集された遺伝子を持って生まれてくる新

生仔がゲノム編集前と異なる形質を持つかどうかを予測できる解析技術です。この技術の確立によってマウスよりも妊娠期間が長い霊長類で、ゲノム編集に失敗した新生仔を極力減らすことにより、研究を迅速に進めることが可能となりました。

次のステップとなる実際の個体の作製では、先述の評価を終えた人工ヌクレアーゼを導入したマーモセット受精卵を数日間培養し、正常に発生している受精卵のみを仮親の子宮に移植しました（図 1B）。その結果、3頭の免疫不全マーモセットが、生後1年以上を経た現在も高度に衛生管理されたクリーン飼育室内で元気に生育しています（図 2）。このマーモセットは、新生児期には免疫細胞の一種であるT細胞が殆ど欠落していましたが、生後半年を超えるとT細胞の増殖が認められました。この現象は特定のヒトの重症複合型免疫不全症の病態を反映するものであり、今後の治療法開発のモデル動物として注目されます（図 3）。

今回、ゲノム編集により目的遺伝子が編集された霊長類において、生理的性質（表現型）の変化が認められたのは世界で初めてです。この成功は、本研究グループが開発した「ゲノム編集が受精卵の中でどれだけ迅速に正確に起きているか」を判定する技術が開発されたためであり、今後、多くの疾患モデルマーモセットの作製に有用な技術となります。

<今後の展開>

本研究で作製された免疫不全マーモセットモデルは、ヒトの免疫不全症の発症ならびに病態メカニズムの解明と治療法の開発に有用であるだけでなく、iPS細胞（人工多能性幹細胞）を用いた臓器再生医療の治療法開発における有効性・安全性の検証研究にも有用なモデルとして期待されます。

さらに、今回開発された人工ヌクレアーゼの機能評価方法は、今後、多くの標的遺伝子ノックアウトモデルを作製する上で有効な方法であり、この方法の応用によりヒト自閉症や統合失調症など精神・神経疾患モデルをはじめとした様々な疾患のマーモセットモデルの開発が可能となりました。この成果により、マウスでは研究が困難な知覚、記憶、学習、思考、判断といった高次脳機能のメカニズムの解明や、高次脳機能障害の治療法の開発研究を霊長類であるマーモセットをモデルとして用いた新たな研究の発展が期待されます。

【参考図】

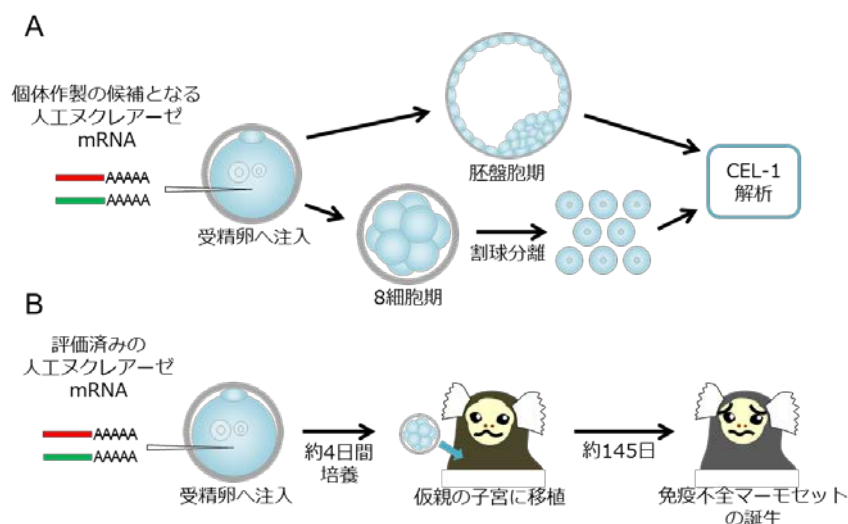


図1 免疫不全モデルマーモセット作製の流れ

(A) 目的とする免疫不全モデル個体の作製が可能かどうかを受精卵レベルで検討するための流れ。この解析を行うことで、遺伝子改変が起こらない（いわゆるハズレ個体）の出現率などが推定できる。CEL-1 解析: わずかな遺伝子の欠損や挿入を検出することができる解析手法 (B) 個体作製の流れ。仮親の子宮に移植された受精卵は約 145 日間胎内で育ち、免疫不全マーモセットとして誕生する。



図2 免疫不全モデルマーモセット

誕生した3匹のマーモセットは、現在もクリーン環境下で順調に成育している。

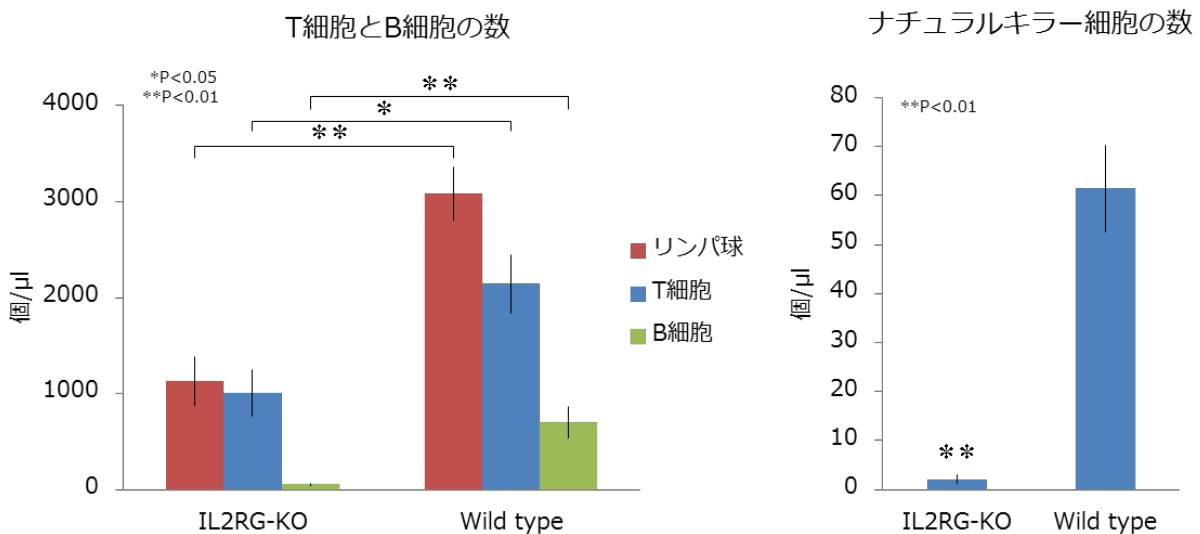


図3 血液解析の結果

3匹の免疫不全マーモセットの末梢血を対象とした解析の結果、免疫不全マーモセット (IL2RG-KO)では野生型(Wild type)に比べて、免疫関連細胞の数が著しく減少していることが解った。

<用語解説>

注1) ゲノム編集: 人工的に合成された遺伝子を用いて生物内の任意の遺伝子を改変する技術の総称。

注2) トランスジェニック: 特定の外来遺伝子が人工的に細胞に導入され個体となった生物を指す。ただし、外来遺伝子が導入される部位はランダムである。

注3) 標的遺伝子ノックアウト技術：生物の細胞や受精卵が生来持っている特定の遺伝子を破壊することで機能しないようにすること。

注4) mRNA：元となる遺伝子からタンパク質合成の遺伝情報を写し取り、合成部位まで伝達することを担う1本鎖ヌクレオチド（塩基＋糖＋リン酸）。

<論文名>

Generation of a Non-human primate model of severe combined immunodeficiency using highly efficient genome editing

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

(公財) 実験動物中央研究所 マーモセット研究部 部長
佐々木 えりか (ササキ エリカ)
Tel : 044-201-8545 Fax : 044-201-8541
E-mail : esasaki@ciea.or.jp

慶應義塾大学 医学部 生理学教室 教授
岡野 栄之 (オカノ ヒデユキ)
Tel : 03-5363-3746 Fax : 03-3357-5445
E-mail : hidokano@a2.keio.jp

<報道担当>

(公財) 実験動物中央研究所 広報担当
阪田 洋子
Tel : 044-201-8510 Fax : 044-201-8511
E-mail : ciea-office@ciea.or.jp

慶應義塾大学
信濃町キャンパス総務課 谷口・吉岡
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
Tel : 03-5363-3611 Fax : 03-5363-3612
E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp

<AMED 事業に関すること>

日本医療研究開発機構 戦略推進部 脳と心の研究課
Tel : 03-6870-2222 Fax : 03-6870-2244
E-mail : brain@amed.ac.jp