

課題番号 : 26指105
研究課題名 : 糖尿病マーモセットを用いた前臨床試験システムの構築
主任研究者名 : 岡村 匡史 国立国際医療研究センター研究所 室長
分担研究者名 : 佐々木えりか 実験動物中央研究所 センター長

キーワード : 糖尿病モデル、マーモセット、ゲノム編集、前臨床試験

研究成果 :

前臨床試験において齧歯類のデータだけでは不十分であり、特に、再生膝ペータ細胞あるいは異種移植豚島などの安全性・有効性を評価するためには、齧歯類以外の糖尿病モデルが必要不可欠である。コモンマーモセット（以下、マーモセット）は、ブラジル北東部原産の体長 25~35cm、体重 200~500g（ラットとほぼ同じ大きさ）の小型のサルで、霊長類として遺伝子導入技術が確立している実験動物として、マーモセットの利用価値は高い。

本研究の目的は、新しいゲノム編集技術を用いてマーモセットのゲノムを高効率に編集し、単一優性遺伝で若齢から糖尿病を発症する新たな糖尿病モデルを開発し、糖尿病マーモセットモデルを用いて、本センターの糖尿病研究における前臨床研究システムを構築する。

1. マウスにおける糖尿病遺伝子変異導入の検証(岡村 匡史)

マーモセットの妊娠期間は約 5 ヶ月であり、研究期間内に変異導入個体を得るためには、ゲノム編集コンストラクトの検証が非常に重要である。平成 26 年度に、Platinum TALEN ゲノム編集技術を用いてマウス糖尿病関連遺伝子に変異を導入した系統を解析し、糖尿病を発症する変異の同定を試みた。糖尿病関連遺伝子にそれぞれ異なる変異が導入された 4 系統を解析した結果、すべての系統で若齢から高血糖を呈していた。糖尿病関連遺伝子に変異が導入された個体は、若齢から常染色体単一優性遺伝様式で高血糖を呈し、これらの高血糖マウスに、ヒトインスリンを腹腔内投与した結果、速やかに血糖値が下降した。

以上の結果から、マーモセットの糖尿病関連遺伝子に同様の変異を導入することで、マーモセットにおいても、若齢から常染色体単一優性遺伝様式で高血糖を呈し、外来性遺伝子に反応して、速やかに血糖値が低下するモデルが作製できることが示唆された。

2. ゲノム編集ツールによるマーモセット糖尿病関連遺伝子への変異導入(佐々木 えりか)

マウスとは異なり、生まれた個体に変異が導入されていなくても、生命倫理上簡単に安楽死することはできない。そのため、今年度は標的としているマーモセット糖尿病関連遺伝子に対するゲノム編集ツールの切断活性評価をマーモセット受精卵で行った。

マーモセット糖尿病関連遺伝子を標的とした Platinum TALEN の mRNA をマーモセット受精卵の細胞質に注入し、後期胚に発生するまで培養した。得られた胚を直接 PCR 反応液に入れ PCR を行い、SURVEYOR assay により変異遺伝子検出試験を行った結果、6 個の胚で PCR が成功し、変異導入効率は約 33.3%であった。

以上の結果から、マーモセット糖尿病関連遺伝子は Platinum TALENs によって改変できること、さらに改変された後期胚が得られたことから遺伝子改変個体を作出可能であることが示唆された。

課題番号 : 26指105
研究課題名 : マウスにおける糖尿病遺伝子変異導入の検証
主任研究者名 : 岡村 匡史
分担研究者名 : 岡村 匡史
キーワード : ゲノム編集、糖尿病、マウス

研究成果 :

マーモセットのような霊長類の遺伝子改変を行う場合、生命倫理および動物福祉に十分配慮する必要がある。マウスとは異なり、生まれた個体に変異が導入されていなくても、生命倫理上簡単に安楽死することはできない。また、マーモセットの妊娠期間は約5ヶ月であり、研究期間内に変異導入個体を得るためには、ゲノム編集コンストラクトの検証が非常に重要である。平成26年度に、Platinum TALEN ゲノム編集技術を用いて、マウス糖尿病関連遺伝子に変異を導入し、糖尿病を発症する変異の同定を試みた。その結果、34匹の変異導入マウスがえられ、平成27年度はこれらの中から、それぞれ異なる変異を有するファウンダーマウスから4系統樹立し、その表現型を解析した。

糖尿病関連遺伝子に変異が導入された系統は、変異1；アミノ産置換を伴う一塩基置換、変異2；3塩基欠損（1アミノ酸欠損）、変異3；変異2とは異なる3塩基欠損（1アミノ酸欠損）、および変異4；6塩基欠損（2アミノ酸欠損）であり、それぞれの系統の4週齢雄の随時血糖値は、それぞれ $384.4\text{mg/dl} \pm 20.6$ 、 $475.4\text{mg/dl} \pm 21.6$ 、 $470\text{mg/dl} \pm 11$ および $499.7\text{mg/dl} \pm 46.6$ であった。それぞれの系統の4週齢雌の随時血糖値は $197.3\text{mg/dl} \pm 37.5$ 、 $412.4\text{mg/dl} \pm 8.6$ 、 $420\text{mg/dl} \pm 2$ および $433.5\text{mg/dl} \pm 46.5$ であり、野生型の雄 $177.2\text{mg/dl} \pm 5.9$ および雌 $139.2\text{mg/dl} \pm 5.3$ に比べ、高血糖を呈していた。糖尿病関連遺伝子に変異が導入された個体は、若齢から常染色体単一優性遺伝様式で高血糖を呈し、特に、変異2、3および4に導入された変異は、雌雄共に顕著な高血糖を引き起こすことが明らかとなった。これの高血糖マウスに、ヒトインスリン（0.75IU/Kg）を腹腔内投与した結果、速やかに血糖値が下降した。

以上の結果から、マーモセットの糖尿病関連遺伝子に同様の変異を導入することで、マーモセットにおいても、若齢から常染色体単一優性遺伝様式で高血糖を呈し、外来性遺伝子に反応して、速やかに血糖値が低下するモデルが作製できることが示唆された。

課題番号 : 26指105
研究課題名 : ゲノム編集ツールによるマーモセット糖尿病関連遺伝子への変異導入
主任研究者名 : 岡村 匡史
分担研究者名 : 佐々木 えりか
キーワード : 糖尿病、マーモセット、ゲノム編集

研究成果 :

小型霊長類コモンマーモセット（マーモセット）を用いたゲノム編集技術による標的遺伝子ノックアウト個体の作製を目標とし、平成 26 年度までに、ゲノム編集ツールの効率、および、個体を作出した際の遺伝子改変の胚内モザイク率を、マーモセット受精卵で検討する技術確立した。その技術を用いて平成 27 年度は、標的としているマーモセット糖尿病関連遺伝子に対するゲノム編集ツールの切断活性評価をマーモセット受精卵で行った。ゲノム編集ツールは、DNA 結合タンパク質を利用した人工ヌクレアーゼの一つである transcription activator-like effector nuclease(TALEN)を更に高活性型に改良した Platinum TALENs を使用した。

マーモセット糖尿病関連遺伝子を標的とした Platinum TALEN の mRNA を合成し、終濃度 4 ng/μl となるよう調整した混合液をマーモセット受精卵 8 個の細胞質に注入した。注入後はヒト用初期胚培地 Sequential Cleav (Origio, 83040010A) 中で 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 37°C 条件下で約 4 日間、その後ヒト用後期胚培地 Sequential Blast (Origio, 83060010A) に移して後期胚に発生するまでさらに 5 日間培養した。得られた胚を直接 PCR 反応液に入れ PCR を行い、PCR 増幅産物 10μl を SURVEYOR mutation detection kit (Transgenomic, 706025) による CEL-1 酵素をもちいた変異遺伝子検出試験に供した。Platinum TALENs 注入胚 8 個の注入後 8 日目 (IVF 後 9 日目) における発生率は 1 細胞期胚が 4 個 (50%)、2 細胞期～4 細胞期胚が 2 個 (25%)、8 細胞期～胚盤胞期胚が 2 個 (25%) であった。発生胚をそれぞれ PCR 反応液に移し、PCR 反応および変異遺伝子検出試験を行った結果、6 個の胚で PCR が成功し、そのうち 3 細胞期胚および 4 細胞期胚において標的遺伝子の改変が認められたことから、改変効率は約 33.3% であった。これら PCR 産物をサブクローニングし、シーケンス解析を行った結果、標的遺伝子において 3 細胞期胚では 2bp の挿入、4 細胞期胚では 3bp の欠損が認められたが、いずれの胚も野生型配列も検出されたため、ヘテロ改変もしくはモザイク様の改変が起こっていたと考えられた。

以上の結果から、マーモセット糖尿病関連遺伝子は Platinum TALENs によって改変できること、さらに改変された後期胚が得られたことから遺伝子改変個体を作出可能であることが示唆された。

Subject No. : 26 指 105

Title : Establishment of diabetic marmoset model for preclinical research

Researchers : Tadashi Okamura, Erika Sasaki

Key word : Diabetic model, Marmoset, Preclinical research, Genome editing

Abstract :

In biomedical researches, laboratory animals bridge the gap between *in vitro* studies and clinical medicine. Although the most popular laboratory animal is rodents, rodent models are insufficient as diabetic models for preclinical research to evaluate the efficacy and safety of autologous and xeno-islet cell transplantations. Non-human primates (NHPs) also play important roles in preclinical research in the biomedical sciences. The aim of our project is to establish diabetic marmoset model to introduce the mutation for diabetes-associated gene by genome-editing technique using Platinum TALEN.

1. Validation of diabetes-associated gene mutation in mice (Tadashi Okamura)

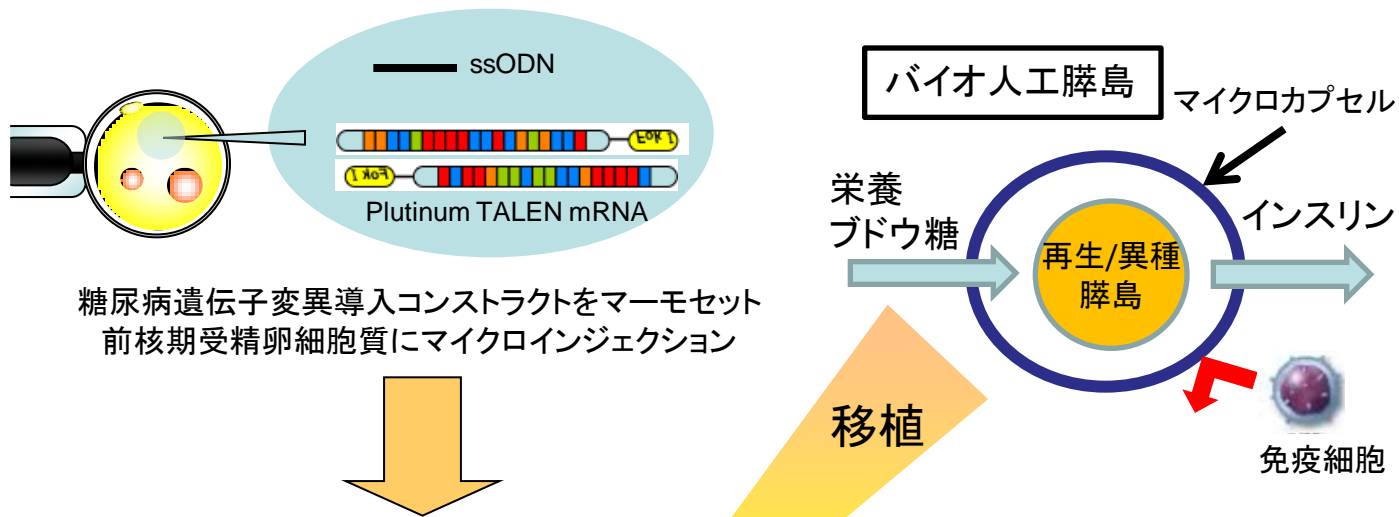
Given that the ethical concerns regarding use of NHPs, it is important to validate the modified gene using other laboratory animals. Because NHPs must be maintained by non-sibling mating, dominant mutation of the modified gene would be suitable to generate NHPs genetically modified diabetic models to express phenotype. To introduce mutation in diabetes-associated gene, *in vitro* synthesized Platinum TALEN mRNAs for diabetes-associated gene and ssODN, were co-injected into the cytoplasm of pronuclear stage mouse embryos. We have established four independent lines, which carried independent diabetes mutations. Blood glucose levels of mice carrying heterozygous mutation for diabetes gene were markedly higher than those of control mice at 4 weeks of age. Insulin tolerance test revealed that diabetic mice have a normal glycaemic response to exogenous human insulin. These results indicated that the mutations in diabetes-associated gene caused hyperglycemia in mice, and suggested that the same mutations could also cause hyperglycemia in marmoset.

2. Validation of Platinum TALEN for diabetes-associated gene in marmoset embryo (Erika Sasaki)

To establish the genome editing technologies in common marmoset (marmoset), new estimation methods for the efficiency of gene modification and mosaicism have been developed last year in our group. In this year, we carried out the validation of marmoset diabetes-associated gene modification by Platinum TALENs in marmoset embryos. *In vitro* synthesized mRNA solution of the final concentration 4 ng/μl each was injected into the cytoplasm of pronuclear stage embryos. The mRNA-injected embryos were cultured up to the 8-cell stage in Sequential Cleav medium (Origio, 83040010A) under 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ at 37°C. Then 8-cell stage embryos were transferred to Sequential Blast medium (Origio, 83060010A), and cultured until morula to blastocyst stage. Then each cultured embryos were performed PCR and CEL-1 assays were carried out by SURVEYOR mutation detection kit (Transgenomic, 706025).

As the results, the CEL-1 assays showed that the genetic modification rate estimated from the number of mutant embryos was 33.3% (2/6 PCR samples). Furthermore, sequence analysis revealed that Platinum TALENs-injected embryos contained two types of mutant diabetes-associated gene; however, these were not biallelic mutations. These results suggested that marmoset diabetes-associated gene was able to be modified using Platinum TALENs, and this finding will facilitate the efficient production of diabetes-associated gene knock-out marmosets.

再生医療研究領域での前臨床試験に非齧歯類の動物モデルでの評価は必須である



糖尿病遺伝子変異導入コンストラクトをマーモセット前核期受精卵細胞質にマイクロインジェクション

移植

コモンマーモセット



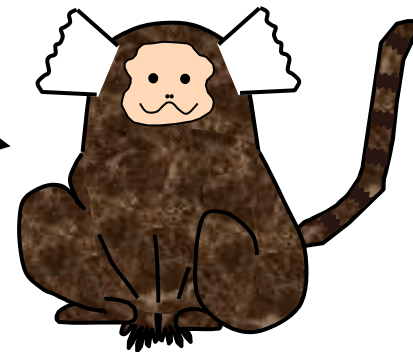
Sasaki, E. et al, 2009

1型糖尿病 マーモセットモデル



糖尿病遺伝子変異を導入することにより、**若齢から高血糖**を呈する。

QOLの改善

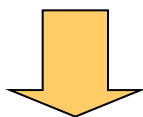
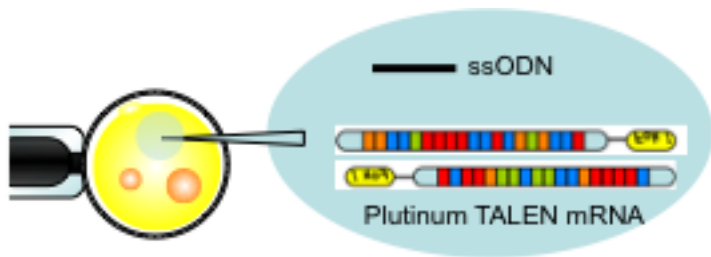


膵島移植の適応症例
 ・劇症型1型糖尿病
 ・1型糖尿病
 ・慢性膵炎

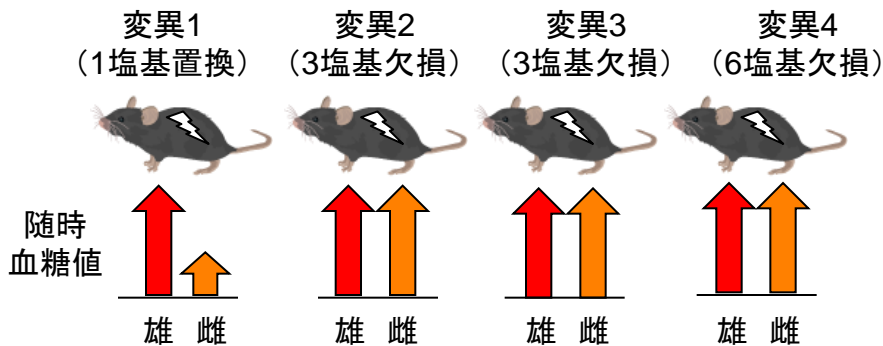
- ・遺伝子導入技術が確立している霊長類
- ・代謝経路、薬物感受性がヒトに近い
- ・ラットとほぼ同じ大きさであるため、薬剤の投与量や移植細胞数が少なくてすむ。
- ・STZによる糖尿病誘発に抵抗性。

H27年度の成果 1. マウスにおける糖尿病遺伝子変異導入の検証

Platinum TALENを用いて、糖尿病遺伝子に変異を導入

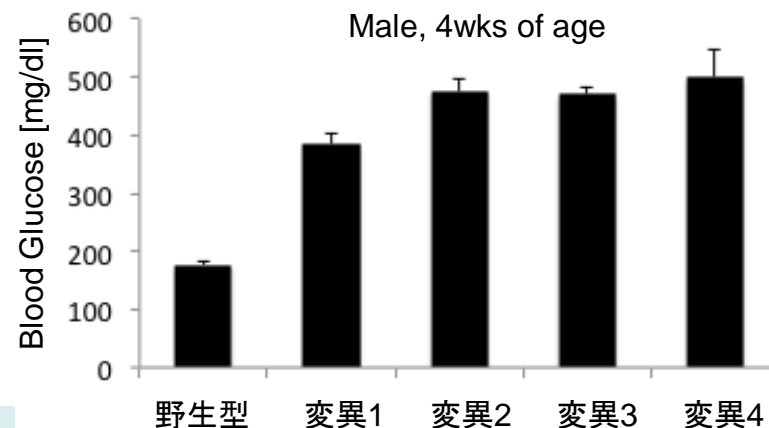
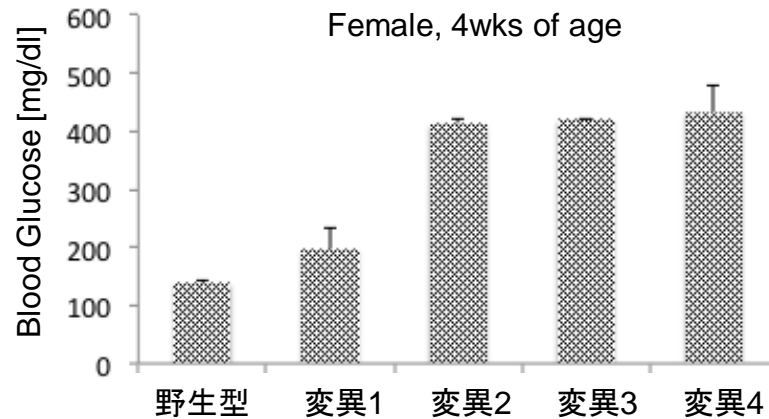


糖尿病関連遺伝子に別々の変異を導入した4系統を樹立



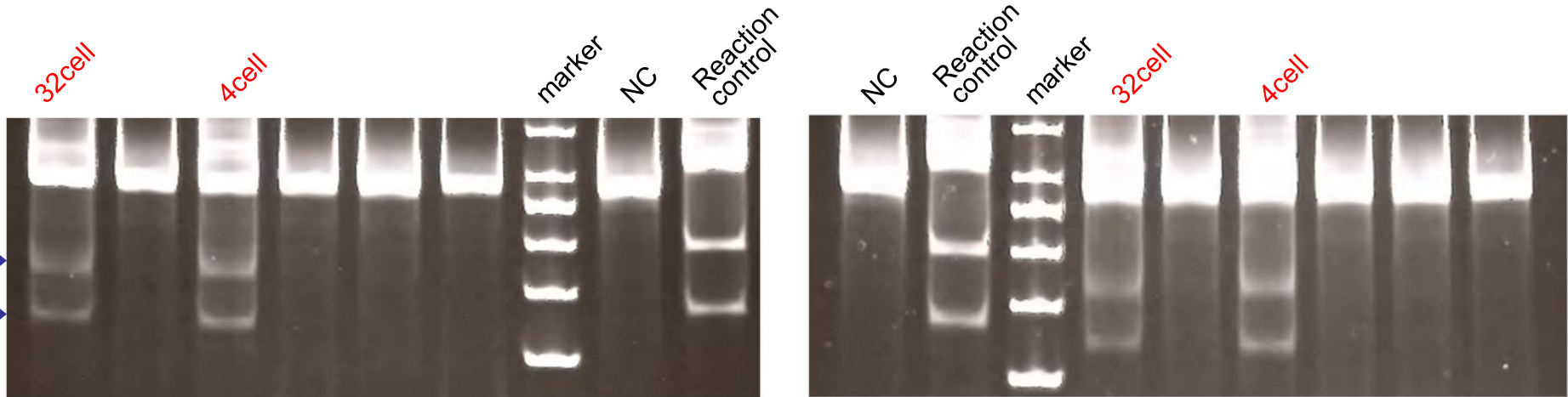
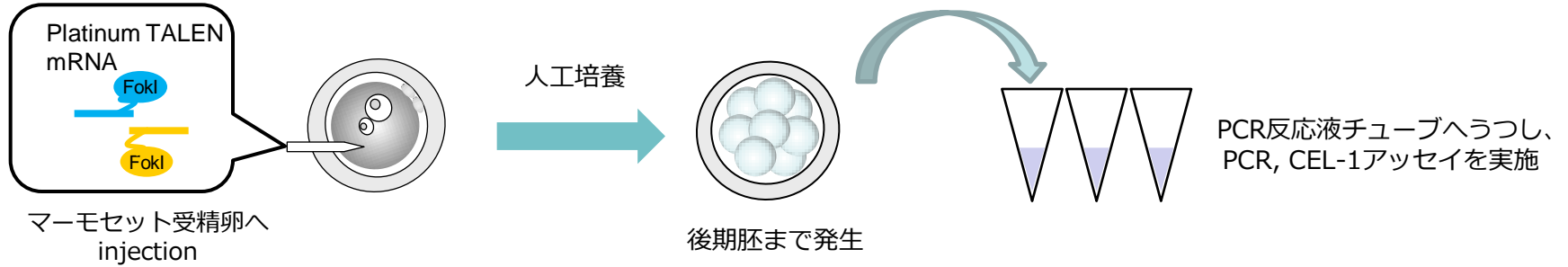
糖尿病関連遺伝子に、変異を導入することで雌雄共に若齢から高血糖を呈する。

糖尿病遺伝子変異導入マウスの随時血糖値



糖尿病関連遺伝子に変異を導入することで、マーマセツでも同様に若齢から高血糖を呈することが予想される

H27年度の成果 2. ゲノム編集ツールによるマーモセット糖尿病関連遺伝子への変異導入



Original PCR product samples

+Wild-type PCR product samples

Platinum TALEN mRNA conc. (F/R [ng/ul])	Injection site	No. of injected embryos	Development at Day9 (%)				PCR(+) Sample	No. of Indel	Indel (%)
			dead	1cell	2-4cell	8cell - Blast			
4 / 4	cyto	8	0 (0)	4 (50)	2 (25)	2 (25)	6	2	33.3

33.3%の胚で改変が確認されたが、ヘテロもしくはモザイク様の改変であったことが示唆された

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指105

研究課題名：糖尿病マーマーモセットを用いた前臨床試験システムの構築

主任研究者名：岡村 匡史

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Functional validation of tensin2 SH2-PTB domain by CRISPR/Cas9-mediated genome editing.	Marusugi K1, Nakano K, Sasaki H, Kimura J, Yanobu-Takanashi R, Okamura T, Sasaki N.	J Vet Med Sci.		in press

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
ゲノム編集技術を用いた効率的遺伝子改変マウスの作製	岡村 匡史	本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 (スポンサードシンポジウム2)	大宮	2016年3月
CRISPR/Casシステムを用いた遺伝子改変マウスの作製とその応用	岡村匡史、高梨理絵子、中野堅太、清水有紀子、新田剛	第158回日本獣医学会学術集会	十和田	2015年9月
新規エレクトロポレーション法を用いた遺伝子改変マウス作製効率の検討	中野堅太、高梨理絵子、清水有紀子、金子武人、岡村匡史	第158回日本獣医学会学術集会	十和田	2015年9月
電気穿孔法を用いた効率的マウスゲノム編集法	中野堅太、高梨理絵子、清水有紀子、金子武人、岡村匡史	第62回日本実験動物学会総会	京都	2015年5月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当無し				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。