

課題番号 : 26指105
研究課題名 : 糖尿病マーマ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、マーマセット、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、再生膵β細胞あるいは異種移植膵島などの安全性・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。コモンマーマセット（以下、マーマセット）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、マーマ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マ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、糖尿病マーマ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)

マーマ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。まず、マウスを用いて、ヘテロ接合体で糖尿病を発症する糖尿病遺伝子に変異導入を試みた。変異導入部位を切断する Platinum TALEN mRNA を合成し遺伝子変異を導入する ssODN と共に、マウス受精卵前核に注入した結果、76 匹の産仔中 34 匹 (44.7%) 変異が導入され、そのうちの 6 匹 (17.6%) に糖尿病遺伝子変異が導入されていた。糖尿病遺伝子変異導入個体のヘテロ接合体は、4 週齢から 350-500mg/dl の高血糖を呈し、ヒトインスリンを投与した結果、速やかに血糖値が下降した。さらに興味深いことに、特定の変異を導入することで、随時血糖値が 200-250mg/dl の軽症糖尿病モデルを作製する事ができた。

2. マーマセット受精卵を用いたモザイク率推定法の開発 (佐々木えりか)

霊長類であるマーマセットは、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、マーマセットの受精卵におけるゲノム編集の効率および作出した際の改変遺伝子のモザイク率を検討する技術を確認した。このことにより、マーマセット受精卵において、変異導入効率が高いコンストラクトの選別が可能となり、より効率的に糖尿病マーマセットを作製する事ができる。マーマセット受精卵の細胞質に Zinc Finger Nuclease mRNA を注入し、8 細胞期まで培養した。透明帯を除去し、単一割球に分離後、CEL-1 アッセイにより各割球に導入された変異を検証した。シークエンスにより、変異を同定したところ、オスの場合には 2 細胞期、メスの場合は 1 細胞期にゲノム改変が起きていることが推定され、人工ヌクレアーゼ注入後、非常に早い時期にゲノム改変が起きてい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。

まず、CRISPR/Cas システムを用いて、ヘテロ接合体で糖尿病を発症する糖尿病遺伝子に変異導入を試みた。変異導入部位周辺には PAM 配列 (NGG) が 1 カ所しか存在しなかったため、その部位を認識する sgRNA を合成した。さらに、相同組換えにより遺伝子変異を導入する 81mer の ssODN を合成し、sgRNA および Cas9 mRNA と共に 461 個のマウス受精卵前核に注入した。その結果、57 匹の産仔が生まれそのうち 1 匹に 12 塩基の欠失変異が挿入されたが、遺伝子変異導入個体は得られなかった。これまでに、21 遺伝子について CRISPR/Cas システムでマウスのゲノム編集を行っているが、平均変異導入効率は $48 \pm 7.4\%$ であり、産仔の約 50% に変異が導入されている。本研究の変異導入効率は 1.8% (1/57 匹) であるため、他の遺伝子に比べ著しく低い。さらに、遺伝子変異導入部位周辺には PAM 配列 (NGG) が 1 カ所しか存在しないため、他の部位に sgRNA を設計することはできない。そのため、認識配列の自由度が高く、CRISPR/Cas システムと同等の高い変異導入効率を示す Platinum TALEN を用いて、糖尿病遺伝子変異導入を試みた。変異導入部位を切断する Platinum TALEN mRNA を合成し遺伝子変異を導入する ssODN と共に、マウス受精卵前核に注入した結果、76 匹の産仔中 34 匹 (44.7%) 変異が導入され、そのうちの 6 匹 (17.6%) に目的の糖尿病遺伝子変異が導入されていた。細胞質に Platinum TALEN mRNA を注入する場合、濃度依存的に産仔率が低下し、4ng/ul が最も効率的に遺伝子変異導入個体を得られることがわかった。

糖尿病遺伝子変異導入個体は、ヘテロ接合体で 4 週齢から 350-500mg/dl の高血糖を呈し、ヒトインスリンを投与した結果、速やかに血糖値が下降した。さらに興味深いことに、特定の変異を導入することで、随時血糖値が 200-250mg/dl の軽症糖尿病モデルを作製する事ができた。

以上の結果から、マーモセットにおいても導入する遺伝子変異をコントロールすることで重症および軽症糖尿病モデルが作製できる可能性が示された。

課題番号 : 26指105
研究課題名 : ゲノム編集技術を用いた糖尿病モデルマーマーモセットの作製
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、マーマーモセット、ゲノム編集

研究成果 :

現在までに報告されているマカクザルのゲノム編集による標的遺伝子ノックアウトでは、ノックアウト遺伝子の表現型が出ていないが、その理由として改変遺伝子がモザイクになっていることが考えられている。そこで、小型霊長類コモンマーマーモセット（マーマーモセット）の受精卵におけるゲノム編集の効率および作出した際の改変遺伝子のモザイク率を検討する技術確立した。マーマーモセット受精卵の細胞質に Hi-Fi Zinc Finger Nuclease もしくは eHi-Fi Zinc Finger Nuclease の mRNA を各ペアあたり 8 ng/μl を注入し、ISM-1 培地を用いて 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 37°C の条件下で約 4 日間、8 細胞期に発生するまで培養を行った。8 細胞期まで発生した受精卵は、透明帯を除去し、ピペッティングにより単一割球に分離した。各割球は、直接 PCR 反応液に入れ PCR を行った。次いで、この PCR 反応物 10μl を Surveyor mutation detection kit (Transgenomic, 706025) による CEL-1 アッセイに供した。その結果、Hi-Fi ZFN の場合、8 割球中 3 割球にゲノム改変が、eHi-Fi ZFN の場合には 8 割球全てにおいて同様の改変が認められた。また、PCR 産物のサブクローニングを行い、シーケンス解析を行った結果、eHi-Fi ZFN の場合、解析した 32 にクローン全てのサブクローンにおいて、2bp の挿入もしくは 50bp の欠失のいずれかの配列しか認められなかった。この結果から、この胚がオスの場合には 2 細胞期、メスの場合は 1 細胞期にゲノム改変が起きていることが推定され、人工ヌクレアーゼ注入後、非常に早い時期にゲノム改変が起きていることが示唆された。本方法により、ゲノム編集技術による標的遺伝子ノックアウト動物作製時のモザイク率の推定が可能な技術が確立された。

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, Gene-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 common marmoset is a small New World primate that is native to the Atlantic coastal forests in northeastern Brazil in South America. Adult marmosets have an average height of 25-35cm, and weight 200-500g. Marmosets take 15months to mature sexually, carry babies for 5months and often give birth to 2-3 young. The aim of our project is to establish diabetic marmoset model to introduce gene mutation for diabetes gene by genome-editing technique using CRISPR/Cas system or TALEN. Because NHPs must be maintained by non-sibling mating, dominant-negative mutation of the modified gene would be suitable to generate NHPs genetically modified diabetic models to express phenotype.

1. Validation of diabetes 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. Platinum TALEN mRNAs for diabetes gene and ssODN which introduce diabetes mutation were co-injected into the male pronucleus of single cell mouse embryo. We found that 44.4%(34/76) of the pups carried the mutations and 6 of them (17.6%) carried diabetes mutation. Blood glucose levels of diabetic mice carrying heterozygous mutation for diabetes gene were markedly higher than those of control mice, even at 4weeks of age. Insulin tolerance test revealed that diabetic mice have a normal glycaemic response to exogenous human insulin.

2. Method for estimation of mosaicism in the genome edited marmoset embryos (Erika Sasaki)

The genome editing technologies enable to produce target gene knock out (KO) non-human primates (NHP). Recently, generations of target gene KO NHP have been reported. However, most likely due to the high mosaicism of mutant genes in NHPs, mutant animal phenotypes have not yet been observed. In this study, we have developed methods for estimation of mosaicism before start target gene KO animal production. *In vitro* synthesized ZFN mRNA was injected into the cytoplasm of pronuclear stage embryos and were cultured up to the 8-cell stage. Then, 8-cell stage embryos were split in to each blastomere to be analyzed. After PCR, CEL-1 assays were performed by Surveyor mutation detection kit (Transgenomic, 706025). As the results of the CEL-1 assays showed that the genetic modification rate estimated from the number of mutant blastomeres was 37.5% (3/8) for HiFi-ZFN and 100% (8/8) for eHiFi-ZFN. Furthermore, sequence analysis revealed that eHiFi-injected embryos contained only two types of mutant genes. These results suggest that genome modification in eHiFi-ZFN-derived embryos occurred at the one-cell stage for female embryos and at the two-cell stage for male embryos. Using this method, we were able to estimate the mosaicism of the target gene KO marmoset before proceed animal production.

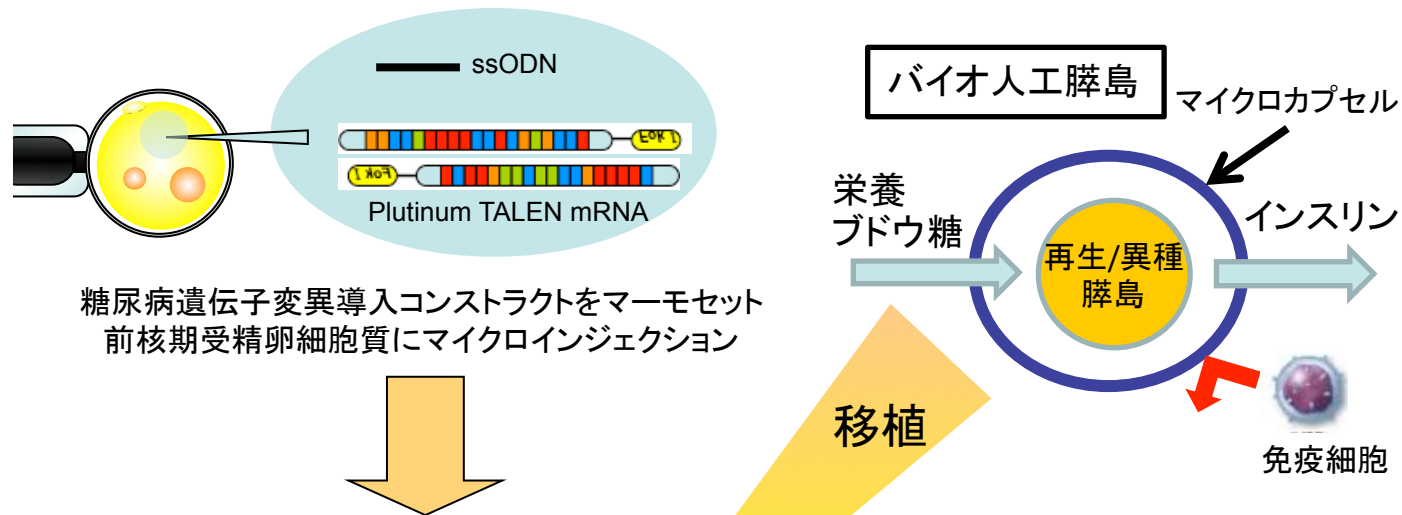
再生医療研究領域での前臨床試験に非齧歯類の動物モデルでの評価は必須である

コモンマーモセット

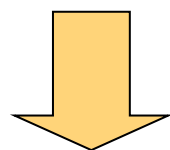


Sasaki, E. et al, 2009

- ・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。



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



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。

移植

QOLの改善

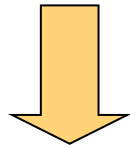


- 膵島移植の適応症例
- ・劇症型1型糖尿病
 - ・1型糖尿病
 - ・慢性膵炎

H26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

表1 CRISPR/Casシステムを用いた糖尿病遺伝子変異導入効率

Construct	Mutants/Total Mice Tested(%)	SNP-KI (%)
SNP	1/57 (1.8)	0/1 (0)



変異導入効率が著しく低いため
Platinum TALENに変更

表2 Platinum TALENを用いた糖尿病遺伝子変異導入効率

Construct	Mutants/Total Mice Tested(%)	SNP-KI (%)
SNP	34/76 (44.7)	6/34 (17.6)

6匹に目的の糖尿病遺伝子変異が導入された

系統化

糖尿病遺伝子変異導入マウスのヘテロ接合体は、若齢から高血糖を呈し、ヒトインスリンを投与すると速やかに血糖値が下降する

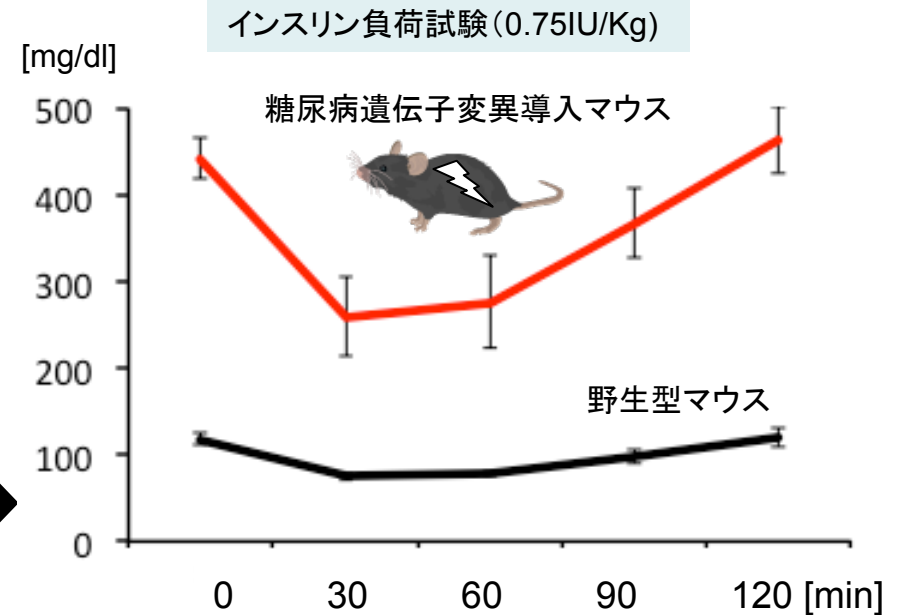


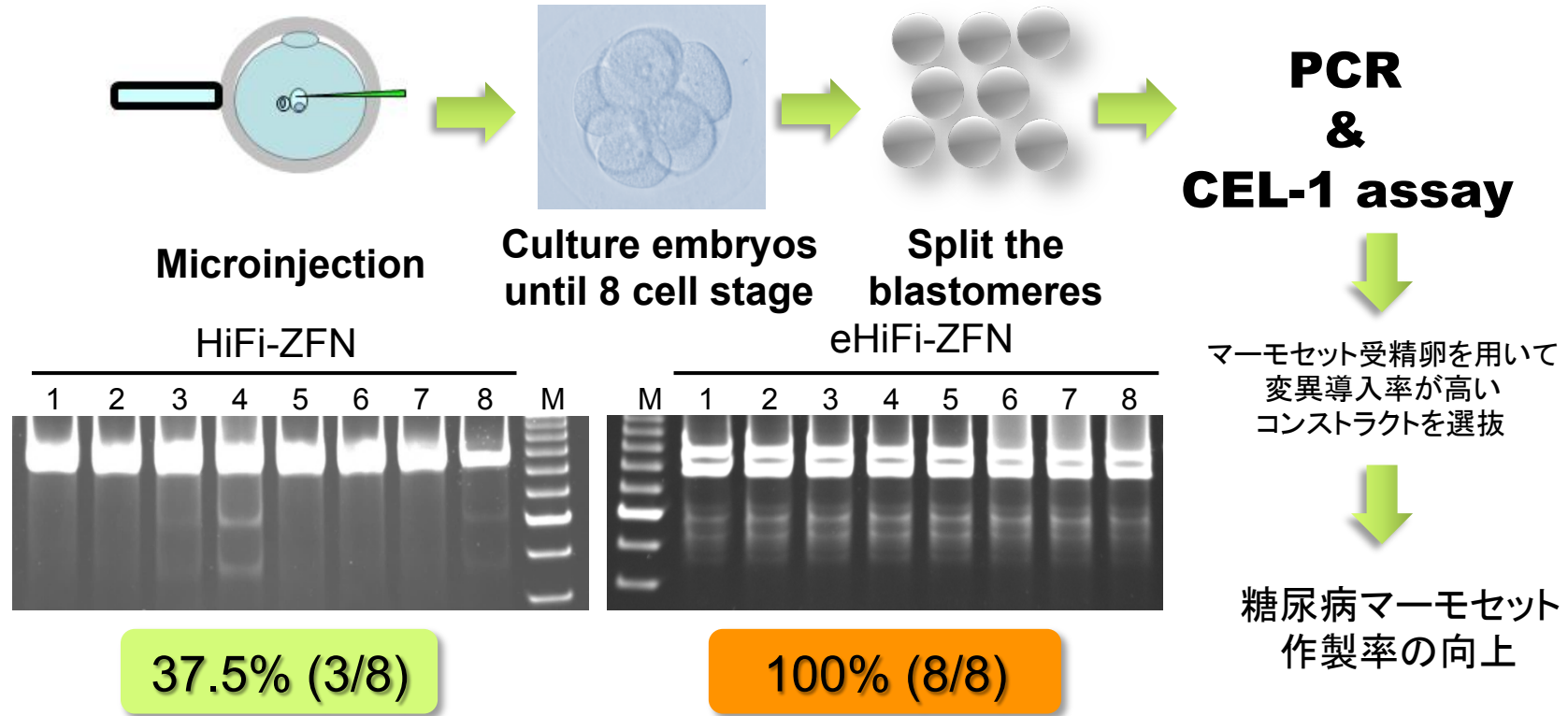
表3 Platinum TALEN-mediated gene targeting in BDF1 mice.

Dose of TALEN mRNA (ng/ul)	Dose of ssODN (ng/ul)	Injection site	No. of injected embryos	Two-cell embryos	No. of Newborns(%)	Mutants(%)
50	100	Cyto	74	7 (9.4%)	0 (0%)	
25	50	Cyto	80	23 (28.8%)	0 (0%)	
10	100	Cyto	63	15 (23.8%)	1 (6.7%)	0 (0%)
4	100	Cyto	100	49 (49%)	5 (10.2%)	3 (60.0%)
1	100	Cyto	63	27 (42.8%)	8 (29.6%)	1 (12.5%)

Platinum TALEN mRNAを受精卵の細胞質に導入する場合は、4ng/ulが最も効率的に遺伝子変異導入個体が得られた

H26年度の成果 2. 割球毎の遺伝子変異を同定する方法を開発

Method for estimation of mosaicism in the genome edited marmoset embryos



Wild Type	ACTTGGTGCAGT <u>ACCGGACTGACTGGGACCACACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATGTGA</u>	
HiFi Bm3	ACTTGGTGCAGT <u>ACCGGACTGACTGG-ACGGACTG</u> ACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATG	-1bp, +4bp: 1/9
	ACTTGGTGCAGT <u>ACCGGACTGACT</u> -----GTGAGTGACTAGGATGTGA	-17bp: 2/9
HiFi Bm4	ACTTGGTGCAGT <u>ACCGGACTGACTGG-ACGGACTG</u> ACCTGCAGTGTGAGTGACTAGGATG	-1bp, +4bp: 1/9
HiFi Bm8	ACTTGGTGCAGT <u>ACCGGACTGACTGG-ACGGACTG</u> ACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATG	-1bp, +4bp: 1/9
eHiFi Bm1-8	ACTTGGTGCAGT <u>ACCGGACTGACTGGGAT</u> ACCACACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATGT	+2bp: 15/32
	-----GAGTGACTAGGATGTGA	-50bp: 17/32

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： 糖尿病マウ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
The thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing cdT cells.	Nitta, T., Muro, R., Shimizu, Y., Nitta, S., Oda, H., Ohte, Y., Goto, M., Yanobu-Takanashi, R., Narita, T., Takayanagi, H., Yasuda, H., Okamura, T., Murata, S. and Suzuki, H.	EMBO reports	16	2015
The histidine transporter SLC15A4 coordinates mTOR-dependent inflammatory responses and pathogenic antibody production.	Kobayashi T, Shimabukuro-Demoto S, Yoshida-Sugitani R, Furuyama-Tanaka K, Karyu H, Sugiura Y, Shimizu Y, Hosaka T, Goto M, Kato N, Okamura T, Suematsu M, Yokoyama S, Toyama-Sorimachi N.	Immunity	41	2014
Marmoset Neuroscience.	Tokuno H, Watson C, Roberts A, Sasaki E, Okano H.	Neurosci Res.	93	2015
Prospects for genetically modified non-human primate models, including the common marmoset.	Sasaki E.	Neurosci Res	93	2015
Birth of healthy offspring following ICSI in in vitro-matured common marmoset (Callithrix jacchus) oocytes.	Takahashi T, Hanazawa K, Inoue T, Sato K, Sedohara A, Okahara J, Suemizu H, Yagihashi C, Yamamoto M, Eto T, Konno Y, Okano H, Suematsu M, Sasaki E.	PLoS One	9(4)	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
CRISPR/Casシステムによるドミナントネガティブ型遺伝子変異の同定	高梨(矢延)理絵子、新井哲也、後藤元人、新田剛、中野堅太、清水有紀子、岡村匡史	第4回ゲノム編集研究会	広島	2014年10月
CRISPR/Casシステムを利用したナイーブT細胞減少(TN)マウスの原因遺伝子の同定	岡村匡史、高梨理絵子、後藤元人、清水有紀子、鈴木春巳、新田剛	第61回日本実験動物科学技術2014	札幌	2014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
該当なし				

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)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※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。