

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  
分担研究者名 : 佐々木えりか  
キーワード : ゲノム編集、糖尿病、マウス  
研究成果 :

マウスを中心とした齧歯類は、その適度な大きさと遺伝子改変が比較的容易であるため、ヒト疾患モデルとして広く使われている。しかし、ヒトと齧歯類では、脳神経機能、代謝経路および薬物感受性など遺伝的・生理的な差異は大きく、マウスとヒトを埋めるモデル動物が期待される。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、過去には、マウスではみられなかったサリドマイドの催奇形性がみられるなどで注目された非ヒト霊長類の実験動物である。遺伝的・微生物学的に統御された動物が市販されており、近年は、解剖学および機能的なヒトとの類似性から、脳科学研究および脳神経変性疾患モデルとして広く利用されている。本研究の目的は、新しいゲノム編集技術である **Platinum TALENs** および **CRISPR/Cas** システムを用いてマーモセットのゲノムを編集し、先天的に糖尿病を発症する新たな糖尿病モデルを開発することである。マーモセットを含む新世界ザルは、カニクイザル、アカゲザルなどの旧世界ザルと異なり、ヒトと同様、膵β細胞でのグルコーストランスポーター2 (**Glut2**) の発現が低いため、ストレプトゾトシンやアロキサンのような糖尿病誘発に抵抗性を示す。そのため、薬剤による糖尿病誘発に適しておらず、糖尿病モデルの作製には、遺伝子改変技術が有用である。

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。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。そこで、まずマーモセットに遺伝子変異を導入するゲノム編集技術およびコンストラクトをマウスで検証した。マウスの糖尿病関連遺伝子に変異を導入する **Platinum TALEN mRNA** および **ssODN** を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%) に変異が導入され、そのうちの 6 匹 (17.6%) に目的の遺伝子変異が導入されていた。**Platinum TALEN** は細胞毒性が高く、細胞質に注入する場合、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が得られることがわかった。さらに 34 匹の変異導入マウスの中から、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それぞれ異なる変異が導入された 4 系統 (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)) 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。

霊長類であるマーモセットは、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。さらに、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。そのため、小型霊長類であるマーモセットを用いたゲノム編集技術による糖尿病関連遺伝子改変個体の作製を目的とし、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を確立した。

まず、ゲノム編集ツールの効率、および、個体を作出した際の推定モザイク率をマーモセット受精卵で検討する技術として、Zinc Finger Nuclease (ZFN)を用いた一連の検討方法の確立をおこなった。マーモセット受精卵の細胞質に Hi-Fi ZFN もしくは eHi-Fi ZFN の人工合成 mRNA を各ペアあたり 8 ng/μL を注入し、初期胚培養培地を用いて 8 細胞期に発生するまで培養し、透明帯を除去後、胚内の割球細胞を単一割球に分離した。各割球を直接 PCR 反応液に移し、改変標的部位を PCR によって増幅した後に、この PCR 増幅産物を SURVEYOR アッセイにより、変異遺伝子を同定した。その結果、Hi-Fi ZFN の場合、8 割球中 3 割球、eHi-Fi ZFN の場合には 8 割球全てにおいて同様のゲノム改変が認められた。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 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、人工ヌクレアーゼ注入後、早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となった。マーモ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モセットを作製する事が可能となった。限られた研究期間で、糖尿病マーモセットの表現型解析を行うためには、F0 世代（ファウンダー）で解析する必要があるが、モザイク率が高いと期待した表現型がでないため、受精卵の段階で変異導入効率を評価できる方法は非常に有用である。

次に、Transcription activator-like effector nuclease(TALEN)を更に高活性型に改良した Platinum TALENs を用いて、マーモセット糖尿病関連遺伝子の改変率を検討した。マーモセット糖尿病関連遺伝子を標的とした Platinum TALEN の人工合成 mRNA を用い、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後に、ヒト用初期胚培地中で約 4 日間、その後ヒト用後期胚培地に移してさらに 5 日間、後期発生胚が得られるまで培養した。得られた胚を直接 PCR 反応液に入れ PCR 反応を行い、PCR 増幅産物を SURVEYOR assay により変異遺伝子検出試験を行った。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、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 32 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 によって遺伝子改変できることは示されたが、その改変効率は低く、モザイクになっていることから、野生型配列を保有する割球細胞、およびモザイク改変の低減化、遺伝子改変効率の向上が必要であると判断した。

マウス受精卵を用いた結果から、Platinum TALEN は変異導入効率は高いものの、細胞毒性が高く、変異導入効率が低くても、インジェクションする TALEN mRNA の濃度を上げることができない。そのため、近年コンストラクト作成の容易さから急速に広まっている、新しいゲノム編集技術である CRISPR/Cas システムを用い、マーモセット受精卵における糖尿病関連遺伝子の遺伝子改変効率とモザイク改変効率を検討した。gRNA と Cas9 を、マーモセット受精卵に注入後、8 細胞期胚の各割球細胞における切断活性検討を実施した。9 個の受精卵に注入し、5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 38°C 条件下で約 4 日間培養後

の胚発生率は、死滅胚が 1 個 (11.1%)、1~4 細胞期胚が 4 個 (44.4%)、4~8 細胞期胚が 4 個 (44.4%) であった。注入胚の割球細胞を用いて変異遺伝子検出試験を行った結果、検討した 4 個の胚において、88% (8 細胞期胚)、100% (6 細胞期胚)、50% (6 細胞期胚)、100% (3 細胞期胚) であった。従来使用していた Cas9 では注入胚の半分しか後期胚に発生しなかったが、高効率に標的遺伝子を改変可能な Cas9 を見だし、適切な gRNA と Cas9 の混合比を検討したところ、注入胚の発生率および変異導入効率を大幅に改善することができた。これらの方法を用いることで、変異導入効率が高いコンストラクトを選ぶことが可能となり、糖尿病関連遺伝子ノックアウトマウスの効率的な作成が可能であることが強く示唆された。

本研究により、特定の糖尿病関連遺伝子に変異を導入すると、先天的に若齢から糖尿病を発症することがわかった。さらに、マウスの受精卵において、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ウスを作製する事が可能となった。糖尿病マウスモデルを開発することで、再生膵島あるいは異種移植膵島などの前臨床試験が可能となり、臨床応用への直前の段階までを完成させる事が可能になる。また、飼育マウスの平均寿命は 10-15 年で、マウスでは困難な細胞移植後の造腫瘍性の有無を初めとする安全性検証が長期間にわたり可能である。代謝経路や生理学的・解剖学的特徴のヒトとの類似性から、齧歯類の糖尿病モデルでは難しかった、糖尿病慢性期合併症を発症する事も期待されるため、合併症研究への応用も期待される。

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 :

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、再生膵島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。マーモセットを含む新世界ザルは、カニクイザル、アカゲザルなどの旧世界ザルと異なり、ヒトと同様、膵B細胞でのグルコーストランスポーター2 (Glut2) の発現が低いため、ストレプトゾトシンやアロキサンによる糖尿病誘発に抵抗性を示す。そのため、薬剤による糖尿病誘発に適しておらず、糖尿病モデルの作製には、遺伝子改変技術が有用である。一方で、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。そこで、本研究は、マーモセットに遺伝子変異を導入するゲノム編集技術およびコンストラクトをマウスで検証することを目的とした。

まず、新しいゲノム編集技術である CRISPR/Cas システムを用いて遺伝子変異導入を試みたが、目的の遺伝子変異導入個体は得られなかった。そのため、変異導入部位を切断する Platinum TALEN mRNA を新たに合成し、マウスの糖尿病関連遺伝子に変異を導入する ssODN と共に、マウス受精卵前核に注入した。その結果、76匹の産仔中34匹(44.7%)に変異が導入され、そのうちの6匹(17.6%)に目的の遺伝子変異が導入されていた。Platinum TALEN は細胞毒性が高く、細胞質に注入する場合、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が得られることがわかった。Platinum TALEN が有用であること、そのインジェクション濃度は4ng/ul が最適であることがわかり、マーモセット受精卵へゲノム編集を行うための、重要な基礎データを得ることができた。さらに34匹の変異導入マウスの中から、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384.4mg/dl ±20.6、475.4 mg/dl ±21.6、470mg/dl ±11 および499.7 mg/dl ±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197.3mg/dl ±37.5、412.4 mg/dl ±8.6、420mg/dl ±2 および433.5 mg/dl ±46.5であり、野生型の雄177.2 mg/dl ±5.9 および雌139.2 mg/dl ±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。

ヒト iPS 細胞由来膵β細胞の評価には、ストレプトゾトシン (STZ) 投与により糖尿病を誘発した重度免疫不全マウスが用いられている。しかし、STZ による糖尿病誘発効率は個体毎のばらつきが多く、また STZ による膵β細胞以外の臓器への毒性も懸念され、効率的に長期期間、移植した膵β細胞の有効性・安全性を評価するためには、先天的に若齢から安定して高血糖を呈する、免疫不全マウスの開発が必要である。Platinum TALEN で作製した 34 匹のファウンダーマウスの中に、軽度の糖尿病を発症する系統を発見した。この系統では、糖尿病関連遺伝子に 1 アミノ酸置換を伴う 1 塩基置換が導入されていた。雄ヘテロ接合体の随時血糖値は、14 週齢以降に 200-250mg/dl 軽度の糖尿病を発症した。一方、雌ヘテロ接合体の随時血糖値は野生型とほぼ同等であった。さらに、この変異を導入したホモ接合体では、雌雄共に少なくとも 6-40 週齢まで、安定して高血糖 (400-600mg/dl) を呈することを見いだした。

同種膵島移植は有望な糖尿病治療として大いに期待されているが、反面他の移植療法と同様にドナー不足が問題である。そこで iPS 細胞由来膵β細胞移植やブタ膵島などを用いた異種移植がドナー不足解消の切り札として研究されている。しかし、これらの新しい次世代治療は、その効果や安全性が未知であり、動物モデルを用いた十分な検討が必須である。

本研究により糖尿病関連遺伝子に変異を導入されたマウスは、若齢から常染色体単一優性遺伝様式で高血糖を呈することが明らかとなった。このことにより、先天的に若齢から糖尿病を発症する非げっ歯類 (マーモセット) モデル動物を樹立することが可能となった。

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 :

小型霊長類コモンマーマーモセット(マーマーモセット)を用いたゲノム編集技術による糖尿病関連遺伝子ノックアウト個体の作製を目標とし、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、マーマーモセット受精卵で検討する技術を確認した。その技術を用いて、標的としているマー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マーモセット受精卵で行い、標的遺伝子が高効率に改変されたマーマーモセット胚の獲得に成功した。本成果により、糖尿病関連遺伝子ノックアウト個体作成の可能性を見出した。

ゲノム編集ツールの効率、および、個体を作出した際の推定モザイク率をマーマーモセット受精卵で検討する技術として、Zinc Finger Nuclease (ZFN)を用いた一連の検討方法の確立をおこなった。マーマーモセット受精卵の細胞質に Hi-Fi ZFN もしくは eHi-Fi ZFN の人工合成 mRNA を各ペアあたり 8 ng/μL を注入し、初期胚培養培地を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> 条件下で 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胚は、透明帯を除去し、胚内の割球細胞を単一割球に分離した。各割球は直接 PCR 反応液に移し、改変標的部位を PCR によって増幅した。次いで、この PCR 増幅産物を SURVEYOR mutation detection kit (Integrated DNA Technologies, Inc., 706020)による変異遺伝子検出試験に供した。その結果、Hi-Fi ZFN の場合、8 割球中 3 割球、eHi-Fi ZFN の場合には 8 割球全てにおいて同様のゲノム改変が認められた。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 クローンの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、人工ヌクレアーゼ注入後、早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。次に、前述のとおり確立された、マーマーモセット胚を用いたゲノム編集技術による標的遺伝子改変効率の検討方法を用いて、マーマーモセット糖尿病関連遺伝子の改変率の検討を実施した。ゲノム編集ツールは、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。

マーマーモセット糖尿病関連遺伝子を標的とした Platinum TALEN の人工合成 mRNA を用い、終濃度 4 ng/μL となるよう調整した混合液をマー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中で 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 38°C 条件下で約 4 日間、その後ヒト用後期胚培地に移してさらに 5 日間、後期発生胚が得られるまで培養した。得られた胚を直接 PCR 反応液に入れ PCR 反応を行い、PCR 増幅産物 10μl を SURVEYOR mutation detection kit による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 32 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 32 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。しかしながら、改変胚獲得効率は約 33%であり、また野生型配列割球(未改変割球)の残存が見られたため、野生型配列を保有する割球細胞の低減化、モザイク改変の低減化、改変効率の向上が必要であると判断した。

具体的には、Platinum TALENs を再設計し、高効率に改変を引き起こせるコンストラクトの選定を、マーモセット受精卵を用いて検討した。また、ゲノム編集ツール CRISPR/Cas9 を用いた検討を計画し、同じ標的遺伝子部位に guideRNA を設計し、マーモセット受精卵を用いて検討を実施した。

Platinum TALENs の再設計は 2 回実施し、1 回目の再設計コンストラクトでは切断活性が得られなかった(データ略)。2 回目設計 Platinum TALEN の人工合成 mRNA(終濃度 4ng/uL)、および CRISPR/Cas9 (crRNA/tracrRNA 終濃度 50ng/uL、Cas9 蛋白終濃度 100ng/uL 混合液)を用い、マーモセット受精卵に注入後、8 細胞期胚の各割球細胞における切断活性検討を実施した。また Platinum TALENs を用いた検討においては、胚注入後低温度(30°C)培養を実施し、低温下において蛋白の安定性が向上することによる切断活性上昇の可能性を検討した。

Platinum TALENs を受精卵 18 個に注入し、そのうち 9 個は 30°C に 20 時間、その後 38°C に移し、残り 9 個は 38°C の培養温度で、5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> 条件下で約 4 日間培養した。30°C 培養を行った胚の発生率は 1~4 細胞期胚が 9 個(100%)、8 細胞期~胚盤胞期胚は得られなかった。また 38°C 培養胚の発生率は死滅胚が 2 個(22.2%)、1~4 細胞期胚が 4 個(44.4%)、4~8 細胞期胚が 3 個(33.3%)であった。一方、CRISPR/Cas9 は 9 個の受精卵に注入し、5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 38°C 条件下で約 4 日間培養後の胚発生率は死滅胚が 1 個(11.1%)、1~4 細胞期胚が 4 個(44.4%)、4~8 細胞期胚が 4 個(44.4%)であった。注入胚の割球細胞を用いて変異遺伝子検出試験を行った結果、Platinum TALENs 注入 30°C 培養胚において、検討した 2 細胞期胚 2 個において全ての割球が改変されており、3 細胞期胚 1 個では 2 割球(66.6%)が改変されていた。Platinum TALENs 注入 38°C 培養胚 3 個では、割球改変率はそれぞれ 100%(8 細胞期胚)、71%(7 細胞期胚)、60%(5 細胞期胚)であった。それに比較して CRISPR/Cas9 注入胚では検討した 4 個の胚において、88%(8 細胞期胚)、100%(6 細胞期胚)、50%(6 細胞期胚)、100%(3 細胞期胚)であり、発生率と改変率の両点において良好な結果が得られた。

以上の結果から、ゲノム編集ツールを用いた効率的な糖尿病関連遺伝子改変胚の獲得に成功した。本結果から、糖尿病関連遺伝子ノックアウトマーモセット個体の効率的な作成が可能であることが強く示唆された。

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, Gene-editing  
Abstract :

In biomedical researches, laboratory animals bridge the gap between *in vitro* studies and clinical medicine. Although the small rodents, such as mice and rats, are the most popular laboratory animal, 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 15 months to mature sexually, carry babies for 5 months and often give birth to 2-3 young. Streptozotocin (STZ) is a common diabetogenic drug that selectively damage pancreatic islets after uptake via the Glut2 glucose transporter. However, the expression of Glut2 in beta cells in the New World monkeys was lower than that of Old World monkeys. Therefore, New World monkeys are inappropriate STZ-induced diabetic models. Recently, the common marmoset can be used to generate genetically modified research models. Genetically modified NHPs would provide a powerful experimental model to assess the safety and efficacy of new therapies and to develop new drugs. The aim of our study is to establish diabetic marmoset model to introduce the mutation for diabetes-associated gene by genome-editing technique using Platinum TALEN and CRISPR/Cas system.

Given that the ethical concerns regarding use of NHPs, it is important to validate the modified gene using other laboratory animals. Because NHPs should be maintained by non-sibling mating, dominant mutation of the modified gene would be suitable to generate genetically modified diabetic NHPs models to express phenotype. First, We evaluated the gene-editing constructs to introduce diabetes-associated gene mutation in mice. 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 found that 44.4%(34/76) of the pups carried the mutations and 6 of them (17.6%) carried diabetes mutation. We also 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.

Genome editing technologies enable the modification of target genes in marmosets, and recently, the generation of target gene knockout (KO) NHPs was reported. In this study, we developed methods to estimate mosaicism before target gene KO in animals via genome-editing technologies and



examined the efficiency of target gene modification using established methods. *In vitro* synthesized zinc finger nuclease (ZFN) mRNA (final concentration 8 ng/ $\mu$ L) was injected into the cytoplasm of pronuclear-stage embryos. The mRNA-injected embryos were cultured in medium for early embryos under 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub> at 37°C until reaching the 8-cell stage. The 8-cell stage embryos were split into blastomeres for analysis, and the blastomeres were subjected to polymerase chain reaction (PCR). After PCR, CEL-1 assays were performed using the Surveyor Mutation Detection Kit (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA). 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 target genes. These results suggest that genome modification in eHiFi-ZFN-derived embryos occurred at an early cell stage. Using this method, we were able to estimate the mosaicism in target gene KO marmosets before proceeding with genetically modified animal production.

To produce a diabetic marmoset model via gene modification, we validated diabetes-associated gene modification using Platinum transcription activator-like effector nucleases (TALENs) in marmoset embryos. *In vitro* synthesized Platinum TALEN mRNA, adjusted to a final concentration of 4 ng/ $\mu$ L, was injected into the cytoplasm of pronuclear-stage embryos. The mRNA-injected embryos were cultured in medium for early embryos under 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub> at 37°C until reaching the 8-cell stage. The 8-cell stage embryos were transferred to medium for late embryos and cultured until reaching the morula to blastocyst stage. PCR and CEL-1 assays were carried out in cultured embryos using the Surveyor Mutation Detection Kit. 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 the Platinum TALEN-injected embryos contained two types of mutant diabetes-associated genes, but these remained as intact sequences. However, the injected embryos were intact. These results suggested that the marmoset diabetes-associated genes were modifiable by Platinum TALENs, and this will facilitate the efficient production of diabetes-associated gene KO marmosets.

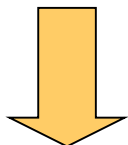
To decrease the intact blastomeres, reconstructed Platinum TALENs and CRISPR/Cas9 were used to investigate diabetes-associated gene modifications in marmoset embryos. Newly constructed Platinum TALENs mRNA and CRISPR/Cas9 (crRNA/tracrRNA with Cas9 nuclease) were injected into marmoset embryos, and were treated with acidified Tyrode's solutions to drill the zona pellucida. The naked embryos were washed and were split into single cells using glass capillaries. The single blastomeres from 8-cell embryos were examined for target gene modifications. In addition, to investigate the possibility that cleavage activity is improved by protein stability at low temperatures, we cultured Platinum TALEN-injected embryos under low temperature conditions (30°C). Low temperature-cultured embryos were arrested at the 1–4-cell stage on day 5. On day 5 after Platinum TALEN injection, the embryos cultured under the typical temperature (38°C) comprised 33.3% 4–8-cell-stage embryos, 44.4% 1–4-cell-stage embryos, and 22.2% dead embryos. On day 5 after CRISPR/Cas9 injection, the embryos comprised 44.4% 4–8-cell-stage embryos, 44.4% 1–4-cell-stage embryos, and 11.1% dead embryos. Furthermore, the target gene modification rates in embryos

cultured at low temperature after Platinum TALEN injection were 100% (2-cell stage), 100% (2-cell stage) and 66.6% (3-cell stage). The target gene modification rates in embryos cultured at 38°C were 100% (8-cell stage), 71% (7-cell stage), and 60% (5-cell stage). On the other hand, the gene modification rates in CRISPR/Cas9-injected embryos were 88% (8-cell stage), 100% (6-cell stage), 50% (6-cell stage), and 100% (3-cell stage). These results suggest that CRISPR/Cas9 was better both of efficiency and rate of development for this gene modification. We demonstrated that efficient acquisition of diabetes-associated gene modifications in marmoset embryos via genome-editing technologies. Although the further study is required to establish genetically modified diabetic marmoset model, our results strongly suggest that diabetes-associated gene-modified marmosets can be generated using genome-editing technologies. Diabetic marmoset model is useful for preclinical research to evaluate the efficacy and safety of autologous and xeno-islet cell transplantations.

# マウス受精卵における糖尿病遺伝子変異導入効率の検証

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



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

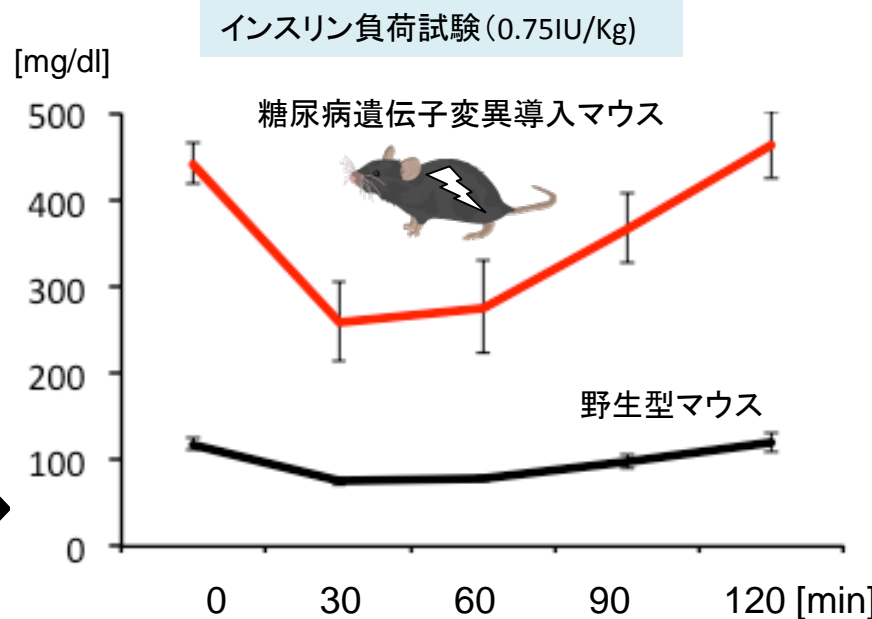


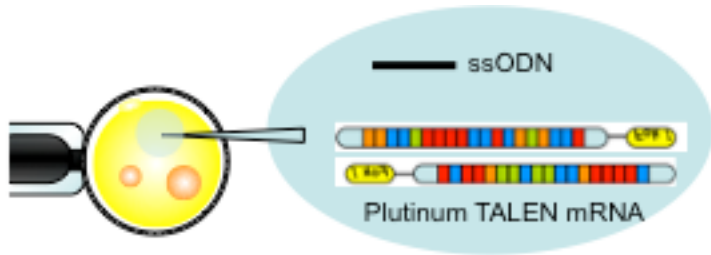
表3 Platinum TALEN-mediated gene targeting in BDF1 mice.

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%)

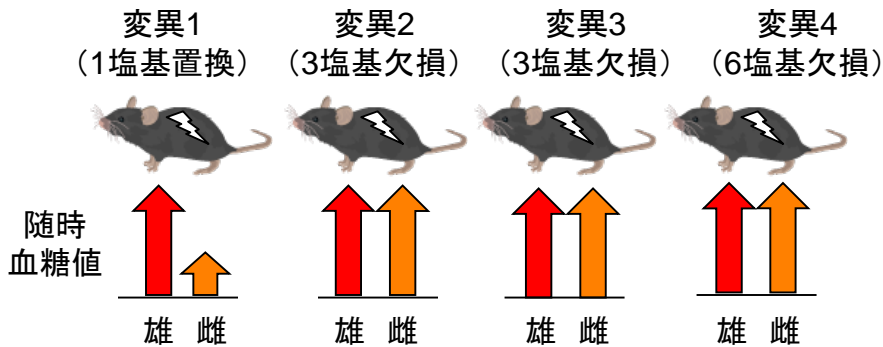
Platinum TALENは細胞毒性が強く、4ng/ulが最も効率的に遺伝子変異導入個体が得られた

# 糖尿病関連遺伝子変異導入マウスの解析

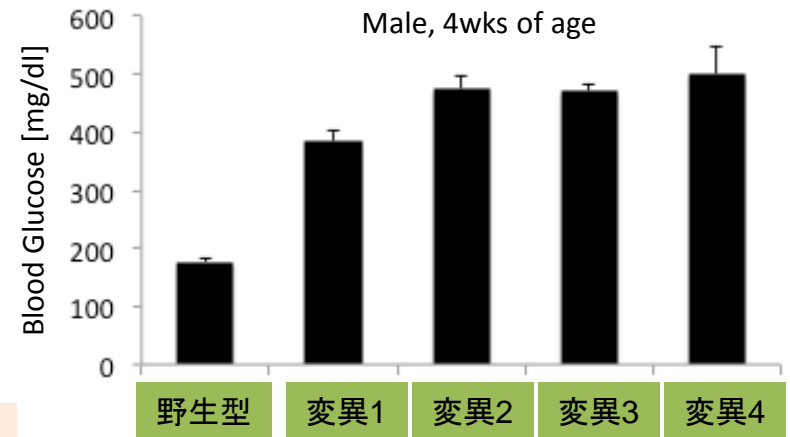
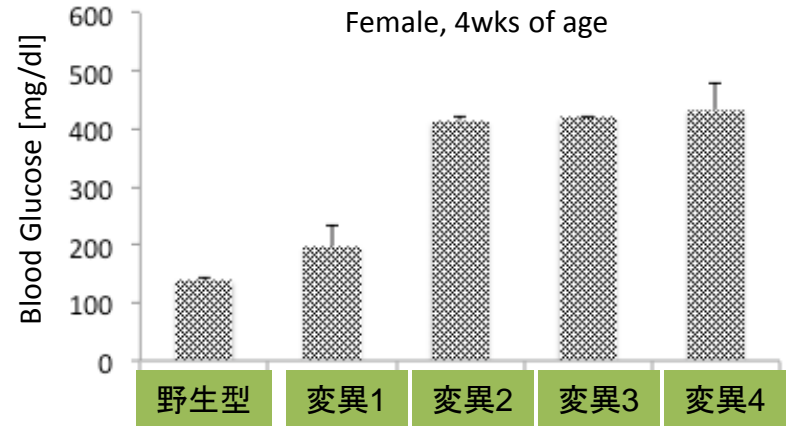
Platinum TALENを用いて、糖尿病遺伝子に変異を導入



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



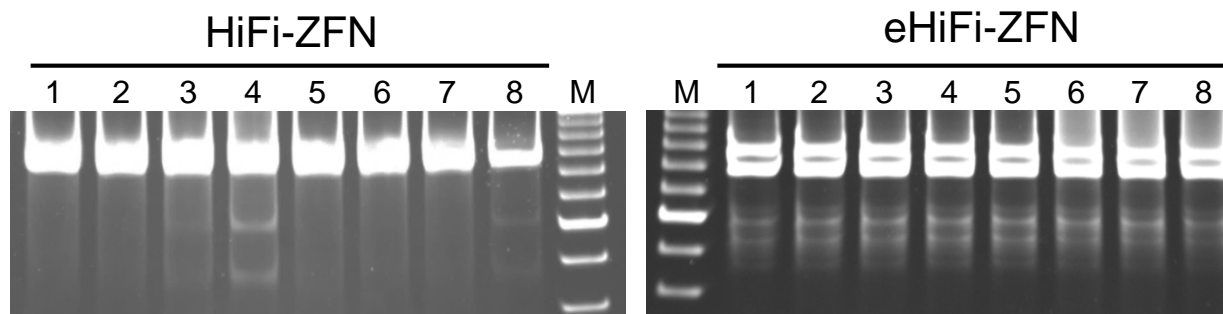
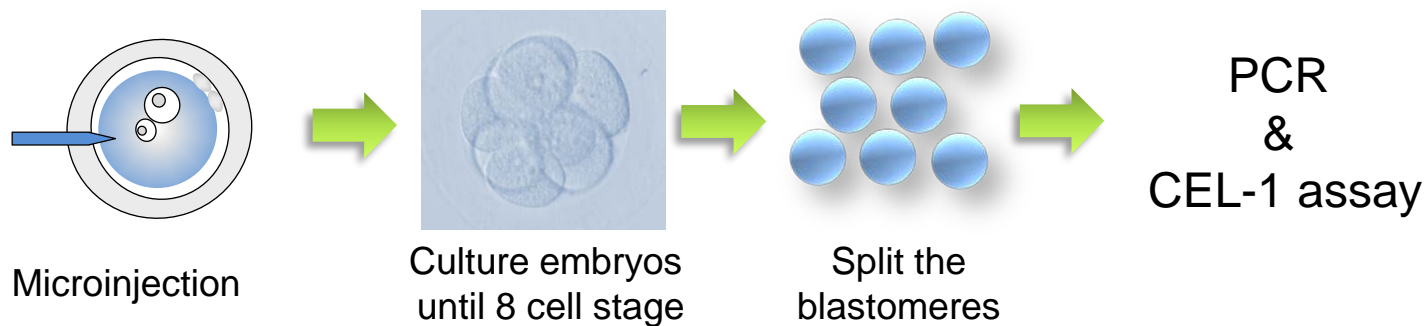
糖尿病遺伝子変異導入マウスの随時血糖値



糖尿病関連遺伝子に、変異を導入することで雌雄共に若齢から高血糖を呈する。

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

# 割球分割PCRによるモザイク改変率の検討

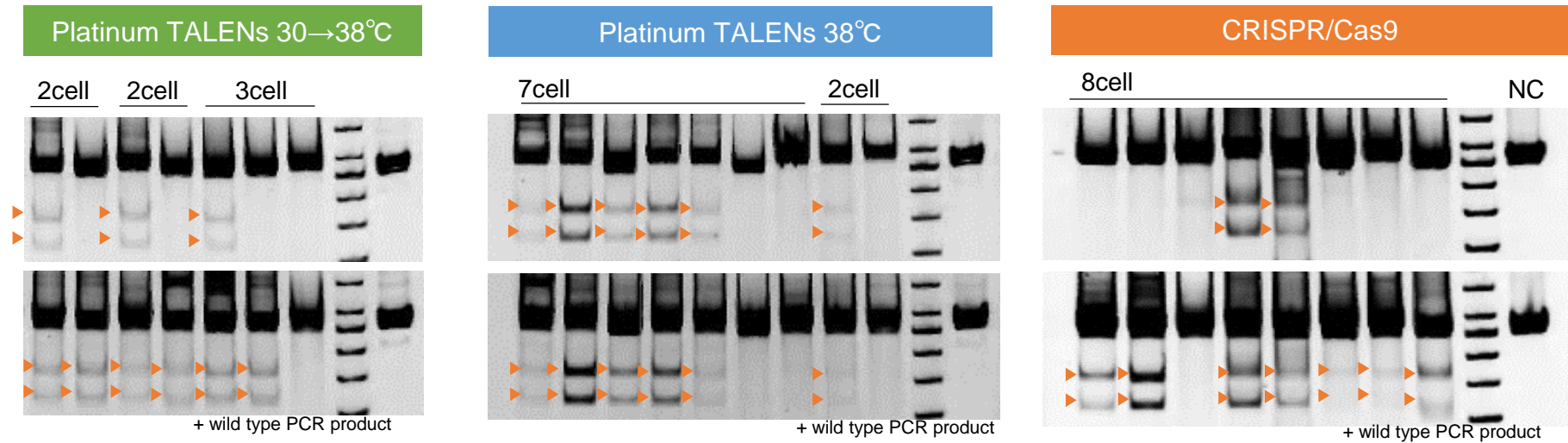
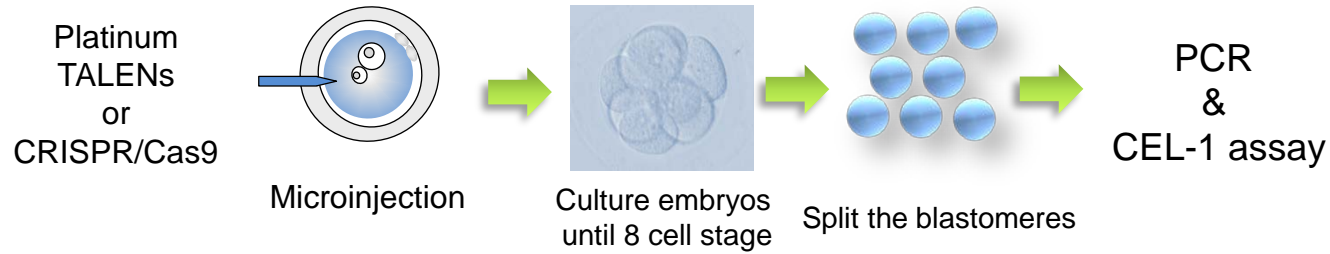


37.5% (3/8)

100% (8/8)

Wild Type	ACTTGGTGCAGT <u>TACCGGACTGACTGGG</u> ACCACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATGTGA
HiFi Bm3	ACTTGGTGCAGT <u>TACCGGACTGACTGG</u> -AC <b>GGACTG</b> ACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATG -1bp, +4bp: 1/9 ACTTGGTGCAGT <u>TACCGGACTGACT</u> - <u>-----GTGAGTGACTAGGATGTGA</u> -17bp: 2/9
HiFi Bm4	ACTTGGTGCAGT <u>TACCGGACTGACTGG</u> -AC <b>GGACTG</b> ACCTGCCTGTGAGTGACTAGGATG -1bp, +4bp: 1/9
HiFi Bm8	ACTTGGTGCAGT <u>TACCGGACTGACTGG</u> -AC <b>GGACTG</b> ACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATG -1bp, +4bp: 1/9
eHiFi Bm1-8	ACTTGGTGCAGT <u>TACCGGACTGACTGGG</u> <b>AT</b> ACCACCTGGACTGTGAGTGACTAGGATGT +2bp: 15/32 <u>-----GAGTGACTAGGATGTGA</u> -50bp: 17/32

# マーマセット受精卵における糖尿病関連遺伝子変異導入効率の評価 (Platinum TALEN and CRISPR/Cas9)



Genome editing	Culture condition	stage	Mutation of blastomere		
			intact	modified	Indel (%)
Platinum TALENs	30°C	3cell	1	3	66.6
		2cell	0	2	100
		2cell	0	2	100
	38°C	8cell	0	8	100
		7cell	2	5	71
CRISPR/Cas9	38°C	5cell	2	3	60
		8cell	1	7	88
		6cell	0	6	100
		6cell	3	3	50
		3cell	0	3	100

モザイク率の低いゲノム編集条件を検討することで、効率的にF0個体の表現型を解析することが可能となった。

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： 糖尿病マウスマウス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
LOX Fails to Substitute for RANKL in Osteoclastogenesis.	Tsukasaki M, Hamada K, Okamoto K, Nagashima K, Terashima A, Komatsu N, Win SJ, Okamura T, Nitta T, Yasuda H, Penninger JM, Takayanagi H.	J Bone Miner Res.	32(3)	2017
IL-10 production in murine IgM+ CD138hi cells is driven by Blimp-1 and downregulated in class-switched cells.	Suzuki-Yamazaki N, Yanobu-Takanashi R, Okamura T, Takaki S.	Eur J Immunol.	47(3)	2017
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.	78	2016
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

研究発表及び特許取得報告について

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 ( <i>Callithrix jacchus</i> ) 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
エレクトロポレーション法による汎用的電気条件の検討	中野堅太、高梨理絵子、新井哲也、岡村匡史	第159回日本獣医学会学術集会	藤沢	2016年3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63回日本実験動物学会総会	川崎	2016年5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	日本本糖尿病・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 他	第158回日本獣医学会学術集会	十和田	2015年9月



研究発表及び特許取得報告について

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 岡村匡史 他	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、岡村匡史 他	第62回日本実験動物学会総会	京都	2015年5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、岡村匡史 他	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ナীবT細胞減少（TN）マウスの原因遺伝子の同定	岡村匡史 他	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
「神の領域」に近づくゲノム編集 人間での研究はどこまで許されるか	佐々木えりか	朝日新聞出版	AERA	2016/9/12日号
連載「生殖医療 命が始まる時」第7部 進歩の先に ②ゲノム編集	佐々木えりか	中国新聞	朝刊11面	2016/10/16
遺伝子改変マーマセットで脳の高次機能解析を加速、Cas9タンパク質の導入で、モザイクなしのゲノム編集を目指す	佐々木えりか	Thermo Fisher社情報誌（サーモフィッシャーサイエンティフィック）「NEXT」	P10-11	2016年12月号
[ScienceNews2017]シリーズ・ゲノム編集、(1)日本独自の展開	佐々木えりか	JSTサイエンスニュース	<a href="https://youtu.be/JF3f63zi0uM">https://youtu.be/JF3f63zi0uM</a>	2017年2月15日 配信
川崎スカイフロントi-Newsletter ビデオ特集 Vol.9	佐々木えりか	川崎スカイフロントi-Newsletter	<a href="http://inewsletter-king-skyfront.jp/jp/video_feature/vol-9-feature01">http://inewsletter-king-skyfront.jp/jp/video_feature/vol-9-feature01</a>	2017年3月動画 配信

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