



## ヒト疾患モデルカニクイザル作成のための、 効率的な遺伝子改変技術の開発に成功 —霊長類を用いたアルツハイマー病などの難病研究に道—

滋賀医科大学動物生命科学研究センター清田弥寿成特任講師、依馬正次教授らの研究グループは、霊長類であるカニクイザルで遺伝子改変動物の効率的な作出手法の開発に成功しました。この成果は、3月14日(木)発刊のアメリカ繁殖学会誌「Biology of Reproduction」に掲載されました。

なお、非ヒト霊長類モデルは、げっ歯類モデルでは再現できないようなヒトの病態を忠実に再現できるため、従来より開発が求められてきました。本学では1990年代から、非ヒト霊長類であるカニクイザルを使用した発生工学技術の開発を進め、人工繁殖法を確立、計画的に繁殖を継続しています。

### POINT

- ・ 外来遺伝子の発現を調節するDNA領域(プロモーター)の選択を改良し、効率的な遺伝子改変カニクイザル作出手法を開発した。
- ・ 本手法で出産に至った4頭のカニクイザルが、全て遺伝子改変カニクイザルであった。
- ・ カニクイザル個体を用いた実験系は高度な動物倫理が求められるため、試験管内で最適プロモーターを評価する実験系を確立した。
- ・ アルツハイマーなどのヒト難病モデルカニクイザルの作成が可能になり、前臨床研究が大きく前進するものと期待される。

#### 《内容詳細に関するお問い合わせ先》

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター

TEL: 077-548-2332

(特任講師 清田弥寿成、 教授 依馬正次、  
センター長 小笠原一誠)

e-mail: hqanimal@belle.shiga-med.ac.jp

#### 《プレスリリース発信元》

滋賀医科大学 総務企画課評価係

(担当: 鎌田・竹島)

TEL: 077-548-2012

e-mail: hqkouhou@belle.shiga-med.ac.jp

## (別紙 1) 内容詳細

### 全身で GFP を発現する遺伝子改変カニクイザルの作成

#### 【要旨】

現在、遺伝子操作が容易なげっ歯類を用いて多くの疾患モデルが作成されています。しかし、パーキンソン病やアルツハイマー病などの一部のモデルでは、ヒトでの病態を再現できない例が報告されています。そこで、よりヒトに近い非ヒト霊長類の疾患モデルの開発が求められています。2001年に霊長類初の遺伝子改変アカゲザルの作出が報告されており、同一グループからハンテントン病モデルアカゲザルが2008年に作出され、カニクイザルでは2グループからの報告がありますが、日本では遺伝子改変コモンマーマセットの作出が報告されているのみであり、遺伝子改変カニクイザルの作出例はありませんでした。

本学動物生命科学研究センターでは、レンチウイルスベクター法によって全身で GFP を発現する世界初の遺伝子改変カニクイザルの作出に成功しました (Seita et al., 2016)。ヒト疾患原因遺伝子などの外来遺伝子を全身性に高発現する遺伝子改変カニクイザルを作成するためには、外来遺伝子の発現を促進するプロモーターと呼ばれる DNA 制御領域の選択が非常に重要ですが、カニクイザルでは個体レベルで十分な検討が行われていませんでした。

カニクイザル個体を用いた実験系は高度な動物倫理が求められるため、プロモーター活性を評価する試験管内アッセイ系をカニクイザル ES 細胞を用いて構築し(図1)、そこで外来遺伝子の発現が高かった CAG、EF1 $\alpha$ プロモーターを用いて GFP 遺伝子改変カニクイザルを作成したところ(図2)、CAGプロモーターで強い GFP 蛍光を全身性に高発現する遺伝子改変カニクイザルを効率的に作成することに成功しました(図3)。

(3月14日付け「Biology of Reproduction」誌に掲載)

#### 【研究の背景と経緯】

現在まで、多くのヒト疾患モデル動物が、遺伝子改変が容易なげっ歯類を用いて開発されてきました。しかし、げっ歯類モデルではインフルエンザなどのヒト病態を再現できない例が報告されているため、よりヒトの病態を忠実に再現できる非ヒト霊長類モデルの開発が期待されていました。特に、旧世界霊長類は胚や胎盤の構造、内分泌・代謝、さらには血清、血液成分の多くがヒトに類似しているため、得られたデータのヒトへの外挿が比較的容易だと考えられます。実験動物用の旧世界霊長類としては、アカゲザルが挙げられますが、繁殖に季節性があるため、年間を通じて繁殖可能なカニクイザルの有用性が高いと考えられます。2001年に霊長類初の遺伝子改変アカゲザルの作出が報告されており、同一グループからハンテントン病モデルアカゲザルが2008年に作出されました。他にアカゲザルでは2例の報告があり、カニクイザルでは1グループからの報告があります。

日本では、2016年に本学動物生命科学研究センターの清田弥寿成特任講師と依馬正次教授の研究グループが遺伝子改変カニクイザルの作成に成功しています。今回、遺伝子改変霊長類の作出法をさらに改良し、外来遺伝子を高発現する遺伝子改変カニクイザル作成法の開発に成功しました。

## 【研究の内容】

本研究グループは、本学動物生命科学研究センターが長年かけて確立したカニクイザルの発生工学的手法と人工繁殖、哺育技術により、遺伝子改変カニクイザルを作出しました。この遺伝子改変カニクイザルの作出では、未受精卵の囲卵腔へウイルスベクターを注入して、GFP をコードする遺伝子を導入しました。遺伝子を導入した未受精卵をヒトの不妊治療でも用いられている細胞質精子注入法（ICSI）で受精させ、数日間培養を行い、GFP を発現した受精卵だけを選んでカニクイザルの仮親の子宮へ移植しました。この方法により、生まれてきた4頭のカニクイザル全てが遺伝子改変カニクイザルであることが確認されました。

従来は、授精約1週間の段階で蛍光を発した卵を仮親に移植する方法で遺伝子改変カニクイザルを作成していました。しかし、プロモーターによっては受精卵の段階で蛍光を発現していても、産仔では蛍光の発現が弱い個体が見られました。この問題を解決するために、ES細胞にさまざまなプロモーターを繋いだ遺伝子を導入して分化させ、分化した細胞での蛍光を観察することで、カニクイザル分化細胞で発現が強いプロモーターを選別しました。このプロモーターで、ウイルスベクターを作成し卵に感染させることで、個体レベルで遺伝子発現が強いカニクイザルの作成に成功しました。

## 【今後の展開】

本研究で確立したカニクイザルの遺伝子改変技術を用いて、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である変異型 APP ( $\beta$ -amyloid precursor protein) を導入した家族性アルツハイマー病モデルカニクイザルを作成し、治療法開発研究などへの貢献が期待されます。また、さまざまな細胞、臓器移植研究に使用可能な移植免疫寛容 GFP カニクイザルの作成を行い、本学が中期計画で掲げている神経難病研究、総合がん医療推進研究、生活習慣病、サルを用いた再生医学研究に役立てていきたいと考えています。

## 【参考図】

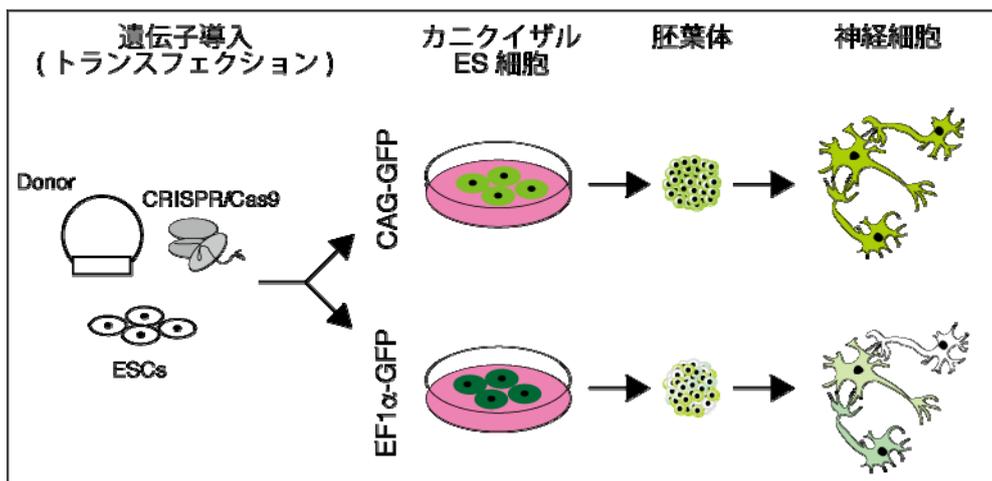


図1. 試験管内プロモーター評価法

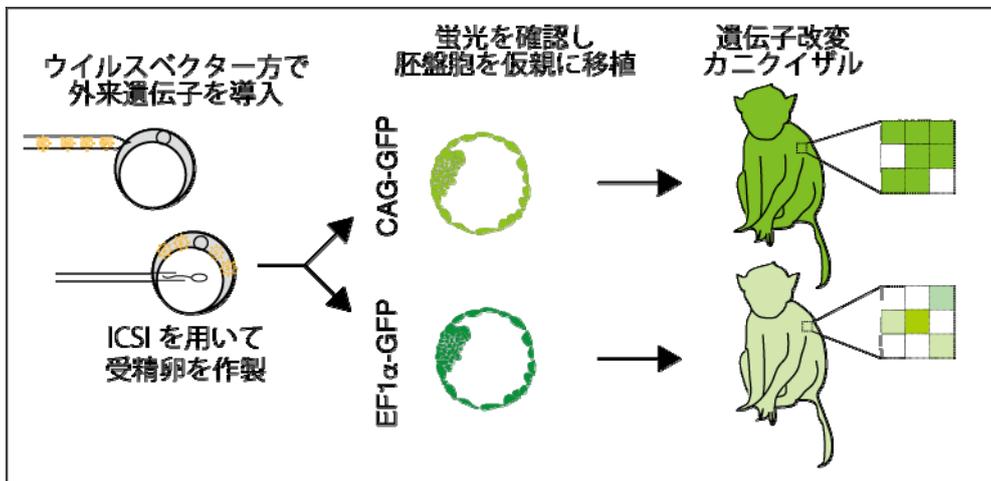


図2. 遺伝子改変カニクイザル作成法



図3. 野生型カニクイザル(左、WT) と GFP を発現するカニクイザル(右、CAG-GFP Tg)

### 【用語解説】

\*プロモーター

遺伝子発現をコントロールする DNA 領域の一つ。ここに DNA 結合蛋白質が結合し、遺伝子の発現を ON、OFF させる。

\*\*ウイルスベクター

ウイルス遺伝子の一部を欠損させ病原性が発現しないようにしたウイルス遺伝子に、目的の遺伝子を組み込んだウイルスを用いて、細胞などに目的の遺伝子を導入する方法。ウイルスが感染する際に、宿主の染色体にウイルス遺伝子を組み込む性質を利用したもの。