

長寿医療研究のための技術基盤形成に資する基礎技術研究 ③疾患モデル動物の作成  
(21-27-3)

主任研究者 下田 修義 国立長寿医療研究センター 研究推進基盤センター (室長)

研究要旨

研究推進基盤センターの分子機能解析室は、国立長寿医療研究センター (NCGG) で実施される研究の、主に核酸の機能解析を支援することで疾患の発症機序解明に貢献することを目指している。今回の課題で当室は所内の研究者のリクエストに応じて疾患モデル動物、具体的にはゲノム編集技術を用いたマウスおよびゼブラフィッシュの変異体作成、維持、および分配を継続できる体制の整備を目標とする。そのため本課題では研究員や研究補助員へのトレーニングを含み技術および知識の継承にも積極的に取り組む。現段階では、ゲノム編集技術を利用して、認知症、疼痛、並びに免疫に関連する遺伝子のノックアウト (機能喪失) と疾患関連バリエーションのノックインをマウスとゼブラフィッシュにおいて実施できる環境を構築しつつある。

A. 研究目的

老年病の発症原因や病態を解明し、その理解に立脚して予防法や治療法を開発するには疾患のモデルとなる動物が必要である。当センター内では現在、バイオバンク試料を活用した、メディカルゲノムセンターによるヒトゲノム解析からアルツハイマー病やレビー小体型認知症の発症に関連したバリエーション (DNA の塩基置換) を持つ遺伝子が次々と発見されており、次の段階としてそれらバリエーションのもたらす影響をモデル動物で評価することが必要となっている。この場合、効率やコストの面、またノウハウの蓄積がなされるという点、さらに技術の継承がなされるということから、変異体を集約的に作成する支援体制をセンター内に構築するのが合理的である。そこで本研究ではゲノム編集技術を利用して、高齢者特有の疾患に関連する遺伝子のノックアウトとバリエーションのノックインをマウスとゼブラフィッシュで行い、それらをセンター内研究者に供給できる体制の構築を目的とする。

## B. 研究方法

今年度は、主に昨年度樹立したマウスとゼブラフィッシュの F1 ヘテロ変異体を掛け合わせ F2 ホモ変異体を作成した。例外的に、今年度作成依頼を受けた免疫関連遺伝子 (Ax1) については昨年度と同様に、ゲノム編集技術を利用してノックアウト変異を持つヘテロ接合体から作成した。具体的には、IDT 社のサイトでガイド RNA のデザインを行い、ガイド RNA と Cas9 タンパク質 (IDT 社より購入) の複合体を試験管内で形成させた後、実験動物管理室へ渡した。実験動物管理室はガイド RNA/Cas9 タンパク質複合体をマウス受精卵へエレクトロポレーション法により導入後、偽妊娠マウスへ移植、自然出産あるいは帝王切開により産仔を取得した。産仔は仮親により育成された。離乳した産仔 (G0; 変異の possible carrier) のテールチップから DNA を抽出し、変異予想箇所に対して HMA (heteroduplex melt curve analysis) を行った。HMA 後、変異が検出された G0 については変異がモザイクで存在すると考えられたため、変異導入箇所を PCR により増幅した後、クローニングし、フレームシフト変異の有無を確認した。フレームシフト変異を有している可能性のある G0 マウスは野生型マウスとアウトクロスし、F1 マウスを得た。F1 の中の変異キャリアの同定は G0 の変異同定と同じ手法により行った。

昨年度すでに得られていた F1 ヘテロ変異体についてはヘテロ接合体同士を掛け合わせ、ホモ変異体を作成した。

ゼブラフィッシュについても、F1 ヘテロ変異体同士の掛け合わせによりホモ変異体を作成した。ゼブラフィッシュの mfsd3 変異体についてはホモ変異体の成魚から脳を摘出し、市販のキットを用いてアセチルコリンエステラーゼ活性 (AchE) およびブチリルコリンエステラーゼ活性 (BchE) 酵素活性を測定した。

### (倫理面への配慮)

遺伝子操作や疾患モデル動物については、当センターの各専門委員会の審査、承認を得て実施した。動物実験では、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」等の遵守、遺伝子組換え実験では、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」等の法令を遵守して研究を行った。

## C. 研究結果

### 1. モデル動物への変異導入

これまでに作成し終えた、あるいは作成過程にある合計 20 のモデル動物について依頼先、疾患分野、ターゲット遺伝子、および変異体作出状況等について情報を以下の表にまとめた。

委託元	疾患	モデル動物	遺伝子名	ノックイン変異・ドナーオリゴ	作成段階	ノックアウト変異	作成段階	機能解析	引き渡し
MGC	DLB	マウス	Mrpl43	-	-	Δ6bp	ヘテロ	-	済み
MGC	DLB	マウス	Mfsd3	-	-	+1bp	ホモ	開始	済み
MGC	DLB	マウス	Mfsd3	-	-	Δ31bp	ヘテロ	-	-
MGC	AD	マウス	M1k1	p. Q48X・(+)	ホモ	-	-	-	-
MGC	AD	マウス	M1k1	-	-	Δ1 Δ6bp	ホモ	-	4月予定
MGC	AD	マウス	01fr578	p. R272H・(+)	ヘテロ	-	-	-	-
MGC	AD	マウス	01fr578	p. R272H・(-)	ヘテロ	-	-	-	-
MGC	AD	マウス	01fr578	-	-	+1bp	ヘテロ	-	-
MGC	AD	マウス	01fr578	-	-	Δ1bp	ヘテロ	-	-
MGC	AD	マウス	Sharpin	p. G183R・(+)	ホモ	-	-	開始	済み
MGC	AD	マウス	Sharpin	p. G183R・(-)	ヘテロ	-	-	-	-
MGC	AD	マウス	Sharpin	-	-	+23bp	ヘテロ	-	-
CFA	免疫	マウス	Axl	-	-	+1bp	ヘテロ	-	済み
CFA	免疫	マウス	Axl	-	-	Δ19bp	ヘテロ	-	-
MGC	DLB	zf	mfsd3	-	-	Δ13p	ホモ	開始	済み
MGC	DLB	zf	mrpl43	-	-	-	致死	-	-
CAMD	疼痛	zf	CCKAR	-	-	+25bp	ホモ	開始	済み
CAMD	疼痛	zf	CCKBRa	-	-	Δ4bp	ヘテロ	-	-
CAMD	疼痛	zf	CCKBRb	-	-	Δ2bp	ホモ	-	-
CAMD	疼痛	zf	CCKBRa/b	-	-	Δ4bp Ra Δ2bp Rb	ヘテロ	-	-

MGC: メディカルゲノムセンター、CFA: 研究推進基盤センター、CAMD: 認知症先端医療開発センター、zf: ゼブラフィッシュ

昨年度は Ax1 遺伝子のモデルマウスを除いて、ほぼすべてのマウスおよびゼブラフィッシュにおいて目的とする F1 ヘテロ変異体を得るところまで成功した。これらの F1 変ヘテロ異体はキャリアの G0 (ジーゼロ : CRISPR/Cas9 タンパク質複合体を導入した受精卵から発生した個体) と野生型との掛け合わせから得られたものである。机上ではそれら F1 ヘテロ接合体同士を掛け合わせれば F2 の 1/4 の確率でホモ変異体を得られるということになるが、マウスでもゼブラフィッシュでも、以下のような、それぞれいくつかの生き物としての固有の問題から必ずしも予定通りに、F2 においてホモ接合体が得られたわけではなかった。具体的には、望ましい変異を有する F1 キャリアの不足である。F1 キャリアの掛け合わせにより F2 ホモ変異体を得るわけであるが、そのためには同一の、望ましい変異 (ノックダウンの場合フレームシフト変異) を有する十分量 (複数の掛け合わせを同時に行うに足るオスメス個体数) の F1 の確保が必要である。ところが CRISPR/Cas9 による変異は発生の過程で導入されるため G0 キャリアは変異について基本的に体細胞モザイクである。そのため多産のゼブラフィッシュにおいてすら、F1 世代で同一の、望ましい変異を有する F1 を十分に得られないケースがあった。これはゼブラフィッシュの発生がきわめて早く進むため、ゲノム編集が生じるまでに、具体的にはガイド RNA が標的遺伝子 DNA を切断し、そしてそれが修復されるまでに、ある程度卵割が進んでしまい、同一の変異を有する体細胞のモザイク率が低くなるためと考えられた。さらにゼブラフィッシュにおいては原因不明の性の偏りも F2 ホモ変異体を得ることを困難にした。一方マウスでは顕著な性の偏りは見られなかったが、一回の出産における産仔が 5 匹前後と少なく、結果として必要十分な F1 交配を実施するために、実際には同一の G0 キャリアを幾度となく野生型と交配 (アウトクロス) して F1 数を増やしたり、場合によっては F1 を再度野生型にアウトクロスしたりする必要があった。この場合、ホモ変異体は次世代の F3 世代で得られた。また母親マウスによる原因不明の産仔食殺がしばしばおこり、これも変異ホモ化を遅らせる要因の一つとなった。

なおノックアウトマウスのうち、Mlkl, Olfr578, Sharpin についてはもともと依頼されたモデルマウスはノックインであったが、ノックインマウス作成の過程で、副産物として短い欠損変異をもつマウスも取れてきた。これらノックアウトマウスはしたがって本来依頼された変異動物ではないが、ノックインマウスのよいコントロール (null 変異) として使用できる可能性があるため、ノックイン変異と同様にホモ化を進めている。

## 2. 変異体の機能解析

- ① すでに作成した変異体の一部、Sharpin ノックインマウス、Mfsd3 ノックアウトマウス、Ax1 ノックアウトマウスについては依頼先の研究者に引き渡した (表)。また Sharpin と Mfsd3 マウスについては現在、マウスの表現型解析システム「インテリケージ」で記憶と学習の能力の変化を解析している。

- ② レビー小体型認知症では血中のアセチルコリンエステラーゼ活性が上昇しているという報告がある。そこでレビー小体型認知症との関連が示されたヒトの MFSD3 ゼブラフィッシュホモログ、*mfsd3* のノックアウト変異体について、バイオインフォマティクス研究部との共同で、脳内のアセチルコリンエステラーゼ活性(AchE)およびブチリルコリンエステラーゼ活性(BchE)の酵素活性を測定した。その結果、*mfsd3* 変異体において AchE 活性に有意な差は認められなかったが、BchE 活性が上昇しているという予備的結果が得られた。
- ③ 昨年度、認知症研究センター本庄研究員から、痛覚刺激の伝達に関わるペプチド、「コレシストキニン」、のレセプター遺伝子 *cholecystokinin-like neuropeptide receptor* の3つのパラログ、CCKAR, CCKBRa, CCKBRb の3つの遺伝子のノックアウトフィッシュの作成を依頼された。それら遺伝子に対する crRNA (crisper RNA) と Cas9 をゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションすることで当該遺伝子にノックアウト変異を導入することができた。CCKAR および CCKBRb についてはホモ変異体の樹立に成功し、CCKBRa については現在ヘテロ接合体を育成中である。CCKAR、CCKBRb および CCKBRb のいずれのホモ変異体の外観や行動に異常は観察されていない。先行して作成できた CCKAR 胚について本庄研究員は熱プローブ接触による逃避行動を調べたが、これまでのところ野生型との差は観察されていない。

#### D. 考察と結論

当該研究は当センターにおける認知症等の長寿医療の中核となる疾患の病態解明に資する研究技術開発を行う課題である。本研究課題では、これまで高齢者に多く見られる三つの疾患分野、すなわち1) 認知症、2) 疼痛、3) 免疫、の研究者からモデル動物作成の依頼を受け、ゲノム編集技術を用いてマウスのノックイン・ノックアウト変異体、およびゼブラフィッシュノックアウト変異体の作成を行っている。今後順次、M1k1 ノックインマウス、Olf578 ノックアウトマウスのホモ変異体が作成できる見込みで、これらについてもインテリケージによる記憶・学習能力の解析へとつなげる予定である。ただしインテリケージによる行動・学習解析は現在、外部に委託しておりその費用が高額(およそ120万円/変異体)であるため、その分の予算を獲得する必要がある。また認知症関連遺伝子、特にレビー小体型認知症のモデルマウスについては多重変異体において表現型が明確に出ることを期待して、掛け合わせにより多重変異体を作成する予定である。

レビー小体型認知症では血中のアセチルコリンエステラーゼ活性が上昇しているという報告があり、ゼブラフィッシュの *mfsd3* の脳内のアセチルコリンエステラーゼ(AchE)活性およびブチリルコリンエステラーゼ(BchE)活性を測定したところ、BchE 活性の上昇が見ら

れた。現在、この結果に再現性があるか、次世代の魚で検証するための準備を進めている。

疼痛に関するコレシストキニンの受容体に変異を持つゼブラフィッシュの変異体については、CCKAR 変異体ではこれまでのところ熱プローブ接触による逃避行動は野生型との差が見られていない。現在作製中の CCKBRa 変異体と CCKBRb 変異体については単独の変異体のみならず、パラログ同士の CCKBRa/CCKBRb 二重変異体の作成も進めている。そしてこれから単独及び二重変異体についても痛み刺激への感受性を解析する予定である。

いくつかの系統ではマウスの変異体作成が当初見込みよりやや遅れている。この原因は単純ではあるが本研究をスタートした時点では予期できなかった。それは望ましい変異をもつ F1 ヘテロ接合体マウスが得られたとしても、必ずしも速やかに F2 ホモ変異体の樹立できないという問題である。変異導入に利用しているマウスは C57BL6 という系統であるが、おとなしく扱いやすい反面、ボディーサイズが小さく、したがって産仔の数が少ない。そのうえしばしば母親マウスが一部あるいはすべての産仔を食殺しまうということが生じた。F1 キャリアが得られても匹数が少ないとどちらかの性に偏ることがしばしば生じ、その結果掛け合わせができず、再度野生型とアウトクロスをしなければならなくなった。この場合、ホモ化は F3 世代目と先延ばしになる。またゼブラフィッシュでは別のトラブルに見舞われた。おそらく餌の与えすぎによる水質の低下から、システム水槽中に原生動物繊毛虫のコレプス(Clepus)が大発生してしまい、コレプスはふ化後の稚魚を食べてしまうことから、コレプスの数の抑制に至るまでの数ヶ月間、継代ができなくなってしまった。そこでシステム水槽の徹底的な洗浄を行い、ふ化後の稚魚に与える人工飼料の量を控えめにし、またブラインシュリンプを与える時期を受精後 16 日から遅らすなど対応策を講じた結果、コレプスの繁殖は完全には抑えられないものの、継代に問題がない程度まで低下させることができた。

このようにいくつかの予想外の障害には見舞われたが、それぞれ対応策を考え、実行することで克服し、変異体作成のパイプラインは頑強になったと認識している。全般的に見れば、当課題は、研究所内で安定したモデル動物の供給を実現し、一部は計画を前倒しにして表現型解析をはじめると、これまで順調に進んでいる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shirai, M., Nara, T., Takahashi, H., Takayama, K., Chen, Y., Hirose, Y., Fujii, M., Awazu, A., Shimoda, N., Kikuchi, Y. Identification of aberrant transcription termination at specific gene loci with DNA hypomethylated

transcription termination sites caused by DNA methyltransferase deficiency. Genes & Genetic Systems. Vol. 97, p139-152 (2022).

2) Shirai, M., Takayama, K., Takahashi, H., Hirose, Y., Fujii, M., Awazu, A., Shimoda, N., Kikuchi, Y. Methylome data derived from maternal-zygotic *DNA methyltransferase 3aa*<sup>-/-</sup>. Data in Brief. Vol. 44, 108514 (2022).

3) Yasuno, F., Watanabe, A., Kimura, Y., Yamauchi, U., Ogata, A., Ikenuma, H., Abe, J., Minami, H., Nihashi, T., Yokoi, K., Hattori, S., Shimoda, N., Kasuga, K., Ikeuchi, T., Takeda, A., Sakurai, T., Ito, K., Kato, T. Estimation of blood-based biomarkers of glial activation related to neuroinflammation. Brain, Behavior, & Immunity-Health 26 (2022) 100549.

4) Yasuno, F., Kimura, Y., Ogata, A., Ikenuma, H., Abe, J., Minami, H., Nihashi, T., Yokoi, K., Hattori, S., Shimoda, N., Watanabe, A., Kasuga, K., Ikeuchi, T., Takeda, A., Sakurai, T., Ito, K., Kato, T. Involvement of inflammation in the medial temporal region in the development of agitation in Alzheimer's disease: an in vivo positron emission tomography study. Psychogeriatrics (2023) 23(1)126-135.

5) Shirai, M., Shimoda, N., Takahashi, H., Takayama, K., Kikuchi, Y. Microarray Transcriptome datasets of maternal-zygotic DNA methyltransferase *3aa*<sup>-/-</sup> zebrafish during early developmental stages. Data in Brief. Vol. 47, 108967 (2023).

6) 新飯田俊平、下田修義 診断バイオマーカーとしての DNA メチル化 基礎老化研究 (2022)10 月

## 2. 学会発表

1) 光森 理紗、中村 昭範、新畑 豊、尾崎 浩一、新飯田 俊平、下田 修義. メチローム解析によるアルツハイマー型認知症血液マーカーの探索. 第 15 回日本エピジェネティクス研究会・年会 福岡県 2022 年 6 月 9~10 日.

2) 白井 均樹、奈良 拓也、高橋 治子、高山 和也、Chen Yuan、廣瀬 湧大、藤井 雅史。栗津 暁紀、下田 修義、菊池 裕 Identification of aberrant transcription termination at specific gene loci with DNA hypomethylated transcription

termination sites caused by DNA methyltransferase deficiency. 第45回日本分子  
生物学会年会 幕張メッセ 2022/11/30~12/2

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし