

遺伝子改変コモンマーモセットを用いた 神経科学研究の進捗

Next-generation Neuroscience
using the common marmoset



岡野 栄之(慶應義塾大学医学部)
佐々木えりか(実験動物中央研究所)

なぜ霊長類の実験動物が必要なのか？

薬物代謝の相違

サリドマイドによる催奇形性



小型霊長類・マーモセット



(Poswillo et al., Nature 1972)



(Gilbert, Dev Biol.)

病原体への感受性の相違

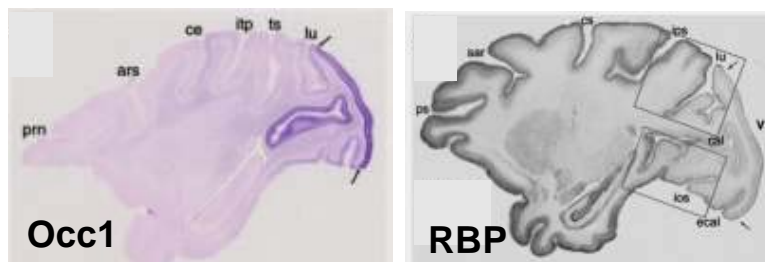
A型肝炎ウイルス/EBウイルス/麻疹ウイルスへの感受性



発現遺伝子の相違

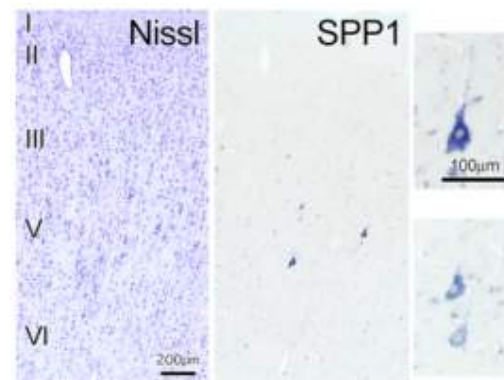
霊長類の脳で特異的に発現する遺伝子

霊長類一次視覚野特異的遺伝子



アカゲザル

霊長類皮質脊髄路特異的遺伝子



コモンマーモセットの実験動物としての利点

トランスジェニック動物の作製が可能

- ・遺伝子改変動物が系統化された霊長類はマーモセットのみ
(Sasaki et al., Nature 2009)

ヒトに近縁であり類似性が高い

- ・代謝経路、生理学的・解剖学的特徴がヒトと非常に類似している
- ・年間5～6匹出産、一匹の雌の生涯産仔数40～80
- ・ヒトのサイトカイン、ホルモンと交差性を示す

繁殖効率が良く発生工学研究に適している

- ・性成熟まで約1年半と他の霊長類に比べ短い
- ・性別・年齢・体重を揃えて繰り返し実験が可能

小型で飼育や実験上の取り扱いが容易

- ・比較的簡単なトレーニングで飼育可能
- ・自発運動量が多く、行動観察が比較的容易

実験動物用として目的繁殖されている

- ・ヒトにとって危険な人獣共通感染症の報告がない
- ・遺伝的に均質、微生物学的な統御がされている



遺伝子改変マーマーモセットモデルを用いた疾患研究の戦略 —変性疾患モデルの前臨床治験への応用—

パーキンソン病モデルマーマーモセット



平成20-24年度においてライン化に成功し、前臨床試験に使用する個体数の確保が可能になった

新規治療法の開発

ES、iPS細胞を用いた移植療法
遺伝子治療
新規治療薬の開発(創薬研究との連携)

ALSモデルマーマーモセット

平成20-24年度で作成中

治療薬の開発

治療薬候補の効果検証
リルテック HGF キサリプロデン メチルコバラミン
デクスプラミペキソール クルクミン VEGFなど
新規治療薬の開発(創薬研究との連携)

トランスジェニック・マーモセット個体の作出に成功

ARTICLES

Generation of transgenic non-human primates with germline transmission

Nature
5.28. 2009

Erika Sasaki¹, Hiroshi Suemizu¹, Akiko Shimada¹, Kisaburo Hanazawa², Ryo Oiwa¹, Michiko Kamioka¹, Ikuo Tomioka^{1,3}, Yusuke Sotomaru⁵, Reiko Hirakawa^{1,3}, Tomoo Eto¹, Seiji Shiozawa^{1,4}, Takuji Maeda^{1,4}, Mamoru Ito¹, Ryoji Ito¹, Chika Kito¹, Chie Yazihashi¹, Kenji Kawai¹, Hirovuki Mivoshi⁶, Yoshikuni Tanioka¹, Norikazu Tamaoki¹, Sonoko Habu⁷,

アルツハイマー病モデルマーモセットの作成



レンチウイルスベクター

•UbC-APP(Swe/Ind)-2A-hKO



•Syn-MAPT(P301L)-2A-EGFP

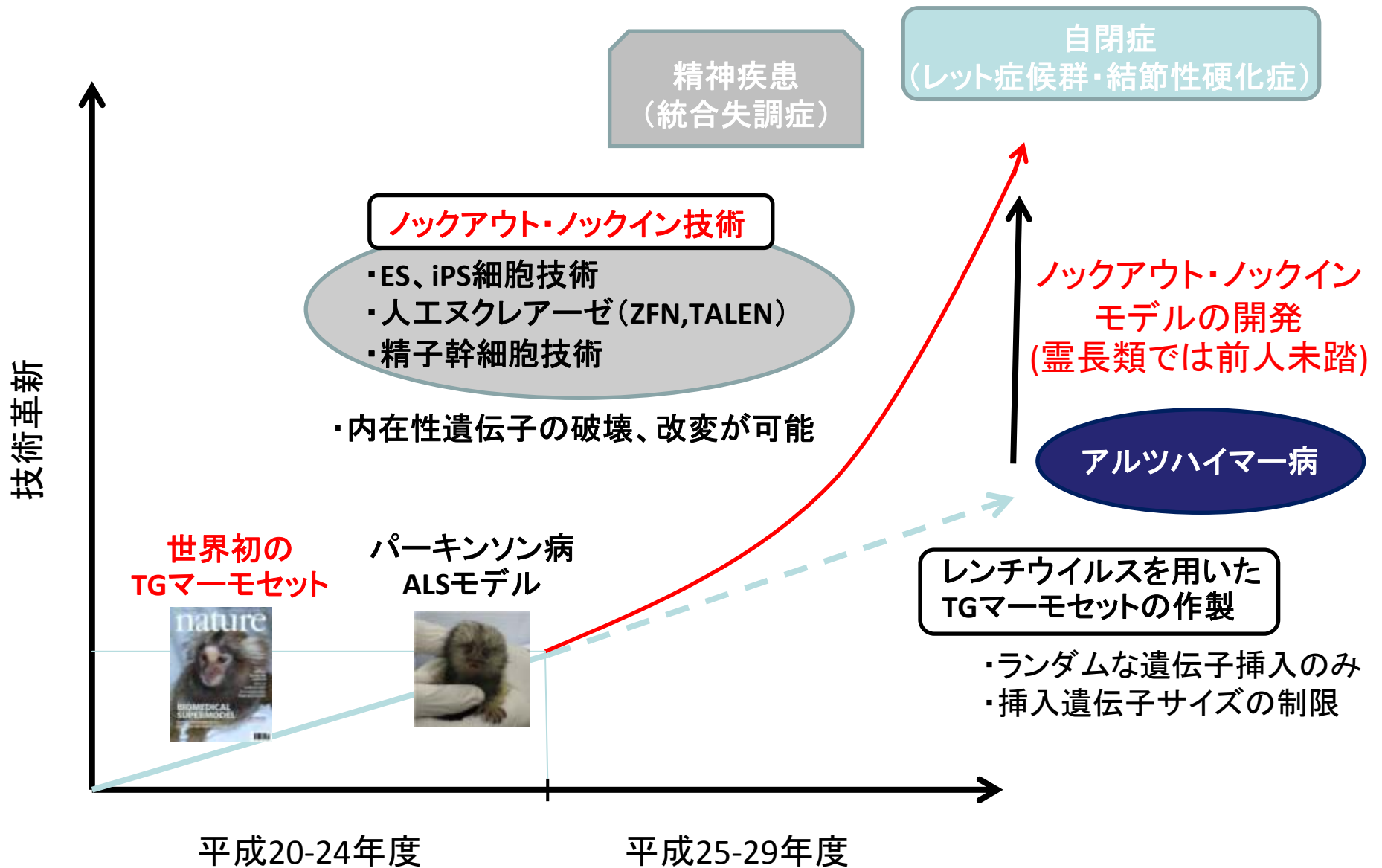


マーモセットニューロスフェアにおける Transgene の発現

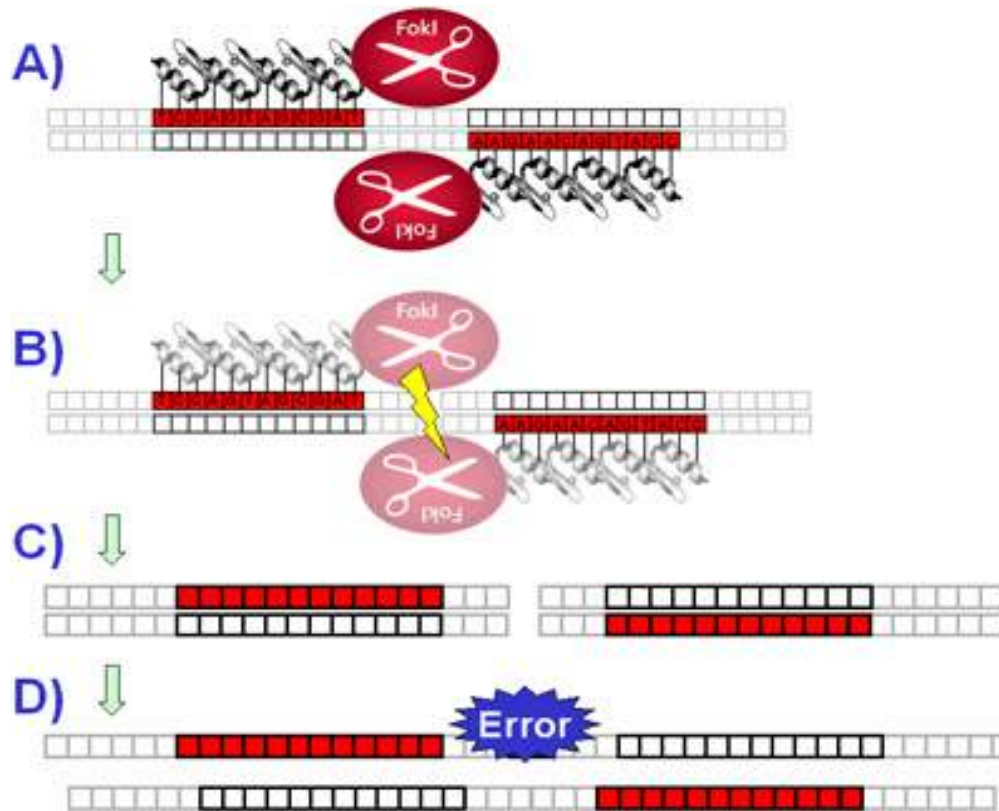


→マーモセット初期胚への Injection

新しい遺伝子改変技術による研究の加速的展開



人工ヌクレアーゼ(ZFN, Talen)を用いたレット症候群モデルマウスの作製



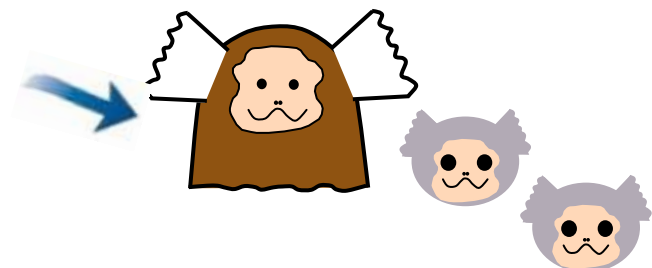
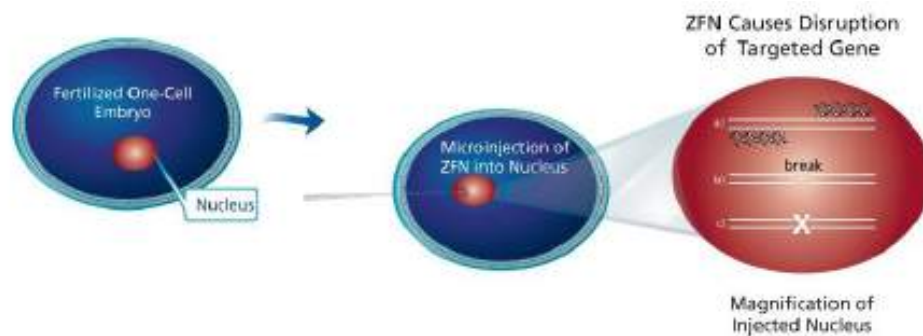
Zinc Finger domains bind to target DNA

Fok I nuclease digests the target DNA

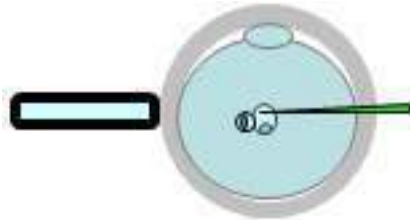
DNA repair

Error recovery will occur by Non-Homologous End-Joining (NHEJ)

Loss of gene function



トランスジェニックマーマーモセット作成技術の開発: 次の課題

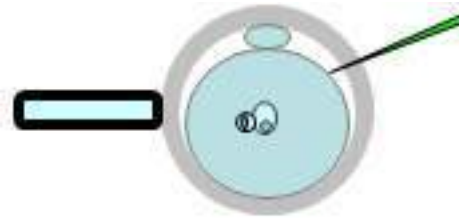


DNA 直接注入

Can introduce long DNA.
Large amount of oocytes
are needed



1~2 年間で達成



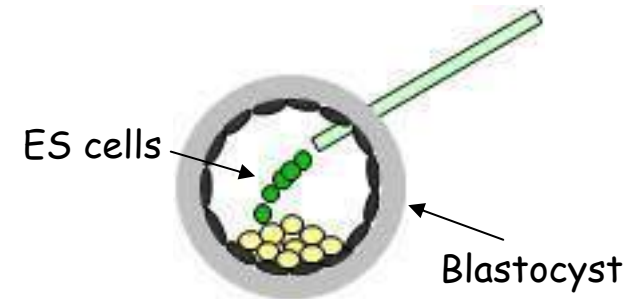
レンチウイルスベクター注入

Can apply to all stage
of embryos.

DNA size is limited
up to 8.5kb.



2009 年



ES細胞のBlastocyst への注入

Can produce target gene
Knock-out animals.

ES cells with chimeric animal
production ability are required.



3~4年間で達成

脳プロ(H20-24年度)で作製したTGマーモセットの有効利用

GFPトランスジェニックマーモセット(Founder: 2(4)匹、F1: 10匹、F2: 2匹)

骨髄幹細胞研究

マイクロキメリズム研究

パーキンソン病モデル(APKO-mRFP)トランスジェニックマーモセット(Founder:2匹、F1: 8匹)

F1個体を用いたライブイメージング研究(MRI, PET)、理研分子イメージングセンター

創薬研究

パーキンソン病モデル(APKO-hKO)トランスジェニックマーモセット(Founder:4匹)

今秋より繁殖開始

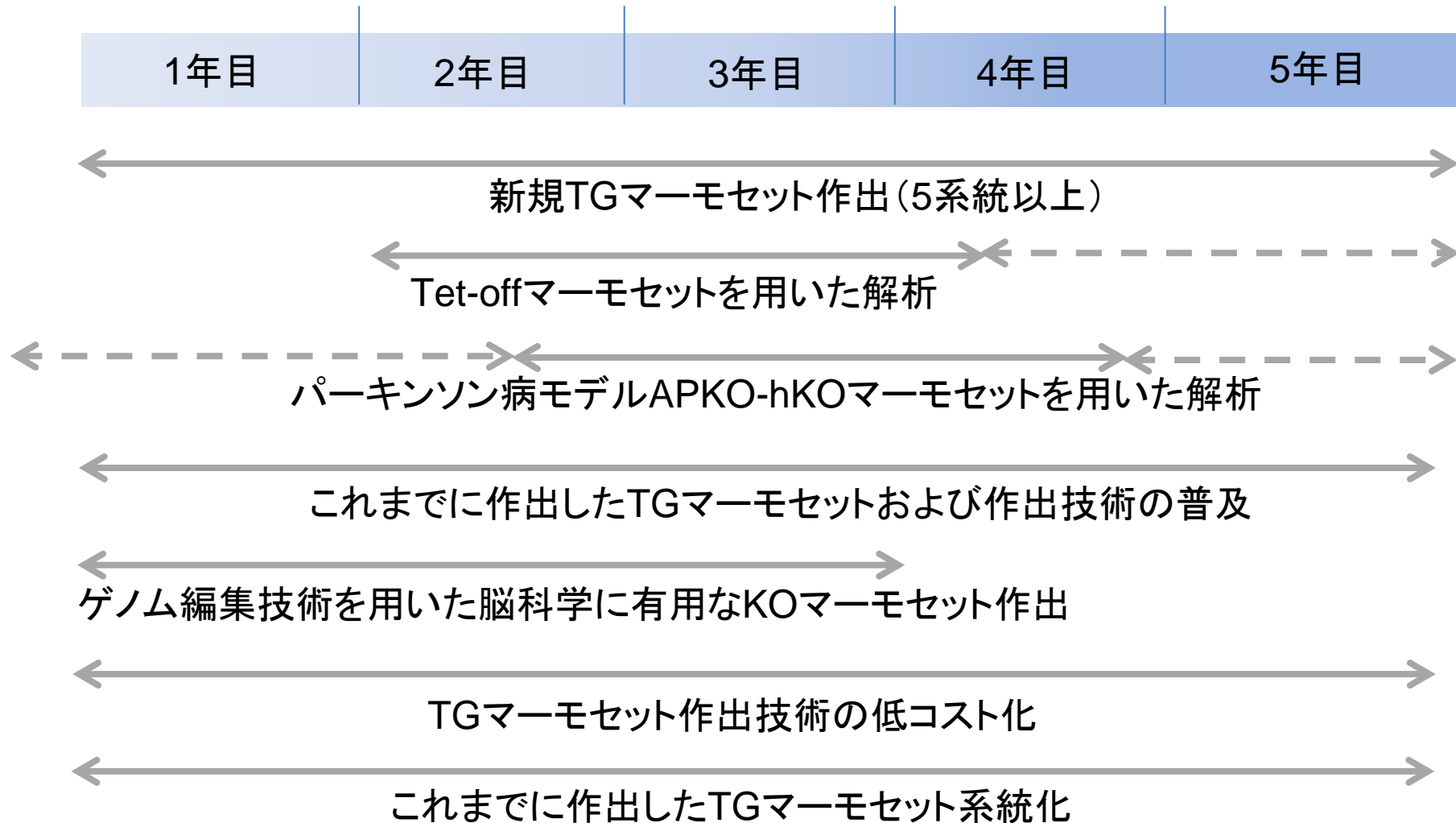
Founder個体を用いたライブイメージング研究(MRI, PET)、理研分子イメージングセンター

導入遺伝子の神経細胞特異的発現増強Tet-offトランスジェニックマーモセット(Founder 5匹)

今秋より繁殖開始

脳科学研究

今後5年間のTGマーモセット普及のための計画



TGマーモセットおよび作出技術の開発および普及

脳プロ:平成20-24年度

世界初のTG霊長類の系統化に成功

他資金

代謝疾患ノックダウンマーモセット作出

他資金

世界初のノックアウトマーモセット作出
代謝疾患
免疫不全
自閉症モデル

他資金

新規疾患モデルマーモセット作出
アルツハイマーモデル
脳神経発達解析

平成29年度まで

世界初のTGマーモセットの実用例を提示
TGマーモセット作製可能施設拡大
基礎生物学研究所
群馬大学など

産・学・官を含めた研究領域でのTGマーモセットモデルの使用の拡大

日本マーモセット研究会を通じた普及

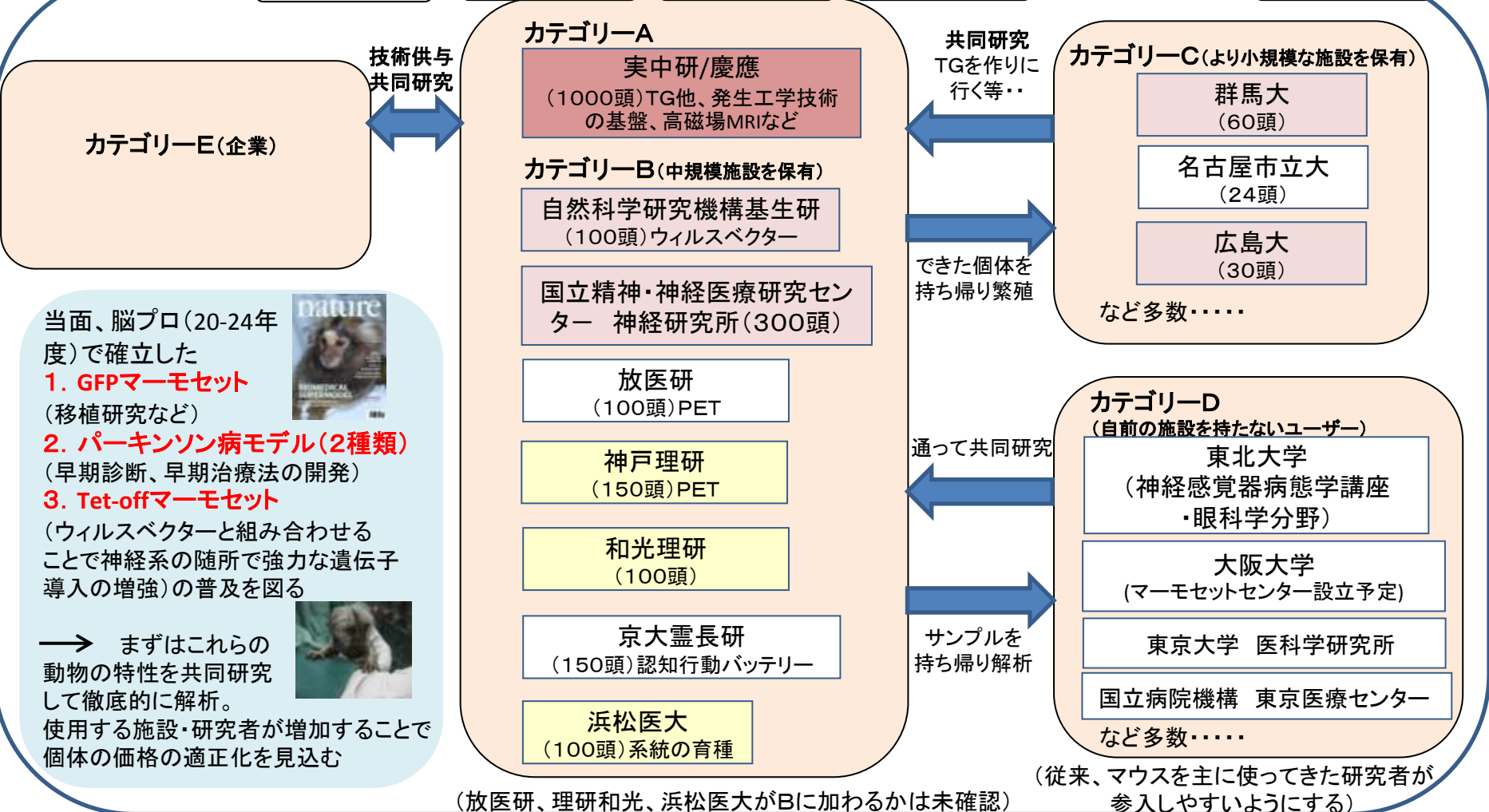
製薬企業2社と既にTGマーモセット作製に関する共同研究開始

基盤整備
ゲノム情報、BACライブラリー、抗原抗体作製、薬物代謝経路、新しい発生工学技術

日本マーモセット研究会
会長: 垣生園子
事務局: 実験動物中央研究所

情報交換・飼育・繁殖技術の共有
神経科学だけでなく広く
バイオメディカル全体をカバー
TGIには限定しない

神経科学 — 免疫学 — 循環器病学 — 再生医学 — 血液病学 — 創薬 — 前臨床試験



当面、脳プロ(20-24年度)で確立した

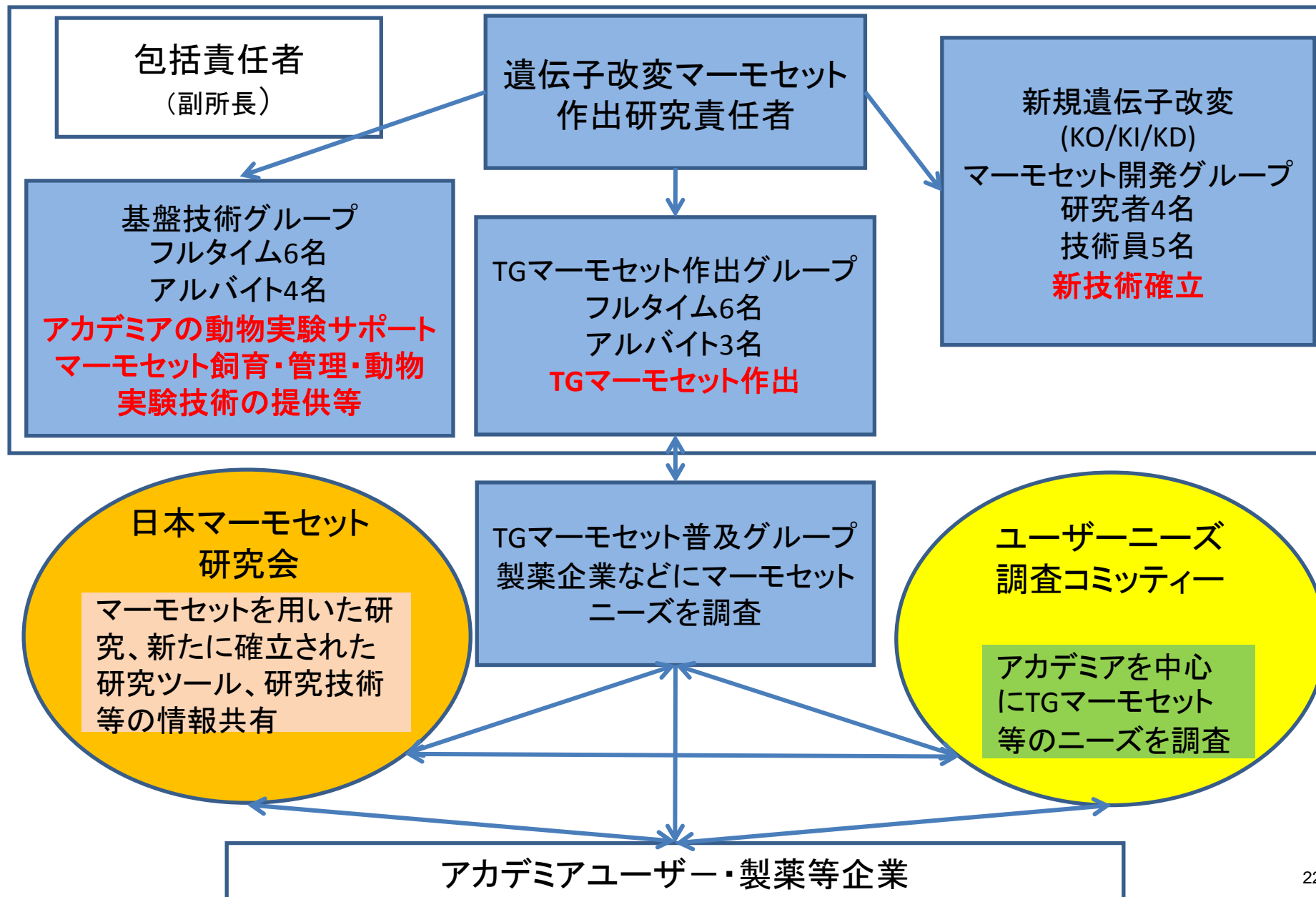
- GFPマーモセット** (移植研究など)
- パーキンソン病モデル(2種類)** (早期診断、早期治療法の開発)
- Tet-offマーモセット** (ウィルスベクターと組み合わせることで神経系の随所で強力な遺伝子導入の増強)の普及を図る

→ まずはこれらの動物の特性を共同研究して徹底的に解析。使用する施設・研究者が増加することで個体の価格の適正化を見込む

(放医研、理研和光、浜松医大がBに加わるかは未確認)

- * (注 ■) 実中研で完成したTG作製技術の技術移転が完了した研究機関。基生研は大学共同利用機関の枠組みで大学等の研究者を支援
- * (注 □) 実中研で完成したTG作製技術の技術移転が設備・人材などの面で可能な施設
- * 様々な外部資金の獲得を共同して目指す
- * DからCへの移行をサポートする

TGマーモセット普及母体としての実中研の組織体制



共同研究拠点を担う実中研の準備状況

実験動物中央研究所

世界最大規模のマーモセット飼育・研究施設（飼育頭数：1000頭）

欧米ガイドラインに準じた最高水準の飼育運営体制

世界初の霊長類トランスジェニック動物システムの作出に成功

TGマーモセット作製施設

遺伝子解析設備

二光子顕微鏡

MRI 画像診断設備

共通利用目的の実験空間

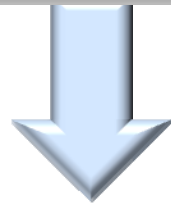


TGマーモセット作製班

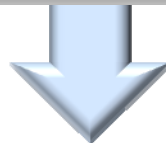
ES/iPS細胞樹立・培養技術

飼育・実験動物技術員の教育

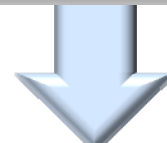
動物生命倫理の厳正管理・教育



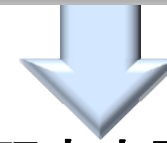
マーモセット試料の提供



技術情報の提供

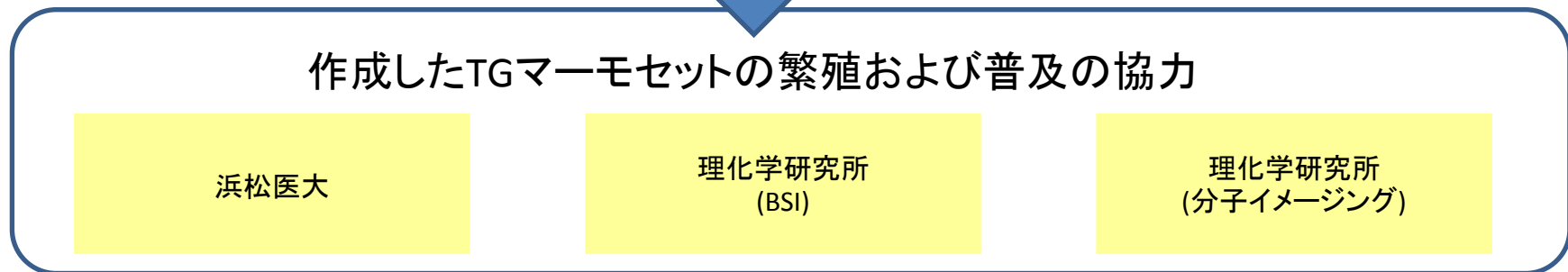
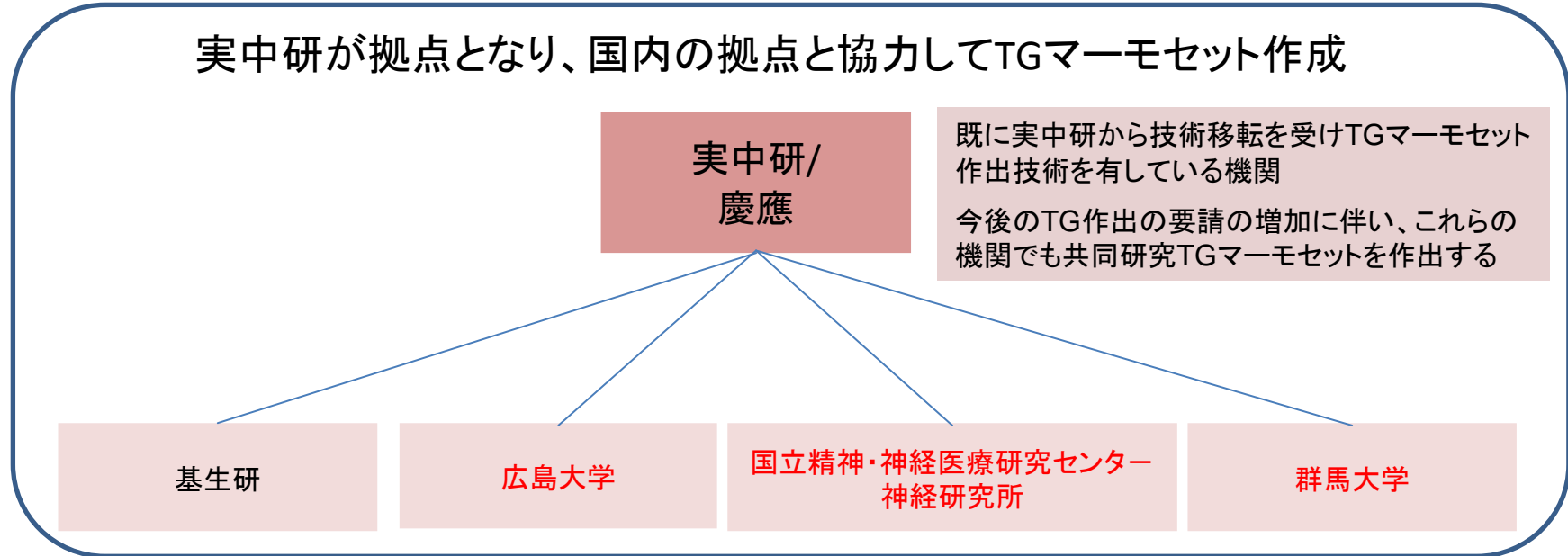


系統維持
飼育の支援



共同研究実験の実施

遺伝子改変マーモセット作成拠点と協力機関(案)



現在TGマーモセット作出可能な施設

TGマーモセット作出可能な施設を有する研究所

5年後に自立的に機能するための戦略

1. 脳プロ(平成20-24年度)で作出したTG(遺伝子改変)マーマーモセットを用いた研究の実績を挙げる
TGマーマーモセットの有用性の実証
2. 複数のTG作出可能機関設立
基生研、広島大学、国立精神・神経医療研究センター神経研究所、群馬大学等
いずれも既に技術移転済み
3. TG繁殖・配布機関設立
浜松医大、理化学研究所BSI、理化学研究所分子イメージング等
既に100頭を超える飼育および繁殖施設を保有
4. 遺伝子改変マーマーモセット作出コスト削減
発生工学技術の効率化、作業効率化、出生率の上昇などによるコスト削減
5. バイオメディカル全般の遺伝子改変モデルマーマーモセット作出
肥満、糖尿病、免疫不全モデル等の作成は既に開始している
新規遺伝子改変技術の確立により新たな難治性疾患モデルの作出を可能にする
6. 非遺伝子改変疾患モデル
脊髄損傷、心筋梗塞、パーキンソン病モデル等の普及・汎用化
免疫寛容モデル等の開発

TGマーモセット作出の効率化



ネットワークカメラ

PLanex

CS-WMV04N

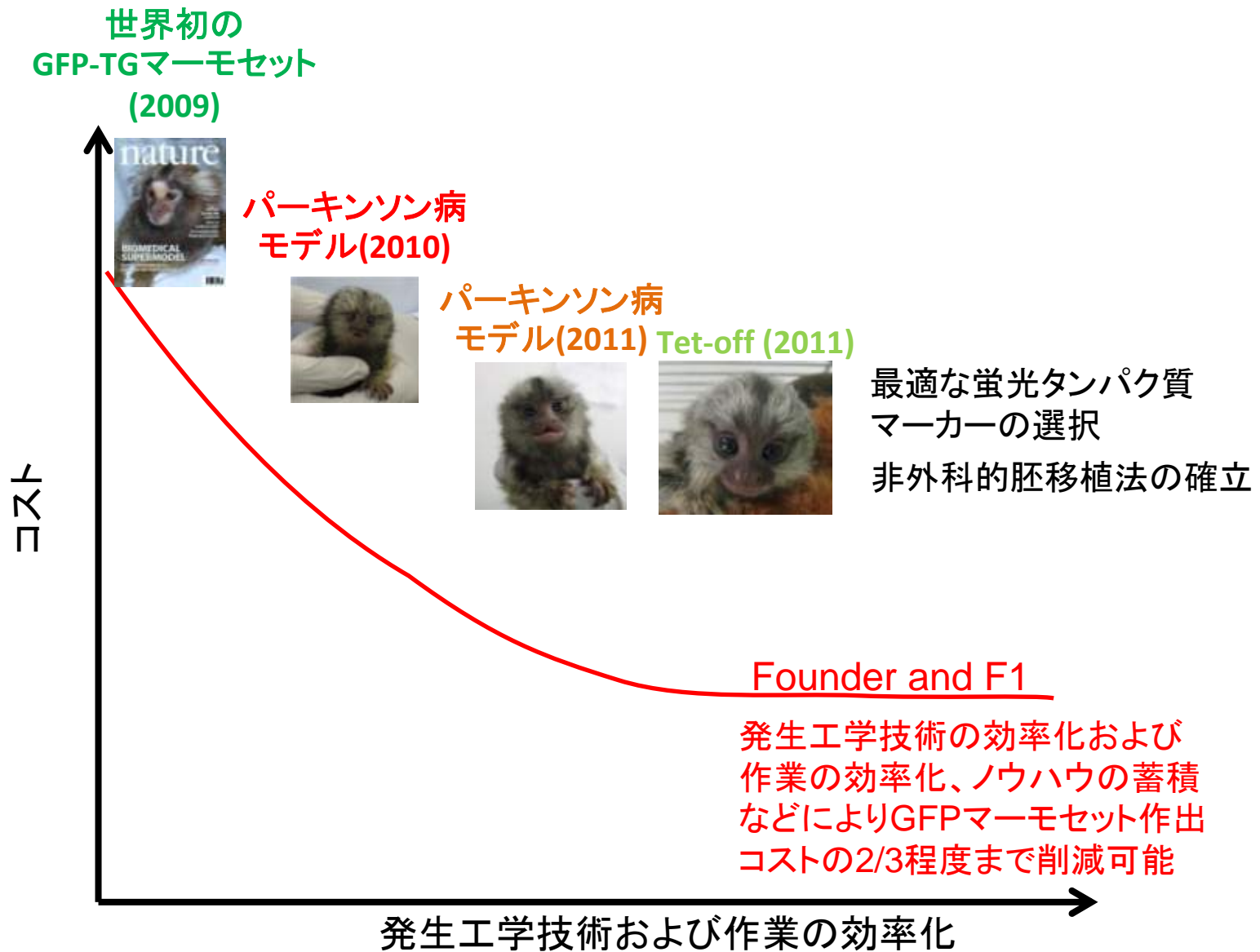


生まれてきた個体の生存率を
上げることで作出効率を上げる

外部(自宅や携帯)から監視

| 駆けつけ | 出産のべ数 | 駆けつけ回数 | 問題なし(親保育) | 問題あり(人工保育) | 「問題あり」のうち 生存/死亡 |
|------|-------------|--------|----------------|--------------|--------------------|
| なし | 17 (24匹) | - | 12出産数 (16匹) | 5出産数 (3匹) | 生存2匹 死亡5匹 |
| あり | 7 (9匹) | 7 | 3出産数 (5匹) | 4出産数 (4匹) | 生存4匹 死亡0匹 |

TGマーモセット作出のコストダウン計画



遺伝子改変マーマーモセット技術の新展開

- 神経精神疾患モデル動物の作成とそれを用いた前臨床研究・創薬研究とその普及
- 脳科学に役に立つTGマーマーモセットTet-Offラインの開発とそれを用いた神経回路遺伝学の実施
- 人工核酸ヌクレアーゼを用いたノックイン, ノックアウト技術の開発(本年度中)
- TGマーマーモセット作出の効率化とコストダウン
- TGマーマーモセット作成技術の普及とuserの爆発的拡大