

2024年8月31日  
公益財団法人実中研  
国立研究開発法人理化学研究所

## ゲノム編集技術によるヘテロ接合型でのエクソン欠損霊長類の作製に成功 — アルツハイマー病の病態解析、新薬開発の貢献に期待 —

### <概要>

日本医療研究開発機構・革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトの一環として、公益財団法人実中研 マーモセット医学生物学研究部の佐々木 えりか部長ら、国立研究開発法人理化学研究所(理研) 脳神経科学研究センター神経老化制御研究チームの西道 隆臣チームリーダーら、理研 生命医科学研究センター応用ゲノム解析技術研究チームの岡崎 康司チームリーダーら、国立大学法人 広島大学統合生命科学研究科分子遺伝学研究室 山本 卓教授らは、ゲノム編集技術を用いて一部の家族性アルツハイマー病患者で認められる9番目のエクソン<sup>(注1)</sup>を欠失した Presenilin 1 (*PSEN1*) 遺伝子を持つ小型霊長類コモンマーモセットの作製に成功しました。霊長類における人為的なエクソン欠損は世界で初めての報告であり、この技術開発により、特定のエクソンだけをヘテロ接合型<sup>(注2)</sup>に除去する事が可能になりました。今後、遺伝性疾患やエクソン欠損に関連する様々な疾患研究に利用可能です。また、本研究で見出した初代動物において目的とする遺伝子改変を持つ動物を効率的に得る方法は、目的外の遺伝子改変動物を作らない、使用動物数を削減するなど実験動物の福祉において重要な3Rの原則<sup>(注3)</sup>の促進にも繋がります。さらに、本研究で作製された変異型 *PSEN1* マーモセットは、ヒトの家族性アルツハイマー病患者の遺伝子型や生化学的特徴を忠実に再現していることから、今後アルツハイマー病の発生病序や病態の解明、新薬の開発などへの貢献が期待されます。

本研究成果は、2024年8月30日(英国時間16時)発行の科学雑誌 LabAnimal 誌に掲載されます。

本成果は、主に以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

#### 日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明

研究課題名: 「神経変性疾患モデルマーモセット開発と新規発生工学技術の開発研究」

研究代表者: 佐々木 えりか(公益財団法人 実中研 マーモセット医学生物学研究部 部長)

研究期間: 2019年7月~2024年3月

#### 研究課題名: 「アルツハイマー病マーモセットモデル作出と解析」

研究代表者: 西道 隆臣(国立研究開発法人 理化学研究所 脳神経科学研究センター チームリーダー)

研究期間: 2019年7月~2024年3月

### <研究成果のポイント>

- ・ 霊長類の遺伝子の特定のエクソンを欠損させることに初めて成功した。
- ・ ヘテロ接合型に遺伝子を改変する技術確立により着床不全を回避する事が可能となった。
- ・ 作製した動物はアルツハイマー病の克服に貢献することが期待される。

### <研究の背景と経緯>

遺伝子改変マウスは、遺伝子機能の解析や疾患の発症メカニズムの解明などライフサイエンス研究分野に多くの貢献をしてきましたが、マウスとヒトは解剖学的、生理学的な相違が多く、研究成果を直接ヒトに当てはめられない場合もあります。本研究でゲノム編集を行った *PSEN1* 遺伝子は、ヒトの遺伝性疾患である家族性早期発症型アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子とされており、発症患者の一部では *PSEN1* 遺伝子の 9 番目のエクソンの欠損 (*PSEN1*- $\Delta E9$ ) が報告されています。この疾患は基本的に両親のどちらかが変異型の *PSEN1* 遺伝子を一对持っており、その子供は父親、母親それぞれから1つずつ遺伝子を受けつづることから 25%の確率でアルツハイマー病を発症します。したがってこの病気をゲノム編集した胚から生まれた個体で再現する場合は、オスまたはメスのいずれか一方の遺伝子を改変する必要があります。本研究では霊長類においてメスの遺伝子だけで特定のエクソンを除去する方法を開発しました。

### <研究の内容>

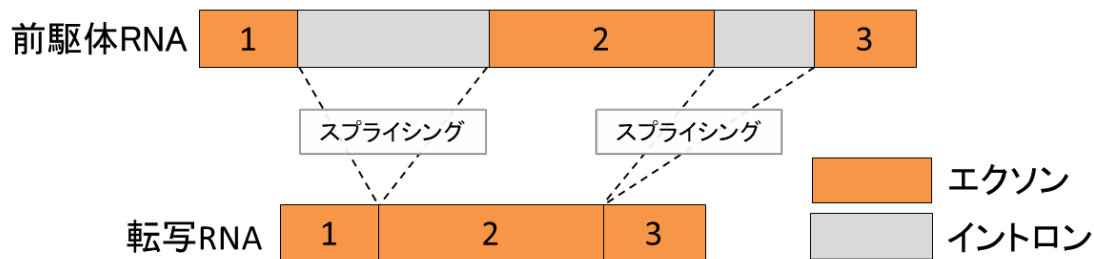
今回の研究ではマーモセットの *PSEN1* 遺伝子の 9 番目のエクソンのスプライシング(図1A)に関与する遺伝子配列を破壊するゲノム編集ツールを設計し(図1B)、マーモセットの受精卵にゲノム編集を行うと着床不全となる事が示されました。ヒトの FAD 患者さんでは、片アレル<sup>(注4)</sup>のみが *PSEN1*- $\Delta E9$  遺伝子を持つことから、両アレルで変異型 *PSEN1* 遺伝子を持つと、受精卵が正常に着床しない事が示唆されました。そこでマーモセットの卵子の *PSEN1* 遺伝子のゲノム編集を行い、野生型の精子で人工授精した受精卵を(図2A) 仮親のマーモセット子宮内に移植することで 5 頭の初代動物が生まれました(図2B)。遺伝子解析により、これら 5 頭は、正常な *PSEN1* と変異型 *PSEN1* をおよそ半数ずつ持つこと(図1C)、また、生理的性質(表現型)の解析では、アルツハイマー病の発症のリスクといわれているアミロイド $\beta$  42<sup>(注5)</sup>が血液中で高いこと(図3)、アミロイド $\beta$  産生に重要な役割を果たしている *PSEN1* の自己タンパク分解の異常が示されました。また、性成熟に至った動物の配偶子(精子、卵子)を用いた次世代動物の作製を実施し、初代動物が持つ変異型 *PSEN1* が次世代の動物に正確に遺伝することも明らかにしました。

### <今後の展開>

本研究で開発した遺伝子改変方法は、霊長類に限らず様々な実験動物を用いた遺伝性疾患やエクソン欠損に関する研究に利用可能です。特に初代動物において目的とする動物を得られるという点は、動物福祉において重要である 3R の原則の促進にも繋がります。また本研究で作製された変異型 *PSEN1* マーモセットについては、現在も多角的な解析を続けており、今後アルツハイマー病を発症すれば病気の克服に向けた優れた疾患モデル動物となることが期待されます。

【参考図】

A



B

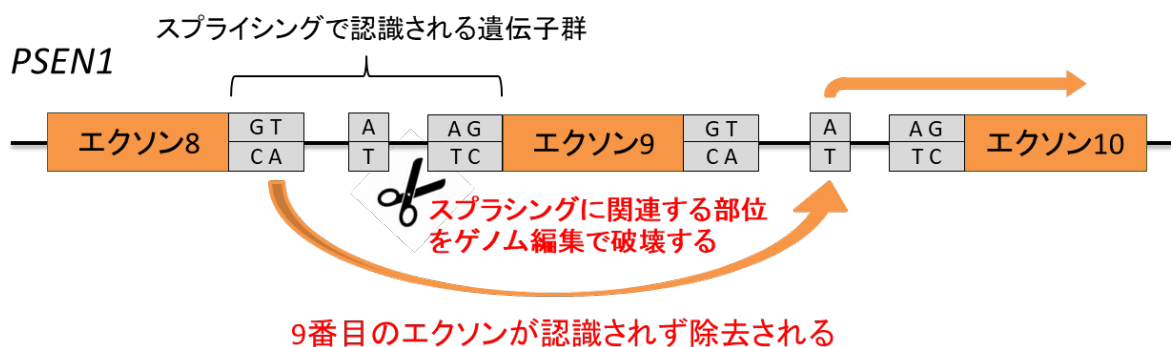


図1 遺伝子のスプライシング機構と本研究の実験計画

(A) ゲノム上の遺伝子はタンパク質の amino 酸情報を含むエクソンとそうでないイントロンが連続して存在する。遺伝子がタンパク質に翻訳される際にはエクソンだけがスプライシングによって切り出され、エクソンだけが整列した状態となる。(B) スプライシングはイントロン上の特定の遺伝子配列を認識して起こる。本研究では *PSEN1* の 9 番目のエクソンのスプライシングに関わる遺伝子配列をゲノム編集で破壊することを計画した。

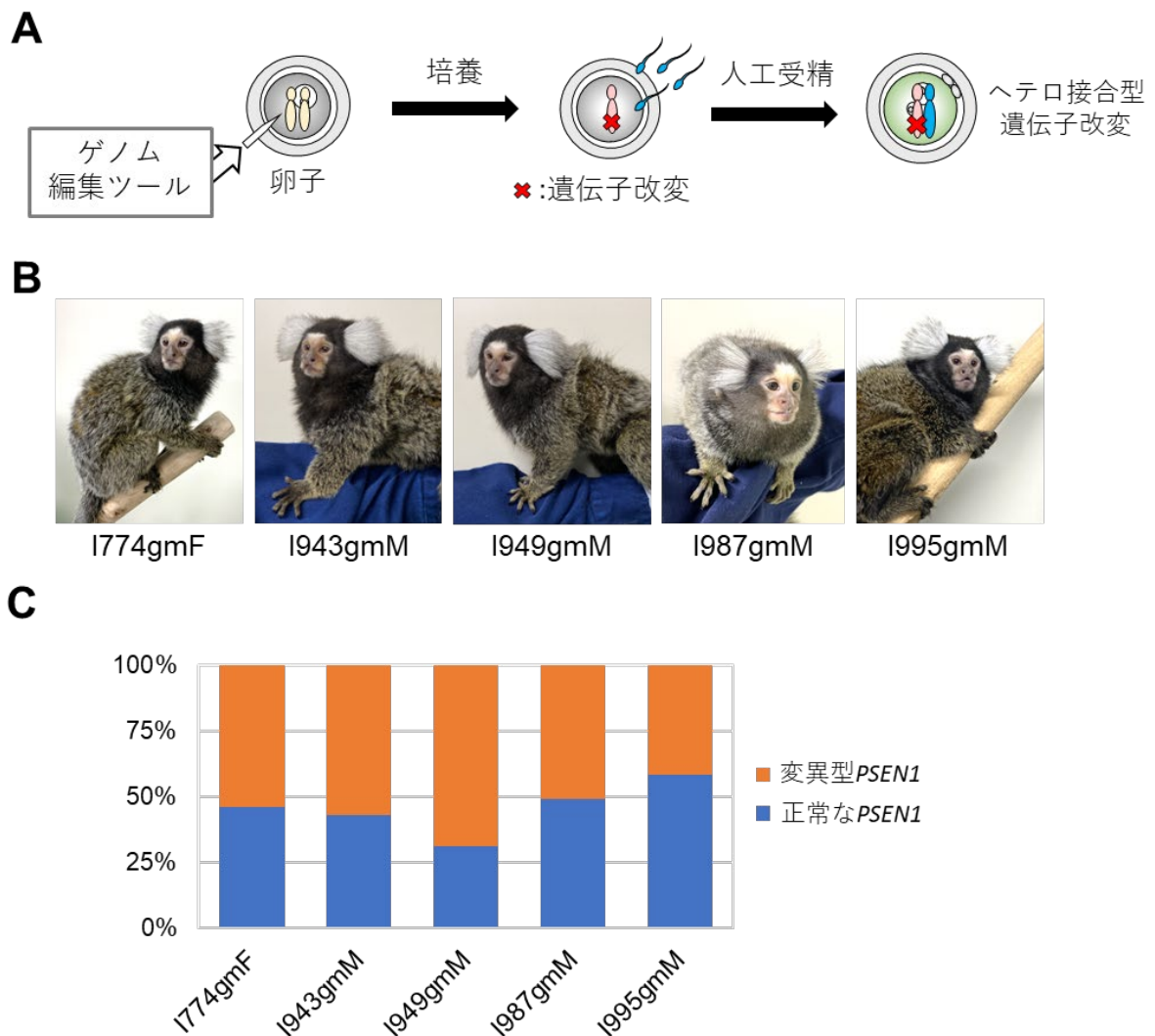


図2 実験の模式図と作製した初代動物

(A) マーモセットの卵子をあらかじめゲノム編集し、その後野生型の精子で人工授精を実施することで、ヘテロ接合型の受精卵を高効率で得ることができる。(B) 獲得された5頭の初代動物。(C) 獲得された動物では正常な *PSEN1* と変異型 *PSEN1* をおよそ半数ずつ持つことが示された。

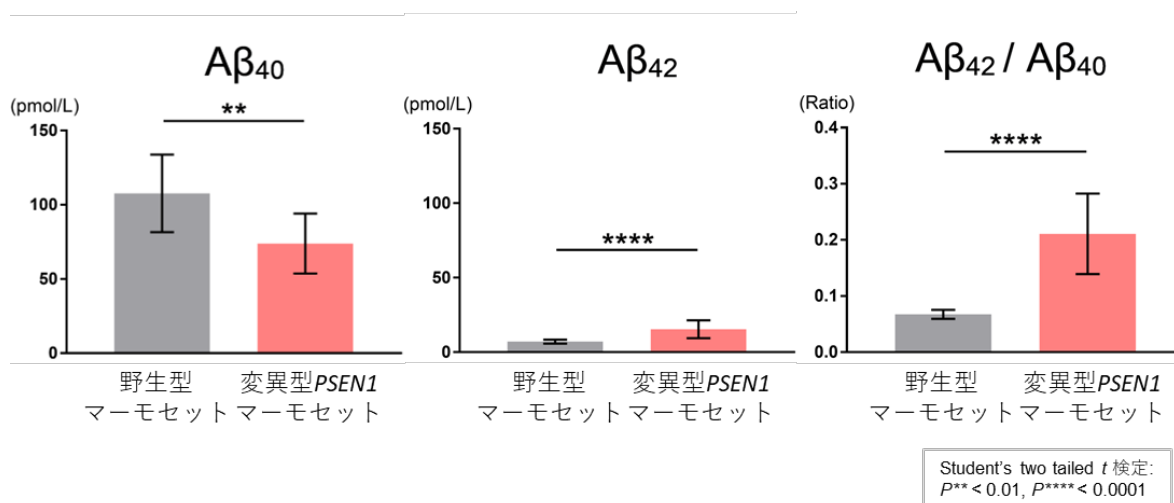


図3 血液中のアミロイドβの測定結果

野生型と変異型 *PSEN1* マーモセットの血液中のアミロイドβを比較したところ、変異型 *PSEN1* マーモセットでは脳の中で固まりやすいとされるアミロイドβ 42 の割合が非常に高くなっていることが示された。

#### <論文情報>

雑誌名: LabAnimal

題名: Production of a heterozygous exon skipping model of common marmosets using gene-editing technology

著者名: 佐藤賢哉、笹栗弘貴、汲田和歌子、佐久間哲史、盛岡朋恵、永田健一、井上貴史、黒滝陽子、三平尚美、田上道平、眞鍋理一郎、尾崎心、岡崎康司、山本卓、末松誠、西道隆臣、佐々木えりか

DOI: 10.1038/s41684-024-01424-0.

#### <用語解説>

(注1) エクソン

真核生物の DNA の中でタンパク質合成に必要な遺伝情報が書かれている部分。

(注2) ヘテロ接合型

二倍体である生物で相同な遺伝子座の遺伝子で異なる対立遺伝子が対になっている状態。本研究で例えると変異 *PSEN1* と正常 *PSEN1* が対になっている状態。

(注3) 3R の原則

動物実験適正化の国際原則で、Replacement (代替法の利用)、Reduction (使用数の削減)、Refinement (苦痛の軽減) の頭文字の 3 つの R から「3R の原則」と呼ばれる。

(注4) アレル (対立遺伝子)

二倍体の生物は、それぞれ父、母から一対ずつ染色体を受け取る。その染色体の相同な遺伝子座にある遺伝子に遺伝子変異などの違いがある場合、その個々の遺伝子を指す。

(注5) アミロイドβ 42

アミロイドは水に溶けない繊維状のタンパク質で、多くはアミロイド 40 として体内に存在するが、アミロイド β 42 は特に脳の中で固まりやすくアルツハイマー発症の因子とされている

<問合せ先>

■ 研究に関する問合せ

公益財団法人実中研 マーモセット医学生物学研究部 部長

佐々木 えりか(ささき えりか)

Tel:044-201-8545、E-mail: esasaki@ciea.or.jp

国立研究開発法人理化学研究所 脳神経科学研究センター 神経老化制御研究チーム チームリーダー

西道 隆臣(さいどう たかおみ)

Tel:090-3497-2650 Fax:048-467-9716

E-mail: takaomi.saido@riken.jp

■ 報道に関する問合せ

公益財団法人 実中研 広報室

〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-12

Tel:044-201-8516 E-mail: pr-office@ciea.or.jp

国立研究開発法人理化学研究所

Tel:050-3495-0247 E-mail: ex-press@ml.riken.jp