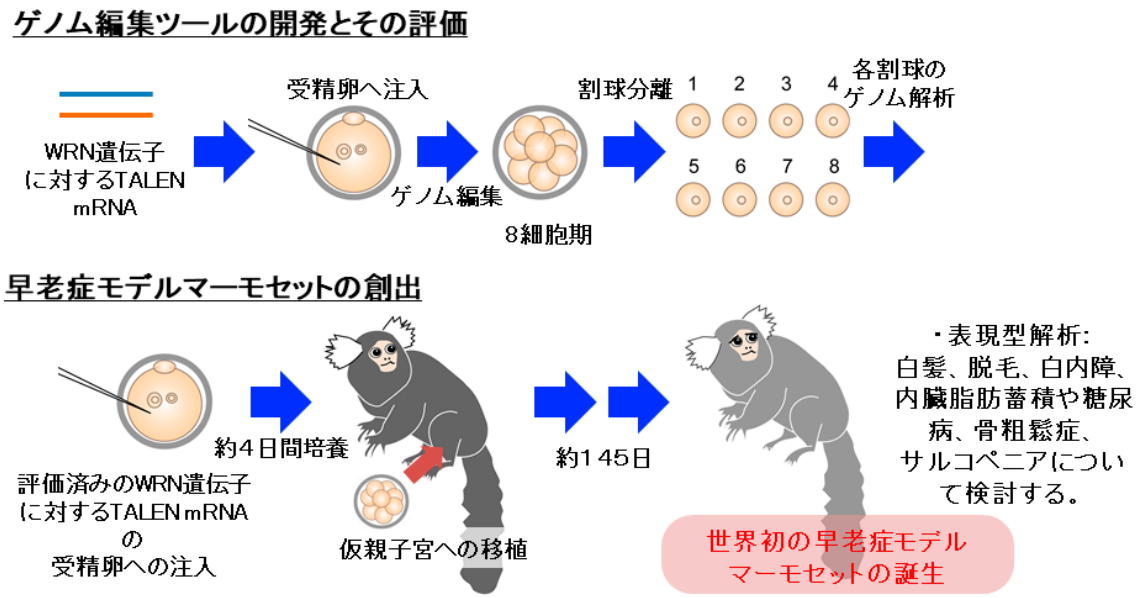
71　遺伝子改変霊長類を用いた老化促進病態の解明と応用	横手　幸太郎

【目的】ヒトには、遺伝的早老症と呼ばれる疾患群があり、白髪・脱毛や白内障、皮膚の萎縮など、各種の老化症候が暦年齢に比べて早発し促進されることが知られている。中でも常染色体劣性遺伝の Werner 症候群（以下、WS と略）は、成人期に老化が促進される accelerated aging syndrome の代表であり、糖尿病や動脈硬化、骨髄異形成症候群など、一般集団でも加齢とともに好発する疾病を早期から高頻度に合併する。したがって、WS の病態解明は、この難病に革新的治療法をもたらすのみならず、ヒト老化機序全般の理解や介入手法開発に大きな手掛かりを与えると期待されている。本疾患は、RecQ 型 DNA ヘリケース *WRN* の遺伝子変異を原因とすることが示されているものの、そのノックアウト（KO）マウスは何ら早老形質を示さないため、齧歯類をはじめ病態解明研究に用いることのできる動物モデルが存在しない。ところが、近年のゲノム編集技術を用い、非ヒト霊長類マーモセットの遺伝子を改変して KO モデルを作製することが日本国内で可能となった。そこで我々は、*WRN* 遺伝子を欠損した老化促進マーモセットモデルを世界に先駆けて開発、その形質と分子病態を解明することを研究の目的とした。

【方法】ヒト／マーモセット共通配列を標的とした WRN TALEN を設計し、その活性を *in vitro* および *in vivo* で検証、マーモセット受精卵への TALEN mRNA 注入と割球におけるゲノム解析を行うとともに、移植へ向けたゲノム編集受精卵の作製と仮親マーモセットの準備を行った。

【結果】マーモセット *WRN* 遺伝子のノックアウトを目的として、Exon 2、3 を標的とした TALEN をそれぞれ 2 セットずつ設計した。構築した WRN TALENs を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に回収して遺伝子の変異解析を行ったところ、2 種類の TALEN Ex2A および Ex3A が高活性を示すことが分かった。続いて、TALEN mRNA をマーモセットの受精卵へ注入し、8 細胞期において割球を分離、Surveyor アッセイと sequence 解析でゲノム解析を実施した結果、Ex2A に *WRN* 遺伝子の編集が確認された。すなわち、*WRN*Exon2 に対する TALEN を用いることで、高効率・低毒性のゲノム編集ツールの開発を完了できたと考えられる。2020 年 4 月現在、新型コロナウイルス感染症の影響により研究遂行に制約があるものの、実験動物中央研究所との連携を通じて、移植用ゲノム編集受精卵の作製と移植対象となる仮親マーモセットの準備を進めている。研究再開の暁には、仮親子宮への受精卵移植を実施し、個体を得て、その表現型解析を実施する計画である。

WRN 遺伝子ノックアウトマーモセットの作製と解析を通じた老化病態の解明



71. 遺伝子改変霊長類を用いた老化促進病態の解明と応用

横手　幸太郎

千葉大学 大学院医学研究院 内分泌代謝・血液・老年内科学

Key words：早老症，erner 症候群，WRN，マーモセット，老化

緒　言

超高齢社会を迎え健康長寿の実現が喫緊の課題とされる我が国で、老化メカニズムの解明とその制御はブレイクスルーをもたらしうる。近年、基礎老化研究は、細胞や線虫・マウスなどの動物モデルを対象に国内外で盛んに行われてきた。しかし、ヒトとは生理学的・解剖学的な差異が大きく、寿命も異なるため、老化研究の生物学的知見を既存のモデル動物から「人間へと応用」できた事例はほとんどない。

ヒトには、遺伝的早老症と呼ばれる疾患群があり、白髪・脱毛や白内障、皮膚の萎縮など、各種の老化症候が暦年齢に比べて早発し促進されることが知られている。中でも常染色体劣性遺伝の Werner 症候群（以下、WS と略）は、成人期に老化が促進される accelerated aging syndrome の代表であり、糖尿病や動脈硬化、骨髄異形成症候群など、一般集団でも加齢とともに好発する疾病を早期から高頻度に合併する［1］。したがって、WS の病態解明は、この難病に革新的治療法をもたらすのみならず、ヒト老化機序全般の理解や介入手法開発に大きな手掛かりを与えると期待されている。本疾患は、RecQ 型 DNA ヘリケース *WRN* の遺伝子変異を原因とすることが示されているものの、そのノックアウトマウスは何ら早老形質を示さない（no phenotype）ため、齧歯類をはじめ病態解明研究に用いることのできる動物モデルが存在しない。ちなみに、ノックアウトマウスが phenotype を示す早老症としては Hutchinson-Gilford Progeria 症候群が知られているが、小児期に発症するいわば発育障害（premature aging）であり、また、細胞障害性タンパク産物 progerin の発現による細胞障害を原因とするため、一般の “老化” への応用が困難である。

WS は常染色体劣性遺伝による希少難病であり、世界の症例の 6 割以上を日本人が占めるという特徴を持つ。我々は、日本国内に多い WS 患者を苦しみから解放し、その研究から得られる新たな知見を世界へ発信すべくこれまで取り組んできた。2009 年から厚生労働省難治性疾患克服研究事業（現政策研究事業）により WS の全国疫学調査を実施、25 年ぶりの診断基準改訂と世界初の診療ガイドライン策定を行なった［2］。この過程で WS 患者家族会を組織し、 2014 年に同疾患の難病指定を実現した。2015 年からは AMED 難治性疾患実用化研究事業により WS の疾患レジストリーを構築、自然歴の調査や新規薬剤候補を用いた臨床試験にも着手している。

一方、前述のように原因遺伝子 *WRN* のノックアウトマウスが早老を示さないため、WS には未だ好適なモデル動物がなく、病態解明の大きな妨げとなっている。原因機序解明の一助として、AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラムの支援により、WS から採取した末梢血幹細胞へセンダイウイルスを用いた疾患 iPS 細胞を樹立、細胞レベルでのメカニズム解明研究が開始されたが、“個体” レベルでの病態解明の手掛かりにはならない［3，4］。すなわち、早老症研究には、好適な動物（個体）モデルの存在しないことが最大の弱点として残されている。そのような中、近年のゲノム編集技術を用い、非ヒト霊長類コモンマーモセット（以下、マーモセットと略）の遺伝子を改変してノックアウトモデルを作製することが日本国内で可能となった［5］。

そこで我々は、*WRN* 遺伝子を欠損した老化促進マーモセットモデルを世界に先駆けて開発し、その形質と分子病態を解明、究極的には我が国が世界をリードする早老症の臨床研究の知見と融合、ヒトの老化や加齢関連疾患の機序解明と新規治療法開発につながる知見を得ることを目的に本研究を計画した。

方　法

1.　ヒト／マーモセット共通配列を標的とした WRN TALEN の設計

ヒトと 88.6%の相同性を有するマーモセット *WRN* 遺伝子をノックアウトするため、Exon 1～3 の間で TALEN の設計を試みた。実験上、ヒト細胞での評価を可能にするため、ヒトとマーモセットに共通する配列上で検討し、これらの基準を満たす TALEN として、Exon 2 に 2 セット（Ex2A、Ex2B）と Exon 3 に 2 セット（Ex3A、Ex3B）を設計した。

2.　WRN TALEN の活性の検証

構築した WRN TALENs を（Ex2A、Ex2B、Ex3A、Ex3B の計 4 種）HEK293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に回収ののち、GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit を用いて *WRN* 遺伝子の変異解析を行った。

3.　マーモセット受精卵への TALEN mRNA 注入と割球におけるゲノム解析

In vitro で活性を認めた TALEN mRNA を選択してマーモセットの受精卵へ注入、培養ののち、8 細胞期に割球を分離した。これらの各割球を対象に、Surveyor アッセイおよび sequence 解析を用いてゲノム解析を実施した。

4.　移植へ向けたゲノム編集受精卵の作製と仮親マーモセットの準備

活性を確認した TALEN mRNA を用いて移植用の受精卵にゲノム編集とともに移植対象となる仮親マーモセットの準備を行う。

結　果

1.　ヒト／マーモセット共通配列を標的とした WRN TALEN の設計

マーモセット *WRN* 遺伝子のノックアウトを目的として、Exon 1～3 の範囲に対象を定め、また、*in vitro* での実験上、ヒト細胞を用いたでの評価を可能にするため、ヒトとマーモセットに共通する配列上で検討を行なった。これらの条件を満たす TALEN として、Exon 2 に 2 セット（Ex2A、Ex2B）と Exon 3 に 2 セット（Ex3A、Ex3B）を設計した。図 1 にヒトとマーモセットの *WRN* 遺伝子の alignment と TALEN の標的配列を示す。

```
緑色マーカー：Ex2A TALEN
黄色マーカー：Ex3A TALEN

>Exon 2
Query  1         GCATGTGTTCAGAAGAGTGTTTTTGAAGATGACCTCCCATTCTTAGAATTCGCTGGATCC  60
                 |||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||
Sbjct  31059153  GCATGTGTTCGGAAGAGTGTTTTTGAAGATGACCTCCCCTTCTTAGAATTCACTGGATCC  31059212

Query  61        ATTGTGTATAGTTATGAAGCTAGTGATTGCTCTTTCCTGTCAGAAGATATTAG  113
                 ||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 31059213   ATTGTGTATAGTTACGATGCTAGTGATTGCTCTTTCCTGTCAGAAGATATTAG  31059265

>Exon 3
Query  1         CATGAGTCTATCAGATGGGGAGATGGTGGGATTTGACATGGAGTGGCCACCAGTATACAA  60
                 ||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  31064289  CATGAGTCTATCAGATGGGGATGTGGTGGGATTTGACATGGAGTGGCCACCATTATACAA  31064348

Query  61        TAAAGGGAAACTTGGCAAAGTTGCACTAATTCAGTTGTGTGTGTCTGAGAGCAAATGTTA  120
                 || ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  31064349  TAGAGGGAAACTTGGCAAAGTTGCACTAATTCAGTTGTGTGTTTCTGAGAGCAAATGTTA  31064408

Query  121       TTTGTTCCACATTTCTTCCATGTCAG  146
                  ||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  31064409  CTTGTTCCACGTTTCTTCCATGTCAG  31064434
```

図 1.　ヒトおよびマーモセットの *WRN* 遺伝子の alignment と設計した TALEN の標的配列

2.　WRN TALEN の活性の検証

構築した WRN TALENs を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に回収して *WRN* 遺伝子における変異解析を行ったところ、Ex2A、Ex3A TALEN を用いた細胞で明確な切断バンドが確認され、これら 2 種類の TALEN が高活性を示すと考えられた（図 2）。

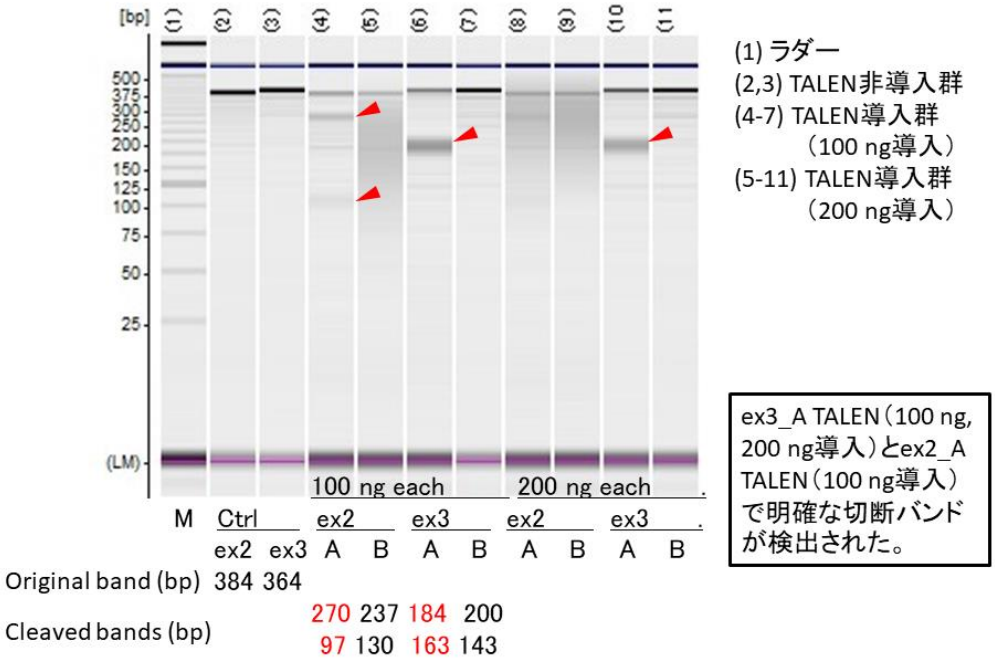


図 2.　ヒト培養細胞を用いた WRN TALEN の活性検証

3.　マーモセット受精卵への TALEN mRNA 注入と割球におけるゲノム解析

In vitro で活性を認めた Ex2A ならびに Ex3A TALEN mRNA をマーモセットの受精卵へ注入し、培養ののち、8 細胞期において割球を分離した。これら各割球に対して、Surveyor アッセイおよび sequence 解析によりゲノム解析を実施した結果、Ex2A を用いた場合に、いずれの割球でも、前述の *in vitro* 解析と同様 *WRN* 遺伝子の編集が確認された。すなわち、WRN Exon2 に対する TALEN を用いることで、高効率・低毒性のゲノム編集ツールの開発を完了できたと考えられる（図 3）。

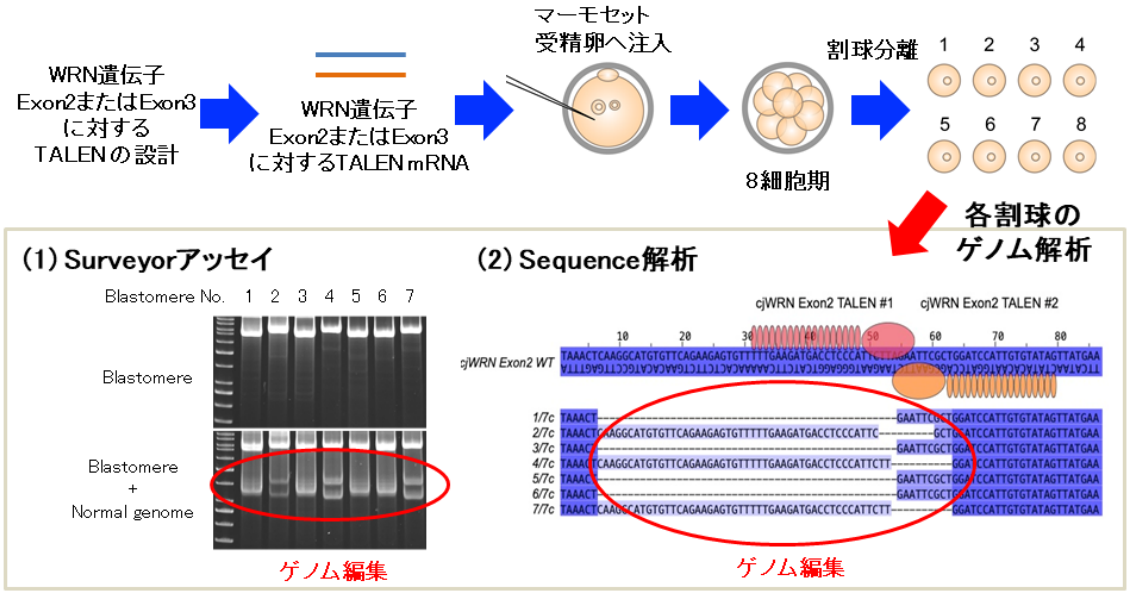


図 3.　Exon2 に対する TALEN を用いたマーモセット受精卵の割球におけるゲノムに編集の確認

3. 移植へ向けたゲノム編集受精卵の作製と仮親マーモセットの準備

実験動物中央研究所との連携により、移植用ゲノム編集受精卵の作製と移植対象となる仮親マーモセットの準備を進めている。新型コロナウイルス感染症に伴う研究活動の縮小が解除され次第、仮親子宮への胚移植を実施する計画である。

考　察

今回、我々は、マーモセットの *WRN* 遺伝子を標的とした TALEN を設計し、その活性を *in vitro* および *in vivo* で検証、マーモセット受精卵への TALEN mRNA 注入と割球におけるゲノム解析を行うとともに、移植へ向けたゲノム編集受精卵の作製と仮親マーモセットの準備を行った。

マーモセット *WRN* 遺伝子のノックアウトを目的として、Exon 2、3 を標的とした TALEN をそれぞれ 2 セットずつ設計し、HEK293T 細胞を用いた *in vitro* の活性スクリーニングを経て、マーモセット受精卵への注入を行った。その結果、Exon 2 を対象とした TALEN により、8 細胞期の割球すべてで *WRN* 遺伝子の編集が確認された。すなわち、高効率・低毒性のゲノム編集ツールの開発を完了できたと考えられる。新型コロナウイルス感染症の影響による研究遂行の制約が解除され次第、仮親マーモセット子宮への受精卵移植を開始し、個体を得て、その表現型解析を実施する計画である。

ヒトの代表的な遺伝的早老症として知られる WS は、RecQ 型 DNA ヘリケース *WRN* の遺伝子変異を原因とすることが明らかにされているものの［6］、そのノックアウトがマウスが何ら早老形質を示さないため、齧歯類をはじめ病態解明研究に用いることのできる動物モデルが存在しない。*WRN* 遺伝子変異がマウスで早老を示さない理由としては、1. 霊長類に比べてマウスのテロメア長が長いこと（テロメア短縮下においてのみ WRN 欠損による異常形質が表出する）や 2. マウス組織では他の RecQ ファミリーのヘリケースが WRN の機能を代償する可能性、3. ヒトに比べてマウスは短命であるため、早老症候を示す前に死を迎えてしまう可能性などが指摘されている。ヒトに近い霊長類モデルでは、これらマウスの不完全性を補うことができ、ヒトの老化促進病態を模した世界初の動物モデルを創出できる可能性が高い。

非ヒト霊長類を用いた遺伝子改変モデルとしては、カニクイザルなどの研究が世界的にも進んでいるが、未だ WS のモデルは報告されておらず、また、仮に病態を再現できたとしても、比較的長寿命であるが故に年余の観察を必要とすることが予想される。一方、マーモセットは性成熟が早く寿命もより短いため、早老症候をより早期に検出することができる。また、遺伝子改変マーモセットモデルは実験動物中央研究所の佐々木らにより世界に先駆けて開発されたため［5］、我が国にアドバンテージがあり、共同研究により高い国際競争力をもって研究を推進することが可能である。

WS は、糖尿病や動脈硬化、骨髄異形成症候群など、一般の集団においても加齢に伴って好発する疾病を早期から高頻度に合併する。したがって、WS の病態解明は、この難病に革新的治療法をもたらすのみならず、ヒト老化機序全般の理解や介入手法開発に大きな手掛かりを与えると期待される。さらに、早老症に見られる老化徴候は segmental aging とも呼ばれ、全身に万遍なく発現するというより、より症状の出やすい臓器がある。WS の場合には、間葉系の組織に特異的に老化やがん化を呈しやすい。また、WS は患者のほとんどが日本人であるという特徴を有し、臨床診断や治療に精通した医師・研究者がほぼ日本国内にしか存在しない。したがって、マーモセットモデルが期待通りに早老症候を呈した場合、それを鋭敏かつ正確に検出し、ヒト患者の症状と照合して研究を深化させる得るバックグラウンドが海外には乏しく、日本が圧倒的なオリジナリティを発揮できる研究課題といえる。

今後、仮親子宮への受精卵移植を経て、*WRN* ノックアウト個体が得られた暁には、白内障や体毛変化（白化や脱毛）、皮膚の硬化と萎縮、創傷治癒能低下、サルコペニア、内臓脂肪蓄積、骨塩量低下、インスリン抵抗性と耐糖能障害、悪性腫瘍の出現、軟部組織の異所性石灰化、原発性性腺機能低下症などヒト WS に見られる各種早老徴候の発現を検討する計画である。また、NAD（ニコチナミド・アデニン・ジヌクレオチド）前駆物質や mTOR 阻害薬、senolytics（老化抗原除去薬）として知られる Bcl-2 阻害薬など、抗加齢作用が期待されるものの、ヒトでは直接老化遅延効果の検証が難しい化合物の寿命延長や早老症候発現遅延効果をマーモセットモデルを用いて解析したい。

このように、遺伝子改変霊長類モデルの確立を通じて早老症における老化促進病態を解明し、ひいてはヒトの一般的老化や加齢に伴い増加する疾患の病態解明と新規治療法開発への応用に結び付けたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院医学研究院内分泌代謝・血液・老年内科学教室の前澤善朗講師ならびに実験動物中央研究所 Tg マーモセット作製チームの黒滝陽子室長である。

文　献

1) Yokote K, Chanprasert S, Lee L, Eirich K, Takemoto M, Watanabe A, Koizumi N, Lessel D, Mori T, Hisama FM, Ladd PD, Angle B, Baris H, Cefle K, Palanduz S, Ozturk S, Chateau A, Deguchi K, Easwar TK, Federico A, Fox A, Grebe TA, Hay B, Nampoothiri S, Seiter K, Streeten E, Piña-Aguilar RE, Poke G, Poot M, Posmyk R, Martin GM, Kubisch C, Schindler D, Oshima J. WRN Mutation Update: Mutation Spectrum, Patient Registries, and Translational Prospects. Hum Mutat. 2017 Jan;38(1):7-15. doi: 10.1002/humu.23128.

2) Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, Tanaka Y, Miki T, Yokote K Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. Geriatr Gerontol Int. 2013 Apr;13(2):475-81. doi: 10.1111/j.1447-0594.

3) Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H, Koyama H, Shimizu T, Takemoto M, Yokote K, Goto M, Tahara H. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. PLoS One. 2014 Nov 12;9(11):e112900. doi: 10.1371/journal.pone.0112900.

4) Fang EF, Hou Y, Lautrup S, Jensen MB, Yang B, SenGupta T, Caponio D, Khezri R, Demarest TG, Aman Y, Figueroa D, Morevati M, Lee HJ, Kato H, Kassahun H, Lee JH, Filippelli D, Okur MN, Mangerich A, Croteau DL, Maezawa Y, Lyssiotis CA, Tao J, Yokote K, Rusten TE, Mattson MP, Jasper H, Nilsen H, Bohr VA. NAD+ augmentation restores mitophagy and limits accelerated aging in Werner syndrome. Nat Commun. 2019 Nov 21;10(1):5284. doi: 10.1038/s41467-019-13172-8.

5) Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. Nature. 2009 May 28;459(7246):523-7. doi: 10.1038/nature08090.

6) Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. Science. 1996 Apr 12;272(5259):258-62. doi: 10.1126/science.272.5259.258. PMID: 8602509