

ヒト型オキシトシン受容体遺伝子を持つマウスの作成

西森克彦（代表研究者） 東北大学農学研究科・分子生物学分野教授

東田陽博（共同研究者） 金沢大学子どものこころの発達研究センター相互認識機能研究基礎部門教授

横山 茂（共同研究者） 金沢大学子どものこころの発達研究センター自閉症遺伝子研究部門教授

<要 旨>

オキシトシン受容体(OXTR)遺伝子は、動物やヒトの向社会行動を制御する脳内神経修飾因子のオキシトシンに対する受容体をコードする物として知られていたが、近年の研究から、OXTR 遺伝子の変異と自閉症発症の関係が疑われている。本研究は、共同研究者の東田博士、横山博士が自閉症患者より得た変異型 OXTR 遺伝子の生理機能をマウス個体を用いて明らかにしようという計画の一環として、正常ヒト型 OXTR 遺伝子を cDNA として、その OXTR 遺伝子領域へ挿入したマウスの作成を行った。

CRISPR/Cas9 法マウス OXTR 遺伝子に対して動作するか、まずマウス ES 細胞を用いて実践し、OXTR 遺伝子の破壊を確認した。この方法を、マウス受精卵に対し適用し現在も作成を続行している。

<キーワード>

オキシトシン受容体、自閉症スペクトラム障害、CRISPR/Cas9

<はじめに>

本研究は、これまで行ってきたマウスのオキシトシン受容体 (OXTR) を中心としたモデル疾患動物研究を、ヒト由来遺伝子の行動生理学的解析に応用しようとする初めての試みであります。この研究の進展により、今後我々の研究を精神疾患研究、特に自閉症スペクトラム障害の遺伝子・神経基盤研究領域でより拡大し、又当該領域への貢献を期待できるものと考えております。本研究助成金による援助を戴いた明治安田こころの健康財団と、諸関係者の皆様には、このご支援に対し、心よりお礼申し上げます。

<研究計画の背景>

1-1. モデルマウス作成によるOXT・オキシトシン受容体系機能の解明

オキシトシン (OXT) はGPCRのオキシトシン受容体 (OXTR) を介し分娩や射乳誘導能を持つとされていたが、代表研究者の西森は初めてオキシトシン遺伝子KOマウスを作成し1996年に発表した(1)。また2005年には世界で初めて作成したOXTR遺伝子KOマウスの解析結果を報告した(2)。これらの研究を通じてOXTR遺伝子を発現する脳内神経系が社会記憶行動(2,3)に代表される同種個体同士の行動、社会行動を制御している事が見出された。オキシトシン遺伝子欠損マウスやOXTR遺伝子欠損マウスから見出されたOXT・受容体系は社会行動の制御に関係していると考えられてきた。特に、同種個体間で互いの生存環境を擁護促進し相手や集団の利益の為となるような社会行動を向社会行動(prosocial behaviors)とも呼び、

子育て行動（母性行動）(2) や社会的緩衝作用（social buffering）(4)、共感性、ペア形成行動（pair bonding、特定の雄雌が長期間にわたって固い結束をもったペアを形成する行動；米国原産の平原ハタネズミ；prairie voleで顕著だが、マウスでははっきりは見られない）などがあるが、この向社会行動に関して最近の研究はOXT・受容体系が密接な関わりを持っている事を示している。

一方、OXT・受容体の各遺伝子KOマウスで見出された社会記憶の低下は、動物レベルでの自閉症疾患モデルとも考えられている(1,2)。これについては、本研究計画とも密接に関連する事項であるが、1-2に於いて更に詳しく述べる。

我々はOXTR遺伝子KOマウスの作成・解析に引き続き、OXTRを発現する脳内のニューロンの分布やその性質を解析することを狙って、OXTR制御下にVenus (EYFP) 遺伝子を導入したマウス (OXTR-Venus knockinマウス) を作製、このマウスを用いて脳内でのOXTR発現ニューロンの分布の詳細を解析した(5)。この結果、扁桃体(情動制御)、海馬(記憶や恐怖)、縫線核(覚醒状態の制御、鬱病との関係)、視索前野(母性行動)など情動と社会性に関わる重要な脳内神経核領域で、OXTRの発現を見出した。また、セロトニン(5-HT)ニューロンの局在する正中・背側両縫線核での5-HT神経の半数でOXTRが発現している事を見出した(5)。また、外側中隔や扁桃体内側核のOXTR発現ニューロンは母性行動、社会記憶や社会的緩衝作用などに密接に関わっているが、これらのOXTR発現ニューロンの多くはGABA作動性で有る事も見出している(4,及び未発表)。

OXTR遺伝子はヘテロ欠損でも社会行動異常を起こす“heteroinsufficient”性を示す事が明らかとなり、OXTR遺伝子異常がASDなど精神疾患の原因となる可能性が高い事も明らかにした(6)。

1-2. ヒトのOXT・受容体系の役割、自閉症とOXTR、そして自閉症へのOXT投与研究の開始

以前より心理学分野に於いて、OXTを経鼻腔投与するとヒトの信頼や顔表情の読み取り能を向上させる事などが報告されていた。向社会行動・精神活動に於けるOXTR系の役割に関する研究が拡大している。そして、神経科学・精神医学分野に於ける最近のOXT研究は、OXTの経鼻腔投与が自閉書の症状を軽減・改善する効果の有る事を示した。に関する神経生理学的に理解する格好の因子としても、OXT・受容体系は重要だ。高頻度で発症(人口の1%以上)する自閉症(自閉症スペクトラム障害(ASD)研究の進展は、特定の遺伝子異常が発症に結びつく遺伝神経疾患としての側面も示されている。社会性動物は個体-個体間の正常な関係の維持が個体や種の生存を担保し、つがい、家族や母子、群れなど個体間の関係の障害とASD発症は密接に関わる。実際OXTR遺伝子もASD発症の有力な1候補である。我々は以前からOXT・受容体系と自閉症発症機序の関係について研究を進めており、共同研究者の東田陽博博士・横山茂博士らは、ヒト自閉症患者の一部から変異のあるOXTR遺伝子を見出し、この遺伝子より発現させた変異OXTRタンパクは、GPCRとしての機能が大きく損なわれている事を報告している(7)。

現在、自閉症の治療に於いては、今やOXT・受容体系が大きな治療の標的となっており、

これまで効果的な治療薬が無く、家族の負担も大きかった100万人以上の日本人ASD患者と家族に対し、OXTは史上初めての有効なASD治療薬として注目されている。

1-3. OXT投与のマイナス面とOXTによる他の生理代謝・発生調節作用

OXTは1970年代以降陣痛促進剤(注射乳促進剤)等に臨床応用されて来たが、産科領域でのOXTの副作用、特に脳神経系への影響は大規模調査が行われず注目されずにいた。OXTが自閉症治療薬として注目され、鬱病や統合失調症治療薬としての可能性も示されてきている。一方で、分娩時に一部の妊婦にのみ処方されていたOXTは、今後広い年齢層の男女に継続的に投与される可能性が高まり、その

ここで問題となるのは、OXTに関する殆どの基礎研究がマウスや一部ラットを用いて行われていることである。OXTそのもののアミノ酸配列は齧歯類とヒトで同じであるが、受容体に関して言えば、その配列は一部異なる。特に、既に特許の切れている内在性ホルモンのOXTに対し、今後OXTの機能を上回るようなOXTRアゴニスト(そしてアンタゴニスト)の開発が激しさを増す可能性は極めて高く、その際基礎薬理実験動物として、マウスやラットを用いるとしても、その受容体をヒト化しておくことは極めて重要であると考えた。その為の道筋として、コード領域に変異を持つヒト(自閉症患者)由来のOXTR遺伝子全体を、変異遺伝子 cDNA 毎にマウスの OXTR 遺伝子座

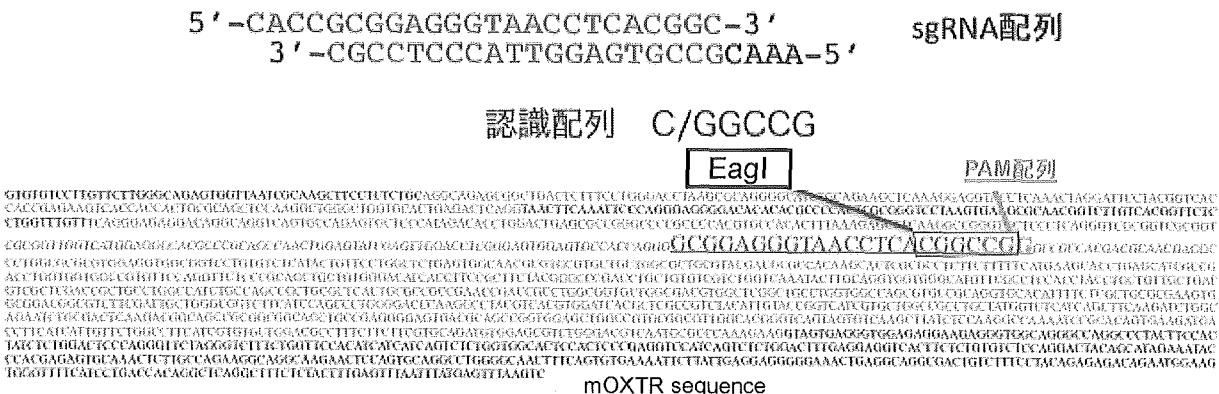


図1 マウスOXTR遺伝子切断用sgRNA切断効率の検討I

潜在的副作用を調べる必要は高まっている。一方で、妊婦へのOXT投与がASD発症を誘導する可能性を示した報告(8)、mouse脳室へのOXT長期投与が示す有害な効果の報告(9)などはOXT投与の副作用を示唆している。ASD患者への本格的OXT長期投与臨床実験が開始される今、長期間のOXT投与がOXTRを介し脳神経系へ与える予想外の有害な影響とメカニズムを調べ、安全性を確保する事は喫緊の課題となりつつある。

へ相同組み換え等により導入することは、極めて非効率的であり、消耗の大きな方法である。本計画では、次の段階としてヒト変異型OXTRで見られた点変異や、小さな欠損、或いは小さな挿入を、Crispr/Cas9システム(10)を使って迅速にマウス個体中へ導入することを狙い、まずはその基盤となる、ヒト型OXTR遺伝子(cDNA配列)を、本来のマウス型OXTR遺伝子部分と交換したマウスを作成することを本申

請で提案した。

ヒト OXTR 型マウスが作成されれば、以降 ASD 症患者から見出され、ASD 症状の直接的な原因を担っている事が疑われているヒト変異型 OXTR 遺伝子 (cDNA) に関し、その点変異等を含む小さな領域部分に対応する合成 DNA を用い (両側には、変異の無いアーム部分を持つ)、Crispr/Cas9 法により、直接ヒト型 OXTR 遺伝子を持つマウス受精卵中へ送り込み、変異を導入する事を計画している。そして、マウス生体中で、このヒト変異型 OXTR 遺伝子の機能障害を、行動薬理学的 (マウス行動解析)、生理学的 (電気生理学的解析、光遺伝学的解析等)、さらには解剖学的 (細胞内分布解析や形成神経回路解析) に明らかにし、ASD 発症に於ける変異 OXTR の病因論的な研究を展開す

<方法>

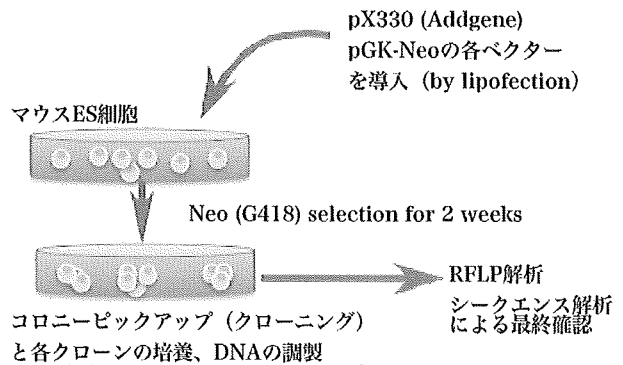


図2 マウスOXTR遺伝子切断用sgRNA切断効率の検討II

1. 遺伝子変換マウスの作製を迅速化する為、CRISPR/Cas技術の当研究室への導入を図り、まずマウスES細胞 (胚性幹細胞) のOXTR配列を細胞レベルで破壊し、反応の動作確認を行う。

1-1. その為、マウスOXTR遺伝子の配列の

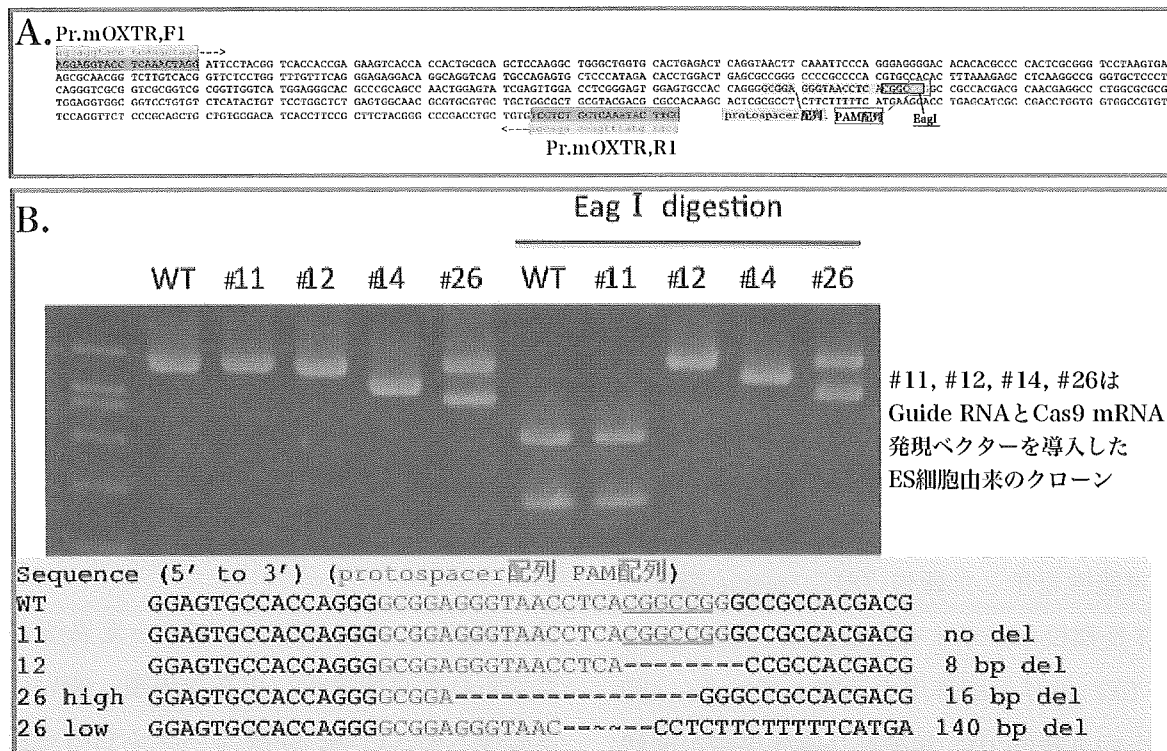


図3 マウスOXTR遺伝子切断用sgRNA切断効率の検討 III、A. PCR産物とprimer、B. ES細胞クローンゲノムの解析結果

るための基盤整備を目論む物として、本研究を提案した。

中から PAM配列とその近傍に比較的希な制限酵素サイトが存在する候補配列を検索し、図1

に示したように、エキソン3内にある標的配列を決定し、またガイドRNA (sgRNA) の配列を決定した。この標的サイトには制限酵素のEagIサイトが存在し、Crispr/Cas9システムにより欠損が起きた場合には、PCR産物のEagIサイトが欠損することで容易に検出でき、とくにES細胞などでCrispr/Cas9によって遺伝子

及びDNAの塩基配列の確認により、Crispr/Cas9システムによる遺伝子破壊の確認を行う。

2. マウス受精卵を対象とするCRISPR/Cas9技術の確認を兼ね、ニューロン等で発現するOXTR蛋白の可視化を図るためにmCherry蛍光タンパクのcDNA配列を、マウスOXTR遺伝子ア

ミノ末端へ挿入する為のベクター作成を行う。

(図4)に概要とノックインベクターの概要を示した。

3. マウスOXTR遺伝子へのヒト

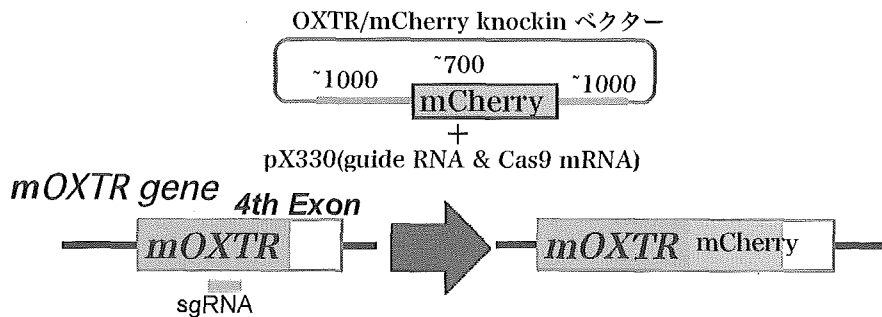


図4 mCherryをコードするDNA配列の、マウスOXTR 遺伝子C末端領域への挿入計画と、ノックインベクターの設計・作製

の欠損を誘導したときなど簡便な検出が可能となる。

1-2. 図2に示したように、マウスES細胞 (E14Tg2a) に、このsgRNAを転写できるベクター (pX330に、合成DNAを挿入して作成) と、マーカーのG418耐性遺伝子を持つpGK-Neoプラスミドをco-transfectionする。得られたクローンをピックアップ (クローニング) し、

各コロニーを細胞培養してDNAを抽出、これより標的配列付近をPCRにより増幅し (図3A)、得られたDNAフラグメントのサイズ確認とEagIによる切断、

型OXTRcDNAの導入

3-1. 導入用ベクターの作成

前記のsgRNAを転写できるベクター (pX330に、合成DNAを挿入し作成) より、sgRNAの鋳型部分をin vitro転写用ベクターに移した。これを基に、sgRNAはin vitroシステムにより転写精製した。並行して、CRISPR/Cas9法によって、

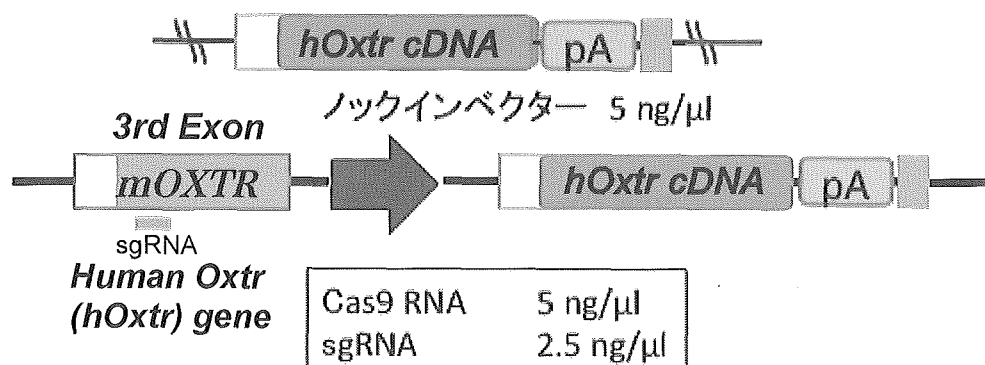


図5 ヒト型OXTR cDNA

マウスゲノム中のマウス型OXTR遺伝子のコード領域をヒト型OXTR配列に置き換える (図5)

為の、正常ヒト由来OXTR (hOXTR) cDNA配列を持つノックイン用ベクターを作製する(図6)。3-2. hOXTR cDNA導入ベクターと1-2で確認したsgRNA (in vitroで転写、精製) を、マウス受精卵へマイクロinjectionし、ヒト型OXTR cDNAがマウスのOXTR遺伝子座に正しく挿入されたクローンの確認を、PCR、サザンブロット、及び増幅DNAの塩基配列決定により行う。

4. 作成されたヒト型OXTR配列を持つマウスを利用した、ヒト自閉症患者由来変異型OXTR遺伝子の生理機能解析

簡単な合成オリゴDNAに由来するガイドRNAと、同じく短い左右アームを持つ、点変異(或いはオリゴ変異)をもつ合成”ノックインベクター”を、3-2で作製したh. OXTRマウスに由来する受精卵へ導入し、ヒトASD患者由来変異型OXTR遺伝子を持つマウスを作製する。変異ヒト型OXTR遺伝子を持つマウスを繁殖させ、様々な行動学、生理学、解剖学的解析を行う。

<結果>

本研究計画では開始後1年目までの本助成金による研究の達成目標を1~3-2までとした。

その結果、当研究室でこれまで経験の無かったCRISPR/Cas9系の導入と技術確立をまず細胞レベルで図り、これに成功した(図3)。

1-1、1-2. 図3に示したように、まず

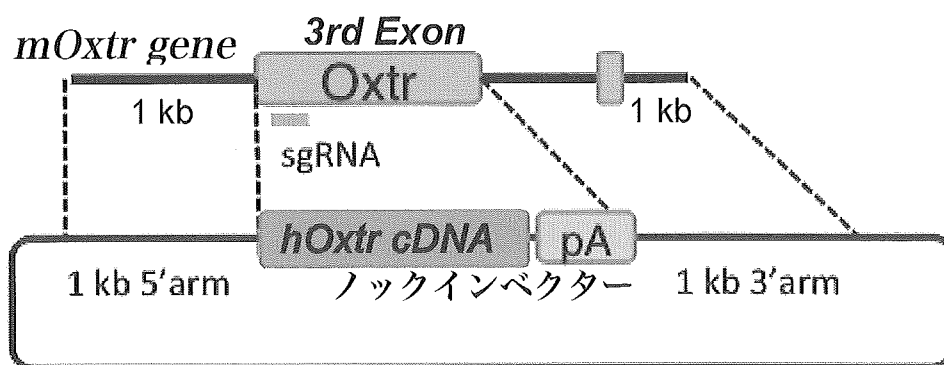


図6 hOxtrノックインベクターの設計と作製

ガイドRNAを設計、その発現部位とCas9 mRNAを発現するベクター(pX330由来)を作成、これをES細胞へ導入し、G418耐性より幾つかのクローンを得た。そのうち、クローン(#12, 及び#26)のDNAからは、それぞれ8bp、16bp、140bpの配列欠損を検出し、設計したRNAが有効に機能することを確認できた。

2. 次にOXTR蛋白の可視化を図るために、マウスOXTR蛋白のC末へmCherry蛍光蛋白のcDNAを相同組み換えにより導入するためのベクター(概要は図4に図示)を作成した。これについては、現在、まずマウスES細胞を利用して、挿入が起きるかどうかの確認を行う予定である。

3. 3-1の計画に沿って、マウスOXTR遺伝子の第3エキソンに、正常ヒト型OXTRcDNAを挿入するためのノックインベクターを作成した。このベクター作成に用いたヒトOXTR.cDNAはUMR cDNA Resource Center (University of Missouri-Rolla 1870 Miner Circle Rolla, MO 65409)から購入したヒト型cDNA(389a.a., 1200bp)を用い、ノックインベクターを完成した(概念は図5に、また構造は図6に示した)。

3-2の計画に沿って、マウス受精卵へのヒト型OXTR遺伝子cDNAの導入ベクターとsgRNA(in vitroで転写、精製)の受精卵へのInjection

は、2015年5月までに2回、計33個の受精卵に対して行い、これを疑妊娠マウス子宮へ移植したが、この実験から得られたマウスからはヒト型OXTR cDNAの挿入

は確認できなかった。インジェクション用の針作成法などに於いて幾つかの改良を行い、引き続きマイクロインジェクションを続行中である。今年度中期、遅くとも年末までにはマウスの OXTR 遺伝子座にヒト型 OXTR cDNA 正しく挿入されたマウスラインが得られるものと考えている。

3. ヒト型 OXTR 遺伝子を持つマウスを利用した、ASD 由来の変異型ヒト OXTR 遺伝子を持つマウス作製と、その行動生理解析研究は、ヒト型 OXTR 遺伝子 cDNA を持つマウスを得てからで無いと開始できない実験であるが、まずは当該マウスの取得に全力を傾け、継続していく予定である。

<References>

- (1) Nishimori K., et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:11699, (1996)
- (2) Takayanagi Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA: 102.16096 (2006)
- (3) Ferguson, J.N., et al., Nature Genet. 25:284 (2000)
- (4) Guzmán, Y.F. et al., Nat Neurosci, 16: 1185 (2013)
- (5) Yoshida M. et al., J Neurosci., 29:2259 (2009)
- (6) Sala, M. et al., Journal of Neuroendocrinology, 25, 107(2013)
- (7) Ma, W.J. et al., Mol Autism, 4, 22 (2013)
- (8) Gregory, S.G. et al., JAMA Pediatr. 167:959 (2013)
- (9) Peters, S. et al., Psychoneuroendocrinol., 42:225 (2014),
- (10) Ran, F.A. et al., Cell, 154:1380 (2013)