

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：29-11

課題名：ゲノム編集による疾患の原因遺伝子同定や病態解明のための基盤技術開発

高田 修治 (所属施設) 国立成育医療研究センター
(所属・職名) システム発生・再生医学研究部・部長

(研究成果の要約) 成育医療に関する研究をバックアップするため、成育センターの研究者にゲノム編集による遺伝子改変マウスを提供し、17の遺伝子変異に関して系統の樹立等を行った。また、fCas9を用いることで、マウス系統を樹立しなくても、F₀世代で表現型の解析ができる可能性が本研究により判明してきたため、多数の遺伝子改変した胎仔を作製し、この可能性を昨年度に引き続き検討した。fCas9を用いれば理論上はオフターゲットがほぼ存在せずに遺伝子改変が可能となるが、その検討はまだ不十分である。純系のC57BL/6を用いてfCas9により作製した遺伝子改変胎仔に実際にどれくらいオフターゲットが存在するのかを検討するため、fCas9、Cas9により遺伝子改変マウスを作製し次世代シーケンズ解析を行った。また、ゲノム編集により各種タグをノックインする事が可能であるため、抗体が存在しない遺伝子産物をコードする遺伝子にタグをノックインし、クロマチン免疫沈降の実験系を確立する。そのモデルとして、マウス受精卵に対するゲノム編集ノックインにより123塩基のタグ配列(Stag-3xFLAG配列、41アミノ酸残基)が*Klf14*遺伝子の開始コドン直後(N末タグ挿入)あるいは終止コドン直前(C末タグ挿入)に挿入された系統の取得を試みた。N末タグ挿入系統は樹立できたのに対し、C末タグが挿入された個体は取得できなかった。後者についてはゲノム編集デザインの変更を検討する。

1. 研究目的

(1) 成育センターの研究者にゲノム編集による遺伝子改変マウスを提供し、成育医療に関する研究をバックアップする。必要に応じて新規の応用法開発を行い、成育センターにおける研究に貢献する。

(2) (1)に関しては、これまでに確立したゲノム編集の応用法を用いるが、さらに以下の方法を開発することで、(1)に適用できる実験系を拡張する。

(イ) オフターゲットが存在しないゲノム編集法の開発と受精卵へゲノム編集を応用してもモザイクとならない方法を開発する。

(ロ) 次世代シーケンサー(NGS)を用いた疾患ゲノム解析により同定された多数の疾患原因候補に関して、モデルマウスや変異マウスを短時間に多数解析するシステムを作り、成育疾患の原因を同定するためのスクリーニング系を開発する。

(ハ) (ロ)で開発する実験系が実際に機能する例として、主任研究者がこれまでに

同定した胎仔期精巣で卵巣より発現が高い多数の遺伝子に対してそれぞれKOマウスを作製し、生殖腺での機能を提示する。この系が完成すれば、当センターで多数解析されている性分化疾患のNGSによる結果の解釈に大きく貢献できる。

(ニ) ゲノム編集ノックイン技術を応用し、任意の疾患関連転写因子の標的ゲノム部位の網羅的同定が可能な解析系を構築する。

2. 研究組織

研究者	所属施設
高田修治	国立成育医療研究センター
中林一彦	国立成育医療研究センター

3. 研究成果

(1) 成育センターの研究者にゲノム編集による遺伝子改変マウスを提供し、成育医療に関する研究をバックアップする。以下の提供を行った。昨年度作製し、今年度樹立したSNV導入マウス3件

今年度作製し、樹立または解析に供したマウス 14 件

- ・SNV 導入マウスが 9 件
- ・Tag KI マウスが 1 件
- ・KO マウスが 3 件
- ・胎生致死となる遺伝子に疾患を再現した SNV 導入マウスが 1 件

(2) (1) に関しては、これまでに確立したゲノム編集の応用を用いるが、さらに以下の方法を開発することで、(1) に適用できる実験系を拡張した。

(イ) モデルマウスや変異マウスを短時間に多数解析するシステムを作り、成育疾患の原因を同定するためには、マウスの掛け合わせを必要とせず、ゲノム編集した受精卵から得られた F0 個体で解析できる方法が有効であり、その開発を行った。昨年度までに fCas9 を用いれば F0 個体でホモまたは複合ヘテロの個体が効率良く得られることを示唆するデータが得られたため、今年度は 3 つの遺伝子に対して、受精卵に gRNA2 つ (a、b とする)/fCas9、gRNAa/Cas9、gRNAb/Cas9 をマイクロインジェクション後発生させた胎仔を回収し、スクリーニング系がワークするか検討した。3 つの遺伝子について解析し、いずれでも F0 でノックアウトマウスを作製することができた。

(ロ) Cas9D10A、HypaCas9 はゲノム編集の効率が悪く、マウス受精卵でのゲノム編集に適さなかった。そのため、オフターゲットが存在しないゲノム編集法として現実的なのは、fCas9 である。fCas9 は理論上オフターゲットはほぼ存在しない。しかし、実際にオフターゲットしないか実験的に検討しなければならない。厳密に検討するため、精子と卵子を採集した C57BL/6 マウスの肝臓と、人工授精後ゲノム編集した胎仔から抽出したトリオを次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンス解析を行う。すでに fCas9 と 2 つの sgRNA (sgRNA1 と sgRNA2) を打って変位を導入した胎仔、Cas9 と sgRNA1、Cas9 と sgRNA2 を打って変位を導入した胎仔が得られたため、全ゲノムシーケンス解析を行った。配列の解析を行い、論文としてまとめたい。

(ハ) (イ) で開発した実験系が実際に機能する例として、主任研究者がこれまでに

同定した胎仔期精巣で卵巣より発現が高い多数の遺伝子に対してそれぞれ KO マウスを作製し、生殖腺での機能を検討した。昨年度はこれらの遺伝子から、過去に KO され、KO が胎生致死でなく、産仔数減少などの生殖関連の表現型が報告されている 11 遺伝子について、性分化疾患の原因となる時期に相当する胎生 13.5 日で解析を行った。1 遺伝子は、系統差による浸透度の違いと考えられる胎生致死であったが、残りの 10 遺伝子についてはマウスの作製が終了した。1 遺伝子は約 20 個体中 2 個体が XY 雌の可能性があるため、本年度系統の樹立を行った。すでに F1 が得られているため、F2 でホモ変異体を同定し、性分化への関与を検討した。しかし、系統として作製したマウスでは、KO でも性分化疾患様の表現型は観察できなかった。

(ニ) マウス受精卵に対するゲノム編集ノックインにより、*Klf14* 遺伝子の終止コドン直前に 123 塩基のタグ配列 (Stag-3xFLAG 配列、41 アミノ酸残基) が挿入されたマウス個体 (C 末タグ挿入) の取得を試みた。20 個体を得たが、遺伝子型判定の結果、目的とするタグが挿入された個体は含まれていなかった。Cas9 によるゲノム切断部位を変更するなど、異なるゲノム編集法の適用を検討する必要があると考えられた。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究では、実験動物を用いた研究を行った。動物実験・DNA 組換え実験については、国立成育医療研究センター研究所・動物実験委員会と組換え DNA 実験安全委員会の承認を得ている (承認番号 A2016-002、A2014-001、2010-002、および 08-4、13-3、10-1、13-8A)。法令等を遵守し、十分な対策と措置を講じた上で実験を遂行した。