

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2020B-1

課題名：ゲノム編集による成育疾患モデルマウス作製支援体制の構築

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

(研究成果の要約) 成育医療研究センターの疾患ゲノム解析や病態解明、治療法の開発などを推進するため、ゲノム編集により疾患モデルマウスを作製し、医師、研究者に提供した。単に作製するだけでなく、マウスの取り扱い、遺伝子組換えや実験動物の申請補助、マウス遺伝学の知識や考え方、実験デザインなど総合的にサポートした。新規技術の導入としては、Prime editing について、導入準備を進めた。さらに、ヒトとマウスの種差の影響の少ない疾患モデルマウスの作製を目指し、将来エクソン-イントロン構造を有したヒト遺伝子をマウス遺伝子と置換したゲノムヒト化マウス作製を目指している。今年度は17 kb 及び領域に homology directed repair により、設計通りに正確に cDNA を導入できる実験系を構築した。また、疾患病態解明の手段としてオミックス解析を必要とする医師・研究者を支援する体制を構築・運用も目指した。今年度は、smallRNA シーケンス2件、RNA シーケンス2件、DNA メチル化解析1件の解析支援を行った。疾患病態解明に有用であり、臨床検体やモデルマウス由来生体試料に適応可能なエピゲノム解析技術として、酵素変換 DNA メチル化シーケンス法、二種類のクロマチン解析法 (ATAC シーケンス法、CUT&RUN 法) の実験条件を確立した。いずれも従来法と比較して、より少量のゲノム DNA・少数の細胞を出発材料としてゲノムワイドデータが取得できる。この特徴は、微量臨床検体を解析する際に重要である。

### 1. 研究目的

・成育医療研究センターでも多数の疾患ゲノム解析が行われている。次の段階として、疾患モデル、遺伝子改変マウス作製が必要な事が多いが、多数の障壁があり、諦める案件が多いと考えられる。遺伝子組換えの委員会承認、実験動物委員会への研究計画申請、ゲノム編集のデザイン、必要な核酸の準備、マウス受精卵の操作、胚移植、genotyping のためのバイオプシー、塩基配列解析、マウスのかけ合わせのための遺伝学の基礎など多数の段階があるためである。本研究では、成育医療研究センター内の医師、研究者のニーズに合わせ、最初の段階からモデル動物が獲られた後までサポートすることにより、医師、研究者が中心でありつつも成育疾患のモデルマウスの解析ができるようにトータルでサポートし、いまままで諦めていた疾患モデルマウス解析が実行できるようにする。

・既存のゲノム編集技術では作製可能か分からないアレルの作製が毎年のように依頼される。その様な場合に、必要な技術の導入や技術自体の開発を行うことで、必要と

するアレルを有するマウスを作製する。

・ゲノムヒト化マウスの作製のための最初のステップとして、初年度はイントロンを含むマウスの遺伝子をヒト由来の cDNA に置換したマウスの作製を目指す。

・ゲノム改変マウスを得た次のステップとして、そのマウスがヒト疾患モデルとしての表現型を示すかを確定するために、また疾患表現型が認められた場合は疾患分子病態の解明のために、様々な角度からの解析・検討が必要となる場合が多い。本分担研究では、疾患モデルマウスの病態解明の手段としてオミックス解析を必要とする医師、研究者を支援する体制を構築する。

### 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) 今年度は15件の受精卵への microinjection による変異マウス作製を行った。目的のアレルを作製できた案件は10件、

現在も4件の遺伝子型判別を進めている(昨年度に受精卵への microinjection し、今年度遺伝子型判別した4案件とマウス作製を行ったが、目的アレルが取れなかった案件も含むため、変異マウス作製案件数とは一致しない)。受精卵の操作後、研究代表者が遺伝子型判別の実験をしたのが5件あった。研究代表者が遺伝子組換えの申請、動物実験の申請を行った、または手伝った案件が6件あった。マウスの扱い方、DNA抽出法、遺伝子型判別のためのPCR、塩基配列の決定、結果の解析までを指導した案件が2件あった。塩基配列の解析結果の生データからの遺伝子型判別を1件行った。今年度はコロナウイルスによる感染拡大のため、マウスの取り扱い方を教えるためのハンズオントレーニングは実施を見送った。

(2) Prime editingに必要な pegRNA 発現プラスミド、逆転写酵素の結合した dCas9 の発現プラスミドを Addgene から導入した。欠失を誘導するために必要な pegRNA を設計するための Python のスクリプトを作製した。

(3) 今回置き換え対象とした領域は約17 kb、導入する cDNA は約1.5 kb とした。cDNA が正しく導入された場合のみ検出することができる PCR プライマーを設計し、得られた産仔のゲノム DNA を用いて PCR による遺伝子型判別を行った結果、複数の産仔に於いて正しく置換が起こっていたことをしめすデータが得られた。この PCR 産物を sequence 解析した結果、確かに計画通りの置換が起こっていたことが明らかとなった。

(4) 以下のオミックス解析を行った。

(イ) smallRNA シーケンス：生殖医療研究部(阿久津英憲部長)より提供されたヒト ES 細胞由来ミニ腸培養上清とコントロール(未使用培地)各1mlより、exoRNeasy キット(Qiagen 社)を用いて totalRNA を抽出し、smallRNA シーケンス解析に供した。培養上清中に含まれる smallRNA 群の同定が可能

であることが確認された。順天堂大学医学部産婦人科と周産期病態研究部との共同研究プロジェクトにおいて初代培養により得られた子宮内膜由来間質細胞および脱落膜化細胞(合計12サンプル)に対して smallRNA 解析を実施し、脱落膜化によって発現変動する miRNA 群を同定した。

(ロ) RNA シーケンス：生殖医療研究部、小児がんセンター(加藤元博診療部長)の要請を受けて RNA シーケンス解析を支援した(ヒト iPS 細胞18検体、小児血液腫瘍40検体)。センター内計算機クラスターで使用可能な解析スクリプトを更新し、従来の FPKM 値による定量解析に加えて TPM 値による解析が可能な体制を整備した。

(ハ) 酵素変換法による DNA メチル化解析：従来のバイサルファイト変換法に比べて、少ない PCR サイクルで平均鎖長がより長いライブラリが作製可能であることを確認した。分子内分泌研究部(鏡雅代室長)の要請を受け、臨床検体6検体に対する全ゲノム DNA メチル化解析を実施した(図1)。

(ニ) クロマチン解析：ATAC シーケンスについては、1-5万個の生細胞・凍結細胞を出発材料として良好なデータを取得できるプロトコルを確立した。ヒストン修飾 H3K4me3 に対する抗体を用いた CUT&RUN 法を試行し、原著論文の条件を数点変更することで、シグナル/ノイズ比が高い良好な結果が得ることに成功した。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

動物実験の実施(マウスを用いた実験)は施設内の実験動物委員会の承認の下に実施する。法令等を遵守し、十分な対策と措置を講じた上で3Rの原則(動物を使用しない方法への置き換え「Replacement」、実験動物使用数の減少「Reduction」、動物の苦痛を最小限にする「Refinement」)に基づき実験を遂行する。