

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2020C-14

課題名：Multiplex genome editing による希少疾患変異の *in vivo* 高速解析

福井 由宇子

国立研究開発法人・国立成育医療研究センター  
研究所・分子内分泌研究部・特任研究員

(研究成果の要約) *CHD7* 翻訳領域変異陰性と確認した3名の CHARGE 症候群患者を対象に14の新規原因候補遺伝子バリエーションを確認してきた。これらの多数の有力変異の病原性のモデル動物を用いた *in vivo* 検証のために、ゲノム編集 multiplex genome editing による変異マウス作成を分担研究者高田部長とともに行った。本研究課題で導入した変異は CHARGE 症候群患児一例 A で我々が見出した5遺伝子座の有害ヘテロ接合型変異である。変異導入マウスを作成し F0 世代での表現型を解析を行い、F1 および F2 世代での F0 世代での表現型比較解析の妥当性の検証を行った。成育医療研究センター病院、また国内他機関との連携による検体と臨床情報の収集は分担研究者・成育医療研究センター研究所・分子内分泌研究部・深見部長、小崎部長が遂行した。

### 1. 研究目的

次世代シーケンサーの普及により疾患原因遺伝子候補が複数ノミネートされている。エクソーム解析で患者に見出した変異が、ホモ接合型変異あるいは複合ヘテロ接合型変異の場合は、研究者はモデル動物マウスを用いた *in vivo* 解析に比較的躊躇なく進む。しかし、単なるヘテロ接合型変異の多くは、*in vivo* 解析の研究対象とはならない。この判断が新規疾患原因遺伝子の発見を逃している可能性は否定できない。さらに、二つの遺伝子変異に起因する Digenic inheritance 等は、複数の家系例がない限り解析優先度は低い。本研究課題では、新規疾患原因候補ヘテロ接合型変異の病的意義の迅速 *in vivo* 検証のため、マウス受精卵に対する multiplex genome editing を行う挑戦的萌芽的研究である。

導入予定変異は CHARGE 症候群患児一例で我々が見出した有害ヘテロ接合型変異のある5遺伝子座である。これまで、ゼブラフィッシュ受精卵を用いた multiplex genome editing では同時に5つの遺伝子座にて in/del 変異の導入に成功している。マウス受精卵に対する multiplex genome editing は Cas9 を用いて2遺伝子同時にホモ接合型変異塩基置換に成功した報告、改変型 Cas9 Base editing により3遺伝子同時にホモ接合型に nonsense 変異を導入した報告がある。いずれも標的遺伝子の両アレルを同時に編集する目的で行われている。本研究課題の目標が5遺伝子座のヘテロ接合型変異であるため、実験条件が大幅に異なる。

多くのクロマチン構造変換・転写制御因子変異が小奇形・成長障害を伴う症候性希少疾患に同定されているが、いずれもヘテロ接合型変異が多く患者に見出されてい

る。我々研究グループの進めてきた解析においても、CHARGE 症候群患者一例において、ヒストン修飾因子変異を含む5つの有害ヘテロ接合型変異を認めている。ゲノム編集により、複数の有害ヘテロ接合型変異導入モデル動物を一度のインジェクションにより作成し F0 世代の表現型解析を目指す。研究所の進める疾患原因遺伝子解析による動物飼育施設の収容限界を意識すれば、当研究課題は喫緊の課題でありセンター全般に必要な研究である。本研究課題は倫理委員会の承認を得て、関連する法律、並びに指針等を遵守した。

## 2. 研究組織

・研究者：福井 由宇子

所属施設：国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・分子内分泌研究部

・研究者：小崎 里華

所属施設：国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・器官病態系内科部・遺伝診療科

・研究者：高田 修治

所属施設：国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・システム発生・再生医学研究部

・深見 真紀

国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・分子内分泌研究部

## 3. 研究成果

エクソーム解析の汎用化に伴い、多くの候補遺伝子バリエーションを解析対象にせざるをえない。より効率的で、かつオフターゲットでの組換えの少ない改変が必要である。分担研究者・成育医療研究センター研

究所システム発生・再生医学研究部・高田部長は、CAS9 タンパクを用いて高効率ゲノム編集が可能であることを確認してきた。これまでに、多くの遺伝子座において、予想通りの変異マウスを得ている。従来のクローニングステップが不要な化学合成 tracrRNA (trans-activating crisper RNA) と 改変型 Cas9 タンパク fCas9 (FokI-dCas9) を併用した実験系を開発し、従来法に比較して効率良く、かつより正確な変異導入を確認した。このような実験系の先鋭化により、マウス受精卵に同時に複数の標的遺伝子にゲノム編集を施す multiplex genome editing へのチャレンジが可能となった。

*CHD7* 変異陰性 CHARGE 症候群類似の表現型を呈する患者 3 名において、それぞれの患者に 5 から 10 個の有害変異 (probability of LoF intolerance >0.9 かつ CADD >20, ExAC <3/125000 のヘテロ接合型変異、KO マウス表現型がないまたは全く異なる表現型の遺伝子は除く) を見出してきた。有害ホモ接合型変異あるいは有害複合ヘテロ接合型変異は認めていない。*CHD7* 病的変異、全ゲノム領域コピー数バリエーションのない 1 名の患者 A で検出した、5 つの有害ヘテロ接合型変異は以下の遺伝子に認められた。リン酸化タンパク遺伝子 *TAOK1* 新規 splicing 変異 (およそ 20 以上で有害性を示す指標 CADD\_phred score が 27.0)、ヒストンシャペロン遺伝子 *HIRA* 新規 missense 変異 (CADD\_phred score 22.8)、integrator complex 因子遺伝子 *INTS10* nonsense 変異 (CADD\_phred score 41)、ヒストン修飾因子遺伝子 *KMT2C* 新規 missense 変異 (CADD\_phred score 27.7)、転写抑制因子遺伝子 *TLE4* 新規 missense 変

異 (CADD\_phred score 25.1)。分担研究者・成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部・高田部長との連携により、CRISPR/Cas9 を用い multiplex genome editing による 5 つの遺伝子変異マウスの同時作成を試みた。予備的実験では *Taok1*, *Hira* 変異は高確率で embryonic lethal が予想されたため、*Ints10*, *Kmt2c*, *Tle4* のトリプル遺伝子変異マウス作成を試み、一度のインジェクションで上記 3 遺伝子のフレームシフト (fs) 変異を保有する F0 世代を得ることに成功した。*Taok1*, *Hira* は gRNA 等の量を調整して其々単独でのインジェクションを行い、*Taok1* (fs 変異)、*Hira* (一塩基置換) F0 世代を得た。患者に見られた出生後の成長障害 (低体重)、耳介形態異常などの表現型解析を行い、病的意義のある変異を検討した。さらに、単独変異 F1 ヘテロ接合型マウス、各変異遺伝子 F1 世代ヘテロ接合型変異マウスの組み合わせの交配の表現型を解析した。その結果、*Ints10*, *Kmt2c*, *Tle4*, *Taok1*, *Hira* 遺伝子それぞれ単独の変異マウスは異常がないこと、ある 2 つの遺伝子の変異を併せ持つ F2 マウスが、出生後の成長障害を示すことを明らかにした。この結果は F0 世代のマウス表現型ともほぼ矛盾はなく、さらに、患者と両親トリオ解析による当該変異遺伝様式に照らしても合理的に解釈できた。F0 世代での表現型解析により病原性のあるヘテロ接合型変異遺伝子候補の検討が有効であることを明らかにした (第 43 回日本分子生物学会年会 2020)。

さらに、CHARGE 症候群原因遺伝子 CHD7 機能からのアプローチとして、*CHD7* 変異の新たな病態である中枢性性腺機能低下症につ

いて、これまで国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・深見部長が収集してきた中枢性性腺機能低下症患者において、ゴナドトロピン欠損症新規責任遺伝子バリエーションの意義を検討した (Tamaoka et al., 2021)。また、あるクロマチン構成タンパク K0 マウスでは、成長障害、耳介形態異常、左右非対称の顔面、嚙下困難などの表現型を観察し、*Chd7* との遺伝的相互作用を確認したので投稿準備中である。

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・小崎部長と深見部長は、国内他施設に広くネットワークを広げた。本研究課題遂行期間、多くの国内施設 (北海道大学、東北大学、東京医科歯科大学、浜松医科大学、久留米大学、聖マリアンナ医科大学、大津市民病院、岐阜総合医療センターなど) より検体が提供された。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

遺伝子解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守して下記承認課題にて行った。組換え DNA 実験はカルタヘナ法を厳守し申請により下記承認を受けている。

[国立成育医療センター遺伝子組換え実験安全委員会・実験計画番号 (06-7, 07-7)]

[承認番号 2013-001, 2016-002]

動物実験は 3R (refinement, replacement, reduction) の原則を遵守して当センター研究所の規定に準じて下記承認課題にておこなった。

〔先天奇形症候群における遺伝的要因の探索（課題番号 518；代表 深見真紀）〕

本研究課題では、研究への参加および撤回が自由意思で決定されること、検体が匿名化された後に解析されることが定められている。同意は書面で行われ、同意書、患者-匿名化番号の対応表は個人情報管理者居室の鍵付きキャビネットで保管される。検体試料の採取を行う各施設においても本課題が承認されている。