

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（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）
（部長）

（研究成果の要約）本研究では受精卵にゲノム編集を行った場合の問題点の克服と新規技術の開発を行う。一つ目の問題点として、オフターゲットがあり、実際にどの程度のオフターゲットが存在するのか検討している。そのため、野生型 Cas9、Cas9D10A、dCas9-FokI、HypaCas9 を受精卵へ導入し、シーケンスによりオフターゲットを検出する。今年度は Cas9、dCas9-FokI からシーケンスに用いることができるサンプルを得た。二つ目の問題点として、モザイク個体の存在がある。モザイクとならないゲノム編集を目指し、光反応性 Cas9 を 1 細胞期の 2n の時期にだけ機能させる実験系の構築を行っている。光反応性 Cas9 は受精卵での実績がなく、受精卵でも機能する条件を確立した。来年度、2n の時期特異的に機能する条件を検討する。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。そのため、Klf14 遺伝子をモデルとし、今年度はゲノム編集により Klf14 遺伝子にタグを導入することに成功した。

1. 研究目的

（1）ゲノム編集技術によるゲノム治療を可能にするために、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の開発を行う。新規技術開発と既発表技術の導入及び改変を行い、最善の方法を検討する。

（2）疾患ゲノム研究で次世代シーケンサー（NGS）の次に必要とされるのは、同定した変異を模した治療モデルの作製や、疾患ゲノム解析の結果からも変異が同定できず多数の候補が残ってしまった場合の変異候補の同定法の確立である。そのため、主任研究者はゲノム編集によりモデルマウスや変異マウスを短時間に多数解析するためのシステムを作り、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。

（3）国立成育医療研究センター内の研究者が必要としている遺伝子改変マウスを作製

し、提供することにより、成育疾患研究に貢献する。

（4）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。転写因子の直接的標的遺伝子群同定法であるクロマチン免疫沈降シーケンス法（ChIPseq 法）は変性条件下でも転写因子タンパクを認識できる抗体が存在する場合にのみ実施可能な方法であり、そのような抗体が存在しても類似タンパクへの交叉反応性が真の標的遺伝子群の同定の妨げとなる場合もある。

本研究でモデルとする転写因子 KLF14 は、大規模発現 QTL 解析の結果から、白色脂肪組織で複数の代謝関連遺伝子の発現を制御するマスター転写因子であると提唱されている。更に KLF14 遺伝子座位は、複数のゲノムワイド関連解析・メタ解析で 2 型糖尿病を筆頭とする代謝関連疾患の感受性遺伝子座位として

同定されている。しかし、クロマチン免疫沈降法に適した特異的抗体が無いため、これまでに ChIPseq 法による直接的標的遺伝子群の同定に成功した例は無く、分子レベルでの遺伝子機能解析が停滞している一因となっている。本研究によるタグ配列ノックイン法がブレイクスルーになる可能性を秘めている。

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

本年度は、野生型 Cas9、dCas9-FokI、Cas9 D10A 変異、HypaCas9 を準備し、マウス受精卵をモデルに検討を行った。標的には目の色でゲノム編集効率が検討できる *Tyrosinase* 遺伝子を選択し、上記 4 種の Cas9 を受精卵へ microinjection することによりそれぞれの胎仔を得た。野生型 Cas9、dCas9-FokI については次世代シーケンサーによるオフターゲット探索に使用できる胎仔の準備ができたが、Cas9 D10A 変異、HypaCas9 については解析数を多くしないとオフターゲット探索に適した胎仔を得ることが難しいため、引き続き実施する予定である。dCas9-FokI を用いた際には半数以上の個体で目の色素が消失したことから、dCas9-FokI は受精卵への microinjection 後、掛け合わせを行うことなく胎仔の状態 で遺伝子をノックアウトできたかの表現型解析が可能になると考えられた。

また、開発しなければならない技術としては、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の開発がある。今年度、光反応性 Cas9 を入手し、マウス受精卵へ導入できる状態にした。この Cas9 をマウス受精卵へ microinjection し、胚を得て解析を実施した。光反応性 Cas9 に関してはこれまで培養細胞でしか結果が得られていなかったが、本研究で、マウス受精卵においてもゲノム編集が可能な実験系の構築に成功した。しかし、光反応性 Cas9 の活性が十分ではなく、さらなる条件検討を来年度に向けて行う。

国立成育医療研究センター内の研究者が必要としている遺伝子改変マウスを 10 系統作

製し、提供した。

クロマチン免疫沈降法 (ChIP) で使用できる抗体が存在しない転写因子について、ChIP シーケンス法で直接標的遺伝子群を同定する技術のモデル系として、Klf14 遺伝子座にタグ配列が挿入されたノックインマウスの作出を試みた。Stag/Flag-tag 配列を N 末端に含む系統・C 末端に含む系統の二種類の作出 (マウス受精卵に対するゲノム編集) を試みた。前者では 42 個体中 4 個体で、目的配列の正確な挿入が確認された。後者では得られた 60 個体でタグ配列挿入個体は無かった。相同組換え頻度はゲノム部位によって異なる一方で、その頻度予測は困難である。当初から二種類の系統作出を試みたのが功を奏した。N 末端ノックインマウスで発現されるタグ挿入 KLF14 タンパクは野生型タンパクと機能的に変わらないことが培養細胞でのタンパク発現実験結果から推察される。この系統を用いて ChIP アッセイの条件検討を開始する。

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。