

(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、9つの遺伝子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、F<sub>0</sub>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。そのため、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しなければならない。今年度はそのサンプル作製を行った。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。そのため、タグ配列 (Stag/FLAGtag) をKLF14のN末端に挿入されたノックインマウス系統を作出し、ChIPシーケンス法を試行したがChIPピークが殆ど検出されなかった。N末端タグ挿入*Klf14*系統においてはゲノム編集実験のデザイン通りにタグ配列が挿入され正常なレベルでのmRNA発現が確認された一方で、タンパク発現レベルが低い可能性が示唆された。

### 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。

(二) 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2件

今年度作製し、樹立または解析に供したマウス7件

- ・SNV導入マウスが2件
- ・KOマウスが2件

- ・ 300 bp の欠損マウスが 1 件
- ・ 300 kb の欠損マウスが 1 件
- ・ 400 kb の欠損マウスが 1 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

これには、受精卵にゲノム編集を行い、胎仔をそのまま解析することにし、F<sub>0</sub> で解析に必要な SNV をヘテロで有する個体を作製して提供した（今年度は 2 回行い、ともに成功した）。この案件は今年度もう一度実行する。

・ マウスでは胎生致死となる、疾患を再現した重複をモザイクにもつマウスが 1 件  
培養細胞系の樹立が一つの目的であったため、作製したモザイクマウスから卵子を採集し、IVF によりヘテロ胎仔を作製後、線維芽細胞と ES 細胞の樹立を行い、現在のところ順調である。

(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として、fCas9 が有効である。fCas9 は理論上オフターゲットはほぼ存在しない。また、我々は fCas9 を用いれば Cas9 よりモザイクがない個体が得られやすいことを見いだした。そのため、fCas9 と Cas9 でオフターゲットの比較を BDF1 系統で試みた。しかし、近年オフターゲットの検索を厳密に行うため、BDF1 でなく、C57BL/6 を用いることが求められるようになってきたため、今年度は C57BL/6 でサンプルを取り直した。fCas9 での解析用サンプルは用意できており、現在 Cas9 での解析用サンプルを調製中である。

(ロ) 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ため、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 F<sub>0</sub> 個体で解析できる方法の開発を行った。昨年度までに fCas9 を用いれば F<sub>0</sub> 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、今年度は異なった標的に対して同実験を行い、解析が終わった 2 遺伝子について、同様の結果を得た。これらから、上記

の方法が有効であると示されたため、今後さらに遺伝子数を増やして確認を行う。

(ハ) (ロ) 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。今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。そのうち 2 遺伝子は (ロ) に記した遺伝子であり、実験系の有効性は示すことができたが、表現型は野生型と変わらなかった。さらに、1 遺伝子 (Zfp42) は約 20 個体中 2 個体が XY 雌の可能性があるため、現在確認を行っている。残りの 7 遺伝子については現在解析中である。これらの解析は今年度中に終わらせることを目指しており、来年度からこの実験系でどのくらい迅速に解析が可能かを検討したい。それにより、NGS 解析で得られた疾患原因遺伝子候補が一度にどの程度解析できるかを検討する。また、成育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も貢献したい。

(二) マウス受精卵に対するゲノム編集ノックインにより、*Klf14* 遺伝子の開始コドン直後に 123 塩基のタグ配列 (Stag-3xFLAG 配列、41 アミノ酸残基) を挿入した。正確にタグ配列が挿入されたことをサンダーシーケンスで確認した個体を系統化し、ChIP アッセイ条件が検討できる体制を整え、ChIP シーケンス法を試行したが ChIP ピークが殆ど検出されなかった。N 末端タグ挿入 *Klf14* 系統においてはゲノム編集実験のデザイン通りにタグ配列が挿入され正常なレベルでの mRNA 発現が確認された一方で、タンパク発現レベルが低い可能性が示唆された。今後 N 末端タグ挿入系統でのタンパク発現評価を継続すると共に、C 末タグ挿入系統の作出について検討する。

#### 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。