

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21763

研究課題名（和文）骨格筋可塑性・再生研究を加速するゲノム編集技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of the genome-editing technology to promote the researches in muscle biology

研究代表者

小野 悠介（ONO, YUSUKE）

熊本大学・発生医学研究所・独立准教授

研究者番号：60601119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：筋幹細胞特異的にCas9を発現誘導するPax7-IRES-CreER/+;Rosa26-LSL-Cas9マウスを作出した。また、筋線維特異的にCas9を発現するMlcCre/+;Rosa26-LSL-Cas9マウスを作出した。初代培養細胞を用いて、エレクトロポレーション法およびリポフェクション法によりgRNAの導入条件を検討した。リポフェクション法と比較し、エレクトロポレーション法によるgRNA導入率は高く、十分なゲノム編集効率を確認した。また、複数のgRNA導入によるノックアウト効率の改善も確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋の可塑性や再生を制御する分子機構については不明な点が多く、研究分野を加速する技術開発が望まれている。今回検討したゲノム編集技術を、今後さらに効率を改善することで、単一遺伝子のみならず複数遺伝子の同時欠損や遺伝子発現調節領域の編集も可能となり、当該分野を加速する強力なツールになる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish genome editing techniques for muscle cells using Cas9 mice. To induce satellite cell-specific Cas9 expression, Pax7-IRES-CreER/+ mice were crossed with R26-LSL-Cas9 mice to create Pax7-IRES-CreER/+;Rosa26-LSL-Cas9 mice. We also generated MlcCre/+;R26-LSL-Cas9 mice that express Cas9 specifically in myofibers. Using primary cultured cells, we investigated transfection efficiency of gRNA by electroporation or lipofection. We observed that the transfection of gRNA was more efficient with electroporation compared to the lipofection method. Genome editing efficiency for target genes was determined by qPCR. We also confirmed the genome editing method is applicable for multiple genes. The knockout efficiency varied with the length of the target genome.

研究分野：筋生物学

キーワード：骨格筋 ゲノム編集 筋幹細胞 筋再生 筋可塑性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動により損傷しても筋線維周囲に存在するサテライト細胞 (筋幹細胞) の働きにより速やかに修復・再生される(図1)。また, 骨格筋は使用頻度や強度に応じて大きさやエネルギー代謝を変化させる可塑性の高い臓器である(図2)。

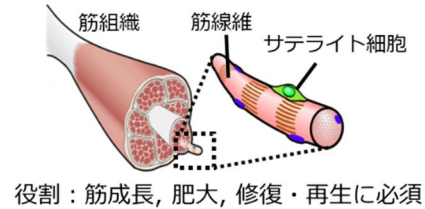


図1 . サテライト細胞 (筋幹細胞)

超高齢化社会を迎えた我が国では, 平均寿命は延びる一方, 健康で介護を必要としない期間である健康寿命は延び悩んでいる。加齢, 不活動, 代謝性疾患では, 骨格筋の可塑性や再生能は低下し, 加齢性筋萎縮 (サルコペニア) 発症の引き金になる。サルコペニアに対する予防治療法を確立するためにも, 骨格筋の可塑性や再生の分子機構の解明は急務である。

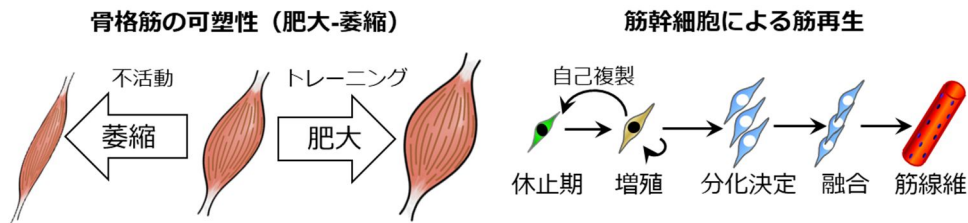


図2 . 骨格筋の萎縮と肥大 (左) と筋幹細胞による筋線維の再生 (右)

2. 研究の目的

本研究では, 骨格筋の可塑性や再生のメカニズム解明研究を加速する技術開発を目的として, 筋幹細胞や筋細胞に対する効率の良い遺伝子改変技術として Cas マウスを用いたゲノム編集技術の有用性を検討する。

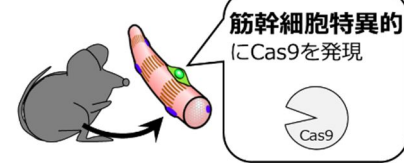
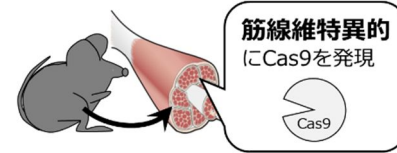
3. 研究の方法

本研究では Cre 依存性に CRISPR/Cas9 システムを誘導できる Rosa26-LSL-Cas9 ノックインマウスを用いる。目的とする筋細胞あるいは筋幹細胞以外のゲノムに影響を与えないように, 筋線維特異的あるいは筋幹細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現させる。そのために, タモキシフェン投与により筋線維特異的に Cre を発現する Acta-CreER/+ マウスまたはタモキシフェン投与によりサテライト細胞特異的に Cre を発現する Pax7-IRES-CreER/+ マウスと, Rosa26-LSL-Cas9 マウスを掛け合わせ, Acta-CreER/+;R26-LSL-Cas9 マウスおよび Pax7-IRES-CreER/+;R26-LSL-Cas9 マウスをそれぞれ作出する (図3)。これらのマウスを用いることで, 任意のゲノム配列を標的とする一本鎖ガイド RNA (sgRNA) を作製・導入することで, 筋線維特異的あるいはサテライト細胞特異的に標的ゲノム

配列を迅速かつ簡便に削除することができる。

本研究で用いたマウス筋幹細胞は、成体マウス後肢筋組織から採取した。エレクトロポレーション法およびリポフェクション法により sgRNA の導入条件を検討した。また、複数の sgRNA を用いて、2 つ以上の遺伝子を標的にしたゲノム編集効率を評価した。

*Acta-CreER/+;R26-LSL-Cas9*マウス



*Pax7-IRES-CreER/+;R26-LSL-Cas9*マウス

図3 . 筋細胞または筋幹細胞特異的に Cas9 を発現誘導する

4 . 研究成果

Cas9 マウスから筋幹細胞を単離し、初代培養系でのゲノム編集効率の条件検討を行った。エレクトロポレーション法およびリポフェクション法により sgRNA の導入条件を検討した。リポフェクション法と比較し、エレクトロポレーション法による sgRNA 導入効率は高く、遺伝子欠損効率は高かった。sgRNA の作成箇所に依存してノックアウト効率は大幅に異なることを確認した。標的ゲノムの長さに応じてノックアウト効率も低下することを観察した。また、複数の sgRNA 導入による遺伝子欠損効率も確認した。ただし、単独での遺伝子欠損の効率に比べて複数の遺伝子を標的した場合の遺伝子欠損効率は低く改善の余地がある。

今回検討したゲノム編集技術を、今後さらに効率を改善することで、単一遺伝子のみならず複数遺伝子の同時欠損や遺伝子発現調節領域の編集も可能となり、当該分野を加速する強力なツールになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujimaki S, Matsumoto T, Muramatsu M, Nagahisa H, Horii N, Seko D, Masuda S, Wang X, Asakura Y, Takahashi Y, Miyamoto Y, Usuki S, Yasunaga KI, Kamei Y, Nishinakamura R, Minami T, Fukuda T, Asakura A, Ono Y	4. 巻 2
2. 論文標題 The endothelial Dll4 - muscular Notch2 axis regulates skeletal muscle mass	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 180-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42255-022-00533-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 7件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Ono
2. 発表標題 Molecular regulation of skeletal muscle plasticity and regeneration: region-specificity and microenvironment
3. 学会等名 Randall Centre for Cell & Molecular Biophysics Seminar Series (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Ono
2. 発表標題 Hox-specified positional memory in muscle stem cells
3. 学会等名 The KAIST - Kumamoto University Joint Invited Speaker Seminar Series for Future Medicine (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 骨格筋の位置記憶
3. 学会等名 第7回日本筋学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 加齢にともなう骨格筋の変容と身体位置特異性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 位置依存的な骨格筋の再生制御機構
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 骨格筋幹細胞の老化制御機構とサルコペニア
3. 学会等名 第8回日本サルコペニア・フレイル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 損傷筋線維由来因子による新たな筋損傷-再生モデル
3. 学会等名 第76回日本体力医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野悠介
2. 発表標題 骨格筋の再生・可塑性における位置情報と組織連関
3. 学会等名 第45回長崎障害者支援再生医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小野悠介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 71-77
3. 書名 実験医学増刊：健康寿命の鍵を握る骨格筋（分担執筆）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------