

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670140

研究課題名(和文) In vivoジーンターゲティング法を用いた遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene therapy using the in vivo gene targeting technology

研究代表者

松田 孝彦 (Matsuda, Takahiko)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：40313093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人工ヌクレアーゼCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術と、生体内(in vivo)エレクトロポレーション法とを組み合わせる事により、生後マウス網膜組織内のニューロンやグリア細胞において、任意の遺伝子座に蛍光蛋白質遺伝子(GFP, RFP)をノックインし、目的の内在性蛋白質を蛍光標識する技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：By combining the CRISPR/Cas9 genome editing technology with an electroporation technique, we succeeded in creating GFP (RFP) knock-in alleles, from which GFP (RFP)-tagged endogenous proteins are produced, in neurons and glial cells in vivo in the postnatal mouse retina.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 網膜 内在性蛋白質

1. 研究開始当初の背景

動物細胞においてゲノム上の任意の部位に特異的に変異を導入する「ジーンターゲティング法」は、これまではマウス ES 細胞(相同組換えが 1/10~1/1000 の高頻度で観察される)などの限られた細胞株でのみ適用可能であった。ヒト ES/iPS 細胞の場合でさえ、ジーンターゲティングは極めて困難な技術であった。これは、マウス ES 細胞などの一部の例外を除き、一般にゲノムの相同組換えは 10 万分の 1 程度の頻度でしか起こらないからである。しかし、ここ数年、Zinc finger nuclease, TALEN, CRISPR/Cas9 といったゲノム上の任意の 1 カ所のみを特異的に切断する「人工ヌクレアーゼ」が開発され、状況は激変した。すなわち、人工ヌクレアーゼでゲノム上の目的のサイトを特異的に切断する事により、ゲノムの相同組換え効率が飛躍的に上昇する事が示され、様々な培養細胞や動物の受精卵などにおけるジーンターゲティングが可能になってきた。つまり、人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術を活用することで、これまで不可能と考えられてきた遺伝子操作への道が開けてきた。

2. 研究の目的

現在行われている遺伝子治療は、遺伝性疾患患者にウイルスベクター等を用いて正常遺伝子の cDNA を導入し、変異遺伝子機能を相補する、という方向性が主流である。また、人工ヌクレアーゼが開発されてからは、患者由来の iPS 細胞の変異ゲノムを *in vitro* の培養系に於いてジーンターゲティング法を用いて修復し、遺伝子修復後の幹細胞を疾患患者に移植しようという試みも始めている。一方、*in vivo* で直接的に遺伝子の変異箇所を修復するという遺伝子治療は、これまでは(ほぼゼロに等しい)相同組換え効率の低さから、現実的ではないと考えられてきた。

しかし、人工ヌクレアーゼの開発に伴い、

「生体内での遺伝子修復」がにわかに現実味を帯びてきた。そこで本研究では、この新たな可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 標的遺伝子

本研究では、人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術と、我々が開発してきた生体内(*in vivo*)エレクトロポレーション法とを組み合わせる事により、生後のマウス網膜組織内において任意の遺伝子座に蛍光蛋白質遺伝子をノックインする技術の開発を目指した。

具体的な標的遺伝子として *Rhodopsin* を選び、緑色蛍光蛋白質 GFP の cDNA を *Rhodopsin* 遺伝子座にノックインし、内在性の *Rhodopsin* 蛋白質と GFP の融合蛋白質を網膜細胞内で産生させることを試みた。

Rhodopsin は網膜特異的な 7 回膜貫通型光受容体であり、網膜ニューロンの中でも桿体視細胞に特異的に発現している。さらに、*Rhodopsin* 蛋白質は、桿体視細胞内では外節および内節とよばれる部位に主に局在している。そのため、網膜内での蛍光シグナルの局在解析から、遺伝子ノックインによる内在性 *Rhodopsin* の蛍光標識の効率と特異性を容易に調べることが出来る。

(2) ベクターのデザイン

Rhodopsin 遺伝子の stop codon 近傍を CRISPR/Cas9 の標的配列として選定し、CRISPR/Cas9 によってゲノムが切断されると、それに誘発される相同組換えによって緑色蛍光蛋白質 GFP cDNA がこの部位にノックインされ、結果として *Rhodopsin*-GFP 融合蛋白質が産生されるようにデザインした。相同性組換え用の GFP ドナーベクター(ターゲティングベクター)には、stop codon を起点にそれぞれ約 1kb の 5' 側相同領域と 3' 側相同領域を持つプラスミド DNA を用いた。

(3) マウス網膜への遺伝子導入

出生直後（生後0日目）のマウス新生仔の網膜に生体内エレクトロポレーション法を用いて、以下の3種類のプラスミドDNAを同時導入した。(1) *Rhodopsin* 遺伝子の特異的に切断する CRISPR/Cas9 発現ベクター (CAG-Cas9/U6-gRNA(Rho))、(2) ターゲティングベクター (*Rhodopsin* targeting vector (EGFP))、(3) DNA が導入された細胞を確認するための赤色蛍光蛋白質 RFP 発現ベクター (CAG-mCherry)。

4. 研究成果

(1) 網膜への遺伝子導入とゲノム編集

Rhodopsin 遺伝子の特異的に切断する CRISPR/Cas9 発現ベクターと、ターゲティングベクターをマウス新生仔網膜に導入し、3週間後に網膜を摘出して解析したところ、CRISPR/Cas9 非存在下では全く GFP シグナルは検出されなかったのに対し、CRISPR/Cas9 存在下では多数の GFP 陽性細胞が観察された。GFP は網膜細胞の中の視細胞にのみ発現しており、かつ、GFP シグナルは主に視細胞外節と内節に局限していた。このような GFP の発現・局在パターンは内在性 *Rhodopsin* の発現・局在と一致しており、期待通りに CRISPR/Cas9 依存的な GFP ノックインが網膜内で起こっていると考えられた。ノックイン効率（遺伝子導入された RFP 陽性視細胞のうち GFP 陽性になった細胞の割合）は、約 10 数%であると見積もられた。

(2) 単一細胞遺伝子解析による検証

GFP 陽性細胞において実際に GFP cDNA が目的の遺伝子座に正確にノックインされたか否かを検証するために、単一細胞遺伝子解析を行なった。具体的には、遺伝子導入した網膜を酵素処理によって単一細胞に分散し、セルソーター (FACS) を用いて GFP 陽性細胞を 1 細胞/1 ウェルで 96 穴プレートに回収し、単

一細胞 PCR 法でゲノム構造を解析した。その結果、ほとんどの回収した GFP 陽性細胞において GFP cDNA が正しく *Rhodopsin* 遺伝子座にノックインされていることが確認出来た。

(3) 生化学的解析による検証

GFP 陽性細胞において *Rhodopsin*-GFP 融合蛋白質が産生されていることを検証するために、遺伝子導入した網膜の Western blot 解析を行なった。その結果、*Rhodopsin* (約 39kDa) と GFP (約 28kDa) が繋がった *Rhodopsin*-GFP 融合蛋白質 (約 67kDa) が、CRISPR/Cas9 依存的に産生されていることが確認出来た。

(4) その他の内在性蛋白質の蛍光標識

次に、CRISPR/Cas9 と生体内エレクトロポレーションを組み合わせた内在性蛋白質標識法が、*Rhodopsin* 以外の網膜蛋白質にも適用出来るか否かを調べた。新たな標的蛋白質として、視細胞における光情報伝達効率の制御に關与する *Arrestin* と、ミュラーグリア細胞におけるグルタミン代謝に關与する *Glutamine synthetase* (*Glul*) を選び、*Rhodopsin* の場合と同様の手法で、それぞれの蛋白質を GFP で標識することを試みた。その結果、いずれの場合も、遺伝子導入した網膜において CRISPR/Cas9 依存的に GFP 陽性細胞が観察され、それらの発現・局在パターンは内在性の *Arrestin*、*Glul* のものと一致していた。また、ゲノム解析、生化学的解析からも GFP cDNA が目的の遺伝子座に正確にノックインされている事が確認された。

(5) 本研究成果の意義と今後の展望

本研究により、CRISPR/Cas9 とエレクトロポレーション法を組み合わせることで、生きたマウス網膜組織内で効率よくジーンターゲティングが行えることが明らかになった。本技術は、今まで不可能と思われてきた「疾

患遺伝子の生体内での直接的な修復」という次世代の遺伝子治療の基盤に十分なり得ると予想される。

また、本研究では、生きたマウス網膜内で内在性の蛋白質が蛍光標識可能なことを示した。本研究ではマウス網膜をモデル系として用いたが、確立した標識技術は、脳や他の臓器における内在性蛋白質に対しても幅広く適用可能であろう。また、マウス以外のモデル動物（例えばラット）や、*in vitro*での組織培養系や初代分散培養系においても使える技術であると考えられる。さらに、本標識法は細胞を固定する必要が無いため、生きたままの細胞・組織・個体レベルでの標的蛋白質の動的挙動の観察（ライブイメージング）目的にも利用可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)松田孝彦
CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による網膜における内在性蛋白質の標識と可視化
第 89 回日本生化学会大会
2016 年 9 月 25 日～9 月 27 日
東北大学川内キャンパス（宮城県仙台市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 孝彦 (Matsuda, Takahiko)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
研究員
研究者番号：40313093

(2)研究分担者 該当なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 該当なし
()

研究者番号：

(4)研究協力者 該当なし
()