

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670438

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムによる神経疾患モデルES細胞群の樹立

研究課題名(英文) Establishing ES cell lines for neurological diseases using CRISPR/Cas9 systems

研究代表者

渡瀬 啓 (Watase, Kei)

東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・准教授

研究者番号：30376800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：家族性パーキンソン病のひとつPARK17の病態を解明するため、新たな遺伝子改変技術であるCRISPR/Cas9法を応用して、患者で見出された遺伝子変異と同様の変異をマウスVps35遺伝子に有するノックインマウス、さらにVps35遺伝子を発現しないノックアウトマウスを迅速に作成することに成功した。加えて細胞内で不要なタンパクを分解する働きを有するリソソームと呼ばれる小器官の産生を促進する転写因子Tfebについてその活性が恒常的に促進したマウスを作製することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently a missense mutation in VPS35 (D620N) has been shown to cause an autosomal dominant late-onset form of Parkinson disease (PARK17) but molecular pathogenesis of PARK17 remains elusive. In order to model PARK17 in mice and elucidate its molecular pathogenesis, I have successfully generated the knockin mice carrying the mutation homologous to D620N as well as the mice with an NHEJ-mediated deletion or insertion mutation in the murine Vps35 gene by CRISPR-Cas9 method. Using the same methodology, I have also succeeded in generating knockin mice which express constitutively active form of Tfeb, which is known as a master regulator of lysosomal biogenesis.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：遺伝子組換えマウス 神経疾患 パーキンソン病 リソソーム

1. 研究開始当初の背景

私はこれまで、病態を再現する脊髄小脳変性症(SCA)のノックイン(KI)マウスの作製と解析を行なって、その発症機構を解明してきた(Neuron, 34: 905-19. 2002; Hum Mol Genet, 12: 2789-95. 2003; PNAS, 105: 11987-92. 2008; PNAS, 109: 17693-98. 2012 など)。このように疾患と相同な遺伝子変異を有する KI マウスは神経疾患研究の有力なツールとなりうるが、従来の方法は複雑で時間がかかり、短期間に複数の KI マウスを作製するのは困難であった。

CRISPR システムは細菌における RNA 依存性の免疫機構で、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) RNA と Cas (CRISPR-associated)ヌクレアーゼタンパクとの協働により侵入ウイルスやプラスミド DNA 内の相補配列を切断する (Mali P, et al, Science, 2013)。最近、このシステムを哺乳類細胞に応用して、ターゲット配列と相補的な 20bp の配列を有する CRISPR RNA (crRNA) と trans-activating crRNA (tracrRNA) を融合させた guide-RNA (gRNA) と Cas9 を導入することで、迅速にゲノム編集を行なう方法が開発され、マウス受精卵・ES 細胞に変異を導入することが可能であることが報告された(Wang H et al, Cell, 2013)。本法を用いれば、疾患相同変異や GWAS で同定されたリスク遺伝子多型をマウスゲノムに短期間で、また同時に複数導入することも可能(Wang H et al, Cell, 2013)となり、神経疾患の病態研究・治療法開発を加速することが期待できる。

2. 研究の目的

疾患と相同な遺伝子変異を有するノックインマウスは神経疾患研究の有力なツールとなりうるが、従来のジーンターゲティング法は複雑で時間がかかるのが難点であった。本研究では、ごく最近開発された CRISPR/Cas システムを用いてマウスゲノム遺伝子の特定配列上に 2 重差切断を導入し、切断部周辺をカバーするオリゴヌクレオチドを同時に導入することにより、疾患変異アレルや疾患関連アレルを有するマウスを迅速に確立する。パーキンソン病や脊髄小脳変性症などの神経変性疾患の責任遺伝子変異やその病態関連分子を対象に確立されたマウスは、我々の研究のみならず、神経疾患の病態・治療研究のツールのリソースとして本邦の神経疾患研究者に公開する。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 法を応用して guide RNA 及び Cas9 タンパクを同時に発現する pX330 ベクターと変異導入オリゴヌクレオチドをマウス受精卵前核に直接マイクロインジェクション

ンすることにより、変異マウスを作製することを試みた。

4. 研究成果

まず家族性パーキンソン病 (PARK17) の D620N 変異と相同変異を有する Vps35 KI マウス及び Vps35 ノックアウトマウスの作製を試みたところ下表に示すように、2 回のインジェクション(#1, #2)により 2 匹の KI F0 マウス (図 1) と Vps35 遺伝子に挿入或は欠失変異を有する NHEJ マウス(ヘテロ接合体)を高効率に得ることに成功した (図 2)。

	KI	NHEJ	KI +NHEJ
#1	1/37	3/37	4/37
#2	1/44	2/44	3/44
Total	2/81 (2.5%)	5/81 (6.2%)	7/81 (8.6%)

表 1 マウス受精卵前核への pX330 ベクターのマイクロインジェクションによる Vps35 変異マウス作製効率

V11(KI, CAGTG to TTCGA)

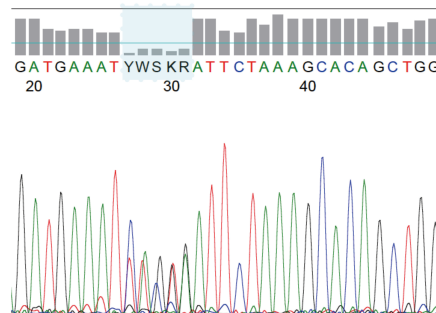


図 1 F0 Vps35 KI マウス(V11)のゲノム DNA 解析 水色部分が TTCGA 変異への置換を示す。

これらの F0 マウスに関してライン化を行なった後、生化学的・病理学的・遺伝学的解析を行なった。ホモ Vps35 NHEJ マウスは既報の Vps35 ノックアウトマウスと同様に embryonic lethal であった。一方 D620N KI/NHEJ コンパウンドヘテロマウスは viable で

あったことから、D620N アレルは gain of function または partial loss of function の機構で PARK17 の病態を発症させることが示唆された。

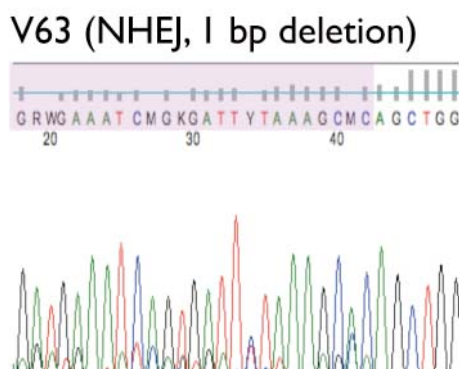


図 2 F0 Vps35 NHEJ マウス (V63) のゲノム DNA 解析 ピンク色部分が 1bp の欠失変異があることを示す。

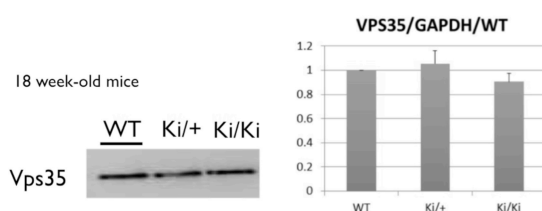


図 3 F2 Vps35 KI マウス脳 of 生化学的解析 (I)

F2 マウス脳抽出物を用いて、Vps35 タンパクの発現解析を行なったが、KI マウスと野生型マウスとの間に明らかな差異は認められず、この変異は Vps35 の発現レベルには影響しないことが示唆された (図 3)。

同様に 4 から 10 週齢の F2 マウス脳抽出物を用いて、チロシン水酸化酵素及びアルファシヌクレインの定量も行なったが KI マウスと野生型マウスとの間に明らかな差異は認められず、この変異は少なくとも全脳ではこれらのタンパクの発現に影響しないことが明らかとなった。

さらにリソソーム生合成のマスター遺伝子として知られている転写因子 Tfeb について神経変性疾患病態との関連や治療応用の

可能性について知見を得るため、constitutive active (恒常的活性化型) Tfeb を発現するマウスの作製を行なった。Tfeb の核内移行を制御するセリン 211 残基をアラニンに置換したマウス (CA-Tfeb KI マウス) を Vps35 KI マウスと同様の手法で作製し、ライン化することに成功した (図 4)。今後このマウスの解析とともに既存の各種神経変性疾患マウスとの交配実験を行なう予定である。

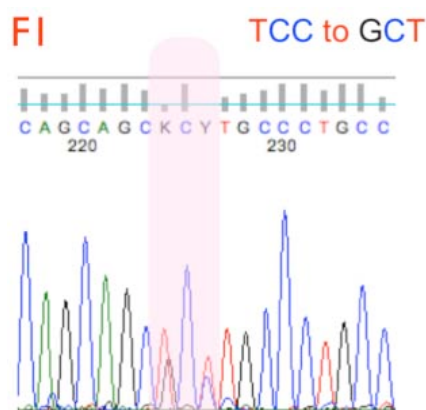


図 4 F1 CA-Tfeb KI マウス (ヘテロ接合体) のゲノム DNA 解析 ピンク色部分が置換変異を示す。

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 2 件)

①渡瀬 啓、相田知海. CRISPR-Cas9 法による Vps35 変異アレルの迅速作製. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 2014. 5. 23.

②Ishizu N, Hebisawa A, Yui D, Aikawa T, Mizusawa H, Yokota T and Watase K. Genetical Studies on knockin mice carrying a PARK17 mutation. 第 56 回日本神経学会学術大会 新潟 2014. 5. 22.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡瀬 啓 (KEI WATASE)
東京医科歯科大学
・脳統合機能研究センター・准教授

研究者番号：30376800

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：