

令和元年6月6日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05049

研究課題名(和文) 受精卵への顕微注入に拠らない簡便な動物個体ゲノム操作法の開発

研究課題名(英文) Development of microinjection-independent animal genome manipulation method

研究代表者

中村 伸吾 (NAKAMURA, Shingo)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター)講師

研究者番号：00505323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：顕微注入による遺伝子改変個体の作製技術は、高価な機材とそれを扱うための熟練した技術が必要とされる。近年のゲノム編集技術の発見は、発生工学分野に大きな変革をもたらした。中でもCRISPR/Cas9系はゲノム編集マウスの作製方法の簡便化に有用であると期待されている。そのような背景に基づき、本研究では、受精卵への顕微注入には拠らない、in situでCRISPR/Cas9系を導入する動物個体ゲノム操作法を検討した。その結果、マウス胎仔のゲノム編集が行える簡便な方法を開発した。これは、胎仔の機能操作や遺伝子組換え動物の簡便な作製に役立つ新技術としての期待が持てる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変動物の作製では、多くの場合、高価な機材とそれを操作する高度な技術等が必要になる。本研究の目的は、それらを回避できる簡便な新技術を検討することである。その成果は、遺伝子関連の研究を行っている多くの研究者にとって有用なものとなり、特に獣医学、農学、医学分野において貢献できると期待される。また、使用する動物個体数の削減による動物福祉の向上についても期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：The traditional transgenic techniques based on microinjection process, require expensive micromanipulator systems and a high level of skill to operate the equipment. In recently, sequence specific nucleases have discovered and revolutionized in the field of developmental engineering. In particular, the CRISPR/Cas9 system has emerged as a very simple and efficient approach to create genome edited mice. Based on such backgrounds, in this study, we attempt to develop microinjection-independent animal genome manipulation method that do not need isolation and ex vivo handling steps but that can deliver the CRISPR/Cas9 system directly in situ. As results, we achieved to elicit CRISPR/Cas9-mediated mutations in a target locus of embryonic cells by intravenous introducing a single plasmid conferring expression of both Cas9 and gRNA via pregnant mice. This may be a useful tool for manipulating the function of embryonic cells in vivo, allowing to create transgenic animal simply.

研究分野：実験動物学

キーワード：発生工学 ゲノム編集 遺伝子改変マウス 遺伝子導入

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術のうち、特に CRISPR/Cas9 システム (CRISPR 系) は取り扱いが容易で標的とする塩基配列もデザインし易い。発生工学の分野においても、CRISPR 系のゲノム編集用核酸を受精卵へ導入してノックアウト (KO) 動物を得る方法は、遺伝子改変動物の新たな取得方法として注目を浴びつつあった。CRISPR 系の受精卵への導入は顕微注入 (マイクロインジェクション) によって実施され、そのためには、i) 顕微注入に必要な高価な専用装置の導入、ii) 当該装置を扱うスキルを持った人材の採用、iii) 受精卵の採取、iv) *in vitro* での胚操作、v) 注入後の卵子の仮親生殖道への移植術の施行、といった煩雑かつ高度な技術は依然として必要とされていた。本研究の開始当初は、これらの煩雑な作業を回避するための幾つかの簡便法が提案され始めた時期であった。

例えば、*in vitro* electroporation によって CRISPR 系核酸成分を受精卵へ導入してゲノム編集マウスを得る方法が報告され、上述の i) と ii) を回避することが可能になった。また、妊娠マウスの卵管内 (2-cell 期胚) に CRISPR 系成分を注入した後に卵管全体へ *in vivo* electroporation を実施することで 2-cell 期胚のゲノム編集が行え、上述の i) から v) の全ての工程を省いてゲノム編集マウスが得られる GONAD 法も報告された。この GONAD 法は、簡便かつ経済的なゲノム編集マウスの作製方法として世界の耳目を集めつつあった。体外に受精卵を取り出さずにゲノム編集個体が作り出せるとする点において、ウシやブタなどの大動物、あるいは胚の体外培養系が確立されていない生物種への応用も期待できた。

これらの成果と世間の動向を見たとき、受精卵への顕微注入に拠らない動物個体のゲノム改変法の開発というテーマは、これからの発生工学のニーズに大いにマッチするであろうと予測でき、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

CRISPR 系ゲノム編集技術を用いた動物個体のゲノム改変実験を深化させることを目指し、受精卵への顕微注入には拠らない、遺伝子改変個体の簡便な作製法に寄与する新技術の模索を行うことが本研究の目的である。具体的には、我々がこれまでに報告を行ってきた幾つかの簡便な遺伝子導入手法に対して CRISPR 系ゲノム編集技術を適用させることを検討し、これが遺伝子改変マウスを作製するための新たな基盤技術になり得るかどうかの検討を行った。

3. 研究の方法

(1) GONAD 法の改良研究

GONAD 法はマウスの 2-cell 期胚にて処理 (CRISPR 系核酸成分の導入とそれによるゲノム編集) が行われるために割球間でゲノム編集の程度に差が生じ、割球子孫の細胞でホモ KO、ヘテロ KO、野生型タイプが混在する、いわゆるモザイク的変異が頻出することが課題であった。これを解決するためには、1-cell 期胚に対して GONAD 法を実施することが考えられた。しかしながら、この時期の胚は顆粒膜細胞で覆われているために外部からの核酸の導入が難しかった。そこで、CRISPR 系成分の卵管内注入とそれに続く卵管全体の *in vivo* electroporation の実施時期に関する検討を EGFP の mRNA を使用して実施し、その蛍光を指標として効率等を評価した。

(2) 遺伝子導入試薬類等の利用の検討

顕微注入法を用いずにマウスの卵子 (着床前胚) へ CRISPR 系の核酸成分を導入する方法としては、電気刺激を利用する electroporation 法が採用されることが多い。他方、遺伝子導入法には electroporation 法以外にも様々なものが知られている。例えば、特別な装置を必要としない試薬類等を用いて遺伝子を導入する極めて簡便な方法もある。この方法では、同じ試薬類等を活用したとしても、その導入対象物となる組織や導入をされる遺伝子によって遺伝子導入効率が異なることも多く、極端な場合では全く導入されないこともあることが大きな課題であった。そこで、核酸類を卵子 (着床前胚) の透明帯を通過させて内部へ導入することが可能とされている試薬類等を用いて、electroporation 法に代わって CRISPR 系の核酸成分を卵子 (着床前胚) へ導入できるかどうか検討した。本実験では EGFP 発現遺伝子等を使用し、その蛍光を指標に効率を含む導入の可否を評価した。

(3) 胎子マウスにおけるゲノム編集の検討

リボソーム/DNA 複合体をマウスの母体尾静脈血内へ投与することで胎盤経由にて胎子へ遺伝子を導入することができる。TPGD 法と名付けた本方法を活用して CRISPR 系の核酸成分をマウス胎子へ遺伝子導入できれば、導入細胞ではゲノム編集が生じ、結果としてゲノム編集胎子を簡便に得ることが出来る。そこで、EGFP を標的とする CRISPR 系の核酸成分を構築し、これをリボソームと複合体化させた後に、妊娠中の雌マウス (EGFP 発現 Tg 雄マウスと交配) へ尾静脈を介して投じた。この結果得られた胎子について、EGFP 蛍光の観察とゲノム解析を行い、ゲノム編集の成否を判定した。

4. 研究成果

(1) GONAD 法の改良研究

ゲノム編集用核酸を導入可能な最も早い時期を検討するために、交配後 0.4 日 (Day 0.4) と 0.7 日 (Day 0.7) という異なる二つのタイミングにおいて検討を行った。1.0-1.5 μ l の EGFP mRNA (1 μ g/ μ l) をトリパンプルー溶液と共に輸卵管へ導入し (Fig.1a) GONAD 法の条件に沿って *in vivo* electroporation (BTX T820) を実施した。そして mRNA 導入 2 日目 (8 細胞期) に、胚を単離して EGFP 蛍光を調べた。一連の作業を Day 0.4 にて行った胚においては、EGFP 蛍光は確認されなかった。一方、Day 0.7 で作業を実施した胚においては、EGFP 蛍光が観察された (13/31) (Fig.1b)。この結果は、おそらく以前からの考察通り顆粒膜細胞の影響によるものと考えられた。即ち、顆粒膜細胞の層が Day 0.4 では厚い (Fig. 1c, 左) ために *in vivo* electroporation の効果が阻まれ、Day 0.7 ではその層が薄い (Fig. 1c, 右) ために効果があって遺伝子導入が成された胚が現れたものと考えられた。以上の結果より、Day 0.7 (~16 h) が GONAD 法の実施に最適な時期であることが明らかとなった。

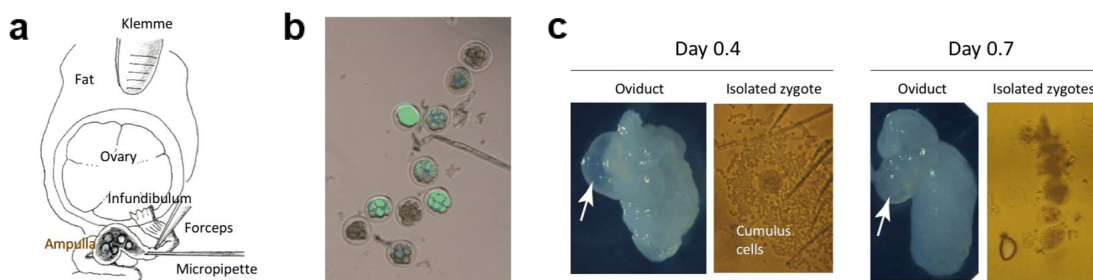


Fig.1 GONAD 法の改良研究

(2) 遺伝子導入試薬類等の利用の検討

カーボンナノ粒子を活用させた胚への遺伝子導入方法について、文献 (Michele M. et al., Efficient delivery of DNA into bovine preimplantation embryos by multiwall carbon nanotubes. *Sci. Rep.* 2016, 6:33588 など) を参考にしながら条件の検討を行った。残念ながら我々の今回の検討においては、我々が使用している EGFP 発現遺伝子等の胚への導入は困難を極めた。今後はさらなる検討を継続するとともに、一方では、今回は検討を行えなかった市販の試薬類等の存在や新たな報告等の存在に注目をして、これらを活用する検討を計画している。

(3) 胎仔マウスにおけるゲノム編集の検討

胎仔におけるゲノム編集効果を確認するために、構築したプラスミド DNA (Cas9 タンパク質及び EGFP を標的とした gRNA を同時に発現するプラスミド DNA) を遺伝子導入試薬 FuGENE6 と複合体化させた後に、交配後 12.5 日の妊娠マウスに対して経尾静脈的に導入した。そして、導入 2 日後に胎仔を単離してその EGFP 蛍光を蛍光顕微鏡によって観察したところ、EGFP の蛍光シグナルが減弱している胎仔を確認した (3/24)。特に、心臓における減弱は顕著であった (Fig.2a)。これらの胎仔を詳しく調べるために、遺伝子解析を行った。その結果、Cas9 gene の存在が確認できた (Fig.2b)。さらに、標的配列 (EGFP) についての解析を行ったところ、変異細胞と通常細胞との混在が確認できた (Fig.2c)。以上のことから、TPGD 法と名付けた経胎盤的遺伝子導入手法によって、マウスのゲノム編集胎仔を簡便に取得出来ることが明らかとなった。本系は遺伝子改変動物の作製手法としては全くの新しい方法であり、今後は実験条件の最適化検討などによる系の効率向上にかかる検討を計画している。

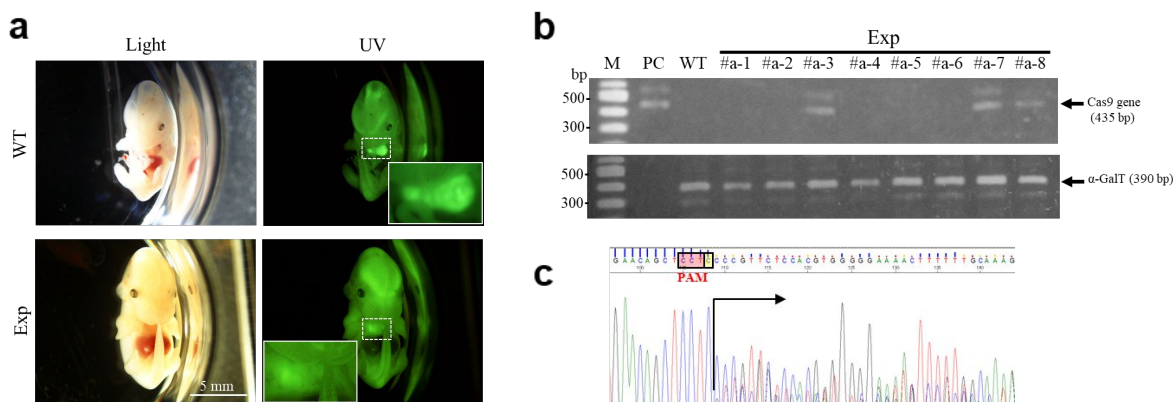


Fig.2 TPGD 法によるゲノム編集胎仔の作製

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Nakamura S, Ishihara M, Ando N, Watanabe S, Sakurai T, Sato M. Transplacental delivery of genome editing components causes mutations in embryonic cardiomyocytes of mid-gestational murine fetuses. *IUBMB Life*. **2019**, in press. doi:10.1002/iub.2004.

Nakamura S, Ishihara M, Watanabe S, Ando N, Ohtsuka M, Sato M. Intravenous delivery of piggyBac transposons as a useful tool for liver-specific gene-switching. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19(11), E3452. doi:10.3390/ijms19113452.

Sato M, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Gurumurthy CB. In vivo genome editing targeted towards the female reproductive system. *Archives of pharmacal research* **2018**, 41(9), 898-910. doi:10.1007/s12272-018-1053-z.

Watanabe S, Sakurai T, Nakamura S, Miyoshi K, Sato M. The Combinational Use of CRISPR/Cas9 and Targeted Toxin Technology Enables Efficient Isolation of Bi-Allelic Knockout Non-Human Mammalian Clones. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19(4) E1075. doi:10.3390/ijms19041075.

Sato M, Kosuke M, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K. Timing of CRISPR/Cas9-related mRNA microinjection after activation as an important factor affecting genome editing efficiency in porcine oocytes. *Theriogenology* **2018**, 108(1), 29-38. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.11.030.

Ohtsuka M, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, Arifin N, Nakamura S, Wada K, Gurumurthy CB. i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome biology* **2018**, 19(1), 25. doi:10.1186/s13059-018-1400-x.

Sato M, Miyoshi K, Nakamura S, Ohtsuka M, Sakurai T, Watanabe S, Kawaguchi H, Tanimoto A. Efficient Generation of Somatic Cell Nuclear Transfer-Competent Porcine Cells with Mutated Alleles at Multiple Target Loci by Using CRISPR/Cas9 Combined with Targeted Toxin-Based Selection System. *International journal of molecular sciences* **2017**, 18(12), E2610. doi:10.3390/ijms18122610.

Sato M, Maeda K, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Miura H, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K. The piggyBac-Based Gene Delivery System Can Confer Successful Production of Cloned Porcine Blastocysts with Multigene Constructs. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17(9), E1424. doi:10.3390/ijms17091424.

[学会発表](計6件)

中村伸吾, 渡部聡, 石原雅之, 安藤尚子, 大塚正人, 佐藤正宏. piggyBac系ベクターのハイドロダイナミクス遺伝子導入法はマウス肝臓での導入遺伝子の持続発現と肝細胞での gene switching を可能とする. 第41回日本分子生物学会年会. 2018年11月.

渡部聡, 中村伸吾, 桜井敬之, 大塚正人, 佐藤正宏. ブタ脂肪前駆細胞不死化細胞株樹立の試み. 第41回日本分子生物学会年会. 2018年11月.

佐藤正宏, 三好和睦, 松永将伍, 渡部聡, 中村伸吾, 川口博明, 谷本昭英. 体細胞核移植胚への直接 electroporation(GENTEP)は効率的なゲノム編集ブタ作製に有効である. 第41回日本分子生物学会年会. 2018年11月.

佐藤正宏, 大塚正人, 中村伸吾. 卵管内注入によるゲノム編集動物作製法(GONAD)の改良:性腺刺激ホルモン投与による実験時間の制御. 第111回日本繁殖生物学会大会. 2018年9月.

大塚正人, 中村伸吾, CB.Gurumurthy, Naomi Arifin, Md Atiquil Islam, 三浦浩美, 佐藤正宏. 卵管内受精卵を標的とした生体内ゲノム編集法(GONAD)習得のための2日間プロトコール. 第51回日本実験動物技術者協会総会. 2017年10月.

佐藤正宏, 前田昂亮, 郡山実優, 稲田絵美, 齋藤一誠, 大塚正人, 中村伸吾, 桜井敬之, 渡部聡, 三好和睦. piggyBac遺伝子導入系により複数遺伝子が同時導入されたブタ細胞は核移植後のクローン胚の発生を保証する. 第109回日本繁殖生物学会大会. 2016年9月.

[図書](計1件)

Sato M, Ohtsuka M, Nakamura S. Intraoviductal instillation of a solution as an effective route for manipulating preimplantation mammalian embryos in vivo. *New Insights into Theriogenology* 2018, Chapter 8, 135-150.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石原 雅之

ローマ字氏名：(ISHIHARA, Masayuki)

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：防衛医学研究センター 医療工学研究部門

職名：教授

研究者番号(8桁)：10508500

研究分担者氏名：佐藤 正宏

ローマ字氏名：(SATO, Masahiro)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：総合科学域総合研究学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：30287099

研究分担者氏名：大塚 正人

ローマ字氏名：(OHTSUKA, Masato)

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：90372945

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、研究者個人に帰属されます。