

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15540

研究課題名(和文)CRISPR技術を用いたモザイク病変を有する遺伝性皮膚疾患モデルマウスの作製

研究課題名(英文)Generation of model mice using CRISPR/Cas9

研究代表者

新熊 悟(Shinkuma, Satoru)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00613788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はモザイク病変を有する遺伝性皮膚疾患モデルマウスを開発することである。表皮水疱症や道化師様魚鱗癬のような重症型遺伝性皮膚疾患モデルマウスの多くは致死性であり、治療研究モデルとして用途が限定される。本研究では、Cas9 nucleaseトランスジェニックマウスに対し、胎生期および新生仔期に経皮的に任意の遺伝子編集を行うことにより、長期生存可能なモザイク状モデルマウスを作製する。細胞レベルにおいて、目的遺伝子の遺伝子編集に成功した。現在、マウスに直接遺伝子編集を施し、モザイク状モデルマウスを作製している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on generation of model mouse with somatic mosaicism of genetic skin disorders. In general, model mice with severe genetic skin disorders such as epidermolysis bullosa and Harlequin ichthyosis cannot survive for a long time period and these mice are not useful for treatment studies. We perform transcutaneous gene-editing for Cas9 nuclease transgenic mice at prenatal or new born period, leading to mosaic model mice that can survive long term. We have succeeded in generating of CRISPR/Cas9 system which can edit targeted genes. And now, we transfect the gene-editing system into the Cas9 nuclease mice.

研究分野：皮膚科

キーワード：CRISPR/Cas9 モザイク病変 モデルマウス 遺伝性皮膚疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 重症型遺伝性皮膚疾患モデルマウスは致死性である

多くの遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子が同定され、疾患モデルマウスが作製された。我々は、表皮水疱症や道化師様魚鱗癬のモデルマウスを作製し、病態解明を行ってきた (Nishie et al, Nat Med 2007, Yanagi et al, Hum Mol Genet 2008, Umemoto, Shinkuma et al, Am J Pathol 2012, Ujiie, Shinkuma et al, J Immunol 2014)。しかし、重症型皮膚疾患モデルマウスの多くは長期生存できず、治療研究の妨げになっている (Yanagi et al, Am J Pathol 2010)。

(2) CRISPR/Cas9 によって任意の遺伝子を編集できる

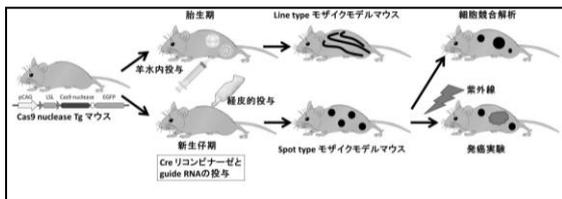
近年、任意のゲノム配列に DNA 二本鎖切断を誘導し、遺伝子変異を導入することができる CRISPR/Cas9 システムが開発された。申請者はこの技術を用いて栄養障害型表皮水疱症の原因である変異 COL7A1 遺伝子の編集に成功し、新規遺伝子治療の開発を行っている (Shinkuma et al, PNAS, 2016)。

(3) Cas9 nuclease トランスジェニック (Tg) マウス

Zhang F らは、Cas9 nuclease Tg マウスを作製した (Platt et al, Cell 2014)。この Tg マウスに guide RNA を導入することにより、in vivo で任意の遺伝子を改変することが可能になった。

(4) Line type および spot type のモザイク状モデルマウス

そこで、Cas9 nuclease Tg マウスに対し、胎生期および新生仔期に経皮的に guide RNA を投与することにより、モザイク状に遺伝子改変された皮膚疾患モデルマウスが作製できるという発想に至った。



2. 研究の目的

本研究の目的は、モザイク病変を有する遺伝性皮膚疾患モデルマウスを開発することである。表皮水疱症や道化師様魚鱗癬のような重症型遺伝性皮膚疾患モデルマウスの多くは致死性であり、治療研究モデルとして用途が限定される。本研究では、Cas9 nuclease トランスジェニックマウスに対し、胎生期および新生仔期に経皮的に任意の遺伝子編集を行うことにより、長期生存可能なモザイク状モデルマウスを作製する。本研究の特色は、胎生期および新生仔期に遺伝子編集を行う

ことにより、blaschko line 状や spot 状にモザイク病変を有する多彩なモデルマウスを作製できることである。本手法は任意の遺伝子を編集できるため、あらゆる遺伝性皮膚疾患や皮膚癌のモデルマウスの作製に応用可能である。

重症型の遺伝性皮膚疾患モデルマウスの多くは致死性であるため、適切なモデルマウスがないことが治療研究の進歩の妨げになっている。本手法が確立されれば、長期生存可能な遺伝性皮膚疾患モデルマウスを容易に作製することが可能になり、in vivo での治療実験を行うことができる。

3. 研究の方法

Col17a1、Col7a1、Abca12、Xpa 遺伝子を対象としたモデルマウスの研究を行う。

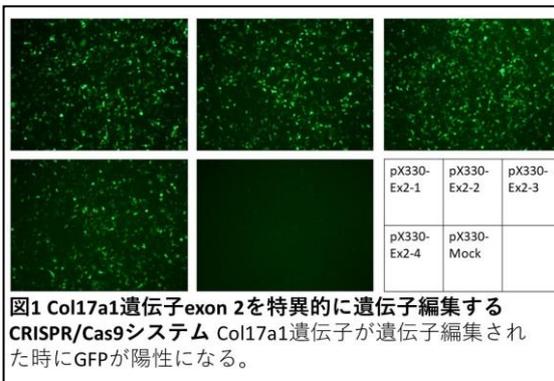
(1) Cre リコンビナーゼ依存性 Cas9 nuclease-GFP Tg マウスに対し、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて胎生期および新生仔期に経皮的に Cre と guide RNA を遺伝子導入し、line type と spot type の遺伝性皮膚疾患モザイクモデルマウスを作製し、解析する。

(2) ルミノメーターを用いて、遺伝子編集を行った GFP 陽性細胞の動態を追跡し、生体内外における変異細胞と正常細胞間での細胞競合について解析する。

(3) Col17a1 および Xpa 遺伝子に対し遺伝子編集を行ったモザイクマウスに紫外線を照射し、病理組織学的に皮膚癌の発生の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) Col17a1、Col7a1、遺伝子の特異的に遺伝子編集する CRISPR/Cas9 システムの開発に成功した (図 1、図 2)。



(2) 培養細胞に対しこれらのシステムを使用することにより、目的遺伝子の遺伝子編集が可能になった (図 3)。

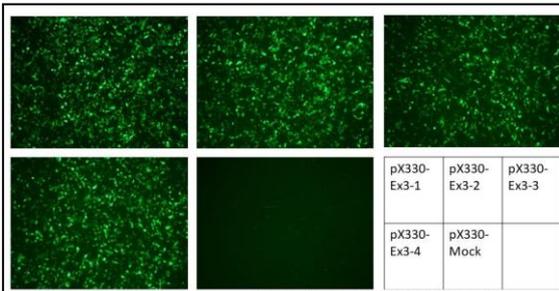


図2 Col17a1遺伝子exon 3を特異的に遺伝子編集するCRISPR/Cas9システム Col17a1遺伝子が遺伝子編集された時にGFPが陽性になる。

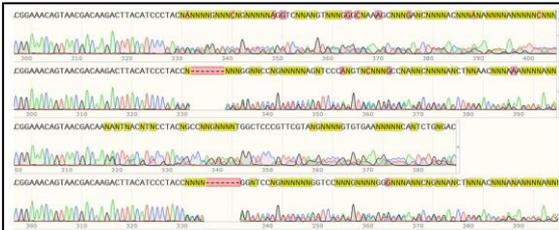


図3 Col17a1遺伝子exon 2を特異的に遺伝子編集した培養細胞に導入された遺伝子変異

(3) 現在、このCRISPR/Cas9システムを胎生期および新生仔期のマウスに経皮的に遺伝子導入し、Col17a1、Col17a1を特異的にノックアウトされたモザイク病変を有するモデルマウスを作製中である。

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 3件)
- ① Sugai T, Shinkuma S, Inafuku K, Takashima S, Nomura T, Fujita Y, Nakamura H, Shimizu H:
The first familial cases of epidermolysis bullosa simplex, generalized severe with p.Asn176Ser in KRT5 revealing the clinical chronology.
J Eur Acad Dermatol Venereol. 査読有、31: e251-e253, 2017
DOI: 10.1111/jdv.14036
 - ② Shinkuma S, Masunaga T, Miyawaki S, Takashima S, Natsuga K, Nomura T, Fujita Y, Nakamura H, Shimizu H:
A case of recessive dystrophic epidermolysis bullosa with a novel c.6885_6898del14 mutation in the COL7A1 gene.
J Dermatol Sci, 査読有、88: 139-141, 2017.
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.03.022
 - ③ Takashima S, Shinkuma S, Fujita Y,

Natsuga K, Nomura T, Hida T, Ishikawa S, Nakamura H, Abe R, Shimizu H:
Novel COL7A1 mutation in a family with bullous dermolysis of the newborn: Phenotypic variability associated with a COL7A1 mutation within the same family.
J Dermatol. 査読有、In press.
DOI: 10.1111/1346-8138

- [学会発表] (計 1件)
- ① Satoru Shinkuma, Tae Masunaga, Saori Miyawaki, Shota Takashima, Toshifumi Nomura, Yasuyuki Fujita, Hideki Nakamura, Hiroshi Shimizu:
A case of recessive dystrophic epidermolysis bullosa with a novel c.6885_6898del14 mutation.
The 76th Annual Meeting of the SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Portland, U. S. A., 2017. 4. 26-29.

[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：
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
新熊 悟 (SHINKUMA, Satoru)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：00613788
 - (2)研究分担者
柳 輝希 (YANAGI, Teruki)
北海道大学・医学研究院・特任助教
研究者番号：50755973

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()