

令和元年5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19326

研究課題名(和文)RNA-guided gene driveによる迅速疾患モデルミニブタの開発

研究課題名(英文)Quick development of disease-model microminiature pig by RNA-guided gene drive

研究代表者

小野 悦郎(ONO, ETSURO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00160903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-guided gene drive用プラスミドを構築した。RNA-guided gene drive用プラスミド、合成sgRNAおよびCas9蛋白質をマイクロミニピッグ(MMP)の胎仔線維芽細胞(PEF)に導入し、3種類のゲノム編集Msh2遺伝子ノックアウトPEFを樹立した。MMPの受精卵を用いて、2回の遺伝子ドライブ実験を実施した。RNA-guided gene drive用プラスミド、合成sgRNAおよびCas9蛋白質をマイクロインジェクションにより、MMPの受精卵前核に注入後、仮親ブタに移植した。そのうち1頭で妊娠が確認された。今後、ゲノム編集MMPの誕生が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gene driveによる遺伝子改変マイクロミニピッグ(MMP)の作製方法の確立は、迅速かつ効率的な遺伝子改変MMPの提供を可能とし、がん・免疫・神経・発生等の高次生命システム研究を加速度的に推進させ、創薬産業へも成果を還元できる。

リンチ症候群は大腸がんや子宮内膜、卵巣、胃、小腸、肝胆道系、腎盂・尿管がんなどの発症リスクが高まる疾患で、全大腸がんの2-5%程度がリンチ症候群と考えられ、最も頻度が高い遺伝性腫瘍の一つである。従って、リンチ症候群の中型動物モデルとして、Msh2遺伝子を欠損させたリンチ症候群MMPを開発することは、本疾患に対する新規予防治療法の開発や外科手術法の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Plasmid for RNA-guided gene drive of the Msh2 gene was constructed. The plasmid, sgRNA and Cas9 protein were transfected into embryonic fibroblasts (PEF) of microminiature pig (MMP). Three different cell lines destroyed the Msh2 gene by genome editing were established. RNA-guided gene drive of the Msh2 gene using fertilized embryos of MMP was performed twice. The plasmid, sgRNA and Cas9 protein were co-microinjected into the pronuclei of fertilized MMP embryos. These embryos were subsequently transplanted into the oviducts of pseudopregnant foster recipient pigs. In one of the foster recipient pigs, the pregnancy was confirmed. It is, therefore, that the birth of genome-edited MMP are expected.

研究分野：実験動物学

キーワード：gene drive ゲノム編集 Msh2遺伝子 リンチ症候群 疾患モデルミニブタ マイクロミニピッグ

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

1. 研究開始当初の背景

マイクロミニピッグ (MMP) は超小型の新しい医療実験用ミニブタであり、非齧歯類の代替動物として、サイズや取り扱い易さが特徴の次世代の実験動物として期待されている。申請者は、この MMP に着目し、疾患モデル MMP の開発を目的に、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を試みることにし、これまでに MMP の受精卵に Cas9 mRNA と sgRNA をインジェクションすることで、ジストロフィン遺伝子がゲノム編集されたモザイク状態のゲノム編集 MMP の作製に成功した (第 66 回日本実験動物学会総会、福岡、2019)。しかし、このままでは、疾患モデル動物としては使用することはできず、遺伝子改変が次世代 MMP に生殖系列伝搬した個体を作成し、系統として樹立、かつ変異を特定しなければならず、膨大な時間が必要となる。このような背景の下、迅速かつ効率的に疾患モデル MMP を樹立するために RNA-guided gene drive に着目した。

CRISPR-Cas9 系遺伝子ドライブでは、片方の染色体に導入された目的の変異が、もう片方の染色体の該当部位にも生じるよう設計されており、遺伝子ドライブ導入個体と野生型個体の交配では、導入変異をホモ接合型で持つ子孫が生じ、交配を繰り返すことで、変異が集団内に効果的に拡散することが知られている。このため、害虫や害虫媒介による疾患を撲滅できる待望の新技术として期待される一方、遺伝子ドライブでゲノムが改変された生物が自然界に流出し拡散すれば、生態系に多大な影響が及ぶ恐れがあるため、その利用が懸念されている。MMP は超小型の新しい医療実験用ミニブタであり、自然界とは完全に隔離された専用の施設で飼育管理されているため、MMP を用いて遺伝子ドライブすることで生態系に重大な影響が及ぶ恐れはないと思われる。

ブタを用いて遺伝子改変疾患モデルを作製するにあたり、重大な問題は、ブタはマウスやラットに比べ、妊娠期間や性成熟までの発育期間が長く、疾患モデル系統の樹立に膨大な時間と多くの動物を必要とし、維持繁殖に必要な飼育スペースを確保する必要があることである。これを解決するための手段として、超小型の MMP を使用し、動物の集団全体を短期間で改変するための最先端の遺伝子改変技術である RNA-guided gene drive により、遺伝性大腸がんモデル動物を開発することとした。

2. 研究の目的

植物や動物の集団全体を短期間で改変するための最先端の遺伝子改変技術である RNA-guided gene drive (CRISPR-Cas9 系遺伝子ドライブ) を用いたマイクロミニピッグ (MMP) の遺伝子ドライブ方法を確立し、疾患モデル MMP を作製する。本研究では、その第一弾として、常染色体優勢の遺伝性疾患で、ヒト大腸がんの約 3% を占めるリンチ症候群の中型動物モデルとして、*Msh2* 遺伝子を欠損させたリンチ症候群 MMP を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNA-guided gene drive 用プラスミドの構築

遺伝子ドライブ用 DNA カセットの挿入部位は、標的配列検索ソフトである CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp>) を使用し、*Msh2* 遺伝子の 5' 側の Exon とした。まず、遺伝子ドライブ用 DNA カセットの挿入部位を含む切断標的 DNA を PCR で増幅し、標的 DNA の切断を *in vitro* で確認するための DSB-HDR アッセイ (Assay for DSB mediated HDR by EGFP reconstitution) 用レポータープラスミド pCAG-EGxxFP に挿入し、標的 DNA が切断されると蛍光蛋白を発現するようになる DSB-HDR アッセイ用レポータープラスミド pCAG-EGxxFP-*Msh2* を構築した。次に、CRISPR direct により標的配列を 2 カ所決定し、CRISPR/Cas9 ベクターである pX459 に 20mer 標的配列に基づくオリゴヌクレオチド (sgRNA 合成用) を挿入し、標的 DNA 切断プラスミド pX459/*Msh2* を 2 種類構築した。構築した pCAG-EGxxFP-*Msh2* と各々の pX459/*Msh2* を Cos-1 細胞に co-transfection し、48 時間後に蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを確認することで DSB-HDR アッセイ用レポータープラスミド中の *Msh2* の DNA 配列に欠失変異が導入されたことを確認した。

切断効率が最良の sgRNA を用いて、sgRNA 発現には、U6 プロモーターを、Cas9 蛋白質は生殖系列のみで発現させるため、ブタの VASA プロモーター (Song et al, 2016) を使用し、sgRNA 発現用 U6-sgRNA と生殖系列特異的に Cas9 蛋白質を発現させる VASA-Cas9 をタンデムに結合させ、*Msh2* 遺伝子の切断部位の 5' 側および 3' 側の各々約 2Kb の DNA 断片で挿入し、gene drive 用 DNA カセットを含むプラスミドを構築した。

(2) MMP 由来胎仔線維芽細胞の gene drive

MMP 由来胎仔線維芽細胞 (PEF) に合成 sgRNA、Cas9 蛋白質および遺伝子ドライブ用 DNA カセットをトランスフェクションし、10ug/ml の puromycin を含む 10%FBS-DMEM 培地で 72 時間培養し、puromycin 抵抗性細胞株を樹立した。樹立した細胞株から DNA を抽出し、*Cas9* 遺伝子の 5' 側および 3' 側の塩基配列を決定し、相同組換えによる gene drive 用 DNA カセットの導入を確認した。

(3) MMP の gene drive

5 匹の排卵誘発した雌 MMP に人工授精を行い、受精卵を回収した。受精卵に合成 sgRNA、Cas9 蛋白質および遺伝子ドライブ用 DNA カセットをマイクロインジェクションで導入し、受精卵を仮親として使用する家畜ブタの卵管に移植した。得られた産仔の耳片から DNA を抽出し、PEF と同様に、gene drive 用 DNA カセットの導入を確認した。

4. 研究成果

(1) RNA-guided gene drive 用プラスミドの構築

Gene drive 用 DNA カセットの挿入部位は、*Msh2* 遺伝子の Exon 1 とし、これを PCR で増幅し、標的 DNA の切断を *in vitro* で確認するための DSB-HDR アッセイ (Assay for DSB mediated HDR by EGFP reconstitution) 用レポータープラスミド pCAG-EGxxFP に挿入し、標的 DNA が切断されると蛍光蛋白を発現するようになる DSB-HDR アッセイ用レポータープラスミド pCAG-EGxxFP-*Msh2* を構築した。CRISPR direct により標的配列を 2 カ所決定し、CRISPR/Cas9 ベクターである pX459 に 20mer 標的配列に基づくオリゴヌクレオチド (sgRNA 合成用) を挿入し、標的 DNA 切断プラスミド pX459/*Msh2* を 2 種類構築した。pCAG-EGxxFP-*Msh2* と各々の pX459/*Msh2* を Cos-1 細胞に co-transfection し、48 時間後に蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを確認することで DSB-HDR アッセイ用レポータープラスミド中の *Msh2* の DNA 配列に欠失変異が導入されたことを確認した。

sgRNA 発現用 U6-sgRNA と生殖系列特異的に Cas9 を発現させる VASA-Cas9 をタンデムに結合させ、*Msh2* 遺伝子の切断部位の 5' 側および 3' 側の各々約 2Kb の DNA 断片で挿入し、gene drive 用 DNA カセットを含むプラスミドを構築した。また、*Cas9* 遺伝子を *GFP* 遺伝子に置き換えたプラスミドも構築した (図 1)。

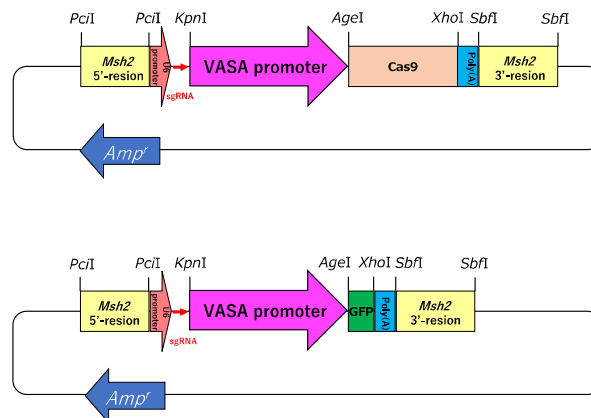


図 1 .Gene drive 用 DNA カセットの模式図

(2) MMP 由来 PEF の gene drive

構築した gene drive 用プラスミド、合成 sgRNA および Cas9 蛋白質を MMP の PEF に導入し、10ug/ml の puromycin を含む 10%FBS-DMEM 培地で 72 時間培養し、puromycin 抵抗性細胞株を樹立した。樹立した細胞株から DNA を抽出し、切断部位の塩基配列を調べた結果、gene drive 用 DNA カセットの導入は認められなかったが、3 種類のゲノム編集 *Msh2* 遺伝子ノックアウト PEF を樹立することに成功した (図 2)。このうちの 1 つは、2 塩基挿入変異で、他の 2 つは、1 塩基および 5 塩基欠失変異であった。これらの細胞株を用いて、今後、体細胞クローン胚を作製、移植することで *Msh2* 遺伝子ノックアウト MMP を作出する予定である。

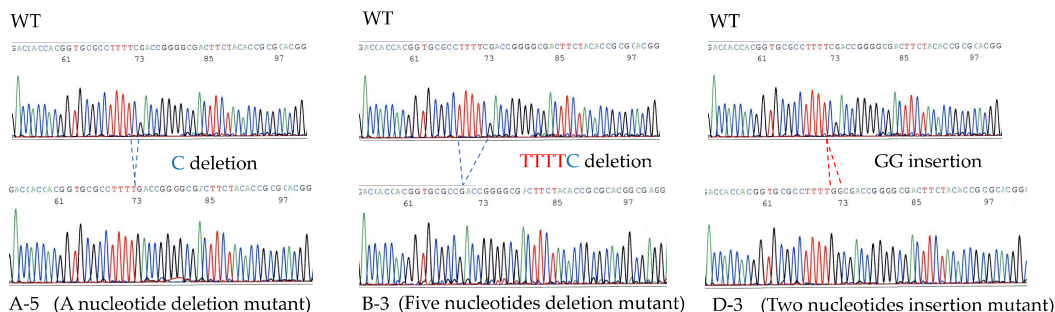


図2. ゲノム編集 *Msh2* 遺伝子ノックアウト PEF

(3) MMP の gene drive

MMP の受精卵を用いて、2 回の gene drive 実験を実施した。合成 sgRNA、Cas9 蛋白質および gene drive 用プラスミドをマイクロインジェクションにより、MMP の受精卵前核に注入後、仮親ブタに移植した。

1 回目は、6 頭の雌 MMP から採卵し、計 66 個の卵を回収し、そのうち 49 個にマイクロインジェクションし、仮親ブタに移植したが、妊娠は確認されなかった。2 回目は、3 頭の雌 MMP から採卵し、計 27 個の卵を回収し、そのうち 26 個にマイクロインジェクションし、仮親ブタに移植したところ、妊娠が確認された。今後、ゲノム編集 MMP の誕生が期待される。

(4) 今後の展望

本研究期間内では、gene drive 用プラスミドを MMP の PEF および受精卵の遺伝子に相同組換えにより導入することが出来なかった。その理由の1つとして、今回の gene drive は、効率が低いとされる古典的なトランスフェクションやマイクロインジェクションにより実施されたことが考えられる。当初計画では、ゲノム編集をより簡単かつ効率的に実施することで、モザイク状態ではないゲノム編集動物を得る確率を向上させる目的でエレクトロポレーションによる方法を採用することになっていた。しかしながら、残念なことに、平成30年9月の岐阜県での最初の豚コレラの発生は、隣県の愛知県へと広がり現在も終息する気配が見えない状況で、このことは愛知県に隣接する静岡県にも影響を与えている。研究分担者の所属する静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターでは、職員の食肉衛生検査所への立入を禁止したため、本研究に使用予定であった家畜ブタの卵巣から未受精卵子を採取することが出来なくなり、単為発生卵を用いたエレクトロポレーションの条件設定実験が実施出来なかった。

gene drive 用プラスミドの効率的な導入は、本研究の最重要ポイントであるので、単為発生卵を用いたエレクトロポレーションの条件を設定するために、早期の豚コレラの終息を期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大竹 正剛

ローマ字氏名：(OTAKE, masayoshi)

所属研究機関名：静岡県畜産技術研究所

部局名：中小家畜研究センター

職名：上席研究員

研究者番号(8桁): 90605677

(2)研究協力者

研究協力者氏名：富岡 幸子

ローマ字氏名：(TOMIOKA, yukiko)

研究協力者氏名：塩谷 聡子

ローマ字氏名：(ENYA, satoko)

研究協力者氏名：寒川 彰久

ローマ字氏名：(KANGAWA, akihisa)