

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12062

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた免疫不全マイクロミニブタの創出

研究課題名(英文) Production of immunodeficient micro-mini pig using genome editing technology.

研究代表者

平田 真樹 (HIRATA, Maki)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・講師

研究者番号：10815583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では人に近い特徴を多く有するモデル動物であるブタについて、取り扱いが容易かつ、再生医療研究等に活用可能な超小型の免疫不全ブタ作出を目指した。その結果、ブタ体外受精卵においてゲノム編集により小型化を図るためのGHRと免疫不全化を導入するためのIL2RGの同時ノックアウトが可能であった。また、小型の実験用ブタであるマイクロミニブタから採取した精液を使用した体外受精に成功したことから、今後これらの技術の融合により、超小型免疫不全ブタの作製が可能であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、iPS細胞をはじめとする幹細胞を用いた再生医療研究は、従来の方法では治療できない難治性疾患への臨床応用にむけ大きな注目を浴びている。本研究はゲノム編集技術を用いて超小型のマイクロミニブタを作出し、多くの研究機関でヒトに近い特徴を有するブタで幹細胞試験を可能にすることを旨とした。超小型の免疫不全ブタが活用できれば、多くの研究機関で有用なモデル動物であるブタを用いた研究が可能となり、再生医療研究のみならず、がん研究など多様な研究分野に貢献可能であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Pigs are useful research model animals that show many characteristics similar to humans. We aimed to produce immunodeficient micro-mini pigs using genome editing technology. In this study, we achieved in vitro fertilization using semen collected from a commercial micro mini pig. In addition, we demonstrated the feasibility of the introduction of double biallelic mutation of the two target genes (IL2RG and GHR), using electroporation to transfer two gRNAs and Cas9 protein to in vitro fertilized embryos. Hence, it will be possible to produce micro-mini-sized immunodeficient pigs by the combination of these technologies.

研究分野：動物生産科学

キーワード：ゲノム編集 ブタ 免疫不全 ミニブタ

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ブタはモデル動物としての有益性が高い反面、その大きさが各研究機関における導入の大きな障壁である。国内外において、iPS 細胞をはじめ様々な幹細胞を用いた前臨床試験研究が進められているが、生理学的にヒトと異なり寿命も非常に短いげっ歯類を用いた研究や、in vitro での安全性および有効性試験が主である。超小型免疫不全ブタの創出により、多くの研究機関へのブタ導入を可能にし、かつ社会的要望の強い再生医療研究において、ヒトに近いブタを使用した異種動物由来幹細胞移植による幹細胞評価系など、外挿性の高い効果的な研究が可能となると考えられる。

#### (1) 再生医療の技術進歩、臨床試験の実際

従来の治療法では克服できない難治性疾患への臨床応用にむけて、iPS 細胞、組織由来間葉系幹細胞など再生医療に関わる幹細胞研究は、社会の期待度を背景に現在大きな進展を見せている。しかし、in vitro およびげっ歯類モデルの結果をもって、ヒトにおいても十分な治療効果が得られるとすることが適当と言えるか疑問が残る。また、げっ歯類は長期間の観察が困難であり、腫瘍形成の可能性など安全性の評価も不十分である。

一方、ブタは生理学的、解剖学的にヒトに近く、また寿命も長いことから長期にわたり、ヒトに近い環境下でより正確な幹細胞の組織再生能評価が可能である。すなわち、ブタを用いてヒト由来幹細胞の持つ治療効果および安全性について検討することは、前臨床段階で治療効果および安全性の高い幹細胞の厳選を可能とし、臨床応用時の成果向上が期待できる。

#### (2) モデル動物としてのブタの必要性と課題

ブタは生理学的および解剖学にヒトに類似していることから、モデル動物として臓器移植、再生医療、医学的トレーニング、医療機器・医薬品開発など広く使用されている。医学、再生医療に関わる研究機関における実験動物施設はマウス・ラットの使用が主であり、中型・大型動物としてもイヌやヤギを想定している場合が多い。通常のブタは成豚時体重が 100kg を超えるため、それら施設への導入は基本的に不可能である。そのため、小型のミニブタやマイクロミニブタが開発されてきており、特に導入へのハードルが低いのは最も小さいマイクロミニブタであるが、免疫不全マイクロミニブタは未だ存在しない。

#### (3) 効率的遺伝子改変ブタ作製技術の開発

近年、CRISPR/Cas9、TALEN などを利用し、ターゲット遺伝子特異的にゲノム編集を行う技術が飛躍的に発展している。我々は CRISPR/Cas9 システムによりブタ胚のゲノム編集を成し遂げる技術 (GEEP 法) を確立した。本法はエレクトロポレーションを用いてブタ体外受精卵においてゲノム編集を導入する技術であり、複数のゲノム編集ブタの産出に成功している。標的とする遺伝子に対するガイド RNA を選択することにより短期間かつ高効率で遺伝子改変ブタ作出が可能となる技術である。

### 2. 研究の目的

各研究機関に導入可能なマイクロミニサイズの免疫不全ブタの創出により、ブタを利用した幹細胞の治療効果評価系の導入が可能になると考えられる。そこで本研究では、再生医療領域における前臨床試験および安全性試験に使用できる超小型免疫不全ブタの作出を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) IL2RG および GHR のゲノム編集条件検討

まず標的遺伝子であるブタ IL2RG およびブタ GHR に対する gRNA をそれぞれ 5 種類設計した。エレクトロポレーションにより Cas9 タンパクとともに計 10 種類の gRNA をブタ体外受精胚に導入し、7 日間培養した。培養後の胚盤胞形成率を検証することにより gRNA と Cas9 タンパク導入が胚発生に及ぼす影響を確認するとともに、得られた胚盤胞よりゲノム DNA を抽出し、各標的遺伝子における gRNA ターゲット領域の配列をシークエンス解析により確認し、変異導入率およびその効率について検討した。

#### (2) IL2RG と GHR の同時ノックアウト確認

実験 (1) の結果、IL2RG および GHR それぞれに対し、変異導入率の高かった gRNA を 2 種類選定し、これらを次の実験に用いた。IL2RG/GHR ダブルノックアウトにむけ、編集効率の高かった gRNA をエレクトロポレーションにより Cas9 タンパクとともに同時に導入した場合に最も効率よく IL2RG/GHR ダブルノックアウトが得られる組み合わせおよびその条件について解析を行った。各標的遺伝子において、野生型配列のみを持つ場合を WT、野生型配列を持たない場合をバイアレリック変異、野生型と変異配列の両方を持つ場合をモザイク変異と定義した。また、2 種類の標的遺伝子に対する gRNA および Cas9 の導入が胚発生に及ぼす影響についても検証した。

#### (3) マイクロミニブタ由来精液を用いた体外受精検討

性成熟に達した雄のマイクロミニブタ 3 頭より精液を採取した。それら精液を用いて体外受精を行い、その後の胚発生について検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) IL2RG および GHR のゲノム編集条件検討

ブタ体外受精胚を用いて *in vitro* において IL2RG および GHR に対するゲノム編集効率の高い gRNA の検討を行った。その結果、IL2RG および GHR についてそれぞれ 2 種類の編集効率の高い gRNA (GHR #1、GHR #2、IL2RG #2、IL2RG #3) を決定することができた (図 1)。また、これらの gRNA を Cas9 とともにエレクトロポレーションにより導入後の胚発生についても検証した結果、それらの導入が胚盤胞発生率に影響しないことも確認された。

##### (2) IL2RG と GHR の同時ノックアウト確認

編集効率の高かった gRNA (GHR #1 と #2、IL2RG #2 と #3) について、組み合わせを変えてブタ体外受精胚にエレクトロポレーション法を用いて導入し、2 つの標的遺伝子配列を確認した。その結果、2 遺伝子に対する gRNA を同時に導入しても、胚発生率には影響がみられなかった (図 2)。ゲノム編集率について確認するために、両標的遺伝子の遺伝子配列を確認した結果、IL2RG#3 よりも IL2RG#2 を GHR に対する gRNA と同時に導入した方が両標的遺伝子にバイアレリック変異が導入される率が高かった。しかし、GHR の gRNA については #1 と #2 で差が見られなかった (図 3)。以上の結果から、ブタ体外受精胚においてエレクトロポレーションを用いて 2 つの標的遺伝子の同時ゲノム編集が可能であることが示された。

(3) マイクロミニブタの雄 3 頭より、通常の種豚からの採精方法と同様に精液を採取後、凍結保存した。定法にのっとり凍結精液を融解後、体外受精に用いた。成熟培養後の肥育豚由来の卵子と体外受精を行った結果、マイクロミニブタ 2 頭由来の精子については、通常の種豚由来の精液と同等の胚盤胞発生率が得られた。

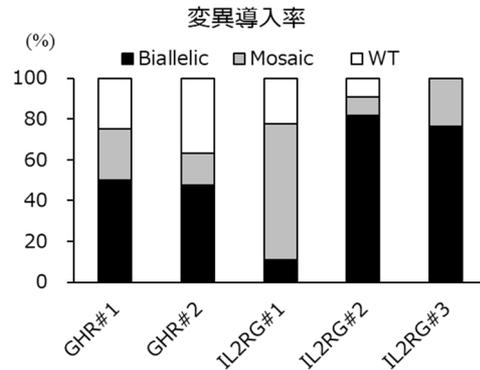


図 1. gRNA ごとの変異導入率

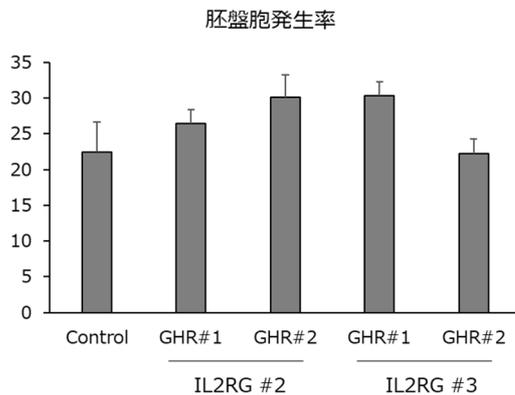


図 2. IL2RG/ GHR の同時ゲノム編集

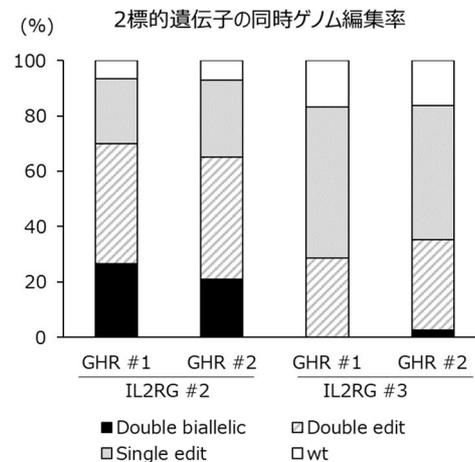


図 3. IL2RG/ GHR の同時ゲノム編集

ブタ体外受精胚においてエレクトロポレーション法を用いて Cas9 タンパク質とともに IL2RG および GHR 遺伝子に対する gRNA を導入することで、同時に IL2RG および GHR のノックアウトが可能であった。また 2 種類の gRNA を同時に導入する場合、その組み合わせが両遺伝子に同時にバイアレリック変異を導入する効率に影響することが明らかとなった。さらに、超小型の実験用ブタであるマイクロミニブタ由来の精液を用いたブタ成熟卵との体外受精も可能であった。今後、マイクロミニブタ由来精子を用いた体外受精胚に対し、IL2RG#2 と GHR#1 もしくは GHR#2 の gRNA を Cas9 タンパク質と導入しゲノム編集を行うことで、超小型免疫不全ブタが作出できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirata M., Wittayarat M., Hirano T., Nguyen TN., Le AQ., Namula Z., Fahrudin M., Tanihara F., Otoi T.	4. 巻 9
2. 論文標題 The relationship between embryonic development and the efficiency of target mutations in porcine endogenous retroviruses (PERVs) pol genes in porcine embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani9090593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, TN., Le, AQ., Hirano, T., Otoi, T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Effects of concentration of CRISPR/Cas9 components on genetic mosaicism in cytoplasmic microinjected porcine embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 209-214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanihara, F., Hirata, M., Iizuka, S., Sairiki, S., Nii, M., Nguyen, TN., Le, AQ., Hirano, T., Otoi, T.	4. 巻 90
2. 論文標題 Relationship among ovarian follicular status, developmental competence of oocytes, and anti-Mullerian hormone levels: A comparative study in Japanese wild boar crossbred gilts and Large White gilts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 712-718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, TN., Le, AQ., Wittayarat, M., Fahrudin, M., Hirano, T., Otoi, T.	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of CD163-edited pig via electroporation of the CRISPR/Cas9 system into porcine in vitro-fertilized zygotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Biotechnology	6. 最初と最後の頁 147-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10495398.2019.1668801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirata M., Wittayarat M., Tanihara F., Sato Y., Namula Z., Le AQ., Lin Q., Takebayashi K., Otoi T.	4. 巻 56
2. 論文標題 One-step genome editing of porcine zygotes through the electroporation of a CRISPR/Cas9 system with two guide RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 614-621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-020-00507-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirata M., Wittayarat M., Namula Z., Le AQ., Lin Q., Nguyen TN., Takebayashi K., Sato Y., Tanihara F., Otoi T.	4. 巻 47
2. 論文標題 Evaluation of multiple gene targeting in porcine embryos by the CRISPR/Cas9 system using electroporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 5073-5079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-020-05576-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanihara F., Hirata M., Nguyen TN., Sawamoto O., Kikuchi T., Masako Doi., Otoi T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Efficient generation of GGTA1-deficient pigs by electroporation of the CRISPR/Cas9 system into in vitro-fertilized zygotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC biotechnology	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12896-020-00638-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Le AQ., Tanihara F., Wittayarat M., Namula Z., Sato Y., Lin Q., Takebayashi K., Hirata M., Otoi T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of the effects of introducing the CRISPR/Cas9 system by microinjection and electroporation into porcine embryos at different stages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-020-05412-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanihara F., Hirata M., Nguyen TN., Sawamoto O., Kikuchi T., Otoi T.	4. 巻 22
2. 論文標題 One-Step generation of multiple gene-edited pigs by electroporation of the CRISPR/Cas9 system into zygotes to reduce xenoantigen biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 2249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052249.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirata M., Wittayarat M., Namula Z., Le AQ., Lin Q., Takebayashi K., Thongkittidilok C., Tanihara F., Otoi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Lipofection-mediated introduction of CRISPR/Cas9 system into porcine oocytes and embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani11020578.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wittayarat M., Hirata M., Namula Z., Sato Y., Nguyen TN., Le AQ., Lin Q., Takebayashi K., Tanihara F., Otoi T.	4. 巻 92
2. 論文標題 Introduction of a point mutation in the KRAS gene of in vitro fertilized porcine zygotes via electroporation of the CRISPR/Cas9 system with single-stranded oligodeoxynucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13534.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 1. 平田真樹、谷原史倫、Nhien Thi Nguyen、Quynh Anh Le、平野隆之、音井威重
2. 発表標題 ブタ体外受精卵におけるCRISPR/Cas9システムを用いた複数遺伝子の同時改変
3. 学会等名 第7回日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirata, M., Tanihara, F., Nguyen, TN., Le, AQ., Hirano, T., Otoi, T.
2. 発表標題 Effects of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting of porcine endogenous retrovirus on the developmental competence of porcine embryos
3. 学会等名 The 15th Transgenic Technology Meeting (TT2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田真樹、谷原史倫、Nhien Thi Nguyen、Zhao Namula、音井威重
2. 発表標題 ブタにおけるCrispr/Cas9システムを使用したゲノム編集効率化についての検討
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第3回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田真樹、谷原史倫、Manita Wittayarat、Nhien Thi Nguyen、Le Anh Quynh、Zhao Namula、新居雅宏、音井威重
2. 発表標題 ブタにおける成熟卵および1細胞期胚段階でのゲノム編集が胚盤胞の変異導入効率に及ぼす影響
3. 学会等名 第6回日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	音井 威重  (OTOI Takeshige)  (30311814)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・教授    (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷原 史倫  (TANIHARA Fuminori)  (90754680)	自治医科大学・先端医療技術開発センター・准教授    (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関