

令和元年5月8日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09623

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムを用いた成体腎臓での後天的遺伝子改変法の確立

研究課題名(英文) In vivo gene editing in the adult kidney by CRISPR/Cas9 technique

研究代表者

草場 哲郎 (Kusaba, Tetsuro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60367365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCRISPR/Cas9システムを用いた腎臓におけるin vivoでの後天的な遺伝子改変方法の確立を試みた。Cas9発現マウスに対して、AAVを腎盂内に投与後に超音波照射法を併用し、がん抑制遺伝子であるLkb1、p53を機能消失させ、癌促進遺伝子であるKRASを持続活性化することで発癌を誘導する遺伝子改変を行ったところ、腎内に複数の異型細胞の集簇が見られた。しかしながら本方法による遺伝子改変効率は低く、今後はその改善が課題と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓病の進展には多くの因子、機序が関わっており、遺伝子治療によりその因子を腎臓だけで制御することを目的に研究を行った。近年開発された新しい遺伝子改変法であるCRISPR/Cas9という方法を用いて、生体腎での遺伝子改変を行うことを試みた。マウスの腎臓に遺伝子改変により癌の発生を誘導するウイルスを注入し、細胞内への取り込みの効率を上昇させる目的で超音波照射を併用した。注入5か月後の腎組織では、核の高度異型を伴う細胞の集簇が腎実質内に散見され、遺伝子改変され腫瘍化したものと考えられた。今後は腎不全治療への応用するために、より効率の高い遺伝子導入、遺伝子改変法を確立する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish the methods of in vivo gene editing in adult kidney using CRISPR/Cas9 technique. We injected AAV encoding gRNA for deletion of Lkb1 and p53 genes, and for continuous activation of KRAS gene into the renal pelvis after transient clamping of ureter, followed by sonoporation. Five months after injection, multiple accumulations of the cells with moderate atypia was found in the renal parenchyma. However, the ratio of gene editing was not sufficient, and the modification of methods is required in the future.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腎臓 遺伝子改変 CRISPR/Cas9

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

1. 研究開始当初の背景

ノックアウトマウスを始めとする遺伝子改変動物を用いた研究は、多くの疾患、病態の分子生物学的な機序の解明に寄与してきた。しかし受精卵や ES 細胞を用いる従来の遺伝子改変マウスの作成方法では、ひとつの受精卵、ES 細胞からは単一の遺伝子の改変しか行えない。したがって複数の遺伝子改変動物を作成するためには、単一の遺伝子改変動物同士の交配を複数回必要とし、多くの費用と極めて長い時間を必要としていた。加えてその遺伝子の欠損により胎生致死を来す場合にはその役割を成体で解明できないこと、なども課題として挙げられる。

CRISPR/Cas9 システムは 2013 年に発表された新しい遺伝子改変方法である。Cas9 という二本鎖 DNA 切断酵素と、Cas9 蛋白を標的遺伝子に誘導する guideRNA (gRNA) の二つの因子により、従来の方法に比し高効率かつ短期間で動植物問わず細胞の遺伝子改変を誘導できる。同法により ES 細胞や胚細胞にも遺伝子改変を行うことで、遺伝子改変動物を短期間で高効率に作成でき、現在、全世界で急速にその利用が広まりつつある。しかしながら CRISPR/Cas9 を用いた成体での後天的な遺伝子改変に関しては現在までに報告は乏しい。

本研究では、従来の遺伝子改変法の一つである Cre-LoxP システムに、近年開発された新規遺伝子改変方法である CRISPR/Cas9 システムを組み合わせることにより、成体の腎臓において後天的かつ組織や細胞特異的に複数遺伝子の改変を同時に行うことができる方法の確立を目指した。

2. 研究の目的

In vitro において標的遺伝子に対する適切な gRNA の設計、合成すること、Cre 依存的に Cas9 蛋白を腎臓で発現するマウスの作成すること、gRNA を経静脈的に投与し、直後に腎臓に超音波照射 (sonoporation) を行い、腎尿細管上皮細胞内に gRNA を誘導すること、遺伝子改変効率の定量的評価すること、を行う。

3. 研究の方法

本研究では Cre-LoxP システムと CRISPR/Cas9 システムを併用し、In vivo において後天的かつ腎臓特異的に遺伝子改変動物を作成することを目的とし、具体的には以下の手順で研究を進める予定としていた。

レポーター蛋白である tdTomato に対する gRNA の設計、作成する、tdTomato/Cas9 共発現細胞株を樹立し、gRNA の投与による In vitro での遺伝子改変効率を定量化する、Cre-LoxP システムを用いて腎臓特異的な tdTomato/Cas9 共発現マウスの作成する、設計、合成した最も有効性の高い gRNA を超音波照射法により腎臓に取り込ませ、tdTomato/Cas9 陽性細胞で遺伝子改変を誘導する、遺伝子改変率は tdTomato 発現量により定量化し、標的外組織、標的外遺伝子での遺伝子改変の有無を解析する。

4. 研究成果

遺伝子改変を定量的に評価するために tdTomato レポーターの消失により定量することとした。tdTomato に対する gRNA を複数作成し、FACS により最も効率の良かった配列を決定した。そしてその gRNA 配列を Cas9 発現レンチウィルスベクターに挿入し、パッケージングベクターとともに HEK293 細胞に感染させ、レンチウィルス液を得た。

tdTomato 蛋白を恒常的に発現しているラット尿細管上皮細胞株にレンチウィルスを感染させ、gRNA の機能確認を行った。FACS を用いた解析では、tdTomato の発現の消失を認めた。また塩基配列を確認したところ、tdTomato 遺伝子内に 1 塩基挿入変異を認めた。

Vivo では近位尿細管上皮特異的 Tamoxifen 誘導性 Cre 発現マウス、Cre 依存的に Cas9 を発現するマウス、Cre 依存的に tdTomato を発現するマウスを相互に交配し、現在 3 つの遺伝子変異を有する改変マウスを作成中した。gRNA の投与のみでは tdTomato の発現の消失を認めず、遺伝子改変を誘導することができなかった。その理由として gRNA の細胞内への導入効率が低いことが推察され、結果として遺伝子改変のために必要な十分な量の gRNA を細胞内で維持できないことが考えられた。

で示された問題を解決するために、gRNA の導入にアデノ随伴ウイルスを用いることとした。また遺伝子導入効率も低いことが予想されることから、少数の細胞での遺伝子改変をより可視化するためのがん抑制遺伝子である Lkb1、p53 を機能消失させ、癌促進遺伝子である KRAS を持続活性化することで発癌を誘導する遺伝子改変を行うこととした。既報にあるように、がん抑制遺伝子である Lkb1、p53 を機能消失させ、癌促進遺伝子である KRAS を持続活性化するような AAV を作成し、腎盂内投与を行った。遺伝子改変され腫瘍を形成するのに時間が必要と考えられたため、投与後 6 ヶ月待機した結果、腎組織内に複数の核異型を有する腫瘍細胞の集簇を認めた。腎組織内で認められた異型細胞の集簇が CRISPR/Cas9 により遺伝子改変されたものであることを確認するために、組織より DNA を抽出し、予想される遺伝子改変部位を含む PCR 産物に対して、T7 エンドヌクレアーゼアッセイを行った。しかし遺伝子改変が生じた細胞の割合が低いせいか、確認が困難であったため、パラフィン切片から腎組織の異型細胞を認める部位を microdissection により採取し、DNA を抽出した。再度、T7 エンドヌクレアーゼアッセイを行い、ミスマッチ変異を生じていたことが確認された。また異型細胞は Cytokeratin 陽性であり、尿管上皮細胞由来であることが確認された。

以上のように、CRISPR/Cas9 システムを用いて腎臓において後天的に遺伝子改変を行うことが可能となったが、その改変効率は不十分であり、その改善のために、AAV の投与量、投与方法、超音波照射を用いた細胞内への誘導方法などの条件検討がまだ必要と考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Noriyuki Yamashita, Tetsuro Kusaba, Noriko Watanabe, Kisho Ikeda, Takashi Kitani, Masahiro Uehara, Keiichi Tamagaki. Mechanical cross-talk between tubular epithelia and fibroblasts maintains renal 3-dimensional structure in injured kidney. ISN FRONTIERS MEETING.2018 Feb22-25 Tokyo Japan.
2. Noriyuki Yamashita, Tetsuro Kusaba, Masahiro Uehara, Keiichi Tamagaki Tubular epithelial proliferation accelerates tubular atrophy after kidney injury through its contractile capacity ASN Kidney Week 2018, 2018 Oct 25-28, San Diego, USA
3. 山下紀行、草場哲郎、渡邊乃梨子、池田葵尚、木谷昂志、上原正弘、玉垣圭一 . 急性腎障害後の尿管上皮細胞増殖と慢性期尿管萎縮の関連についての検討 . 第 61 回腎臓学会 学術集会 2018 年 6 月 8 日 10 日 : 新潟
4. 上原正弘、草場哲郎、渡邊乃梨子、池田葵尚、木谷昂志、山下紀行、玉垣圭一 . CRISPR/Cas9

を用いた細胞周期関連蛋白 ATR/ATM の遺伝子改変が障害尿細管上皮細胞に及ぼす影響 . 第
61 回腎臓学会学術集会 2018 年 6 月 8 日 10 日 : 新潟

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

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。