

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14616

研究課題名（和文）ゲノム安定性制御による逆位ヘテロ接合体の出生前治療の基盤構築

研究課題名（英文）Technological base development of prenatal treatment for heterozygous inversion by controlling genomic stability

研究代表者

岩田 悟（Satoru, Iwata）

中部大学・実験動物教育研究センター・助教

研究者番号：70722891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：逆位染色体（Inversion）のヘテロ接合体（In/+）における不均衡型染色体の発生メカニズムを明らかにすることを目的に、ヘテロ接合型逆位染色体 In(6)1J/+を系統化し、解析した(Iwata et al., G3, 2021)。また、逆位を順位に整復する技術を開発すべく、ゲノム編集技術を用いた逆位マウス作製の最適な条件検討を行った(Iwata et al., Sci. Rep. 2019)。今後は、逆位の作製効率を更に高めることで逆位を順位に高効率に整復する技術を開発し、ヒトの生殖細胞への応用に結び付ける。

研究成果の学術的意義や社会的意義

逆位染色体のヘテロ接合体（In/+）をもつヒトは無症状キャリアで過ごすことが多いが、減数分裂時に発生する不均衡型染色体が、繰り返す不妊や流産あるいは出生後の異常をきたす事が報告されている。それゆえ、逆位キャリアの減数分裂時における不均衡型染色体の発生メカニズムを明らかにし、また、問題となる逆位を修復することが出来れば、革新的治療になると考えられる。これらの技術は、将来的にヒト生殖細胞でのゲノム編集やiPS細胞からの個体発生の倫理的側面が整備されれば革新的治療に結びつくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanism of the development of unbalanced segregation in inversion chromosome, the heterozygous inversion In(6)1J/+ was systematized and analyzed (Iwata et al., G3, 2021). In addition, to develop a technology to restore the inversion chromosome, we examined the optimal conditions for the creation of inversion mice using genome editing technology (Iwata et al., Sci. Rep. 2019). In the future, we will further improve the efficiency of inversion generation to develop a technology for highly efficient restoration of inversion, which will lead to its application to human germline cells.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集 染色体工学 染色体逆位 不均衡型染色体 染色体異常 ゲノム安定性

1. 研究開始当初の背景

染色体の配列順序が部分的に逆転している逆位染色体 (Inversion) のヘテロ接合体 (*In/+*) をもつヒトは無症状キャリアで過ごすことが多いが、減数分裂時に発生する不均衡型染色体が、繰り返す不妊や流産あるいは出生後の異常をきたす事が判っている¹⁾。それゆえ、逆位キャリアの減数分裂時における不均衡型染色体の発生メカニズムを明らかにし、また、問題となる逆位を修復することが出来れば、革新的治療になると考えられる。その研究はこれまで困難であったが、近年ゲノム編集により大幅な遺伝子改変が可能になり²⁾、また、マウス生殖細胞やヒト iPS 細胞からの配偶子の樹立も技術的には可能になりつつある³⁾。

2. 研究の目的

*In/+*マウスにおける不均衡型染色体の派生に及ぼす影響を遺伝学的に解析し、不均衡型染色体の惹起に関与する分子を明らかにすべく以下に述べるプロジェクトを立案した。

- (1) 不均衡型染色体を惹起する逆位マウス *In(6)Ij/+* の樹立
- (2) ゲノム安定性の異常が逆位マウスの不均衡型染色体の発生へ及ぼす影響の解析
- (3) ゲノム編集による高効率の逆位作製法の開発

最終的に、関与分子を *in vivo* 電気穿孔法で一過性に強制発現することで不均衡型染色体の抑制効果を検討し、*In/+*に対する治療基盤の構築に貢献することを目的とする。これらの技術は、将来的にヒト生殖細胞でのゲノム編集や iPS 細胞からの個体発生の倫理的側面が整備されれば革新的治療に結びつくと考えられる。

3. 研究の方法

すべての動物実験は、中部大学実験動物委員会の審査を経た後、学長によって承認され、施設のガイドラインに従って実施された。

- (1) 逆位による不均衡型染色体モニタリングマウスの樹立

NGS 解析により、これまで同定に至っていない C3H/HeJ 由来の染色体逆位 *In(6)Ij* の切断点を塩基レベルで決定する。解析には、クラウドベースの NGS 解析プラットフォーム「Maser」⁵⁾、染色体構造異常解析ツールである「BreakDancer」⁶⁾ を用いた。NGS データは、公共データレポジトリ「DRAsearch」で公開されているデータ⁷⁾ を用いた。個々の NGS リードの詳細な解析は、*In(6)Ij* を有する近交系マウス C3H/HeJ から genomic DNA を精製し、PCR 増幅後に TA cloning したサンプルをサンガーシーケンス解析することで行った。

さらに、逆位領域内を蛍光マーカーで標識することで無動原体や二動原体を持つ不均衡型染色体の観察を容易にすべく *In(6)Ij* に対してノックイン (KI) を試みた。

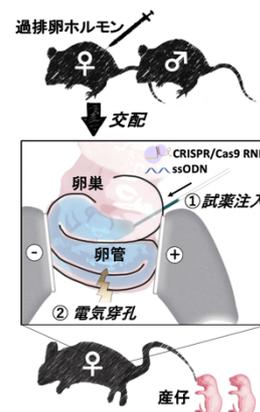
- (2) ゲノム安定性の異常が逆位マウスの不均衡型染色体の発生へ及ぼす影響の解析

申請者はこれまでに不均衡型染色体の派生と関連があると考えられるゲノムの不安定性に関与する候補分子を線虫 *C. elegans* の研究から複数見出している。本研究では、*in vivo* 電気穿孔法⁸⁾ を用いたゲノム編集により不均衡型染色体を惹起に関与すると示唆される候補分子 *Rad51*、*RecQ* に着目し、その分子を欠損したノックアウト (KO) マウスを作製した。*In(6)Ij/+*マウスとこれら KO マウスを交配することにより、不均衡型染色体に関与する分子のスクリーニングを行った。

妊孕性を解析するために、野生型 (+/+), 逆位ヘテロ (*In(6)Ij/+*), 逆位ホモ (*In(6)Ij/In(6)Ij*) の雄と野生型 (+/+) の雌とを交配し、得られる産子数を調べた。さらに、KO された *Rad51*、*RecQ* を遺伝的背景に持つ *In(6)Ij/+*雄と野生型 (+/+) 雌の交配を行い、産子数を調べた。精原細胞は生涯を通じて分裂しているため *In/+*のような染色体異常の多くは加齢に伴って蓄積することから⁹⁾、*In(6)Ij/+*雄に焦点を当てた。

- (3) ゲノム編集による逆位染色体の順位への修復

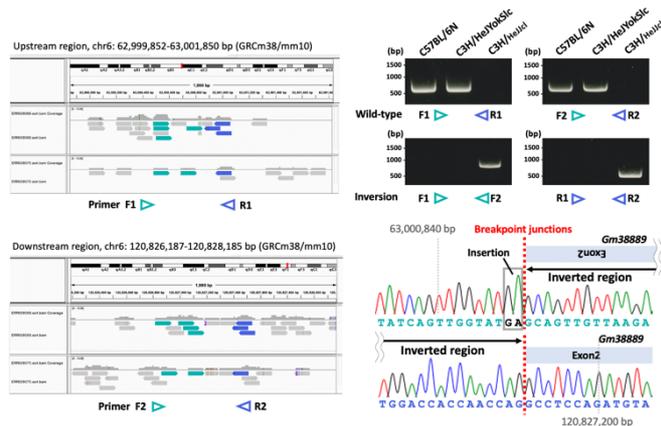
逆位の作製技術効率を高めることで、逆位を順位に高率に修復する技術を開発し、ヒトの生殖細胞への応用に結び付ける。*in vivo* 電気穿孔法で用いる guide RNA、Cas9 タンパクや一本鎖オリゴ DNA (ssODN) の至適濃度を検討し、より効率の良い条件を決定する。逆位を起こす際には、高い標的配列切断活性を持つクローニングフリーの Alt-R S.p. Cas9 Nuclease 3NLS、標的配列を認識する crRNA および tracrRNA (Integrated DNA Technologies 社) からなるリボ核タンパク質 (RNP) を用いた。標的配列は ChopChop (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>), CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu/>) といった複数の設計ツールを利用することでオフターゲットの影響に配慮する。得られた産仔 (F0 世代) の遺伝子型検査は、①PCR 法、②サンガーシーケンスにより検証した。



4. 研究成果

- (1) 逆位による不均衡型染色体モニタリングマウスの樹立

染色体構造異常解析ツール BreakDancer を用いた解析の結果、これまで同定に至っていない C3H/HeJ 系統由来の *In(6)Ij* の逆位切断点 2 箇所を塩基レベルで抽出した。さらに、予測される逆位切断点をサンガーシーケンス解析したところ、*In(6)Ij* の構造を塩基レベルで決定することに成功し、6 番染色体の 38.6%に及ぶ 57.8 Mb の領域が逆位を起こしていることを見出した (右図)¹⁰。興味深いことに、日本エスエルシー社で系統維持されている C3H/HeJYokSlc においては逆位が検出されなかった。逆位 *In(6)Ij* は C3H/HeJ 系統において 1970 年代前半以降に起きたと考えられていることから¹¹、C3H/HeJYokSlc は 1970 年以前の C3H/HeJ 系統に由来することが示唆された。



さらに、野生型 (+/+), 逆位ヘテロ (*In(6)Ij*/+), 逆位ホモ (*In(6)Ij*/*In(6)Ij*) の雄と野生型 (+/+) 雌マウスと交配させたときの産仔数を評価した。逆位ヘテロ (*In(6)Ij*/+) は、C3H/HeJcl (*In(6)Ij*/*In(6)Ij*) と C3H/HeJYokSlc (+/+) と交配して得られた F1 系統を用いた。その結果、野生型 (+/+)、逆位ホモ (*In(6)Ij*/*In(6)Ij*) と比較して *In(6)Ij*/+ は産仔数が少なくなる傾向があった。この産仔数低下の要因としては、受精卵での染色体不均衡が生じたものと示唆される。

続いて、本研究で同定された *In(6)Ij* に対して、蛍光遺伝子を KI することで無動原体や二動原体を持つ不均衡型染色体の観察を容易にすることを試みた。本実験に関しては、新型コロナウイルス感染症の拡大を受けて緊急事態宣言が発令されたこと、マイクロインジェクターが故障し、数ヶ月間研究できない状況が生じたことが重なり、現在、得られた F0 世代を系統化に向けて鋭意遂行中である。

(2) ゲノム安定性の異常が逆位マウスの不均衡型染色体の発生へ及ぼす影響の解析

不均衡型染色体を惹起に関与すると示唆される候補分子 *Rad51*、*RecQ* に着目し、それら分子を欠損したノックアウト (KO) マウスを作製した。*in vivo* 電気穿孔法によって得られた F0 マウスに対して PCR 法による遺伝子型判定を行なった。その結果、*Rad51* では F0 マウス 2 匹に対して解析を行ない、1 匹の KO 系統を得ることに成功した。一方、*RecQ* では F0 マウス 3 匹のうち 2 匹の KO 系統を得ることに成功した。得られた KO 系統に対して、サンガーシーケンス解析により意図した染色体改変を起こしていたことを確認した。

KO された *Rad51*、*RecQ* を遺伝的背景を持つ *In(6)Ij*/+雄と野生型 (+/+)雌の交配を行い、産子数を調べた。*Rad51* はホモ KO が胎生致死となったため、ヘテロ KO 系統 (*Rad51*^{+/-}) を用いた。しかしながら、ゲノム安定性に関与する分子、*Rad51* と *RecQ* の異常は *In(6)Ij*/+雄の妊孕性に影響を与えなかった。よって *Rad51* と *RecQ* は、不均衡型染色体の惹起に関与しないものと考えられた。

(3) ゲノム編集による効率的な逆位染色体の作製

逆位を順位に高率に修復する技術を開発し、ヒトの生殖細胞への応用に結び付けるべく、効率的な逆位染色体作製法の構築を試みた。2 箇所の断端が互いに反対方向となるように HDR を介して再度連結するために必要な糊付け配列 ssODN を設計し、*in vivo* 電気穿孔法での逆位マウス作製の最適な濃度の検討を行った。その結果、ssODN: 495 ng/μL のとき最も効率が高く、4.54 Mb の逆位が出産したマウスで確認された¹²。しかしながら、ゲノム断片が長いほど胎生致死となるリスクが高く、予期せぬ構造をとるケースもあり、誘導効率はまだ十分とは言えない。これは、細胞が HDR を使う頻度が少なく、非相同末端結合という正確性が非常に悪い修復経路を使うことによるものと考えられる。

Cas9 targets	Distance (Mb)	ssODN (ng/μL)	Mice electroporated	Pups born	Inversion (%)	
					One breakpoint detected	Two breakpoints detected
PN-locus G30470N-locus	4.54	250	4	16	2 (12.5)	0 (0)
		495	4	11	6 (54.5)	1 (9.1)
		1000	4	11	0 (0)	0 (0)
		-	5	0	0 (0)	0 (0)

以上、本研究では逆位 *In*/+キャリアにおける不均衡型染色体の発生メカニズムを明らかにすることを目的に、NGS 解析により C3H/HeJ 系統から *In(6)Ij* の breakpoint を同定し、ヘテロ接合型逆位染色体 (*In(6)Ij*/+) を系統化すると共に、ゲノム編集技術を用いることでゲノム安定性制御に関与する分子 (*Rad51*、*RecQ*) の KO 系統を作製した。しかしながら、*Rad51* と *RecQ* の異常は *In(6)Ij*/+雄の妊孕性に影響を与えなかった。今後は *In(6)Ij*/+の妊孕性低下を起こすと示唆される別分子をスクリーニングすることで、不均衡型染色体の惹起に関与する分子を見出していく。

また、逆位を順位に整復する技術を開発すべく、*in vivo* 電気穿孔法によるゲノム編集技術を用いた逆位マウス作製の最適な条件検討を行った。その結果、ssODN: 495 ng/ μ L のとき最も効率が高く、4.54 Mb の逆位が出産したマウスで確認された。今後は、標的 DNA への特異性が高く、オフターゲットの少ないことが特徴の CRISPR/Cpf1 を用いるなどして逆位の作製効率を更に高めることで逆位を順位に高効率に整復する技術を開発し、ヒトの生殖細胞への応用に結び付ける。

本研究で同定した *In(6)IJ* は遺伝学的ツール (balancer 染色体マウス) として系統化し、理化学研究所バイオリソース研究センターへ譲渡した (BRC No. RBRC11511)。本研究の成果は英科学誌「*Scientific Reports* (電子版)」に掲載された。また、米国遺伝学会が発行するオープンアクセスジャーナル「*G3: Genes, Genomes, Genetics*」誌にも掲載され、研究代表者が作成したカバーアートが 8 月号の表紙を飾った (右図)。



引用文献

- 1) Carp, Howard, et al. "Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage." *Fertility and sterility* 81.5 (2004): 1296-1301.
- 2) Lino, Christopher A., et al. "Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches." *Drug delivery* 25.1 (2018): 1234-1257.
- 3) Yamashiro, Chika, et al. "Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro." *Science* 362.6412 (2018): 356-360.
- 4) Ackert-Bicknell, Cheryl L, et al. "A chromosomal inversion within a quantitative trait locus has a major effect on adipogenesis and osteoblastogenesis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116.1 (2007): 291-305.
- 5) Kinjo, Sonoko, et al. "Maser: one-stop platform for NGS big data from analysis to visualization." *Database* 2018 (2018).
- 6) Chen, Ken, et al. "BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation." *Nature methods* 6.9 (2009): 677-681.
- 7) Keane, Thomas M., et al. "Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation." *Nature* 477.7364 (2011): 289-294.
- 8) Ohtsuka, Masato, et al. "i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases." *Genome biology* 19.1 (2018): 1-15.
- 9) Bosch, Mercè, et al. "Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age." *European journal of human genetics* 11.10 (2003): 754-759.
- 10) Iwata, Satoru, et al. "An efficient i-GONAD method for creating and maintaining lethal mutant mice using an inversion balancer identified from the C3H/HeJcl strain." *G3: Genes, Genomes, Genetics* 11(8) (2021): jkab194.
- 11) Akeson, Ellen C., et al. "Chromosomal inversion discovered in C3H/HeJ mice." *Genomics* 87.2 (2006): 311-313.
- 12) Iwata, Satoru, et al. "Simple and large-scale chromosomal engineering of mouse zygotes via In Vitro and In Vivo electroporation." *Scientific reports* 9.1 (2019): 1-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iwata Satoru, Sasaki Takahisa, Nagahara Miki, Iwamoto Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 An efficient i-GONAD method for creating and maintaining lethal mutant mice using an inversion balancer identified from the C3H/HeJcl strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 jkab194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/g3journal/jkab194	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 Suehiro Yuji, Yoshina Sawako, Motohashi Tomoko, Iwata Satoru, Dejima Katsufumi, Mitani Shohei	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient collection of a large number of mutations by mutagenesis of DNA damage response defective animals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87226-7	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 Ogawa Kota, Noda Akiko, Ueda Jun, Ogata Takehiro, Matsuyama Rumiko, Nishizawa Yuji, Qiao Shanlou, Iwata Satoru, Ito Morihiro, Fujihara Yoshitaka, Ichihara Masatoshi, Adachi Koichi, Takaoka Yuji, Iwamoto Takashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Forced expression of miR-143 and -145 in cardiomyocytes induces cardiomyopathy with a reductive redox shift	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Biology Letters	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/s11658-020-00232-x	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 Iwata Satoru, Nakadai Hitomi, Fukushi Daisuke, Jose Mami, Nagahara Miki, Iwamoto Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Simple and large-scale chromosomal engineering of mouse zygotes via in vitro and in vivo electroporation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50900-y	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 Kage-Nakadai E., Sun S., Iwata S., Yoshina S., Nishikawa Y., Mitani S.	4. 巻 69(1)
2. 論文標題 The small GTPase ARF-1.2 is a regulator of unicellular tube formation in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 47-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0617-5	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 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩田悟, 佐々木崇寿, 長原美樹, 岩本隆司
2. 発表標題 バランス染色体B6.C3H-In(6)1Jを用いた致死変異体マウスの効率的な作製と維持
3. 学会等名 ゲノム編集学会 第6回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahisa Sasaki, Satoru Iwata, Miki Nagahara, Takashi Iwamoto
2. 発表標題 An efficient method for creating and maintaining lethal mutant mice using inversion chromosome in C3H/HeJcl strain identified via next-generation sequencing
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田悟, 木場瑞姫, 佐々木崇寿, 福士大輔, 仲臺瞳, 長原美樹, 岩本隆司
2. 発表標題 i-GONAD法を用いたゲノム安定性制御による効率的な染色体改変マウスの作製
3. 学会等名 第67回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田 悟、仲臺 瞳、上瀬 菜美、長原 美樹、岩本 隆司
2. 発表標題 エレクトロポレーション法を用いたゲノム編集技術による染色体改変マウスの作製
3. 学会等名 ゲノム編集学会 第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲臺 瞳、岩田 悟、上瀬 菜美、長原 美樹、岩本 隆司
2. 発表標題 エレクトロポレーション法を用いたゲノム編集技術による染色体改変マウスの作製とその解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>細胞を傷つけず簡便なゲノム編集法で染色体改変、中部大学が成功 https://univ-journal.jp/28383/ 細胞を傷つけず熟練技術不要なゲノム編集実験で染色体の遺伝子操作に成功 https://www3.chubu.ac.jp/research/news/25463/researchmap https://researchmap.jp/iwata/ 中部大学 実験動物教育研究センター webページ https://www3.chubu.ac.jp/celar/</p>

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

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
---------	---------