

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03143

研究課題名(和文) エピゲノム編集による単為発生マウスの作製

研究課題名(英文) Generation of parthenogenetic mice by epigenome editing

研究代表者

堀居 拓郎 (Horii, Takuro)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00361387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物は受精を経ず卵子だけから個体発生する単為発生を生殖戦略の1つとして採用してきた。一方、哺乳類の単為発生胚は配偶子特異的な遺伝子修飾「ゲノムインプリンティング」により発生途中で致死となる。近年では、ゲノムインプリンティングを操作することにより、単為発生マウスを得られるようになった。しかし、ゲノムの改変が必要なことや、発生段階の異なる卵子を準備して一連の核移植操作を行う必要があるなどマウス以外の哺乳類には適用が難しかった。本研究では、我々が最近開発した高効率エピゲノム編集法により、ゲノムを一切改変することなく、遺伝子修飾のみを書き換えることによって卵子から単為発生マウスの作製を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではマウスでの実施にとどまるが、同じ方法はマウス以外の哺乳類にも利用可能と考えられ、今後様々な分野に利用できる可能性がある。1セットのゲノム由来の単為発生動物はホモ接合体となるため、近交系の存在しない家畜や実験動物のホモ接合体を一代で確立できる可能性がある。また、こうして樹立された動物は様々な原因遺伝子の同定を容易にすることができる。

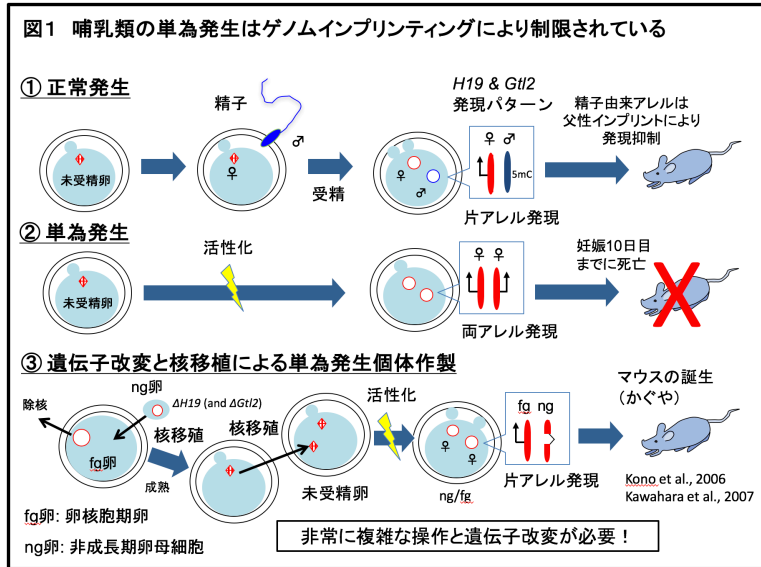
研究成果の概要(英文)：Many animals have adopted parthenogenesis, in which an individual develops from an ovum alone without fertilization, as one of their reproductive strategies. On the other hand, parthenogenetic embryos of mammals are lethal during development. This is because only mammals possess "genomic imprinting," a gamete-specific epigenetic modification. In recent years, genetic engineering and developmental engineering have enabled to manipulate genomic imprinting to obtain parthenogenetic (bi-maternal) mice. However, it is difficult to apply this method to mammals other than mice because it requires modification of the genome in the regulatory region of the imprinted gene expression and a series of nuclear transfer operations by preparing oocytes at different developmental stages. In this study, we attempted to generate parthenogenetic mice from oocyte-derived ES cells by rewriting only the epigenetic modifications using our recently developed highly efficient epigenome editing method.

研究分野：発生工学

キーワード：単為発生 エピゲノム編集

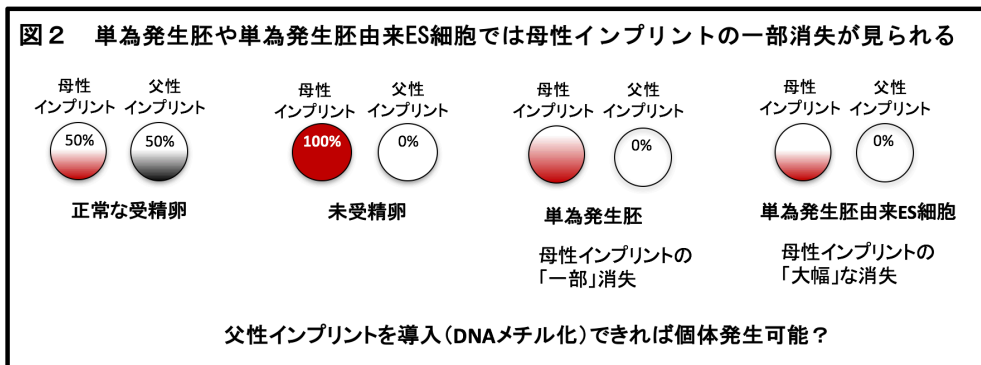
1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの動物種では、受精を経ずに卵子だけから個体発生できる「単為発生」が知られている。一方、哺乳類は単為発生を生殖戦略として使用することはできず、人為的に作製した単為発生胚は妊娠途中で致死となる（図1）。この原因は、哺乳類では配偶子特異的遺伝子修飾、ゲノムインプリンティングが、配偶子特異的な遺伝子発現を制御しているためだと考えられてきた。このことは、1983年に Surani らの核移植実験により強く示唆され、2004年には河野らのノックアウト実験による単為発生マウス「かぐや」の誕生により実証された（図1）。しかし、実際に単為発生個体を作製するには複雑な遺伝子改変と一連の核移植を組み合わせる必要があり、簡単に単為発生動物が得られるわけではない。また、これまでの報告はゲノム自体の改変によるものであり、根本的な原因となっているエピゲノムだけを改変した単為発生個体の作製はまだ報告されていない。



(2) 哺乳類ではゲノムインプリンティングによる配偶子特異的遺伝子発現があるため、卵子のみまたは精子のみのゲノムセットからは個体発生できない。これらの片親由来胚は正常胚とキメラ形成することにより、個体に寄与することができるものの、その寄与する臓器は限定的であった。申請者は単為発生胚を特定の培養液で培養すると卵子特異的なインプリンティング（母性インプリント）の一部が消失すること、さらに単為発生胚由来 ES 細胞では、母性インプリントが大幅に消失し、正常な受精卵に近いインプリント状態になっていることを発見した（Horii *et al.*, Stem Cells, 2008）（図2）。また、母性インプリントを大幅に失った単為発生胚由来細胞は、キメラマウスの組織に非常に寄与しやすいことを発見した。一方、精子特異的なインプリンティング（父性インプリント）に関しては、単為発生胚由来細胞でも完全に消失したままであり（図2）、このことが単為発生胚由来細胞の発生分化能をまだ限定していると想像された。父性インプリント遺伝子の数は母性インプリント遺伝子に比べて圧倒的に少なく、7番染色体の *Igf2* と *H19* 遺伝子、12番染色体の *Dlk1* と *Gtl2* 遺伝子、および9番染色体の *Rasgrfl* 遺伝子の5つ程度である。よって単為発生胚や単為発生胚由来 ES 細胞の父性インプリント

遺伝子の全てまたは一部をエピゲノム編集により正常胚と同じ状態に書き換える

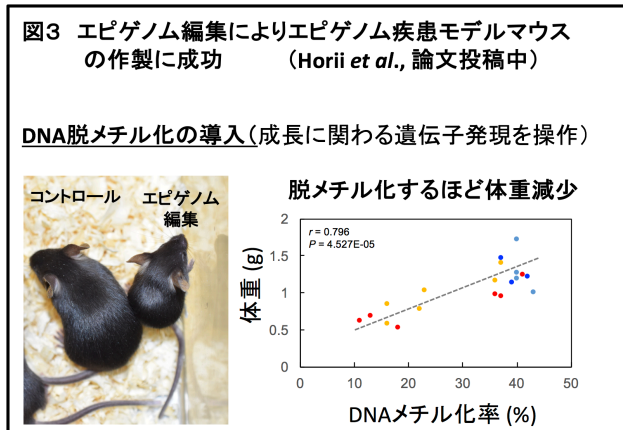


ことで、個体発生できるかもしれないという着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究はゲノムを改変することなく、遺伝子修飾 (DNA メチル化) のみを書き換えるエピゲノム編集法を利用して、単為発生哺乳類を簡便に作製することを目的とする。我々はこれまでに、dCas9 と SunTag システムによる独自の高効率エピゲノム編集法 (Morita *et al.*, Nature Biotechnology, 2016)を開発した。この方法により、培養細胞 (ES 細胞やガン細胞株) におけるエピゲノム編集や胎児期のマウス脳における *in utero* electroporation によるエピゲノム編集に成功している。また、受精卵でのエピゲノム編集によりターゲット特異的な DNA メチル化または脱メチル化を誘導することで、エピゲノム疾患モデルマウスの作製に成功している (Horii *et al.*, Genome Biol, 2020) (図 3)。よって、この技術は単為発生胚のインプリンティングの書き換えにも利用可能と考えられる。

(2) 本研究ではマウスでの実施にとどまるが、同じ方法はマウス以外の哺乳類にも利用可能と考えられ、今後様々な分野に利用できる可能性がある。1セットのゲノム由来の単為発生動物はホモ接合体となるため、近交系の存在しない家畜や実験動物のホモ接合体を一世代で確立できる可能性がある。また、こうして樹立された動物は様々な原因遺伝子の同定を容易にすることができるかもしれない。



3. 研究の方法

(1) これまでの申請者らの研究から、単為発生胚よりも単為発生胚由来 ES 細胞の方が、母性インプリントが消失して正常胚に近い状態であることがわかっている (図 2)。そこで単為発生胚由来 ES 細胞をエピゲノム編集して個体作製を試みる。マウス未受精卵を塩化ストロンチウムおよびサイトカラシン B 添加培地で活性化させて、2 倍体単為発生胚を作製する。アレル特異的エピゲノム編集のために、C57BL/6N(B6)系統と DBA2/N 系統の 2 種類のアレルを保有する単為発生胚 (雌核発生胚) を作製する。これらの単為発生胚より ES 細胞を樹立する (parthenogenetic ES 細胞, PgES 細胞)。

(2) 単為発生のために書き換えが必要な父性インプリントは、以前の報告から *Igf2/H19* 単独 (Kono *et al.*, 2004) あるいは *Dlk1/Gtl2* を加えた 2 箇所のメチル化可変領域 (DMR) (Kawahara *et al.*, 2007) を調節することで効果があることが示されている。*Igf2* と *H19* は *H19*-DMR により、*Dlk1* と *Gtl2* は *IG*-DMR により発現制御されている。初年度は *H19*-DMR のみのエピゲノム編集、次年度以降は *H19*-DMR および *IG*-DMR の両インプリントの編集を行った。PgES 細胞にエピゲノム編集用複合体 (*H19*-DMR および *IG*-DMR の gRNA、dCas9-SunTag、scFv-GFP-Dnmt3a または scFv-GFP-Dnmt3b の発現ベクター) をトランスフェクションし、DMR に DNA メチル化を導入する。フローサイトメーター (FACSAriaII) によりエピゲノム編集された細胞 (GFP 陽性) を選別する。

(3) ES 細胞と 4 倍体胚をキメラにすると ES 細胞のみからなる個体を作製できる (テトラプロイドレスキュー法)。エピゲノム編集された PgES 細胞を 4 倍体胚に導入し、キメラ胚を偽妊娠マウスの子宮に移植し、個体を作製する。通常単為発生胚は妊娠 10 日

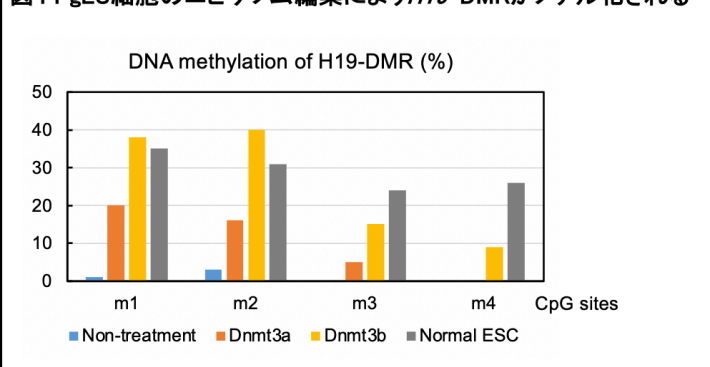
目を超えて発生することはできないため、胎生 10 日目以降の胚を発生ステージごとに回収する。胚より DNA を抽出し、*H19*-DMR および *IG*-DMR の DNA メチル化状態を COBRA 法およびバイサルファイトシーケンス解析により確認する。DNA メチル化が導入された胚のみ発生が延長していれば、エピゲノム編集により単為発生胚の発生が延長されることを証明できる。最終的には、出生までマウスが発生できるか明らかにする。また、単為発生マウスが成体まで育った場合は、雄マウスと交配させ、繁殖能の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) B6D2F1 マウスの MI 期の未受精卵より PgES 細胞を複数ライン樹立した。SNP 解析により、B6 と DBA のヘテロ接合体である ES 細胞株を選別した。多能性マーカーである Oct4 および Nanog の発現量などから、この中で最も状態の良い pMI③の細胞株を選び出し、以降の実験に使用した。

(2) 樹立した PgES 細胞の *H19*-DMR の過剰メチル化をエピゲノム編集により行った。*H19*-DMR にある 4 つの CTCF-binding site (m1, m2, m3, m4) について、COBRA 法によりメチル化解析を行った (図 4)。この領域は卵子では非メチル化状態のため、PgES 細胞でもメチル化されていなかった。一方、Dnmt3a

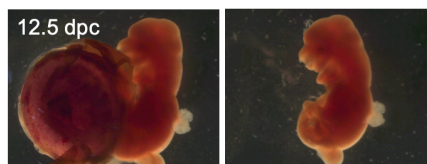
図4 PgES細胞のエピゲノム編集により*H19*-DMRがメチル化される



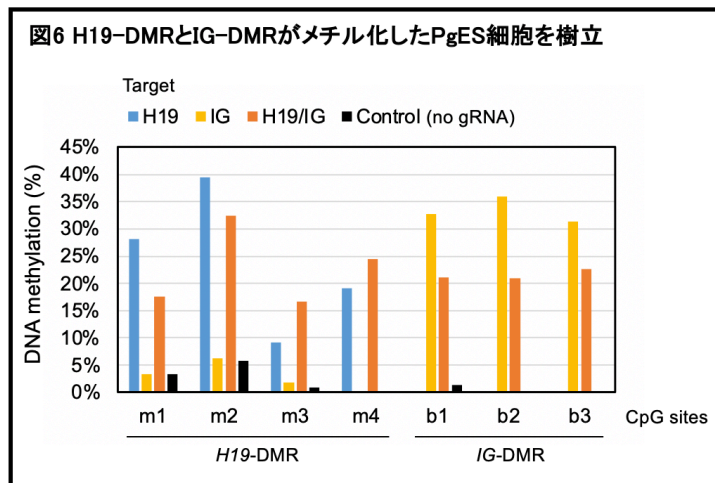
や Dnmt3b によりエピゲノム編集を行った ES 細胞では最大で 40%程度のメチル化が導入されていた。これは正常な受精卵から樹立した ES 細胞 (normal ESC) と同レベルのメチル化率であった。本研究では Dnmt3b の方が Dnmt3a よりも *de novo* メチル化活性が高かったため、以降の実験は Dnmt3b を使用することとした。

(3) *H19*-DMR を過剰メチル化させた PgES 細胞を用いてテトラプロイドレスキュー法により個体作製を試みた。通常単為発生胚は妊娠 10 日目までに致死となるが、*H19*-DMR にメチル化を導入した PgES 細胞は、12.5 日胚まで発生していた (図 5)。回収した胎子のメチル化レベルを調べたところ、通常 0%のところ 60-70%程度まで上昇していることが分かった。しかし、胎子形成率は移植胚のうちの 3%程度とかなり低く、*H19*-DMR と *IG*-DMR の両領域をメチル化させた PgES 細胞の樹立が必要と考えられた。

図5 PgES細胞のエピゲノム編集により発生が延長された

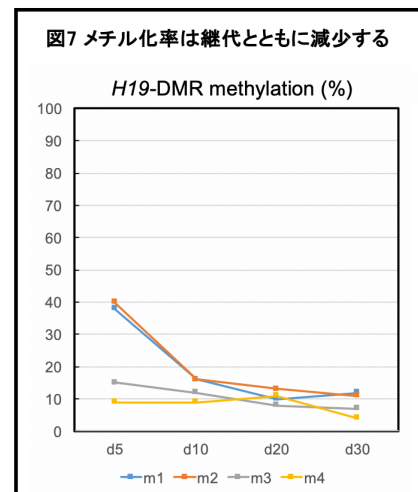


(4) そこで *H19*-DMR と *IG*-DMR の両領域をメチル化させた PgES 細胞の樹立を行った。トランスフェクションして5日目の PgES 細胞を回収し、メチル化解析を実施したところ、*H19*-DMR と *IG*-DMR の両領域がメチル化されていることが判明した (図 6)。*H19*-DMR と *IG*-DMR のメチル化率は最大でそれぞれ、40%と 36%まで上昇していた。この PgES 細胞を用いてテトラプロイドレスキュー法により個体作製を試みているが、現時点では個体が得られていない。



(5)PgES 細胞を過剰メチル化させても個体発生がそれほど延びなかった原因の1つとして導入した DNA メチル化の不安定性を疑った。そこで PgES 細胞の継代培養を行ったところ、トランスフェクションして5日目の PgES 細胞では *H19*-DMR のメチル化率は最大で 40%程度まで上昇していたが、10日目には 20%弱まで減少し、その後も1ヶ月間にわたり徐々に減少していることが判明した (図 7)。おそらく子宮内でも同様にメチル化の急速な減少を生じており、それが個体発生の妨げとなっていたと考えられる。

(6)本研究は PgES 細胞のエピゲノム編集により発生ステージが延長されることを初めて明らかにした。しかし、現時点では個体発生できる数は限定的であり、出生までは至っていない。その原因として導入したメチル化の不安定性が示唆された。今後は、導入したメチル化を安定化させるために、DNA メチル基転移酵素である Dnmt3a や Dnmt3b に加えて、補因子である Dnmt3l やヒストンのヘテロクロマチン化に参与する KRAB ジンクフィンガードメインなどの共導入が必要であることが示唆された。



<引用文献>

- ① Kawahara M, et al. Nat Biotechnol. 2007 Sep;25(9):1045-50.
- ② Kono T, et al. Nature. 2004 Apr 22;428(6985):860-4.
- ③ Horii T, et al. Stem Cells. 2008 Jan;26(1):79-88.
- ④ Morita S, et al. Nat Biotechnol. 2016 Oct;34(10):1060-1065.
- ⑤ Horii T, et al. Genome Biol. 2020 Apr 1;21(1):77.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Horii T, Morita S, Hino S, Kimura M, Hino Y, Kogo H, Nakao M & Hatada I. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genome Biology | 6. 最初と最後の頁 77 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9030546 | 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 Horii T, Kobayashi R, Kimura M, Morita S, Hatada I. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Calcium-Free and Cytochalasin B Treatment Inhibits Blastomere Fusion in 2-Cell Stage Embryos for the Generation of Floxed Mice via Sequential Electroporation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 E1088 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051088 | 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 Morita S, Horii T, Kimura M, Hatada I. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Synergistic Upregulation of Target Genes by TET1 and VP64 in the dCas9-SunTag Platform. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science | 6. 最初と最後の頁 E1574 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051574 | 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 Morita S, Horii T, Kimura M, Hatada I. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Synergistic Upregulation of Target Genes by TET1 and VP64 in the dCas9-SunTag Platform | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 pii: E1574 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051574. | 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 Horii T, Morita S, Hino S, Kimura M, Hino Y, Kogo H, Nakao M, Hatada I. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genome Biol. | 6. 最初と最後の頁 77 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-020-01991-8. | 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 - |

| | |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名 Horii T, Kobayashi R, Kimura M, Morita S, Hatada I. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Calcium-Free and Cytochalasin B Treatment Inhibits Blastomere Fusion in 2-Cell Stage Embryos for the Generation of Floxed Mice via Sequential Electroporation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 pii: E1088 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051088. | 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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 堀居拓郎 |
| 2. 発表標題 Epigenetic Disease Model Animal by Epigenome Editing |
| 3. 学会等名 日本循環器学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、日野信次朗、木村美香、日野裕子、向後寛、中尾光善、畑田出穂 |
| 2. 発表標題 エピゲノム編集したES 細胞からの疾患モデルマウスの作製 |
| 3. 学会等名 第14回 日本エピジェネティクス研究会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、日野信次朗、木村美香、日野裕子、向後寛、中尾光善、畑田出穂 |
| 2. 発表標題 エピゲノム編集による疾患モデルマウスの3つの作製方法 |
| 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 堀居拓郎、小林良祐、木村美香、森田純代、畑田出穂 |
| 2. 発表標題 2細胞期胚のCaフリー処理またはアクチン重合阻害は割球融合を抑制し、2段階エレクトロポレーション法におけるfloxマウス作製効率を上昇させる |
| 3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takuro Horii, Sumiyo Morita, Shinjiro Hino, Mika Kimura, Yuko Hino, Hiroshi Kogo, Mitsuyoshi Nakao, Izuho Hatada |
| 2. 発表標題 Generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome |
| 3. 学会等名 The 15th Transgenic Technology Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、日野信次朗、木村美香、日野裕子、向後寛、中尾光善、畑田出穂 |
| 2. 発表標題 エピゲノム編集による疾患モデルマウスの作製 |
| 3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、日野信次郎、木村美香、日野裕子、向後寛、中尾光善、畑田出穂 |
| 2. 発表標題 エピゲノム編集によるSilver-Russell症候群モデルマウスの作製 |
| 3. 学会等名 第13回 日本エピジェネティクス研究会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、日野信次郎、木村美香、日野裕子、向後寛、中尾光善、畑田出穂 |
| 2. 発表標題 エピゲノム編集によるインプリンティング疾患モデルマウスの作製 |
| 3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第4回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 堀居拓郎 |
| 2. 発表標題 エピゲノム的人為的操作：エピゲノム編集による疾患モデル動物の作製 |
| 3. 学会等名 第112回 日本繁殖生物学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takuro Horii, Sumiyo Morita, Shinjiro Hino, Mika Kimura, Yuko Hino, Hiroshi Kogo, Mitsuyoshi Nakao, Izuho Hatada |
| 2. 発表標題 Generation of epigenetic disease model mice by dCas9-SunTag epigenome editing system |
| 3. 学会等名 第14回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀居拓郎、森田純代、日野信次郎、木村美香、日野裕子、向後寛、中尾光善、畑田出穂 |
| 2. 発表標題 人為的エピゲノム操作によるインプリンティング疾患モデルマウスの作製 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計4件

| | |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 堀居拓郎、森田純代、畑田出穂 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 148 |
| 3. 書名 実験医学「エピゲノム編集疾患モデル動物作製法」 | |

| | |
|------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 森田純代、堀居拓郎、畑田出穂 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 メディカルドゥ | 5. 総ページ数 176 |
| 3. 書名 遺伝子医学「エピゲノム編集と医療応用」 | |

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 堀居拓郎、森田純代、畑田出穂 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 エヌ・ティー・エス | 5. 総ページ数 316 |
| 3. 書名 ダイレクトリプログラミング ~再生医療の新展開~ | |

| | |
|--------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 堀居拓郎、森田純代、畑田出穂 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 メディカル ドゥ | 5. 総ページ数 168 |
| 3. 書名 遺伝子医学 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>群馬大学 生体調節研究所 生体情報ゲノムリソースセンター ゲノム科学リソース分野 http://epigenome.dept.showa.gunma-u.ac.jp/~hatada/index.php 群馬大学 生体調節研究所 生体情報ゲノムリソースセンター ゲノム科学リソース分野 http://epigenome.dept.showa.gunma-u.ac.jp/~hatada/</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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 森田 純代 (Morita Sumiyo) (40589264) | 群馬大学・生体調節研究所・助教 (12301) | |

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 |
|---------|---------|