

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03152

研究課題名（和文）顕微注入を伴わないin situゲノム編集技術による遺伝子改変個体の簡便な作成

研究課題名（英文）Generation of gene modified mice using in situ genome editing system without microinjection

研究代表者

中村 伸吾（Nakamura, Shingo）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 医療工学研究部門・教授

研究者番号：00505323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウス母体の静脈血内へCRISPR/Cas9に関わるプラスミドDNAを投与することで、胎仔心筋細胞にインデルを生成させた。これまでの我々の研究を含む類似研究と比べ、遺伝子導入のためのリボソーム試薬や装置を一切使用せずに胎仔の内在性遺伝子座（MHC）を標的としたゲノム編集を行うことができた。さらに、心筋細胞以外の細胞でもゲノム編集の効果が確認できたことは予想外の結果であった。本システムは、改良の余地が残されているものの、顕微注入を伴わないin situゲノム編集技術による簡便な遺伝子改変個体の作成方法としての期待が持てる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9に代表されるゲノム編集技術により、動物個体の遺伝子改変技術が大きく進歩している。その中にあって本研究は、胚のex vivo操作に依らないin vivo遺伝子導入法によってCRISPR系を稼働させる点に特色を有する。本研究の成果は、心臓の内在性遺伝子が改変された胎仔が簡便に得られたことに集約される。今後、系の改良等本手法の検討をさらに進めていくことで遺伝子操作の対象となる組織が広がって行くものと考えられる。受精卵操作を一切回避したこの様な新技術の発展は、医学生物学分野の研究等に大きく貢献するものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that intravenous injection of plasmid DNA containing CRISPR/Cas9 produced indels in fetal myocardial cells. This study has novelty, which is clearly different from other similar research including our previous study in view that: successful genome editing was achieved when hydrodynamics-based gene delivery was employed without using any gene delivery reagent or equipment, and mutations are induced successfully at the target endogenous MHC locus. In addition, against our expectations, cells with genome editing were also found in non-cardiac cells. We have succeeded in creating convenient method of producing genome-modified fetuses using in situ genome editing system although there is still room for improvements to this method.

研究分野：実験動物学

キーワード：経胎盤的遺伝子導入（TPGD） ゲノム編集 遺伝子改変マウス 発生工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子改変動物の作成手法は、受精卵へ外来性遺伝子を顕微注入して遺伝子組換え動物を作り出す方法、胚性幹細胞を介した gene targeting 法に基づくノックアウトマウスの作成方法、これらが主流であった。しかしながら、研究開始期においてはゲノム編集技術の登場による大きな変革がもたらされていた。即ち、取り扱いが簡便な CRISPR/Cas9 システム (CRISPR 系) を使用した動物個体の標的遺伝子のノックアウト、ノックイン実験が隆盛を極めており、様々な手法が報告されていた。受精卵へ CRISPR 系の核酸成分を直接顕微注入する方法に端を発し、ex vivo 方式による受精卵への電気穿孔法を使用した CRISPR 系成分の導入法 (TAKE 法: technique for animal knockout system by electroporation) [1]、in situ にてそれを実施する方法 (GONAD 法: genome-editing via oviductal nucleic acids delivery) [2] などがその代表例である。これらの方法はマウス以外のラット等での適用も実証されつつあった[3,4]。中でも GONAD 法は、体外へ受精卵を取り出さずに作業が完結できるという特徴があり、発生工学的スキルの熟練度に左右されにくいという利点や胚の体外培養が難しい動物へ適用できる発展性を有していた。

我々は in vivo における非ウイルス系 DNA の遺伝子導入法のいくつかを先駆的に開発しており、その 1 つを CRISPR 系へ応用させたものが GONAD 法であった。GONAD 法に対する世間の評価や動向を見たとき、我々がその開発で掲げた「in situ での動物個体の簡便で経済的なゲノム改変法」というコンセプトは、時代のニーズにマッチしたものと考えられた。そこで、これまでに我々が開発をした非ウイルス系 DNA の in vivo 遺伝子導入法をさらに活用し、特に、生殖細胞や胎子を標的としてゲノム編集を実施するために本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、in situ で実施できる簡便で経済的な動物個体のゲノム改変法の開発を目指した。具体的には、静脈注射のみで実施できる TPGD-GEF (transplacental gene delivery for creation of genome-edited fetuses) に関する検討を中心に据えた。TPGD-GEF は、リポソーム/DNA 複合体を妊娠母体へ静脈注射して経胎盤的に胎仔へ遺伝子導入する TPGD 法 (transplacental gene delivery technique) を基軸としており、これにゲノム編集因子を組み合わせる方法である。これまでの基礎検討では、マーカー遺伝子を発現した胎仔でゲノム編集効果が得られていた[5]。そこで、胎児 (胎仔) 毒性が懸念される遺伝子導入試薬を一切使用しない系を構築し、かつ、内在性遺伝子がゲノム編集されたゲノム改変胎仔マウスを得ることを本研究の主要目的とした。

3. 研究の方法

(1) プラスミド DNA (pCGSap1-MHC) の構築

マウスの内在性遺伝子として cardiac myosin heavy-chain (MHC) 遺伝子 (National Center for Biotechnology Information の Gene ID : 17888) を今回の実験の対象とした。当該遺伝子の上流配列を CRISPR 系の標的とし、その塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これを 95 °C で 5 分間、室温で 30 分間インキュベートした。アニーリングさせたこのオリゴヌクレオチドを pCGSap1 ベクターの Sap I 部位にクローニングし、pCGSap1-MHC を作成した。このプラスミド DNA は、ニワトリ β -アクチンがベースの CAG プロモーターの制御下で Cas9 遺伝子を発現し、同時に、U6 プロモーターの制御下で MHC を標的とする gRNA を発現する。

(2) ハイドロダイナミクス法による TPGD-GEF の実施

マウス尾静脈を介したハイドロダイナミクス法によって TPGD-GEF を実施した。ハイドロダイナミクス法は 30 ゲージ針 (デントロニクス株式会社、東京、日本) を装着した注射器 (3mL Luer Lock タイプ; ニプロ株式会社、大阪、日本) を使用して実施し、試験溶液は麻酔下のマウスに対して一定の注入速度で導入した。試験溶液は、対象マウスの体重の 1/10 重量比相当の PBS あるいは TransIT-EE (Mirus Bio LLC、ウィスコンシン州、米国) とプラスミド DNA 20 μ g とが混合されたものである。プラスミド DNA の導入効率が良い時期を確定させるために、最終的には胎生期 9.5 日、12.5 日、15.5 日の時期を対象とした詳細な検討を実施した。ハイドロダイナミクス法の実施 2 日後に当該マウスを安楽死させて胎仔を単離し、引き続いて顕微鏡下で胎仔の心臓を採材して氷冷下の 1.5mL チューブへ移し替えた。その他の胎仔の組織 (以下、「全身組織」と称する) は、これとは別のチューブへ移し替えた。

(3) 分子生物学的解析

胎仔のゲノム DNA および導入されたプラスミド DNA を抽出するために、心臓や全身組織を溶解させることのできる一般的なライシスバッファーを使用して 37 °C にて 2 日間の穏やか振とう操作を行った。その後、飽和フェノール処理、イソプロパノール沈殿処理を行い、この結果得られた溶液を DNA 抽出液として使用開始まで 4 °C で保存した。

ハイドロダイナミクス法によって導入したプラスミド DNA の存在を確認する目的で、pCGSap1-*MHC* 等のプラスミド DNA の配列の一部を認識するプライマーセットを設計して PCR を行った。また、標的部位のゲノム編集効果の確認のため、当該ゲノム DNA 領域を増幅させることのできるプライマーセットを設計して PCR を行った。これらの PCR では、状況によっては、別のプライマーセットによる nested PCR も実施した。ゲノム編集効果は Eurofins Genomics (ユーロフィンジェノミクス、東京、日本) によるダイレクトシーケンスの結果を用いて評価した。そして、重複配列が判明したサンプルについては、TA クローニングキット (Invitrogen Co.、カリフォルニア州、米国) を使用したサブクローニングを経たコロニー単離作業の後に、ダイレクトシーケンスを再度行った。

4. 研究成果

(1) ハイドロダイナミクス法による TPGD-GEF の実施時期の決定

これまでの TPGD-GEF に関する検討からは、胎生期 12.5 日で FuGENE6 (Promega Co.、ウィスコンシン州、米国) と複合化させたプラスミド DNA の導入を実施していた。そこで本研究が目指す naked プラスミド DNA を使用したハイドロダイナミクス法での遺伝子導入の至適導入時期を選定するため、胎生期 12.5 日を中心に検討を進めた。その結果、胎生期 9.5 日における導入成績が最も良いことがわかった。これは、導入されたプラスミド DNA を検出するための PCR の結果に基づくものである (図 1)。

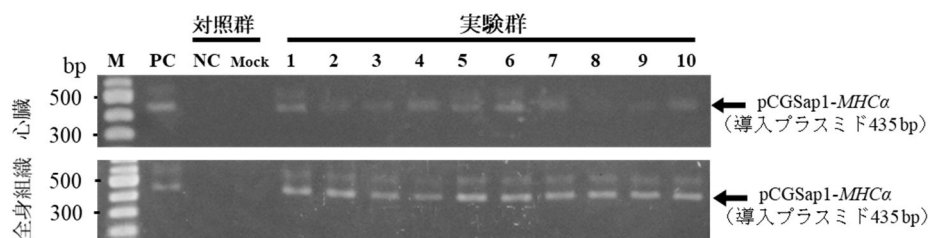


図 1. 導入したプラスミド DNA の検出

PCR 後のサンプルの電気泳動写真の一部を示す。予想される 435 bp に相当する位置にバンドが検出された。これはプラスミド DNA がサンプル中に存在していることを示している。バンドは心臓(上段)と全身組織(下段)の両方で検出された。即ち、TPGD 法による遺伝子導入が達成されていることが明らかになった。胎生期 9.5 日でのバンドの検出数が最も多かった。M は 100-bp ladder markers、PC は positive control (pCGSap1-*MHC*)、NC は negative control (マウス尾由来のゲノム DNA)、Mock は遺伝子を使用していない TransIT-EE のみを注入した群を示している。

(2) ハイドロダイナミクス法による TPGD-GEF のゲノム編集効果

プラスミド DNA が存在した胎生期 9.5 日の一部の胎仔では、ゲノム編集効果が確認された。これは、心臓ならびに全身組織共に確認することができた (図 2)。

ダイレクトシーケンスの結果からは、検討の対象となった胎仔サンプルの 40% (4/10) でモザイク変異が確認され、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) のすぐ上流の領域でゲノム編集が生じた細胞と全く編集されていない細胞とが混合している状態であった。より詳細な検討を行うために、これらのサンプルを使用した TA クローニングベクターへのサブクローニング、青白コロニースクリーニング、白色コロニーからのプラスミドの単離作業を行い、ダイレクトシーケンスを再度実施した。その結果、例えば、胎仔 #1 の心臓由来の 12 クローンのうち 3 クローン (25%) は PAM の上流の 2 番目の 1 塩基 (G) の欠失が判明した。2 つのクローン (17%) は PAM の上流の 1 番目から 3 番目の塩基配列のうち 2 塩基 (AG または GA) の欠失があった。1 つのクローン (8%) は PAM の上流 2 番目の 1 塩基置換 (G から C) があった。そして、6 つのクローン (50%) は正常な配列であった。#1 の全身組織由来のサンプルについては、2 つのクローン (20%) で PAM の上流の 2 番目の 1 塩基 (G) の欠失が確認された。さらに興味深い点は、ゲノム編集を受けた胎仔は同じ母体に由来する兄弟胎仔であったことである。このことは、導入時期のみならず母体マウスに起因した何かしらの影響があった可能性も示唆している。この点については、今後詳しく検討する必要がある。

一方、検討対象となった胎仔サンプルの 60% (6/10) では、標的となった MHC ゲノム DNA の配列は正常であった。これらのサンプルでは、Cas9 や gRNA がプラスミド DNA から発現していない可能性も考えられた。あるいは、その発現が非常に弱い、"indel" の頻度が低く、ゲノム編集を受けた細胞数が極端に少なかった可能性が考えられた。

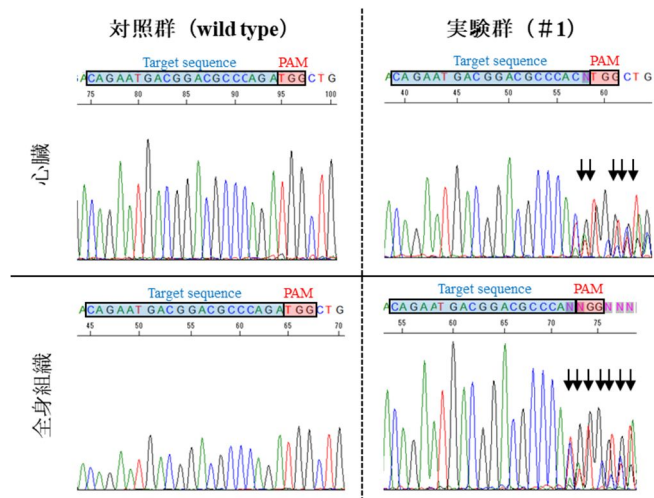


図2.シーケンスの結果

ゲノム編集効果が確認できた一部のサンプルのダイレクトシーケンスの結果を示す。通常は、左列の対照群が示すように塩基の重なりは確認されない。しかし、実験群では、右列の実験群(#1)で示すような、XGG配列で定義されるプロトSpacer隣接モチーフ(PAM)の数塩基上流の標的配列(Target sequence)内を起点に塩基配列の重なりが確認できるものが現れた。これはこの部分で塩基の欠失等が生じたゲノムを有する細胞の存在を示している。

以上の結果が示すように、胎仔への毒性が懸念される遺伝子導入試薬を用いないTPGD-GEFの系を構築し、かつ、内在性遺伝子をゲノム編集することができた[6]。本研究では、in vivoでの肝細胞のトランスフェクションに有効とされるポリアミンベースのTransIT-EE溶液を最終的には使用した。ポリアミンは生体内に存在し、牛乳にも含まれている。この意味から、ハイドロダイナミクス法に基づくTPGD-GEFにTransIT-EEを使用したとしても、胎仔に対して安全なアプローチであると推測できる。

本システムの問題点としては、系が不安定である点が挙げられる。これを解決するためにCas9タンパク質とガイドRNAで構成される複合体の利用による基礎検討を行ったが、その効果は限定的であった。例えば、より小さなCas9タンパク質を使用する等すれば効率の向上に期待が持てる。一方、本システムの利点は複数のgRNAを発現させることのできるベクターを用意すれば、理論的には胎仔の複数の標的遺伝子座のゲノム編集が同時に行えると考えられる点である。現在検討を進めており、これが実現すれば本システムの有用性が飛躍的に高まると期待できる。

(参考文献)

- [1] Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep.* **2014**; 4: 6382.
- [2] Takahashi G, Gurumurthy CB, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M. GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci Rep.* **2015**; 5: 11406.
- [3] Kaneko T. Genome Editing in Mouse and Rat by Electroporation. *Methods Mol Biol.* **2017**; 1630: 81-89.
- [4] Takabayashi S, Aoshima T, Kabashima K, Aoto K, Ohtsuka M, Sato M. i-GONAD (improved genome-editing via oviductal nucleic acids delivery), a convenient in vivo tool to produce genome-edited rats. *Sci Rep.* **2018**; 8: 12059.
- [5] Nakamura S, Ishihara M, Ando N, Watanabe S, Sakurai T, Sato M. Transplacental delivery of genome editing components causes mutations in embryonic cardiomyocytes of mid-gestational murine fetuses. *IUBMB Life.* **2019**; 71: 835-844.
- [6] Nakamura S, Ando N, Watanabe S, Akasaka E, Ishihara M, Sato M. Hydrodynamics-Based Transplacental Delivery as a Useful Noninvasive Tool for Manipulating Fetal Genome. *Cells.* **2020**; 9: 1744.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Sato Masahiro, Saitoh Issei, Kiyokawa Yuki, Akasaka Eri, Nakamura Shingo, Watanabe Satoshi, Inada Emi	4. 巻 6
2. 論文標題 Electroporation-Based Non-Viral Gene Delivery to Adipose Tissue in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 151 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2202151	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 Sato Masahiro, Nakamura Shingo, Inada Emi, Takabayashi Shuji	4. 巻 23
2. 論文標題 Recent Advances in the Production of Genome-Edited Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2548 ~ 2548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052548	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 Nakamura Shingo, Ando Naoko, Watanabe Satoshi, Akasaka Eri, Ishihara Masayuki, Sato Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Hydrodynamics-Based Transplacental Delivery as a Useful Noninvasive Tool for Manipulating Fetal Genome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1744 ~ 1744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9071744	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 Nakamura Shingo, Ando Naoko, Ishihara Masayuki, Sato Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of Novel Heparin/Protamine Nanoparticles Useful for Delivery of Exogenous Proteins In Vitro and In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1584 ~ 1584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano10081584	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 Nakamura Shingo, Ando Naoko, Ishihara Masayuki, Sato Masahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 In vivo Hepatocyte Genome Manipulation via Intravenous Injection of Genome Editing Components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 119 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2004119	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 Sato Masahiro, Inada Emi, Saitoh Issei, Watanabe Satoshi, Nakamura Shingo	4. 巻 12
2. 論文標題 piggyBac-Based Non-Viral In Vivo Gene Delivery Useful for Production of Genetically Modified Animals and Organs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 277 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12030277	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 Sato Masahiro, Takabayashi Shuji, Akasaka Eri, Nakamura Shingo	4. 巻 9
2. 論文標題 Recent Advances and Future Perspectives of In Vivo Targeted Delivery of Genome-Editing Reagents to Germ cells, Embryos, and Fetuses in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 799 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9040799	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 Nakamura Shingo, Watanabe Satoshi, Ando Naoko, Ishihara Masayuki, Sato Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Transplacental Gene Delivery (TPGD) as a Noninvasive Tool for Fetal Gene Manipulation in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5926 ~ 5926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20235926	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村伸吾, 安藤尚子, 渡部聡, 石原雅之, 佐藤正宏
2. 発表標題 Transplacental delivery of CRISPR components via tail veins of pregnant females causes mutations in embryonic cardiomyocytes of murine fetuses
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1件

1. 著者名 Sato Masahiro, Nakamura Shingo	4. 発行年 2019年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 35/110
3. 書名 Gene Editing - Technologies and Applications	

〔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	佐藤 正宏 (Sato Masahiro) (30287099)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・共同研究員 (82612)	
研究分担者	大塚 正人 (Ohtsuka Masato) (90372945)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

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