

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18705

研究課題名(和文) 光応答性CRISPR/CAS9による生殖能の時間的制御モデルの構築

研究課題名(英文) Optogenetic regulation of embryo implantation in mice using photoactivatable CRISPR-Cas9

研究代表者

高尾 知佳 (Takao, Tomoka)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：40612429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：着床は、受精卵と子宮内膜との相互作用により生じ、白血病抑制因子(LIF)を含む着床関連分子の時空間的発現によって媒介される。本研究では、青色LED照射による光応答性CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集システムによるLIFのノックダウンにより、時空間的に着床を制御可能なことをマウスで証明した。今後このシステムを用いて、遺伝子の胚着床に関わる時空間的な分子機構を解明することや、生体内の生殖機能を時間的に制御することで治療戦略にも応用できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9というゲノム編集技術と青色LED照射による光応答的な反応を組合わせた光応答性CRISPR/Cas9システムがマウスの着床を時空間的に制御できるという試みはこれまでなく、in vivoで制御できるという初めての報告となった。このシステムを応用することにより、妊孕能に対する分子メカニズムだけでなく、非侵襲的な治療の応用にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Implantation occurs through the interaction between the fertilized egg and the endometrium and is mediated by the spatiotemporal expression of implantation-related molecules including leukemia inhibitory factor (LIF). In this study, we demonstrated that knockdown of LIF by a photoactivatable CRISPR-Cas9-based genome editing system using blue LED illumination can regulate implantation in a spatiotemporal manner in mice. We believe that this system can be used in the future to elucidate the spatiotemporal molecular mechanisms involved in embryo implantation and to apply it to therapeutic strategies by controlling reproductive functions in vivo.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：photoactivatable CRISPR/CAS9 Lif implantation

1. 研究開始当初の背景

胚の着床は、子宮が胚盤胞を受け入れることができたときにのみ起こる時空間的なイベントである。マウス白血病抑制因子 (LIF) は子宮内膜、特に腺上皮に着床期前後に時空間的に発現しており、遺伝子ノックアウトマウス研究より、LIF が胚着床に必須であることはすでに証明されている (*Reproduction*, 2005)。

光応答性 CRISPR/Cas9 (paCas9) は、Nihongaki らによって開発された新しい分子デバイスである (*Nat. Biotechnol.* 2015)。このシステムでは、Cas9ヌクレアーゼ活性を青色発光ダイオード (LED) で制御することができる。paCas9 は、分割された Cas9 断片と LED 照明誘導可能な二量化ドメインである Magnets (nMag および pMag) から構成されている。paCas9 は、LED 照明の有無によってゲノム編集活性の ON/OFF が可能であり、CRISPR/Cas9 システムにおけるオフターゲット効果を最小化することができる。現在、このシステムは *in vitro* で利用できるが *in vivo* でさらに生殖機能において機能するかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

CRISPR-paCas9 システムを用いて、*in vivo* で生殖機能を光遺伝的に時空間的に制御できるマウス生殖機能制御モデルを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

LIF を標的とした single guide RNA (sgLif) を作製し、single guide RNA コントロール (sgCtrl) + LED、sgLif のみ、sgLif + LED の 3 群に分けて実験を行った。雌マウスに、sgLif または sgCtrl と組み合わせた paCas9 を胎生期 2.0 -2.5 日に腹腔内投与し、その後胎生期 3.0 -3.5 日に全身に LED 照射を行った。その後胎生期 4.5 日に子宮を摘出し、免疫蛍光染色と Immunoblot 解析、胎生期 7.5 日目にも子宮を摘出し妊孕能解析を行った。

4. 研究成果

処置後の胎生期 4.5 日の子宮を摘出し解析したところ、sgCtrl + LED あるいは sgLif のみの群で LIF 強く発現していたが、sgLif + LED 群では劇的に減少していた。免疫蛍光染色により、LIF は sgCtrl + LED あるいは sgLif のみの群で妊娠子宮の子宮内膜腺および隣接する脱分化間質で強く発現していたが、sgLif + LED 群では発現が減少するかほとんど発現していないことが明らかとなった (図 1)。これらの結果は、LED 照射による paCas9 が、マウスの子宮 LIF ゲノムを一部欠損させ、蛋白質発現の抑制に成功したことを示している。さらに処置後の胎生期 7.5 日の子宮を摘出し、Lif の発現抑制が妊孕能に影響を与えたかについて調べた。sgLif + LED 群は、他の sgCtrl + LED あるいは sgLif のみの群に比べて胚の着床が有意に阻害された (図 2)。さらに脱落膜マーカーであるデスミン

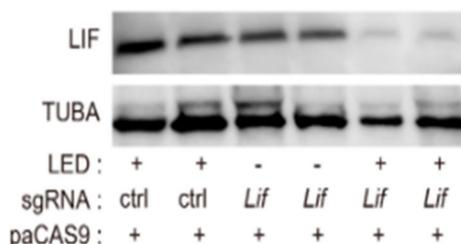


図1: LIFの発現

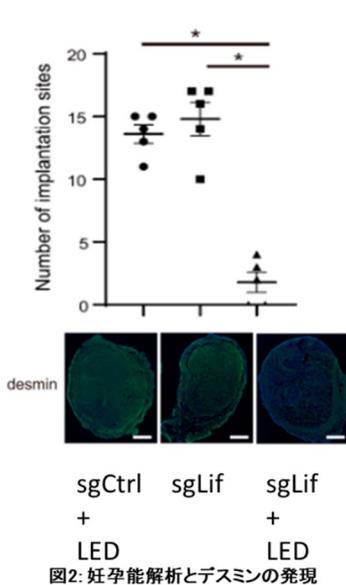


図2: 妊孕能解析とデスミンの発現

子宮内膜症の発症病態マウスモデルの作製を試みた。子宮内膜症モデルを作製するにあたり、現在、ヒト子宮内膜症患者に発現が高く認められている遺伝子として、Steroidogenic factor-1(以下 SF-1) 遺伝子に着目した。この SF-1 と子宮内膜症の関連性は証明されていないが、発症

原因の 1 つではないかと考えられる。まず光応答により強制的にマウス SF-1(mSF-1) を発現できるプラスミドの作製を行った。mSF-1 を挿入するベクターとして CAG 駆動、Cre 依存的な pAAV のベクターを使用した。このベクターは動物注入に適している。mSF-1 を PCR で合成、サブクローニングベクターに挿入し、制限酵素処理後、Ligation 法により pAAV-FLEX-mSF1 を作製した。以前作成した TRE-PA-Cre マウスと Rosa26-tdTomato マウスを交配させて TRE-PA-Cre : Rosa26-tdTomato マウスを作製した。現在、このマウス(雌)の子宮に pAAV-FLEX-mSF-1 を in vivo に強制発現する系を作製している。

光遺伝学を用いたゲノム編集技術は細胞やマウスへの導入報告はいくつもされてきたが、光応答ゲノム編集技術を用いて in vivo のマウス着床機能を制御する報告はこれまでなかった。今回の成果より、この技術を使用することで生体組織において非侵襲的に時空間特異的な生体内遺伝子操作が可能となり、今後様々な組織で新たな分子メカニズムの解明や新規治療方法の一助になり得ると期待される。

の発現も sgLif + LED 群でのみ減少していた(図 2)。これらのことから、paCas9 システムはマウスの着床を非侵襲的に時空間的に制御することが可能であることが明らかとなった。光応答性の LIF の発現抑制による着床阻害が、リコンビナント LIF(recLIF)の補充によって回復するかについて検討した。マウスは sgLif + LED 群と同様の処置を施し、胎生期 3.5 日の LED 照射前に PBS または recLIF を経膈的に子宮に注入した。胎生期 7.5 日に採取した子宮は、PBS を投与したマウスと比較して、recLIF を補充したマウスの着床数が有意に増加した(図 3)。(Takao et al., *PNAS*, 2020)。

この成果

を応用し、

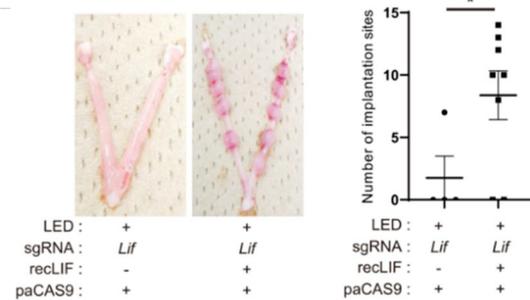


図3: recLifによる妊孕能の回復

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 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takao Tomoka, Sato Moritoshi, Maruyama Tetsuo	4. 巻 117
2. 論文標題 Optogenetic regulation of embryo implantation in mice using photoactivatable CRISPR-Cas9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 28579 ~ 28581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2016850117	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 Joko Ryoji, Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Yoshida Aki, Takihira Shota, Takao Tomoka, Lu Ming, Sato Kohei, Ito Tatsuo, Kunisada Toshiyuki, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Takarada Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 PRRX1 promotes malignant properties in human osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100960 ~ 100960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100960	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 Katakura Satomi, Takao Tomoka, Arase Toru, Yoshimasa Yushi, Tomisato Shoko, Uchida Sayaka, Masuda Hirotaka, Uchida Hiroshi, Tanaka Mamoru, Maruyama Tetsuo	4. 巻 101
2. 論文標題 UDP-glucose, a cellular danger signal, and nucleotide receptor P2Y14 enhance the invasion of human extravillous trophoblast cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 194 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2020.09.061	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 Takao Tomoka, Hiraoka Yuichi, Kawabe Kenji, Yamada Daisuke, Ming Lu, Tanaka Kohichi, Sato Moritoshi, Takarada Takeshi	4. 巻 526
2. 論文標題 Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 213 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.015	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 Takao T, Hiraoka Y, Kawabe K, Yamada D, Ming L, Tanaka K, Sato M, Takarada T.	4. 巻 526
2. 論文標題 Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 213-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.015.	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

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高尾知佳, その他
2. 発表標題 光応答性CRISPR/CAS9システムによる生殖能のin vivo制御
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾知佳, その他
2. 発表標題 光応答性ゲノム編集を用いた生殖関連遺伝子発現と生殖機能のin vivo制御システムの構築
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾知佳, その他
2. 発表標題 光応答性CRISPR/CAS9システムによるマウス生殖能のin vivo制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾知佳, その他
2. 発表標題 光応答性CRISPR/CAS9システムを用いたマウス子宮における肺着床のin vivo制御
3. 学会等名 第24回日本生殖内分泌学会
4. 発表年 2020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

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