

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06464

研究課題名(和文) 複雑脳発生を明らかにする新規組み換え酵素ノックイン技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel recombinant enzyme for understanding complex brain development

研究代表者

恒川 雄二 (Tsunekawa, Yuji)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80733352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子工学的に細胞特異的な遺伝子発現をさせるためのノックイン(KI)モデル動物の作製が困難な生物種に対応できるように、さまざまな動物種において細胞特異的な遺伝子発現を実現する技術の開発を目指した。ノックインを行う際、ドナーとして細胞内に導入したCreが意図せず発現してしまい、目的以外の細胞で遺伝子が発現してしまう現象が観察された。そこで、ノックインされるまでドナーから非特異的な遺伝子発現を抑えるためにコドン改変を行ったリークレスCreを開発した。全身で遺伝子導入のできるアデノ随伴ウイルス(AAV)にLsCreを組み込んで遺伝子導入を試み効率的にAAVを製造、精製する技術開発も行い、報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の過程で開発し、論文として報告したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの新規高効率精製法は、濃縮、バッファー置換に用いる中空糸を用いた全く新規の精製方法であり、今後AAVベクターを用いた研究、遺伝子治療を加速させる学術的、社会的意義の高い成果だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a technology to achieve cell-specific gene expression in various animal species to accommodate the difficulty in creating knock-in (KI) model animals for genetically engineering cell-specific gene expression. During knock-in, a phenomenon was observed in which Cre introduced into cells as a donor was unintentionally expressed, resulting in gene expression in cells other than the target cells. Therefore, we developed leakless Cre with codon modification to suppress nonspecific gene expression from the donor until knock-in is performed. We also developed a technology to efficiently produce and purify AAV by incorporating LsCre into adeno-associated virus (AAV), which is capable of systemic gene transfer, and reported the results.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：AAV

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

典型的なほ乳類モデル動物であるマウスは皺の無い平滑な大脳皮質を持つが、我々ヒトを始めとする高次脳機能を持つ動物は複雑な皺のある大脳皮質を持つ。このような皺のある複雑な大脳皮質は一般的に“複雑脳”と呼ばれ、平滑な大脳皮質に比べ2/3層が拡大しており、ニューロンの密度が高いなど形態的な違いを持つ。このような複雑脳がどのように発生するのかという問いは、我々がどのように高次な脳機能を獲得したのかを知る為、また様々な神経発生異常による疾患の理解の上でも非常に重要である。

申請者はこれまでに複雑脳発生の分子メカニズムを明らかにするための基盤技術開発を行ってきた。2016年、電気穿孔法やアデノ随伴ウイルス(AAV)など研究室レベルで扱える遺伝子導入技術を用いて、CRISPR/Cas9システムを体細胞に導入し、高効率で遺伝子をノックイン/ノックアウトする de novo knock-in 法、HITI 法を確立し報告した。これらの技術は、マウス以外の動物モデルにも適用が可能であり、内在性のタンパク質にEGFPをフュージョンさせ局在を観察する、細胞種特異的に遺伝子を発現させる、疾患関連の変異を導入することにより細胞レベルの疾患モデルが作成可能、など有用な技術である。しかしながら、ノックインされた遺伝子の発現は内在性のプロモーター活性に依存するため、発現が微弱な遺伝子座においてはノックインされた外来遺伝子の発現が弱いことや、一過的に発現する遺伝子の場合、目的の遺伝子が発現していた細胞の運命を知ることは困難であるなど技術的な限界があった。

2. 研究の目的

申請者は上記の問題を解決するアイデアとして、体細胞に対する de novo knock-in を応用した Cre-LoxP システムの構築を目的とする。Cre 組み替え酵素は 34bp からなる LoxP 配列間での DNA の部位特異的組換えを行う。任意の遺伝子座に Cre をノックインしたマウスをもちいることにより、1)LoxP 配列でターゲットする遺伝子を挟んだノックインマウス(flox マウス)と掛け合わせることで、Cre が発現した細胞でのみ遺伝子を欠失させる(cKO)、2)CAG-floxSTOP-GFP トランスジェニックマウス(CAG プロモーターと GFP の間に LoxP 配列で挟んだ転写 STOP 配列が挿入されている)と掛け合わせることで、Cre が発現した事のある細胞系譜が全て GFP でラベルされる(リニエージトレーシング)、3)CAG-floxSTOP-geneX(任意の遺伝子)トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、Cre が発現した細胞のみで任意の遺伝子を発現させる(細胞特異的機能獲得実験)等の実験が可能である。電気穿孔法や AAV を用いた体細胞ゲノム編集を使って Cre-LoxP システムを再現できれば、複雑脳の形態形成分子メカニズムを知るために非常に重要なツールになる。それだけでなく、今まで遺伝子改変動物の作成が困難であった鳥類、爬虫類、食肉類、霊長類などの様々な動物モデルにおいても手軽に Cre-LoxP システムが適用できれば、既存的手法では得ることが困難であった新しい知見を得る事が可能になる。

3. 研究の方法

de novo knock-in 法や HITI 法は体細胞内に多量のドナーDNAの導入を必要とする。そのため、ノックインされる前のドナーDNAからわずかに遺伝子が発現してしまう(リーク)という技術的な問題があった。申請者はベクターバックボーンの改良を繰り返し、蛍光タンパク質などでは問題ないレベルまでリークを抑え込むことに成功しているが、少量のリークでも下流シグナルを強力にエンハンスしてしまう Cre-LoxP システムにおいて、このような非特異的なリークは致命的であった。このような背景をもとに申請者は、現在までにリークが起こるメカニズムを明らかにする基礎実験を行い、Creの活性を失わないと同時に翻訳レベルでリークを抑えることを可能とした、改変型 Cre を開発し、leakless-Cre(LsCre)と命名した。本研究では、新規開発した LsCre を用いてマウスとフェレットをモデル動物として用い、以下の実験を行う。

(1) LsCre ノックインによるリニエージトレーシングと細胞特異的機能獲得実験技術の開発

特定の遺伝子が発現した細胞において蛍光タンパク質や任意の遺伝子を恒常的に発現させるシステムを開発する。まず、上記で選別したトランスポゾンにより CAG-floxSTOP-geneX をゲノムにランダムに挿入する。同時に CRISPR/Cas9 システムを細胞に導入し、任意のプロモーター下に LsCre をノックインする。これらの組み替えを発生期/分化した細胞で行えば、遺伝子が発現した細胞系譜の可視化(リニエージトレーシング)、細胞特異的機能獲得実験が可能になる。

(2) Split LsCre ノックインによるコンディショナルノックアウト法の開発

遺伝子が両染色体でノックアウトされた細胞をラベルするため、Cre を N 末側(Cre-N)と C 末側(Cre-C)に分けてそれぞれの染色体にノックインする。それぞれの染色体に Cre-N と Cre-C がノックインされた場合のみ、細胞内で発現した Cre-N と Cre-C が結合し、活性のある Cre が出来る。まず、LsCre 作成過程で明らかになったリークに対する知見を基盤に、Cre-N と Cre-Cn の活性を保ったままリークしないよう改変した LsCre-N と LsCre-C を開発する。これら、LsCre-N と LsCre-C をノックアウトしたい遺伝子の N 末端側にノックインし、同時にトランスポゾンにより CAG-floxSTOP-EGFP をゲノムにランダムに挿入する。これらの組み替えを発生期/分化した細胞で行えば、遺伝子がホモで欠損した細胞の系譜が可視化するコンディショナルノックアウト

トが可能になる。

上記(1)(2)の技術モデルが実際に複数の遺伝子座において正確に働くかをまず de novo knock-in 法を用いて発生期マウスで確認する。次にフェレット胎児の大脳皮質を用いて複雑脳を持つモデル動物で上記システムが適用可能かを確かめる。最終的には、マウス、フェレットの成獣大脳皮質において AAV を用いた HITI 法による Cre-LoxP システムの適用を目指す。

4. 研究成果

本研究課題ではノックインされるまでドナーから非特異的な遺伝子発現を抑えるためにコドン改変を行ったリークレス Cre (LsCre) を用いて、複雑脳を持ったモデル動物において体細胞に対する de novo knock-in を応用した Cre-LoxP システムの構築を目指した。

研究の方法(1)で提案していた、LsCre ノックインによるリニエージトレーシングと細胞特異的機能獲得実験技術の開発についてフェレットにおいて POC 実験を行い、予想通りのシステムができていることをフェレットで確認した(図1)。まず、神経上皮細胞でのみに発現する Pax6 遺伝子座に LsCre を電気穿孔法ノックインしすることを試みた。フェレット胎児脳において、電気穿孔法により、pCAX-hCas9(Humanized Cas9 発現ベクター), Pax6 gRNA (Pax6 gRNA 発現ベクター), pLR5 CAG-mcherry(トランスポゾン依存性ゲノム挿入ベクター: mcherry 発現ベクター), pLR5 CAG-flox-STOP-GFP(トランスポゾン依存性ゲノム挿入ベクター: Cre レポーターベクター), pCAG-hyper piggybase (piggybase トランスポゼース発現ベクター), optiCre2 Pax6 HDR Donor (LsCre を Pax6 遺伝子座に組み込むためのドナーベクター)を、コントロール群では上記プラスミド群から pCAX-hCas9 を抜いた構成で導入した。Cas9 が共導入されないコントロール群では、共導入された mCherry のみ発現し GFP は発現しないが(図上段)、Cas9 が共導入された場合、GFP が発現することが確認された(図下段右)。これは LsCre がリークせず、Cas9 存在下で Pax6 遺伝子座にノックインが起こった場合のみ CAG-flox-STOP-GFP から転写 STOP 配列が抜き出され、GFP が発現していることが示唆された。

このように、LsCre はプラスミドを用いた電気穿孔法による in vivo 遺伝子導入では予想通りリークしないことが確認された。

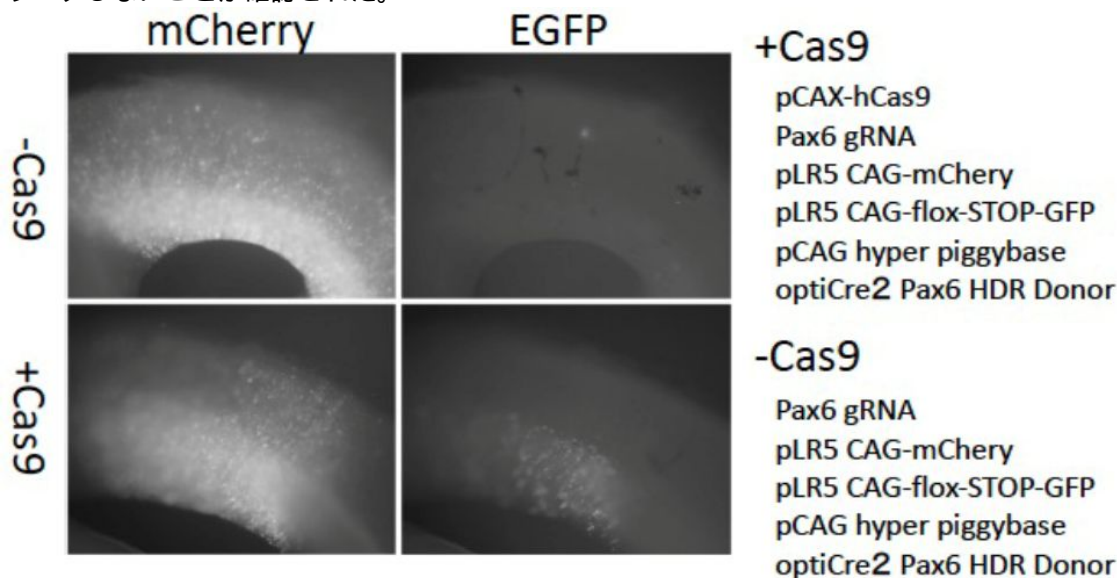


図1 フェレット大脳皮質におけるLsCreノックインによるリニエージトレーシングと細胞特異的機能獲得実験技術

神経上皮細胞特異的に発現する Pax6 遺伝子座に LsCre をノックインし、Pax6 発現細胞でのみ共導入された CAG-flox-STOP-GFP カセットの STOP 配列が切り出され GFP が発現するシステム。Cas9 が共導入されない場合、共導入された mCherry のみ発現し GFP は発現しないが(図上段)、Cas9 が共導入された場合、GFP が発現する(図下段右)。これは LsCre がリークせず、ノックインが起こった場合のみ Cre が発現していることを証明している。

次に狭い範囲でしか遺伝子導入できない電気穿孔法ではなく、全身で遺伝子導入のできるアデノ随伴ウイルス(AAV)に LsCre を組み込んで、in vivo 遺伝子導入を行った。その際に効率的に AAV を製造、精製する技術開発も行い、報告した(Li et al., 2023, Yoshida et al., 2023, Miyaoka et al., 2023)。AAV にフェレットでリークが見られなかったプラスミドと同様の発現カセットを搭載し、in vivo 遺伝子導入を行ったところ、予想外のリークが引き起こされる事実が新たに発見された。これは、AAV が発現する際に細胞内でコンカテマーと呼ばれる環状の DNA 複合体を形成するため、hCas9 などを発現するための CAG プロモーターから LsCre の mRNA が転写、スプライシングによってリークするためではないかと予想されている。今後はなぜ、AAV ベクターでは既存のリークレス設計が働かないかの詳細な分子メカニズムの解明を進め、AAV にお

いてもリークしない新たな LsCre ノックインシステムの開発を進めていく。

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 4件）

1. 著者名 Wada Mikako, Uchida Naoya, Posadas-Herrera Guillermo, Hayashita-Kinoh Hiromi, Tsunekawa Yuji, Hirai Yukihiko, Okada Takashi	4. 巻 30
2. 論文標題 Large-scale purification of functional AAV particles packaging the full genome using short-term ultracentrifugation with a zonal rotor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 641 ~ 648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41434-023-00398-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 Miyaoaka Rimi, Tsunekawa Yuji, Kurosawa Yae, Sasaki Takako, Onodera Azusa, Sakamoto Kenji, Kakiuchi Yuko, Wada Mikako, Nitahara Kasahara Yuko, Hayashita Kinoh Hiromi, Okada Takashi	4. 巻 120
2. 論文標題 Development of a novel purification method for AAV vectors using tangential flow filtration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 3311 ~ 3321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.28524	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 Yoshida Kouhei, Tsunekawa Yuji, Kurihara Kento, Watanabe Kazuya, Makino-Manabe Yuriko, Wada Mikako, Tanaka Toru, Ide Teruhiko, Okada Takashi	4. 巻 31
2. 論文標題 Engineering a highly durable adeno-associated virus receptor for analytical applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 101157 ~ 101157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2023.101157	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 Li Dan, et al.,	4. 巻 3
2. 論文標題 LONRF2 is a protein quality control ubiquitin ligase whose deficiency causes late-onset neurological deficits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 1001 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-023-00464-4	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 Wada M, Uchida N, Posadas-Herrera G, Hayashita-Kinoh H, Tsunekawa Y, Hirai Y, Okada T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Large-scale purification of functional AAV particles packaging the full genome using short-term ultracentrifugation with a zonal rotor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gene Ther .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41434-023-00398-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pilaz LJ, Liu J, Joshi K, Tsunekawa Y, Musso CM, D'Arcy BR, Suzuki IK, Alsina FC, Kc P, Sethi S, Vanderhaeghen P, Polleux F, Silver DL.	4. 巻 111(6)
2. 論文標題 Subcellular mRNA localization and local translation of Arhgap11a in radial glial progenitors regulates cortical development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuron .	6. 最初と最後の頁 839-856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2023.02.023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ウイルスの精製方法	発明者 恒川雄二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022- 47745	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------