

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06131

研究課題名(和文)体細胞モザイク変異疾患モデルマウスとLOH検出マウスの開発

研究課題名(英文)Development of a novel mouse model of mosaic mutation-induced diseases caused by somatic mutations

研究代表者

中山 学(Nakayama, Manabu)

公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・主任研究員

研究者番号：30370927

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)：皮膚病では体細胞突然変異が原因となり生じるモザイク変異疾患が数多く見られる。これらの疾患モデルマウスを作製し発症機構を調べるためには、表皮細胞の(全部ではなく)一部だけに遺伝子ノックアウトまたは変異を導入し、かつその細胞を蛍光標識して解析する必要がある。本研究ではCreとCRISPR/Cas9の系を組み合わせることによって、頻度は稀であるが、一個の細胞内では確実にCre反応が起きるeditedCre(edCre)システムを開発した。この新規手法が正しく機能することは、レポーター細胞を用いた蛍光顕微鏡による解析だけでなく、次世代シーケンサーによる解析により示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性角化症・魚鱗癬にはgain-of-functionである優性の体細胞突然変異が原因となり生じるモザイク疾患が多数存在し、それらのモザイク疾患を調べるためには、表皮細胞の一部だけ変異を導入かつ蛍光標識して解析する必要がある。また、皮膚細胞だけでなく、他の組織においても低頻度で細胞を標識するニーズは確実に存在している。本新規技術を他の組織の低頻度な細胞標識に用いることは比較的容易に達成できると考えられるので、多くの研究者が利用できるコアな技術となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Many mosaic mutations caused by somatic cell mutations have been observed in skin diseases. To produce a novel mouse model for these diseases and investigate their onset mechanisms, it is necessary to introduce gene knockouts or mutations into some but not all epidermal cells. Moreover, these cells should be fluorescently labelled for further analysis. In this study, by combining the Cre/loxP and CRISPR/Cas9 systems, we developed a new method through which strong Cre reactions reliably occur within single cells at low frequencies. We verified that this new method worked well by observation, under a fluorescence microscope, of reporter cells in which only one gene copy was knocked in (at specific locations of their genomes) and by next-generation sequencing analysis.

研究分野：機能ゲノム学

キーワード：ゲノムエンジニアリング ゲノム改変技術 部位特異的組み換え酵素 VCre/VloxP SCre/SloxP パイオテクノロジー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

皮膚疾患の汗孔角化症は、直径数 mm ~ 数 cm の大きさの円形または環状の形をした赤や茶色の皮疹が、身体中の皮膚に多発する病気である。子どもの身体の一部の皮膚に集中して皮疹が出現する「線状汗孔角化症」と、大人になってから腕や足を中心に全身に皮疹ができる「播種状表在性光線性汗孔角化症」がある。また、汗孔角化症の皮疹からは、普通の皮膚よりも皮膚癌ができやすいことが知られている。汗孔角化症を発症する人の多くは、メバロン酸代謝経路の酵素をコードする複数の遺伝子(MVD や MVK を含む複数の遺伝子)のいずれかに生まれつき変異(ヘテロ)を持っており、皮膚の細胞のゲノムに後天的な変化(セカンドヒット)が生じて、遺伝子の父方、母方由来の両アレルが働かなくなった細胞が生まれると、その細胞が汗孔角化症の皮疹を作ることが提唱されている。この汗孔角化症の疾患モデルマウスを作製するためには、全ての皮膚細胞で MVD(または MVK)遺伝子のノックアウトさせるのではなく、非常に数の少ない稀な頻度で Cre を発現させて、限定された細胞のみ MVD 遺伝子をノックアウトさせる必要がある。一方、皮膚病の先天性角化症・魚鱗癬には、gain-of-function である優性の体細胞突然変異が原因となり生じるモザイク疾患が多数存在する。これらの変異が全身の細胞にあれば致死となると考えられ、体細胞モザイク変異であるからこそ、生存が可能となり病気としての症状が現れる。このようなモザイク疾患の疾患モデルマウスを作製し発症機構を調べるためには、表皮細胞の一部だけに変異を導入し、かつ蛍光標識して解析する必要がある。このような状況のために、稀ではあるが確実に遺伝子変異導入と同時に標識できる手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では Cre と CRISPR/Cas9 の系を組み合わせることによって、頻度は稀であるが、確実に Cre 反応が起こる手法を開発し、実証することで体細胞変異マウスの作製に道筋をつけることが目的である。CreERT2 マウスに低濃度のタモキシフェンを投与することにより、まばらに Cre/loxP 反応を起こすことができるかもしれないが、この場合には1つの細胞あたりの活性化された Cre 蛋白質は量が少ないので、exon 除去と STOP カセットの除去による EGFP の発現をさせるための複数カ所の Cre/loxP 反応を確実に行うことは難しいと考えられる。「低頻度だが強く発現する Cre 蛋白質で MVD ノックアウトと蛍光蛋白質の発現が同一の細胞で同時に起こさせる」ために、新規技術の開発を行った。

3. 研究の方法

図1のように Cre の真ん中あたりの活性中心と考えられている場所に2塩基の挿入変異を導入して、蛋白質の翻訳のフレームをずらして、最初は Cre を不活性状態にしておく。2塩基挿入の Cre 配列に対応した gRNA と Cas9 を用いて、NHEJ 経路でゲノム編集を行なう。ゲノム編集では数塩基の欠損や挿入が行なわれるが、丁度余分な2塩基を欠損して機能的な Cre に戻る頻度は非常に稀である。HEK293 細胞を用いた CRISPR /Cas9 の実験で他の遺伝子を欠損させた我々の経験では、1塩基欠損が圧倒的に多くて、2塩基欠損は少なかった。gRNA の配列により欠損される塩基数の頻度に差がみられるかもしれない可能性は考慮すべきであるが、特定の決まった確率で機能的な Cre 蛋白質がゲノム編集により復活すると考えられる。余分な塩基数を増減させることで

Cre が復活する確率を容易に変えることが出来るのも、このシステムの有用な特徴である。

4. 研究成果

皮膚疾患で観察される体細胞突然変異疾患のモデルマウスを作製するためには、稀な頻度でノックアウト、またはノックインされるシステムが必要である。また、皮膚や脳のような層として均一な細胞が並んでいる組織では、蛍光顕微鏡で観察すると、全体が光ってしまっていて、一つの細胞を観察することが出来ないため、稀な頻度で発現させるシステムが必要である。ウイルスベクターで導入する方法やエレクトロポレーションで導入する方法で試みられているが、特別な施設や手技が必要であると考えられる。そこで、Cre と CRISPR/Cas9 の系を組み合わせることによって、頻度は稀であるが、

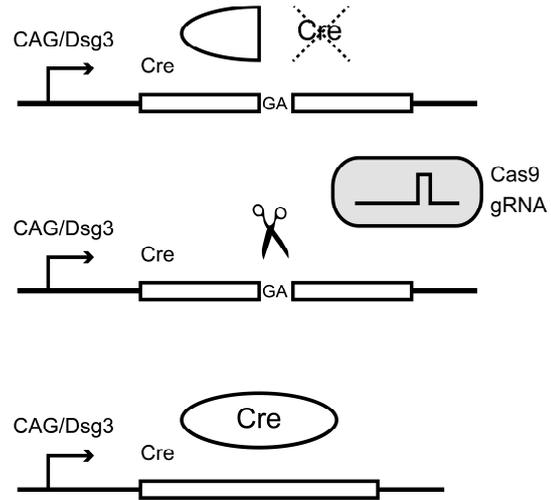


図1 editedCre(edCre) システムの概念図

実際に Cre 反応が起こるシステムを考案した。図1の概念図のように Cre の中央付近の活性中心と考えられている場所に2塩基の挿入変異(GA)を導入して、蛋白質の翻訳のフレームをずらして、最初は Cre を発現しないようにしておく。2塩基の挿入変異(GA)を導入することで、Cre 蛋白質のアミノ酸配列は、AYNTLLRIA EI から AYNTLDYV-STOP(TAG) となり、Cre 蛋白質は、約半分の蛋白質しかできないナンセンス変異体となっている(図

2)。この段階では、Cre 蛋白質は機能できない状態を維持することになる。次に、Cre を低頻度で発現させるために Cre 変異型遺伝子のゲノム編集を行う。2塩基挿入の Cre 配列に対応した gRNA(TTTCGGCTATACGTAATCCA) と Cas9 を用いて、NHEJ でゲノム編集を行なう(図2)。一般的に、ゲノム編集では数塩基の欠損や挿入が行なわれるが、丁度余分な2塩基を欠損して機能的な Cre とすることは非常に稀である。我々の CRISPR/Cas9 で他の遺伝子を欠損させた経験では、1塩基欠損が圧倒的に多くて、2塩基欠損は少なかった。NHEJ は配列によっても影響を受けるのかもしれないが、特定の確率でゲノム編集されて、機能的な Cre 蛋白質が復活する。このようなシステムを editedCre システム、略語として edCre と名付けた。この新規システムが実際に機能するかどうかを培養細胞を用いて確認を行った。図3のように CAG プロモ

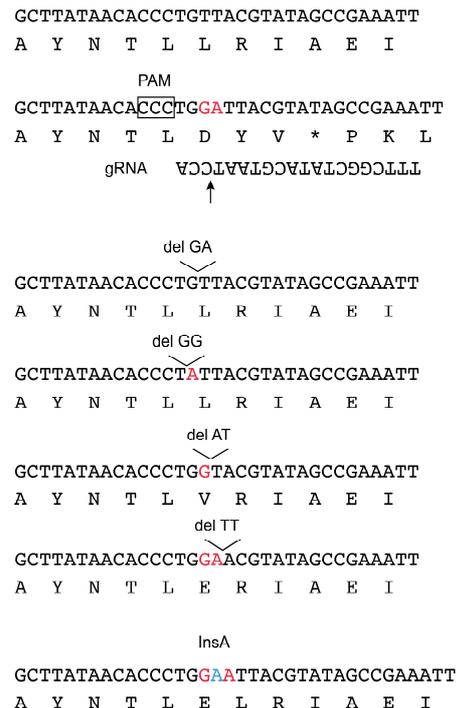


図2 editedCre(edCre) システムの2塩基導入部位とgRNA配列及びゲノム編集後の塩基配列

ーター、loxP-STOP カセット-loxP、EGFP、polyA 付加シグナル、PGK プロモーター、2塩基付加したCre、polyA 付加シグナルの順番で並べて、CXXC1 遺伝子の遺伝子座に VCre/VloxP と SCre/SloxP のRMCE 法経由で導入した。HEK293 の染色体に導入されていることを5'側と3'側のPCRとダイレクトシーケンスで確認してゲノム改変細胞を得た。この改変細胞に、2塩基挿入の Cre 配列に対応した gRNA(pX330-gRNA-editedCre)と Cas9 の発現プラスミドを形質転換し、一過的に発現させた。形質転換された個々の細胞が Cas9 の NHEJ で2塩基付加の edCre 遺伝子がゲノム編集される。

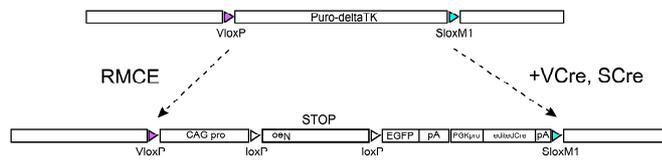


図3 VloxPとSloxPサイトを用いたRMCE法によるゲノムへの導入

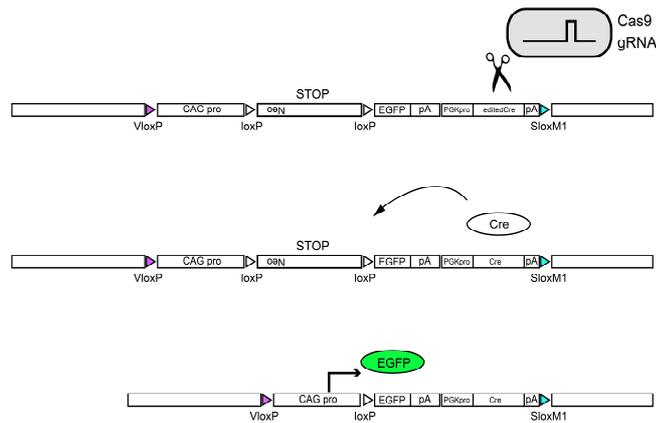


図4 editedCre(edCre) システムの実証実験のための模式図

れる。2塩基が欠損されてフレームが正しく戻り、Cre 蛋白質の機能が復活した細胞は、Cre/loxP 反応が起こり STOP カセットが除かれて、EGFP が発現する(図4)。実際、機能的な Cre 発現プラスミドと pX330-gRNA-editedCre プラスミドを形質転換した陽性コントロールに比べて、約1/100程度の非常に稀にEGFP発現細胞が観察された。一方、gRNA無しのコントロール実験では、全くEGFPの発現は観察されなかった。

続いて、実際に塩基配列レベルで、どのようにゲノム編集されているかを調べた。最初に蛍光の有無に関わらず、言い換えるとSTOPカセットが除去されているか残存しているかの選択なしの状態ではedCre遺伝子の配列を調べた。ゲノムDNAを回収後にPCRで増やし、Tベクターにクローニング後にサンガー法でシーケンスを行なった。数十クローンの塩基配列を調べた結果、約半数は、元の配列であったが、これらはトランスフェクションされなかったゲノム由来だと考えられる。最も多く検出されたゲノム編集は、A塩基の1塩基付加だった。A塩基の1塩基付加はGAAのGluの追加の形でフレームを元に戻すが、Leu-Leu-ArgをLeu-Glu-Leu-Argに変化させる。また、12bp欠損、33bp欠損等の大きな欠損が検出されたが、これらは正しいフレームには戻ってはいなかった。InsAはEGFP細胞の出現頻度と比較してCre活性は戻っていないと考えられるが、このことを確認するためにInsAタイプをサブクローニングして、HEK293+loxP-STOP-loxP-EGFPに形質転換を行なった結果、全くEGFP発現は観察されなかった。R173は活性中心として働くことが知られていて、R173Kの変異はloxPサイトのDNA切断も組み換えも行うことができないことから、組み換えのリン酸基移行ステップの安定化に寄与していると考えられている。R173にはリン酸が切断前と、切断後のリン酸基に結合するので、Argアミノ酸基の位置的なズレが不活性化を引き起こすと考えられる。厳密には、この不活性化が活性中心でのアミノ酸一個分の位置

的なずれによるものか、付加された Glu のチャージによる影響かは明確ではない。

次世代シーケンサーによる edCre 配列のゲノム編集後の配列の解析結果は、頻度的にはサンガー法による結果と同様であり、2 塩基欠損としては del GG と del TT、想定より少なかったが、del GA も存在した。NGS で調べた約 1/4 には NHEJ 由来と考えられる Ins/Del があつた。変異の中で 70% は InsA で、他の変異は各 0.2~3.0% であつた。切断箇所を中心に欠損、挿入が起こっているのは予想通りであつた。以前の行なつた全く別の gRNA の結果は 1bp 欠損が圧倒的に多かつたので、その点は異なるが、1bp の Ins/Del が他の変異に比べて圧倒的に多いという点では一致していた。del GA (0.206%) + del GG (2.672%) で約 3% が活性化 Cre に戻つているという部分は、蛍光顕微鏡での光る細胞の割合とほぼ一致していると考えられる。gRNA の配列により Ins/Del の最も頻度の高い Ins/Del のパターンは決まっているように思われる。

loxP-STOP-loxP から STOP が除かれたもののみ PCR で増やすことで、del GG のタイプが濃縮されてきた。del GG はコドンは変わるが、アミノ酸は Leu-Leu-Arg のままである。del TT は Leu-Glu-Arg である。しかし、予想していなかつたことだが明らかにフレームのずれた欠損タイプも出てきた。これらは loxP-STOP-loxP 由来であるが 34bp が同一であるために生じる PCR 反応中のアーティファクトあるいは、HEK293 細胞を培養しているうちに CXXC1 遺伝子の改変した染色体 18 番が 2 本になってしまったためである可能性が考えられる。HEK293 細胞の改変した染色体が 2 本あつた場合には、そのうち 1 本がゲノム編集で機能が戻つた Cre 蛋白質は、同じ細胞中の機能の戻らなかつたもう一本の loxP-STOP-loxP も STOP カセットを取り除いてしまう可能性が考えられる。発展型としてもう少し頻度を下げる場合には、修復される時に活性のある Cre に戻る可能性が低いパターンを作り上げることが出来る。173Arg は活性中心であるので、まさに Arg の部分に余分な塩基を入れて gRNA により切断し、NHEJ により修復させる。更に低頻度の新しい cdCre としては、GCTTATAACACCCTACCTGTATAGCCGAAATTGC の下線の CT を付加することにより、アミノ酸配列は AYNTLLPV*PKL と変える。ゲノム編集で Arg の部分に入れた CT の 2 塩基を欠損しない限りは、元には戻らず、1 塩基の挿入でも Arg の代わりに入れた Pro が邪魔をして活性を妨げるだろう。近傍の他の 2 塩基が欠損されたとしても、活性を持った Cre 蛋白質は復活しない。重要なこととして、正確な 2 塩基の欠損は非常に確率が低いので、1/1000 以下であると予想している。

次に遺伝子改変マウスを作製する、または NIH3T3 細胞にノックインする細胞を作製することができるターゲティングベクターを作製した。図 5 のように ROSA26 に All-in-one にした発現カセットを導入し、タモキシフェンの誘導で VCre が働き、VloxP サイトと Vlox2272 サイトを用いた FLEx-switch で DNA カセットが反転することで、CAG プロモーターと Cas9 が同じ向きになり、Cas9 が発現される。非常に低い頻度で Cre が修復されて STOP カセットが除かれて、EGFP が発現する予定である。このように本研究では新手法(editedCre システム)を開発し、マウス個体内においても正しく機能す

ることを確認する
ための準備を進め
ることができた。

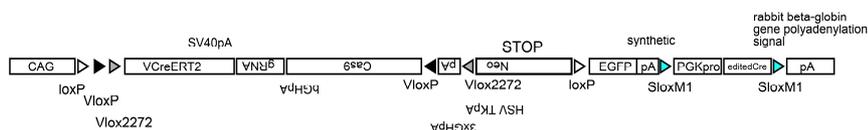


図 5 editedCre(edCre) システムのall-in-one ターゲティングベクターの模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama Manabu	4. 巻 2637
2. 論文標題 VCre/VloxP and SCre/SloxP as Reliable Site-Specific Recombination Systems for Genome Engineering	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 161 ~ 180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-3016-7_13	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

〔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
---------	---------