

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290033

研究課題名(和文) 実験用ラットにおけるゲノム編集基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of genome editing technologies in laboratory rats

研究代表者

真下 知士 (Mashimo, Tomoji)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80397554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：実験用ラットにおける新しいゲノム編集基盤技術を開発するため、CRISPR/Cas9システムを利用して、ノックアウト、SNP置換、十数bp挿入、数Kbp欠失などのゲノム編集ラットを作製することに成功した。長鎖一本鎖DNAを利用したGFPカセットノックイン、コンディショナルラットを作製するCLICK法、BAC等の大規模ゲノム領域をノックインする2H2OP法を開発した。2H2OP法、CLICK法については特許出願を行った。Cas9トランスジェニックラットを利用したin vivoゲノム編集技術の開発、新しいラットゲノム編集基盤技術を用いた新規パーキンソン病モデルラットの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：In order to develop novel genome editing technologies in laboratory rats, we succeeded to generate genome-edited rats, such as knockouts, SNP exchange, a dozen bp insertion, and several Kbp deletion, using the CRISPR/Cas9 system. We also developed a GFP cassette knock-ins using long single-stranded DNA (lssDNA), a CLICK method to efficiently generate conditional knockout rats, a 2H2OP method to knock-in large scale genomic regions such as 200 Kb BAC. The 2H2OP method and the CLICK method were patented. We are developing in vivo genomic editing technology using Cas9-transgenic rats, as well as are generating new rat models of Parkinson's disease using the rat genome editing technology we established in this study.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集 ラット 遺伝子 脳神経疾患 実験動物

1. 研究開始当初の背景

ラットは、マウスと並ぶ代表的な実験動物である。マウスよりも体のサイズが大きなラットは、血液採取や移植実験などが容易である。疾患モデルとしての利用価値も高く、生理実験、脳神経病態解析、行動解析に使いやすいなどから、脳神経系疾患のモデル動物として有用である。これまで ES 細胞による遺伝子改変技術がなかったが、近年、我々は ENU ミュータジェネシス (Mashimo *et al. Nat Genet* 2008)、ジンクフィンガースクレアーゼ (ZFN) (Mashimo *et al. PLoS One* 2010)、TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) (Mashimo *et al. Sci Rep* 2013) により、ラットにおいて標的とする遺伝子を効率的にノックアウトする技術を開発してきた。

最近、原核生物由来の CRISPR/Cas システムを利用したゲノム編集技術が、細胞、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス、ラット等で報告された。CRISPR 技術は、ガイド RNA (gRNA) が 20 塩基程の標的 DNA 配列を認識し、Cas9 ヌクレアーゼが認識した DNA を二本鎖切断する。gRNA の作製が簡単で、マウス、ラットでの遺伝子改変効率も高いことが、報告されている。我々も、この CRISPR 技術を利用して、ラット繊維芽細胞株 (Rat1 細胞) や、ラット受精卵で、高効率 (約 40%) に遺伝子をノックアウトすることに成功している。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR 技術を用いた実験用ラットにおける新しいゲノム編集技術基盤の開発を目指す。

1) アルビノ (*Tyr*)、アグーチ (*Asip*)、頭巾斑 (*Kit*) の毛色遺伝子、緑色蛍光 GFP を標的として、ノックアウト、SNP 置換、十数 bp 挿入、数 Kbp 欠失、GFP ノックイン、複数遺伝子の同時ゲノム編集を実施する。

2) Cas9 トランスジェニックラットを作成し、Cas9 発現受精卵を利用したゲノム編集の効率化を行う。さらに、Cas9 発現ラット個体を用いて、ドラッグデリバリーシステムにより gRNA を脳、肝臓などの各組織へ導入することで、ラット体細胞レベルでのゲノム編集 (*in vivo* ノックアウト) を試みる。

3) 新しく構築したラットゲノム編集技術基盤を用いて、新規パーキンソン病モデルラットの開発を行う。

3. 研究の方法

本研究では、CRISPR を用いた実験用ラットにおける新しいゲノム編集基盤技術の開発を目指す。

1) アルビノ (*Tyr*)、アグーチ (*Asip*)、頭巾斑 (*Kit*) の毛色遺伝子、緑色蛍光 GFP を標的として、ノックアウト、SNP 置換、十数 bp 挿入、数 Kbp 欠失、GFP ノックイン、複数遺伝子の同時ゲノム編集を実施する。

2) Cas9 トランスジェニックラットの受精卵を利用して、ゲノム編集の効率化を行う。さらに、Cas9 発現ラット個体の脳、肝臓などの各組織へ、gRNA を直接導入することで、ラット体細胞レベルでのゲノム編集 (*in vivo* ノックアウト) を試みる。

3) ラットゲノム編集技術を用いて、新規パーキンソン病モデルラットの開発を行う。

4. 研究成果

本研究では、CRISPR を用いた実験用ラットにおける新しいゲノム編集基盤技術の開発を目指している。

平成 26 年度は、ラットにおけるゲノム編集として、特性が一目でわかるアルビノ (*Tyr*)、アグーチ (*Asip*)、頭巾斑 (*Kit*) の毛色遺伝子を標的とした。

① Cas9、gRNA を *in vitro* 転写し、DA 系統の受精卵にインジェクションすることで、*Tyr* ノックアウトラットを作製した。

② Cas9、gRNA、ssODN を F344 系統にインジェクションすることで、*Tyr* 遺伝子ミスセンス変異を野生型に SNP 置換 (レスキュー) した。

③ *Asip* 遺伝子の欠失変異に対して、ssODN により十数 bp 挿入を行い、アグーチラットを作製した。

④ *Kit* 遺伝子の ERV (9K-bp) 挿入変異に対して、二つの gRNA と ssODN を利用して ERV を欠失させることで、全身野生色のラットを作製した。

平成 27 年度は、引続きゲノム編集基盤技術の開発を行った。

⑤ 長鎖一本鎖 DNA (lssDNA) 精製法を新たに確立し、*Thy1* 遺伝子を標的とした効率的な GFP 遺伝子 (1K-bp) ノックインを行った。さ

⑥ 二つの gRNA (はさみ) と 2 つの ssODN (のり) を利用して、効率的に大きなサイズのプラスミド DNA をノックインすることができる 2 ヒット 2 オリゴ法 (2H2OP) を開発した。2H2OP 法により、大規模染色体領域 (BAC : 200K-bp) の標的ノックインに成功した。また、大規模染色体領域の置換 (ラット *Cyp2d* 遺伝子クラスターとヒト *CYP2D6* 遺伝子の入替え) に成功した。

以上の研究成果を取りまとめて、英国科学誌 *Nature Communications* (英国ネイチャー出版グループ オープンアクセス誌) から報告した。またその他、研究成果等は査読付き英文論文や図書等に取りまとめた。2H2OP 法については特許出願を行った。

平成 28 年度も引き続き、CRISPR を用いた実験用ラットにおける新しいゲノム編集基盤技術の開発を行った。

⑦ 二つの gRNA と長鎖一本鎖の lssDNA を利用して、2 箇所同時に loxP 配列をラット受精卵にノックインすることに成功した。マイ

クロインジェクションの代わりにエレクトロポレーションを利用することで、簡便に、効率的にコンディショナルラットを作製することができる CLICK : CRISPR with lssDNA inducing conditional knockout alleles を開発した。

⑧昨年度に開発した 2H2OP を利用することで、ラット Rosa 遺伝子座に GFP-DsRed をノックインした、蛍光蛋白発現レポーターラットの作製を行った。

関連する研究内容を査読付き英文論文、図書等に取りまとめた。CLICK 法については特許出願を行った。

平成 29 年度は以下の研究開発を行った。

⑨GFP 配列をターゲットにした gRNA および Cas9 を発現するアデノ随伴ウイルス AAV ベクターを作成した。これら AAV ベクターによる *in vivo* ゲノム編集を実施した。2H2OP 法により Cas9 ノックインラットを作製している。

⑩これまで開発したゲノム編集技術により、*Snca* 遺伝子 G51D 一塩基置換ラットを作製した。さらに 2 H2OP 法により、ヒト *SNCA-G51D* 変異型をノックインしたパーキンソン病モデルラットを作製した。ヒトパーキンソン病治療モデルとしての評価を行っている。

以上の研究成果は、オープンアクセス誌 *BMC Genomics* から報告される。また、これまでの CRISPR 技術を用いた実験用ラットにおける新しいゲノム編集基盤技術については、Springer 社の *Mammalian Genome* 誌、および日本人類遺伝学会の学会誌 *Journal of Human Genetics* 誌に英文総説として報告している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Application of genome editing technologies in rats for human disease models. Yoshimi K, Mashimo T. *J Hum Genet*. 2017 63(2):115-123, doi: 10.1038/s10038-017-0346-2.
2. Meek S, Mashimo T, Burdon T. From engineering to editing the rat genome. *Mamm Genome*. 2017 28(7-8):302-314, doi: 10.1007/s00335-017-9705-8.
3. Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, *Mashimo T. Engineered Nucleases Lead to Genome Editing Revolution in Rats. *in* Yamamoto T (eds): Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases/Springer Japan, p183-195, 2015
4. Kaneko T, Mashimo T: Creating Knockout and Knockin Rodents Using Engineered Endonucleases via Direct Embryo Injection. *Methods Mol Biol*.1239:307-315, 2015
5. Serikawa T, Mashimo T, Kuramoto T, Voigt B, Ohno Y, Sasa M. Advances on Genetic

- Rat Models of Epilepsy. *Exp Anim*. 64(1):1-7, 2015
6. Rats deficient C-type natriuretic peptide suffer from impaired skeletal growth without early death. Fujii T, Hirota K, Yasoda A, Takizawa A, Morozumi N, Nakamura R, Yotsumoto T, Kondo E, Yamashita Y, Sakane Y, Kanai Y, Ueda Y, Yamauchi I, Yamanaka S, Nakao K, Kuwahara K, Jindo T, Furuya M, Mashimo T, Inagaki N, Serikawa T, Nakao K. *PLoS One*. 2018 Mar 22;13(3):e0194812. doi: 10.1371/journal.pone.0194812. eCollection 2018.
7. Creating a stem cell niche in the inner ear using self-assembling peptide amphiphiles. Matsuoka AJ, Sayed ZA, Stephanopoulos N, Berns EJ, Wadhvani AR, Morrissey ZD, Chadly DM, Kobayashi S, Edelbrock AN, Mashimo T, Miller CA, McGuire TL, Stupp SI, Kessler JA. *PLoS One*. 2017 Dec 28;12(12):e0190150. doi: 10.1371/journal.pone.0190150. eCollection 2017.
8. Tremor dominant Kyoto (Trdk) rats carry a missense mutation in the gene encoding the SK2 subunit of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. Kuramoto T, Yokoe M, Kunisawa N, Ohashi K, Miyake T, Higuchi Y, Yoshimi K, Mashimo T, Tanaka M, Kuwamura M, Kaneko S, Shimizu S, Serikawa T, Ohno Y. *Brain Res*. 2017 Sep 13. pii: S0006-8993(17)30397-9. doi: 10.1016/j.brainres.2017.09.012.
9. A rat model of ataxia-telangiectasia: evidence for a neurodegenerative phenotype. Quek H, Luff J, Cheung K, Kozlov S, Gatei M, Lee CS, Bellingham MC, Noakes PG, Lim YC, Barnett NL, Dingwall S, Wolvetang E, Mashimo T, Roberts TL, Lavin MF. *Hum Mol Genet*. 2017 26 (1): 109-123. doi: 10.1093/hmg/ddw371
10. Rats with a missense mutation in *Atm* display neuroinflammation and neurodegeneration subsequent to accumulation of cytosolic DNA following unrepaired DNA damage. Quek H, Luff J, Cheung K, Kozlov S, Gatei M, Lee CS, Bellingham MC, Noakes PG, Lim YC, Barnett NL, Dingwall S, Wolvetang E, Mashimo T, Roberts TL, Lavin MF. *J Leukoc Biol*. 2017 101(4):927-947. doi: 10.1189/jlb.4VMA0716-316R.
11. A Missense Mutation of the Gene Encoding Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) Confers Seizure Susceptibility by Disrupting Amygdalar Synaptic GABA Release. Tokudome K, Okumura T, Terada R, Shimizu S, Kunisawa N, Mashimo T, Serikawa T, Sasa M, Ohno Y. *Front Pharmacol*. 2016 Jul 14;7:210. doi:

- 10.3389/fphar.2016.00210.
12. Fat Mass Reduction With Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance in Heterozygous PPAR γ Mutant Rats. Gumbilai V, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Ebihara C, Zhao M, Yamamoto Y, Mashimo T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. *Diabetes*. 2016 Oct;65(10):2954-65. doi: 10.2337/db15-1422.
 13. Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) regulates kindling epileptogenesis via GABAergic neurotransmission. Tokudome K, Okumura T, Shimizu S, Mashimo T, Takizawa A, Serikawa T, Terada R, Ishihara S, Kunisawa N, Sasa M, Ohno Y. *Sci Rep*. 2016 Jun 6;6:27420. doi: 10.1038/srep27420.
 14. Generation of a New Model Rat: Nrf2 Knockout Rats Are Sensitive to Aflatoxin B1 Toxicity. Taguchi K, Takaku M, Egner PA, Morita M, Kaneko T, Mashimo T, Kensler TW, Yamamoto M. *Toxicol Sci*. 2016 Jul;152(1):40-52. doi: 10.1093/toxsci/kfw065.
 15. Depdc5 knockout rat: A novel model of mTORopathy. Marsan E, Ishida S, Schramm A, Weckhuysen S, Muraca G, Lecas S, Liang N, Treins C, Pende M, Roussel D, Le Van Quyen M, Mashimo T, Kaneko T, Yamamoto T, Sakuma T, Mahon S, Miles R, Leguern E, Charpier S, Baulac S. *Neurobiol Dis*. 2016 May;89:180-9. doi: 10.1016/j.nbd.2016.02.010.
 16. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. *Nat Commun*. 2016 Jan 20;7:10431. doi: 10.1038/ncomms10431.
 17. Kaneko T, Mashimo T. Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation. *PLoS One*. 10(11):e0142755. 2015
 18. Abe K, Takamatsu N, Ishikawa K, Tsurumi T, Tanimoto S, Sakurai Y, Lisse T, Imai K, Serikawa T, Mashimo T. Novel ENU-Induced Mutation in Tbx6 Causes Dominant Spondylocostal Dysostosis-Like Vertebral Malformations in the Rat. *PLoS One*. 10(6):e0130231. 2015
 19. Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilai V, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. *Hum Mol Genet*. 24(15):4238-49. 2015
 1. 真下 知士「ゲノム編集技術によるモデル動物の作製」日本実験動物技術者協会関西支部平成 29 年度春季大会 大阪大学吹田キャンパス医学部講義棟 1階A 講堂、大阪、2018 年 3 月 24 日 (土)
 2. 真下 知士「ゲノム編集 CRISPR/Cas9 システムの今とこれから」平成 29 年度大阪府高校生物教育研究会、アウリーナ大阪 3 階信貴の間、大阪、2018 年 2 月 16 日 (金)
 3. 真下 知士「新しいヒト化動物の創成 ゲノム編集の成果と展望」平成 29 年度生命科学連携推進協議会市民公開シンポジウム『生命を越えるもの—人工知能・ゲノム編集の衝撃』、グランフロント大阪コングレコンベンションセンター、大阪、2018 年 2 月 12 日 (月)
 4. Mashimo T: CRISPR-mediated genome engineering in mice, rats, and rabbits. The 9th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI), Takeda Pharmaceutical Company Ltd. Osaka, Japan, February 7 – 8, 2018
 5. 真下 知士「ゲノム編集技術と新規モデル動物」先導的学際研究機構創薬サイエンス部門シンポジウム、グランフロント大阪北館タワー、大阪、2018 年 1 月 19 日 (金)
 6. 真下 知士「フランス留学から始まったゲノム編集研究!？」第 187 回日仏生物学会、京都府立医科大学、京都、2017 年 12 月 16 日 (土)
 7. 真下 知士「ラットの遺伝子改変」2017 年度遺伝研研究会、国立遺伝学研究所、三島、静岡、2017 年 12 月 14 日 (木)
 8. 真下 知士「ゲノム編集技術によるモデル動物開発研究」先端医療技術開発センターシンポジウム、自治医科大学、栃木、2017 年 11 月 20 日 (月)
 9. Mashimo T: CRISPR-mediated genome engineering in rats. Edinburgh Rat Meeting, SCRM building, The University of Edinburgh, Edinburgh, UK, 17th November, 2017
 10. Mashimo T: Efficient generation of conditional knockout mice by CLICK. INFRAFRONTIER/IMPC Stakeholder Meeting, Royal Olympic Hotel, Athens, Greece, Nov 14th–16th 2017
 11. Mashimo T: CRISPR-mediated genome engineering in animals. International Conference of the Genetics Society of Korea (ICGSK) 2017, Global Convention Plaza, Utah, Seoul, Korea, October 26-27, 2017
 12. Mashimo T: CRISPR-mediated genome engineering in zygotes. 14th Transgenic Technology Meeting, The International Society for Transgenic Technologies (ISTT), Snowbird Resort, Salt Lake City, Utah, USA,

October 1-4, 2017

13. Mashimo T: Highly efficient genome editing in embryos using the Super Electroporator NEPA21. The 4th World Congress of Reproductive Biology 2017 (WCRB 2017), Okinawa, Japan, Sep 27-29, 2017
14. 真下知士「動物実験施設におけるゲノム編集技術の活用」第 60 回日本神経化学学会大会、仙台国際センター、仙台、平成 29 年 9 月 9 日 (土)
15. 真下知士「ゲノム編集による疾患モデル動物の開発」第 57 回日本先天異常学会・第 6 回日本 DOHaD 学会 合同学術集会、早稲田大学理工学術院西早稲田キャンパス、東京、2017 年 8 月 26 日 (土)
16. Mashimo T: CRISPR-mediated Genome Engineering in Mice, Rats, and Rabbits. 24th Asia Pacific Cancer Conference (APCC), Seoul, Korea, 22-24 June, 2017
17. Mashimo T: Efficient generation of conditional knockout mice by CLICK: 9th Workshop on Innovative Mouse Models, IMM2017, Leiden, The Netherlands, 15-16 June, 2017
18. 真下知士「動物実験施設におけるゲノム編集技術の活用」第 43 回国立大学法人動物実験施設協議会総会技術職員懇談会、香川、サンポートホール高松、2017 年 5 月 19 日
19. 真下知士「マウス・ラットにおける新規ゲノム編集技術の開発」JST-OPERA 「ゲノム編集による革新的な有用細胞・生物作成技術の創出」キックオフシンポジウム、広島、ホテルグランヴィア広島 4F、2017 年 3 月 17 日
20. 真下知士「次世代ゲノム編集ラットの作製支援事業」第 3 回 KBRP ワークショップ、熊本、熊本大学生命資源研究支援センター、2017 年 3 月 10 日
21. 真下知士「ゲノム編集による再生医療モデル動物の開発」第 16 回日本再生医療学会総会 シンポジウム<ゲノム編集と遺伝子治療>、仙台、仙台国際センター、2017 年 3 月 9 日
22. 真下知士「ゲノム編集—その可能性の先にあるものとは」ナレッジキャピタル超学校 MOU-ICHIDO 自分進化論、大阪、グランフロント大阪北館ナレッジキャピタル 1F、2017 年 2 月 25 日
23. 真下知士「ゲノム編集技術によるモデル動物の作製支援事業」大阪大学大学院医学系研究科共同研附属ゲノム編集センター第 1 回セミナー、大阪大学大学院医学系研究科臨床研究棟 3 階、2016 年 12 月 14 日
24. 真下知士「CRISPR/Cas9 と長鎖一本鎖 DNA による超簡単ノックイン法」第 38 回日本分子生物学会バイオテクノロジーセミナー、横浜、パシフィコ横浜、2016 年 12 月 1 日
25. 真下知士「哺乳動物におけるゲノム編集技術の開発」第 39 回日本分子生物学会、横浜、パシフィコ横浜、2016 年 12 月 1 日
26. 真下知士「ゲノム編集時代における実験動物業者のあり方について」日本実験動物協同組合関西支部支部会研修会、メルパルク京都、2016 年 11 月 25 日
27. 真下知士「モデル動物作製のための最先端 CRISPR 技術」BioJapan 2016 World Business Forum、パシフィコ横浜、2016 年 10 月 14 日
28. 真下知士「哺乳動物におけるゲノム編集基盤技術の開発」第 10 回家畜 DNA 西郷シンポジウム、(独)家畜改良センター講堂、福島県西白河郡、2016 年 9 月 28 日
29. 真下知士「ゲノム編集技術の基礎と応用～ゲノム編集動物の現状と可能性・克服すべき課題～」情報機構セミナー、[東京・大井町]きゅりあん 4 階、東京大井町、2016 年 9 月 26 日
30. Mashimo T: ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions: University of Copenhagen PhD course “Genome Editing using CRISPR/Cas9”, Copenhagen Biocenter, Copenhagen Denmark, Sep 21, 2016
31. 真下知士「ラットにおけるゲノム編集技術の最前線」群馬大学遺伝発達行動学セミナー『ラットを用いた医学生命科学研究—最近の知見』基礎大学院講義室、群馬県前橋市、2016 年 9 月 15 日
32. 真下知士「CRISPR/Cas9 によるゲノム編集動物の超簡単作製法」ゲノム編集 2016 ~ Genome Editing 2016 の可能性 ~、中央大学駿河台記念館、東京都千代田区、2016 年 5 月 26 日
33. 真下知士「ゲノム編集とは何か? 遺伝子操作の最新事情」第 96 回北天満サイエンスカフェ、天五中崎通商店街路上、大阪市北区、2016 年 5 月 22 日
34. 真下知士「長鎖一本鎖 DNA を利用したゲノム編集」フナコシ株式会社、東京、2016 年 3 月 11 日
35. 真下知士「ゲノム編集とヒト化動物」大阪大学未来戦略機構第六部門創薬基盤科学研究部門シンポジウム、大阪大学銀杏会館、吹田、2016 年 1 月 15 日
36. Mashimo T: CRISPR/Cas9 with ssODNs enables gene knock-in and replacement of large genomic regions in rats. Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 (TGE 2015), Nara Kasugano International Forum IRAKA, Nara, Japan Nov 19, 2015
37. 真下知士「CRISPR/Cas9 による効率的なモデル動物の開発」第 51 回高血圧関連疾患モデル学会、千里ライフサイエンスセンター、豊中、2015 年 10 月 30 日
38. 真下知士「CRISPR/Cas9 による哺乳動物

でのゲノム編集」第127回関西実験動物研究会、大阪大学銀杏会館、吹田、2015年9月12日

39. 真下知士「発生再生医学におけるゲノム編集革命」大阪大学医学科3年次選択必修科目「発生再生医学」臨床研究棟6階セミナー室、2015年9月3日
40. 真下知士「ゲノム編集とは」ヒトゲノム解析研究倫理審査を考える会、千里ライフサイエンスセンター、豊中、2015年8月9日
41. 真下知士「ゲノム編集技術：動物の遺伝子を自由に操作する」生野高校スーパーサイエンスハイスクール高大連携事業における大阪大学医学部手術実習、大阪大学大学院医学系研究科医学部イノベーションセンター、吹田、2015年7月29日
42. 真下知士「ゲノム編集技術をもちいたゲノム改変ラット」第一回「ゲノム編集技術」に関する戦略ワークショップ、JST-CRDS、JST 東京本部別館、東京、2015年7月20日
43. 真下知士「CRISPR/Cas システムによるノックインラットの作製」第62回日本実験動物学会総会、京都テルサ、京都、2015年5月28日
44. 真下知士「CRISPR/Cas システムを使った遺伝子改変動物の作製」平成27年度和光純薬工業代理店講習会、大阪、和光純薬工業株式会社、2015年5月12日

〔図書〕(計 9 件)

1. 真下知士「ゲノム編集技術の世界動向から社会的課題まで」、実験医学増刊号、All About ゲノム編集、真下知士、山本卓(編者)、羊土社、Vol.34 No.20、p12-17、2016年12月1日
2. 真下知士「ゲノム編集概論」、大阪大学医学部 学友会会誌 Vol. 36、生涯教育講座「ゲノム編集革命!」、真下知士、竹田潤二(編者)、公益財団法人医学振興銀杏会、p49-53、2016年12月
3. 真下知士「ゲノム編集技術の登場・課題・展望」、進化するゲノム編集技術、真下知士、城石俊彦(編者)、株式会社エヌ・ティー・エス、p1-341、2015年10月12日
4. 宮坂佳樹、真下知士：哺乳類でのゲノム編集の利用、ゲノム編集入門-ZFN・TALEN・CRISPR-Cas9-、裳華房、P136-159、2016年12月
5. 真下知士：ヒト疾患モデルとしてのラットの利点、マウス表現型解析スタンダード、実験医学別冊、羊土社、P68-69、2016年11月
6. 真下知士：CRISPR/Cas9によるゲノム編集動物の超簡単作製法、創薬のひろば、

エーイー企画、P11-14、2016年10月

7. 吉見一人、真下知士：CRISPR/Cas9を用いた効率的なノックインラット・マウスの作製～塩基置換やGFP等の導入～、IDT テクニカルレポート、Vol.2、P1-5、2015年11月
8. 真下知士：第4章 ラットでのゲノム編集、論文だけではわからない ゲノム編集成功の秘訣 Q&A、実験医学別冊、羊土社、P124-142、2015年11月
9. 真下知士：実験用ラットにおけるゲノム編集技術の福音、医学のあゆみ Vol.252(2)、p171-176、2015

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称：ゲノム編集方法

発明者：真下知士、宮坂佳樹

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2016-229976

出願年月日：平成28年11月28日

国内外の別：国内

名称：哺乳動物の標的ゲノム領域に DNA をノックインする方法及び細胞

発明者：真下知士、吉見一人、金子武人

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特願 2014-235898、国際出願番号:PCT/JP2015/082279

出願年月日：平成26年11月20日

国内外の別：国内、国外

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科実験動物学

<http://www.iexas-osaka-u.jp/lab/>

大阪大学大学院医学系研究科附属共同ゲノム編集センター

<http://www2.med.osaka-u.ac.jp/gerdc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真下 知士 (Mashimo Tomoji)

大阪大学医学系研究科・准教授

研究者番号：80397554

(2) 研究分担者

卯野 義弘 (Uno Yoshihiro)

大阪大学医学系研究科・助手

研究者番号：80252683

金子 武人 (Kaneko Takehito)

岩手大学理学部・准教授

研究者番号：30332878