

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660258

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9ゲノム編集による筋ジストロフィー疾患モデルミニブタの開発

研究課題名(英文) Generation of muscular dystrophy model miniature pigs using CRISPR/Cas9 system

研究代表者

小野 悦郎 (Ono, Etsuro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00160903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジストロフィン遺伝子を欠損させたデュシェンヌ型筋ジストロフィーマイクロミニブタを開発することを目的にCRISPR/Cas9 システムを用いたマイクロミニブタのゲノム編集方法の確立を試みた。マイクロミニブタのジストロフィン遺伝子のエクソン23 を切断標的とし、4種類のsgRNAを設計した。DSB-HDR アッセイにおいて、最も切断効率の高かったsgRNA2種類を使用し、合計7回のゲノム編集操作を行ったが、6回目の操作においてのみ、3匹の仔ブタが出生した。各々の仔ブタの皮膚からDNA を抽出し、エクソン23 の塩基配列を解析したが、目的の遺伝子欠失等の変異は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked lethal muscle disorder caused by mutations in the Dmd gene encoding Dystrophin. DMD model animals, such as mdx mice and canine X-linked muscular dystrophy dogs, have been widely utilized in the development of a treatment for DMD. Here, we have tried to generate Dmd-mutated micro-miniature pigs using CRISPR/Cas9 systems. To introduce mutations in the micro-miniature pig Dmd gene, located in the X chromosome, we predicted the sequence of exons based on information of the pig Dmd gene, designed two sgRNAs targeting exon 23 of the pig Dmd gene, and simultaneously injected the plasmids, sgRNAs and/or Cas9 proteins into zygotes. Total 7 trials were performed to generate Dmd-mutated micro-miniature pigs using CRISPR/Cas9 systems. In the 6th trial, three piglets were born, but one of them died after their birth due to a severe cardiac deformity. Unfortunately, no mutation was observed in the piglets.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集 筋ジストロフィー 疾患モデル マイクロミニブタ

1. 研究開始当初の背景

実験用ミニブタの遺伝子改変は、ES 細胞が樹立されていないこともあり、我々は、これまで実験用ミニブタ由来の線維芽細胞等の体細胞において相同遺伝子組換えを行い、その細胞核を未受精卵に移植する“体細胞クローン技術”を利用して実施してきた。この方法は、手技が煩雑で熟練と時間を要するため、遺伝子改変ミニブタの作製において最大の問題であった。近年、ZFN やTALEN 等のゲノム編集技術が急展開し、ES 細胞が樹立されていないマウス以外の動物でも遺伝子改変が容易になってきた。さらに、2013年初めには、新たなゲノム編集技術として、CRISPR/Cas9 システムが発表され、CRISPR/Cas9 システムがマウスにおいて迅速かつ正確に目的遺伝子を欠損することが確認され、ミニブタ等のマウス以外の動物への応用が期待されている。

筋ジストロフィーは、約3300 人に1人の割合で男児が発症する未だ根本的な治療法が確立されていない遺伝性の難病である。この病気の治療法を確立するための動物モデルとして、ジストロフィン遺伝子を欠損したmdx マウスやCXMD ビーグル犬が存在するが、mdx マウスは四肢への体重負荷が不十分であるため症状が軽い等の理由で疾患モデルとして問題がある。また、CXMD ビーグル犬は出生直後の死亡率が高く、コロニーの維持自体が難しい状況となっている。また、国際的な動物愛護の観点からもイヌの使用には慎重にならざるを得ない等の問題が存在する。

そこで、以上のような背景のもと、第3のモデル動物として、実験用マイクロミニブタに着目し、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を試みることにした。マイクロミニブタは、マウス、イヌに比べ、解剖学的・生理学的にヒトにより近い特質を持つため、医療用モデルとして利用されており、四肢への体重負荷についても問題はないと考えられた。

2. 研究の目的

次世代遺伝子改変技術(染色体にある標的DNA を切断し、修復の際に起こるエラーを利用して目的の遺伝子操作を行うCRISPR/Cas9 システム)を用いたマイクロミニブタのゲノム編集方法を確立し、疾患モデルマイクロミニブタを作製する。本研究では、その第一弾として、既存の動物モデルであるマウスやイヌでの問題点を克服したジストロフィン遺伝子を欠損させた次世代型デュシェンヌ型筋ジストロフィーマイクロミニブタを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 切断標的 DNA 配列の決定

切断標的DNA となるマイクロミニブタのジストロフィン遺伝子のエクソン23 をPCRで増幅し、標的DNA の切断をin vitro で確認するためのDSB-HDR アッセイ(Assay for DSB mediated HDR by EGFP reconstitution ; 図1)

用レポータープラスミド pCAG-EGxxFPに挿入し、エクソン23 内の標的DNA が切断されると蛍光蛋白を発現するようになるDSB-HDR アッセイ用レポータープラスミドpCAG-EGxxFP-DMDEX23 を構築した。

エクソン23 の塩基配列から切断標的となる配列を複数決定し、CRISPR/Cas9 ベクターであるpX330 に20mer 切断標的オリゴヌクレオチドを挿入し、標的DNA 切断プラスミド pX330-DMD_Ex23 を4 種類構築した。

pCAG-EGxxFP-DMDEX23 と各々のpX330/DMD_Ex23 をHEK293T 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後に蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを確認することでDSB-HDR アッセイ用レポータープラスミド中のエクソン23 のDNA 配列に欠失変異が導入されたことを確認した。切断効率が最も高いpX330/DMD_Ex23 プラスミドをインジェクションに使用した。

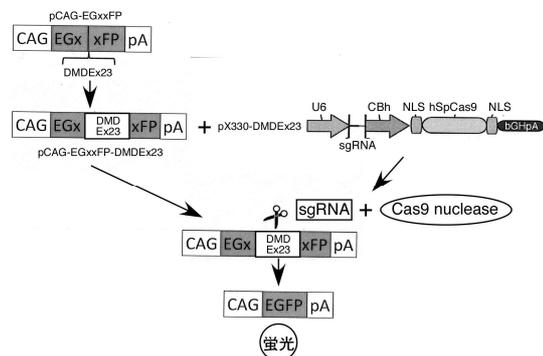


図1. DSB-HDR アッセイ

(2) 産業ブタの受精卵を用いたゲノム編集の確認

家畜ブタの卵巣から未受精卵を取り出し、培養することで成熟させた後、体外受精により受精卵を得た。受精卵の前核にpX330-DMD Ex23 を常法に従いマイクロインジェクションし、胚盤胞まで培養した。各胚盤胞からDNA を抽出し、エクソン23 をPCR で増幅した時と同じプライマーペアでPCRにて増幅し、塩基配列を決定し遺伝子欠失変異を確認した。

(3) マイクロミニブタのゲノム編集

排卵誘発した雌マイクロミニブタに人工授精し、受精卵を回収した。受精卵の前核にpX330-DMD_Ex23 あるいは、化学合成crRNA、tracrRNAおよびCas9蛋白質を、細胞質にsgRNA とCas9 mRNAあるいは、sgRNAと核移行シグナルを付与されたCas9蛋白質を常法に従いマイクロインジェクションし、受精卵を仮親として使用する家畜ブタの卵管に夫々移植した。

得られた産仔から皮膚を採取し、DNA を抽出し、エクソン23 の欠失変異導入部位の前後について、塩基配列を決定し、欠失変異遺伝子型の確認を行った。

(4) マイクロミニブタ由来初代線維芽細胞におけるゲノム編集

DSB-HDR アッセイにおいて、切断効率が良かった2種類の20mer 切断標的オリゴヌクレオチドを puromycin耐性遺伝子を含む CRISPR/Cas9 ベクターであるpX459に挿入し、マイクロミニブタ由来初代線維芽細胞のゲノム編集に使用するプラスミドを構築し、pX459/DMD_Ex23 #3および#4とした。

これらプラスミドをマイクロミニブタ由来初代線維芽細胞にトランスフェクションし、5ug/mlのpuromycinを含む培地で96時間培養し、puromycin抵抗性細胞をその後、通常の培地で培養した。樹立した細胞株からDNA を抽出し、エクソン23 の欠失変異導入部位の前後について、塩基配列を決定し、欠失変異遺伝子型の確認を行った。

4. 研究成果

(1) 切断標的 DNA 配列の決定

切断標的DNA となるマイクロミニブタのジストロフィン遺伝子のエクソン23 をPCRで増幅し、DSB-HDR アッセイ用レポータープラスミド pCAG-EGxxFP-DMDEX23 を構築した。

エクソン23 の塩基配列から切断標的となる配列を4箇所決定し(図2 上段; #1~#4)、CRISPR/Cas9 ベクターであるpX330に20mer 切断標的オリゴヌクレオチドを挿入し、sgRNA およびCas9蛋白質を発現するpX330/DMD_Ex23 #1~#4を構築した。

pCAG-EGxxFP-DMDEX23 と各々のpX330/DMD_Ex23 をHEK293T 細胞にco-transfection し、48 時間後に蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを確認した。使用した全てのpX330-DMD_Ex23 プラスミドは、標的配列を切断した(図2 下段)。切断効率の高かったpX330-DMD_Ex23#3および#4を受精卵のインジェクションに使用することにした。

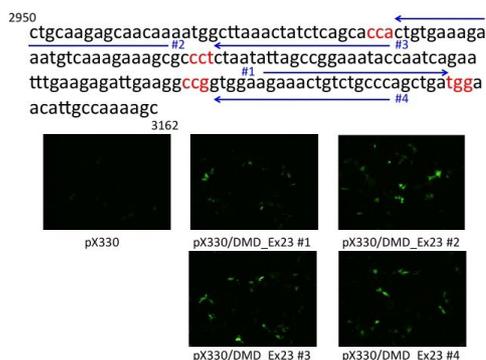


図2. エクソン23の切断標的DNA断片とゲノム編集標的塩基配列(上段; 赤字はPAM配列) DSB-HDR アッセイによる蛍光発現(下段)

(2) 産業ブタの受精卵を用いたゲノム編集の確認

家畜ブタの卵巣由来体外受精卵の前核にpX330-DMDEX23 #3 を常法に従いマイクロインジェクションし、胚盤胞まで培養した。合計66個の胚盤胞からDNAを抽出し、エクソ

ン23をPCRで増幅した時と同じプライマーペアでPCRにて増幅し、塩基配列を決定したが、ゲノム編集による遺伝子の欠失等は確認できなかった。

(3) マイクロミニブタのゲノム編集

ゲノム編集用プラスミドのマイクロミニブタ受精卵前核へのインジェクションによるゲノム編集操作を3回実施した。1回目は、14個、2回目は3個の胚を各1頭の仮親ブタに翌日移植したが、着床しなかった。3回目は、40個の胚を1頭の仮親ブタに翌日移植したが着床は認められなかった。

ゲノム編集用合成 crRNA および tracrRNA と Cas9 蛋白の受精卵前核へのインジェクションによるゲノム編集操作を実施し、20個の胚を1頭の仮親ブタに翌日移植したが着床しなかった。

ゲノム編集用合成 sgRNA と Cas9 mRNA の細胞質へのインジェクションによるゲノム編集操作を2回実施し、胚の移植をインジェクション当日に変更した。1回目は、104個の胚を1頭の仮親ブタに移植し、3頭の子ブタが出生した(図3A)。このうち1頭は、重度の心臓奇形のため生後3日目に死亡した。2回目は、85個の胚を1頭の仮親ブタに当日移植したが、妊娠を維持できなかった。

死亡した仔ブタの肉眼的病理診断では、心奇形(心房中隔欠損、心室中隔欠損、左房室口閉鎖、大血管転換)、肝腫大、脳水腫が観察された。また、病理組織学的解析では、大脳皮質壊死、視床および小脳皮質の点状出血、肝臓の多巣性単核細胞浸潤が認められた。しかしながら、骨格筋には肉眼的、組織学的異常は認められなかった(図3B)。

出生した3匹の仔ブタから各々の皮膚を採取し、DNAを抽出し、エクソン23の塩基配列を解析したが、目的の遺伝子欠失等の変異は認められなかった。

仔ブタがモザイクである可能性も否定できないので、全身10カ所の皮膚を採取し、同様に解析する予定である。

ゲノム編集用合成 sgRNA と核移行シグナル付き Cas9 蛋白の受精卵細胞質へのインジェクションを行い、当日に仮親ブタ1頭へ30個の胚を当日移植した。着床については、未だ確認できていない。

各ゲノム編集操作の結果を以下の表に示す。

自己	性別	調度	胚移植ブタ			産仔ブタ			結果
			胎心	胎動	胎頭数	胎心	胎動数	仔数	
2014.1.2	♀	KX32/DMD_Ex23_10mg/μl	2	2	16	2	10mg	16	16
2015.3.20	♀	KX32/DMD_Ex23_48.Final.8.5mg/μl	4	4	16	4	10mg	16	16
2015.8.20	♀	KX32/DMD_Ex23_48.Final.8.5mg/μl	4	4	16	4	10mg	16	16
DMD	2015.8.20	♀	Callitriken Final 20mg/μl uRNA 10mg/μl	2	2	16	2	10mg	16
	2015.8.20	♀	DMD_Ex23-F3-REV-uRNA, DMD_Ex23-F4-REV-uRNA, uRNA 10mg/μl	2	2	16	2	10mg	16
	2016.1.20	♀	DMD_Ex23_10mg/μl	4	4	11	4	10mg	100% 分娩
	2016.1.20	♀	DMD_Ex23_10mg/μl	4	4	11	4	10mg	100% 分娩
2016.1.20	♀	uRNA 10mg/μl	2	2	16	2	10mg	16	
2016.1.20	♀	Callitriken 30mg/μl+20mg/μl uRNA 10mg/μl	2	2	16	2	10mg	16	
2016.1.20	♀	DMD_Ex23_10mg/μl	2	2	16	2	10mg	16	

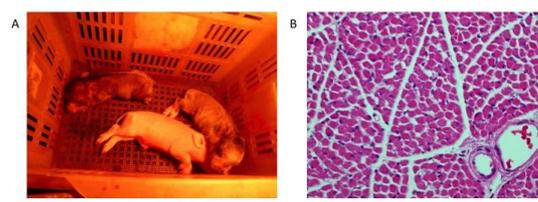


図3. 仮親ブタから出生したマイクロミニブタ。左上の個体は、重度の心臓奇形により、生後3日目に死亡(A)。死亡した仔ブタの大腿四頭筋の組織像(B)。

(4) マイクロミニブタ由来初代線維芽細胞におけるゲノム編集

pX459/DMD_Ex23 #3 のトランスフェクションでは、8 個の細胞コロニーが得られたが、細胞株としては、1 株のみ樹立された。一方、pX459/DMD_Ex23 #4 では、4 個の細胞コロニーが得られ、細胞株として3 株樹立された。

樹立した4 個の細胞株から各々のDNA を抽出し、エクソン 23 の塩基配列を解析したが、目的の遺伝子欠失等の変異は認められなかった。

(5) 今後の展望

本研究成果から、マイクロミニブタのゲノム編集方法として、操作が簡単な合成 sgRNA と Cas9 mRNA 或は合成 sgRNA と核移行シグナル付き Cas9 蛋白の受精卵細胞質へのインジェクションを行い、当日に仮親ブタへ 40 個以上の胚を移植する方法が有望であることが示された。本研究課題の実施期間終了後も、マイクロミニブタのゲノム編集による遺伝子改変技術の確立を目指し、静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターと共同研究を継続し、ゲノム編集によるジストロフィン遺伝子欠損デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルの作製を実施しているが、場合によっては、ゲノム編集部位を別のエクソンに変更する必要もあると思われる。さらに、DNA 修復機構に係る複数の遺伝子欠損による大腸がんモデルの作製も計画している。

また、静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターでは、遺伝子組換え細胞の核を未受精卵に移植する“体細胞クローン技術”を確立しているため、受精卵に対するゲノム編集と平行して、マイクロミニブタ由来初代線維芽細胞におけるゲノム編集技術の確立も目指している。

さらに、静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターでは、GFP 発現マイクロミニブタの開発に成功していることから、再生医療を目的とした幹細胞の安定的供給を目的に、新たに GFP 発現マイクロミニブタの骨髄、脂

肪組織、歯髄由来間葉系幹細胞の分離・培養法および各種細胞への分化誘導法の確立に着手している。本研究課題を基に、将来の疾患モデルマイクロミニブタを用いた幹細胞移植再生医療モデルシステムの構築が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特別講演
小野悦郎
「マイクロミニブタを用いた次世代幹細胞移植再生治療モデルシステムの構築」
第41回日本実験動物技術者協会北海道支部総会、2016.04.23, 札幌

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
小野 悦郎 (ONO ETSURO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：00160903
- (2) 研究分担者
柴田 昌利 (SHIBATA MASATOSHI)
静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・研究統括監
研究者番号：70501443
- (3) 連携研究者
裏出 良博 (URADE YOSHIHIRO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：10201360

- 河原崎 達雄 (KAWARASAKI TATSUO)
東海大学・農学部・教授
研究者番号：70500247

- 岩森 巨樹 (IWAMORI NAOKI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70647362