

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670153

研究課題名(和文)体系的・多遺伝子同時改変マウス作製法開発によるアドレノメデュリンRAMP機能解明

研究課題名(英文)Multiple-gene editing system using a non-inheritable maternal Cas9 in mice

研究代表者

桜井 敬之 (SAKURAI, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80317825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、我々はCRISPR/Cas9 システムによる多遺伝子同時改変マウス作製法の確立を目指して、単一胚盤胞遺伝子アッセイ系など周辺技術を構築し、全身にCas9を過剰発現するTgマウスの樹立(sCAT)と、その受精卵内の非遺伝性の母性Cas9の活用を試みた。その結果、受精卵内へ異なる9種のgRNAの同時注入だけでこれら全標的遺伝子座を同時編集できることを示した。併せてsCATマウスは細胞から器官・個体レベルまでCRISPR/Cas9によるゲノム編集研究のための有用なリソースとなることを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop new strategies to generate multiple-gene edited mice by using CRISPR/Cas9 system. First, we established a single blastocyst-based assay for rapidly determining whether CRISPR/Cas9-mediated genome editing worked in mouse preimplantation embryos. Then, we established transgenic (Tg) mice with systemic Cas9 overexpression (sCAT) to use non-inheritable maternal Cas9 (maCas9) protein derived from the zygotes. The maCas9 protein in zygotes derived from mating or in vitro fertilization of Tg/+ oocytes and +/+ sperm could successfully edit the target genome, and modified nine target genes simultaneously after injection with nine different gRNAs alone. Furthermore, we demonstrated the creation of "Cas9 transgene-free" gene-edited mice using non-Tg (+/+) zygotes carrying maCas9. These results suggest that sCAT zygotes have the potential to create multiple gene-modified mice both with and without the Cas9 transgene, enabling repeatable genome engineering.

研究分野：発生工学、発生生物学

 キーワード：疾患モデル動物 遺伝子改変マウス CRISPR Cas9 ゲノム編集 発生工学 アドレノメデュリン RAM  
P

## 1. 研究開始当初の背景

多機能アドレノメデュリン (AM) の細胞内シグナルは、受容体活性調節タンパク RAMP2 (R2) および RAMP3 (R3) で規定される。この理解が当該分野の重要課題である。我々は自前の R2 や R3 遺伝子欠損マウス解析で、R2 は心血管系発生と成体の恒常性機能維持に、R3 は自然免疫細胞群の応答調節に関与と使い分けを見出し、多活性の仕組みの一端を解明した。更なる詳細な機能解明や治療検討には、R2 や R3 遺伝子単独変異だけでなく、R2 R3 機能関連複数同時遺伝子改変マウスの作製と解析が有効と考えられたが、従来技術 (殆どが 1 操作、1 遺伝子座の 1 カ所改変規格) では作出困難であった。この課題に叶う芽が、2013 年初頭に現れた。それは、真正細菌・古細菌で獲得免疫の役割を担う CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) システムのゲノム編集能であり、細胞株のゲノム加工へ応用され、望む位置に数十塩基欠損を起こせる、その際、短 DNA 断片を導入できる、更に複数個所同時欠損能が提示された (Mali et al. Science2013)。本研究は、AM-RAMP 研究をめざましく進展させるため、このシステムでの遺伝子改変マウス作製への適応を検討することと多遺伝子同時加工の技術開発を目指した。

## 2. 研究の目的

(1) CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウスの作製法を検討。現在、数多くの報告が続いているが、本研究開始の当初、CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウス作製の報告はなかった。そこで初期胚で高翻訳する Cas9 mRNA の開発と、それを受精卵に注入することで遺伝子改変マウスの作製の可能性を検討する。

(2) 高率遺伝子改変条件検討の迅速化のため単一胚盤胞検定法を開発。体内で発生するマウスの遺伝子改変の有無の検定のために出産まで待つには時間も費用も掛かる。単一胚盤胞検定が安定して可能となれば、遺伝子注入受精卵を偽妊娠マウスに移植するまでも無く迅速に成績検討と、コストダウンが期待できる。同時に高活性 gRNA 配列選定を受精卵そのもので検定する系にできることや、遺伝子改変マウス作製の各条件の最適化検討への活用も期待できる。

(3) Cas9 全身常発現マウス系統; sCAT の樹立と体系的・多遺伝子同時改変マウス作製への応用。推定では同系統の受精卵の細胞質には母性 Cas9 (mRNA/タンパク質) が一過的に存在

しており、多遺伝子同時改変作製に好都合と考えた。併せて sCAT マウスで、肝臓への *in vivo* 遺伝子加工および初代培養細胞での *in vitro* 遺伝子改変の検討を実施する。

(4) (1)-(3) の技術により R2 R3 機能関連遺伝子群の同時改変マウスの作製と解析を実施。

## 3. 研究の方法

(1) hCas9 ORF と tracrRNA 部位は、Church グループ (Mali et al. Science2013) の hCas9 および GFPT-1 からそれぞれ該当部分を PCR クローニングで単離した。Cas9 に関しては、この hCas9 の 5' 側に SV40 核移行配列 (NLS) および FLAG 配列を加え、さらにこれを mRNA 合成用 T3-A95 ベクター (合成時に 5' Cap および A 鎖 95 塩基が自動付加; 桜井ら 2002 を改良) に組み込み込んだ (pNFCas9A95)。これを template にして T3 ポリメラーゼで CapCas9A95 mRNA を合成した。

gRNA に関しては、例えば R2 遺伝子の crRNA 配列は BLAST あるいは、CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) で選定後、OligoDNA で合成し、先の tracrRNA 部位とつなぎ合わせて pBSK ベクターの T7 プロモーター配列下に組み込み込んだ (pgRNA-R2)。これを template にして T7 RNA ポリメラーゼで R2 など各遺伝子配列切断用の gRNA を合成した。ノックイン用 DNA 断片は、相同配列を 5' 側と 3' 側に約 50bp から 1kb 付加して常法で準備した。これらを各濃度でマウス受精卵の前核/細胞質/両方に顕微注入する。

(2) 単一の胚盤胞での安定 PCR と遺伝子改変状態を同定のため PCR テンプレート調整法、primer 設定、増幅酵素、反応条件、および塩基配列変異同定法を検討する。加えて単一の胚盤胞で全ゲノム増幅反応 (WGA) も検討する。

(3) Cas9 全身常発現マウス系統の樹立には、通常のトランスジェニックマウス作製法に従った。受精卵注入 DNA は (1) の NFCas9 を pCAG (全身発現) ベクターにクローニングし、CAG-NFCas9pA 部位を切り出して使用した。樹立した Tg マウス (sCAT) は、遺伝学的、分子生物学的、生理学生化学的に解析した。sCAT による *in vivo* による遺伝子改変はハイドロダイナミクス法を用いて肝臓で検討した。In vitro による遺伝子改変は尾由来の初代繊維芽細胞で検討した。受精卵は、体系的・多遺伝子同時改変の検討に用いた。

## 4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウスの作製法の検定。本研究開始の当初、

CARISPR/Cas9 による遺伝子改変マウス作製の報告は無かったが、現在、数多くの報告が続いている。我々の結果もこれらと同様に、遺伝子改変マウスが高率で作製できることを示した。簡単に記すと、NFCas9 の発現と局在を pCAG-NFCas9pA の発現として NIH3T3 細胞で調べたところ、オリジナルの hCas9 に比べ 30% 以上、核への局在が向上した。そこで、NFCas9A95mRNA および R2 対象の gRNA

(R2-gRNA)、あるいは NFCas9A95mRNA、R2-gRNA および R2 KI DNA 断片をマウスの受精卵に顕微注入し、発生させた胚盤胞個々で遺伝子改変を検討したところ、前者は 70-100% で Indel 変異を R2 遺伝子に持っており、後者は 10-30% で R2 遺伝子に DNA 断片の KI が認められた。Indel 変異の内訳は、既報と同様に On-target での塩基欠損あるいは付加数は変化に富んでいた。想定される Off-target 領域の変異は、我々は認めなかった。

(2) 高率遺伝子改変条件検討の迅速化のため単一胚盤胞検定法。従来のトランスジェニックマウス作製法と同じステップで CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウス作製が高率でできることが示されたが、注入濃度、場所等々の最適化には、時間（仔マウス発生）および経費（飼育）が掛かる問題がある。そこで、単一胚盤胞レベルで安定して遺伝子変異が同定および配列決定が可能となれば、迅速（3-4 日以内）、コストダウン（胚移植マウス不要、飼育不要）に加え、直接胚において設定 gRNA の活性効率の検討、モザイク率検定を含め CRISPR/Cas9 による遺伝子改変操作の最適化および開発に役立つと考えた。この目的で検討した単一胚盤胞検定法は Sakurai et al., BMC Biotechnology 2014 に発表した。現在、我々は、事前に設定した CRISPR/Cas9 条件での遺伝子の変異状態（率）を同法にて把握し、必要ならば改良あるいは偽妊娠雌に移植してマウスを誕生させている。

なお単一胚盤胞検定法は、現在更に改良され、当初の nested PCR による 2 回の PCR を必要とせずに 1 回の PCR で希望配列の増幅が可能となっており、さらに簡便・迅速となっている。

(3) CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウス作製の実施。(1)(2)での検討事項および技術を用いて、様々な遺伝子改変マウスの作製に成功した。つまり、R2 遺伝子など、1 遺伝子座変異マウスは 5 種類。R1、R2 遺伝子など、同時 2 遺伝子座変異マウスは 2 種類。

R2 遺伝子などの KI マウスは 3 種類。R1、ET1 遺伝子など、同時 1 遺伝子座 Indel 変異

1 遺伝子座 KI マウスは 1 種類。1 遺伝子座へ Tag 配列導入マウスは 1 種類。1 遺伝子内の 1 アミノ酸のみ欠損マウスは 1 種類。である。現在、これらのマウスの表現型の解析が開始されている。

(4) Cas9 全身常発現マウス系統；sCAT の樹立と遺伝子改変能。全身発現性 Cas9 導入遺伝子を複数コピー保持し、そのため全身に Cas9 を過剰発現するトランスジェニックマウス（以後、sCAT マウスとする）の樹立に成功した。我々は先ず Cas9 過剰発現によるマウス発育、成体への影響を調べたが、発育障害・毒性は認められなかった。この知見は、今後の個体レベルにおける CRISPR/Cas9 の活用に重要な知見である。さらに内在の Cas9 が活性を保持しているか否かを、ハイドロダイナミクス法を用いて肝臓と、尾由来の初代繊維芽細胞で検討した。その結果、両者とも Cas9 による *in vivo* および *in vitro* ゲノム編集能が認められた。このことから、sCAT が細胞から器官・個体レベルまで CRISPR/Cas9 によるゲノム編集研究のためのバイオリソースとなることが明らかとなった。

(5) sCAT 受精卵を用いた多遺伝子同時改変。先ず sCAT 由来の受精卵内に存在する母性 Cas9 が高効率のゲノム編集能を保持していることを明らかとした。そこで、sCAT 母性 Cas9 が Cas9 導入遺伝子(Tg)の非存在下の胚で同時に誘発できる変異の数を調べるため、Tg/+ と +/+ の IVF で準備した受精卵に異なる 9 遺伝子対応の gRNA を顕微注入した。対照として +/+ と +/+ の IVF で準備した受精卵に、この 9 種類の gRNA と合成した NFCas9A95mRNA を顕微注入した。そしてこれら受精卵から発生した胚盤胞 (+/+型) を単一胚検定法に供した。その結果、実験群は対照群とともに、同時 9 種の indel 変異胚盤胞が得られた。そして同時 9 種実施での indel 変異は平均 7.3 遺伝子座であった。しかしながら実験群は対照群に比べ胚盤胞発生率が優れ (42-50% vs 5-19%) しかもモザイク変異率も低い傾向が認められた。つまり多遺伝子座変異マウス個体を安定して得るには、sCAT 由来の受精卵の活用が有用であることが明らかとなった。

さらに興味深いことは、母性 Cas9 を蓄積している非 Tg 型 (+/+) 受精卵を活用することで “Cas9 導入遺伝子-フリー” な遺伝子改変マウスを作製できることを証明した。sCAT マウス由来の受精卵は、Cas9 導入遺伝子を持つ多遺伝子改変マウスの作製(さらに繰り返しのゲノム加工が可能となる利点を保持)や、

Cas9 導入遺伝子フリーな多遺伝子改変マウス作製に有効である。現在、sCAT 母性 Cas9 による多遺伝子同時 KI 改変の条件を探っている。

#### <引用文献>

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 2013; 339: 823-826.

### 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 11 件)

(1)Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Mori C, Watanabe S, Tanaka M, Uetake R, Sato M, Shindo T. A non-inheritable maternal Cas9-based multiple-gene editing system in mice. Sci Rep (査読有り) 2016; 6: 20011. (10.1038/srep20011)

(2)Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Marumo T, Aiba A, Sakurai T, Shindo T, Fujita T. Rac1-Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. Hypertension. 2016; 67: 99-106. (査読有り) (10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06054)

(3)新藤隆行、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、田中愛、劉甜、小山晃英 アドレノメデュリン-RAMP2シグナル 細胞工学(査読無し); 2016; 35: 33-38.

(4) Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Generation of -1,3-Galactosyltransferase-Deficient Porcine Embryonic Fibroblasts by CRISPR/Cas9-Mediated Knock-in of a Small Mutated Sequence and a Targeted Toxin-Based Selection System. Reprod Domest Anim. (査読有り) 2015; 50: 872-880. (10.1111/rda.12565)

(5) Sato M, Koriyama M, Watanabe S, Ohtsuka M, Sakurai T, Inada E, Saitoh I, Nakamura S, Miyoshi K. Direct Injection of CRISPR/Cas9-Related mRNA into Cytoplasm of Parthenogenetically Activated Porcine Oocytes Causes Frequent Mosaicism for

Indel Mutations. Int J Mol Sci.(査読有り) 2015;16: 17831-17856. (10.3390/ijms160817838)

(6) Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. Biotechnol J. (査読有り) 2015; 10: 143-153. (10.1002/biot.201400283)

(7) Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T. Adrenomedullin-RAMP2 System in Vascular Endothelial Cells. J Atheroscler Thromb. (査読有り) 2015; 22: 647-653. (10.5551/jat.29967)

(8) 新藤優佳、桜井敬之、神吉昭子、河手久香、小山晃英、吉沢隆浩、新藤隆行. アドレノメデュリン-RAMP2系の病態生理学的意義 お茶の水医学雑誌 (査読無し) 2015; 63: 331-338.

(9) Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. BMC Biotechnology (査読有り) 2014; 14: 69. (10.1186/1472-6750-14-69)

(10) Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, Nishi Y, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. Xenotransplantation (査読有り) 2014; 21: 291-300. (10.1111/xen.12089)

(11) Watanabe S, Haraguchi S, Nakamura S, Sakurai T, Mugikura S-I, Kajiwar K, Kimura M, Sato M. Novel Cancer Vaccination System Based on Human Endo- -N-Acetyl Glucosaminidase Gene Delivery. J Glycobiol. (査読有り) 2014; 3: 106. (10.4172/2168-958X.1000106)

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) 神吉昭子、桜井敬之、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、平林一貴、大和慎治、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2システムは、白色および褐色脂肪の脂質代謝と分化を制御する 第19回日本心血管内分泌代謝学会 2015年12月10日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

(2) Yuichi Toriyama, Yasuhiro Ilesato, Akira Imai, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Yuka Ichikawa-Shindo, Hisaka Kawate, Akihiro Yamauchi, Kyoko Igarashi, Megumu Tanaka, Tian Liu, Xian Xian, Liuyu Zhai, Shinji Owa Toshinori Murata, Takayuki Shindo Pathophysiological Function of Endogenous Calcitonin Gene-related Peptide in Ocular Vascular Diseases 第79回日本循環器学会 2015年04月24日 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

(3) 佐藤正宏、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、稲田絵美、齋藤一誠、渡部聡 zygote injectionに依らない生殖細胞、胚を標的とした遺伝子導入によるCRISPR/Cas9 genome editingの可能性. 第38回日本分子生物学会 2015年12月01日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

(4) 神吉昭子、桜井敬之、河手久香、新藤優佳、山内啓弘、五十嵐恭子、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、Liuyu Zhai、平林一貴、大和慎治、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2システムによる白色脂肪と褐色脂肪の脂質代謝と分化制御 第36回日本肥満学会 2015年10月02日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

(5) Akira Imai, Yuichi Toriyama, Yasuhiro Ilesato, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Yuka Ichikawa-Shindo, Hisaka Kawate, Takayuki Shindo, Toshinori Murata Adrenomedullin reduces VEGF-induced retinal vascular hyperpermeability ARVO 2015 Annual Meeting 2015年05月03日 Colorado Convention Center (Colorado, USA)

(6) 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、山内啓弘、五十嵐恭子、鳥山佑一、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、Liuyu Zhai、大和慎治、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2

システムによる白色脂肪と褐色脂肪の脂質、エネルギー代謝制御 第88回日本内分泌学会 2015年04月23日 ホテルニューオオタニ東京 (東京都千代田区)

(7) 今井章、鳥山佑一、家里康弘、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行、村田敏規 網膜血管透過性亢進に対するアドレノメデュリンの抑制作用 第119回日本眼科学会総会 2015年04月16日 ロイトン札幌 (北海道札幌市)

(8) 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、山内啓弘、五十嵐恭子、鳥山佑一、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、大和慎治、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2システムは、白色脂肪 褐色脂肪間の脂質、エネルギー代謝を制御する 第44回日本心臓血管動物質学会 2015年02月06日 高松センタービル (香川県高松市)

(9) 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、平林一貴、大和慎治、戴昆、崔南奇、劉騰、五十嵐恭子、山内啓弘、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2システムは、褐色脂肪細胞の細胞分化とエネルギー代謝を制御する 第45回日本心臓血管動物質学会 2016年02月05日 阿波観光ホテル (徳島県徳島市)

(10) Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. A combination of targeted toxin technology and piggyback-mediated gene transfer system enables efficient drug-free isolation of stable transfections in non-human mammalian cells. 第37回日本分子生物学会 2014年11月25日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(11) 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、大和慎治、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2システムは、白色脂肪 褐色脂肪間の脂質、エネルギー代謝バランスを制御する 第18回日本心血管内分泌代謝学会 2014年11月21日 横浜市開港記念館 (神奈川県横浜市)

(12) Watanabe S, Sakurai T, Nakamura S, Kajiwara K, Kimura M, Sato M. The combination of endo-beta-galactosidase C gene and targeted toxin technology can be used as a powerful tool to select biallelic KO cells induced by CRISPR genome editing

system. 第37回日本分子生物学会 2014年11月25日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(13) 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、山内啓弘、五十嵐恭子、鳥山佑一、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、大和慎治、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2システムによる白色脂肪と褐色脂肪組織における脂質代謝制御 第35回日本肥満学会 2014年10月24日 シーガイア (宮崎県宮崎市)

(14) 神吉昭子、桜井敬之、河手久香、新藤優佳、植竹龍一、山内啓弘、五十嵐恭子、鳥山佑一、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2システムによる脂質、エネルギー代謝調節 第87回日本内分泌学会 2014年04月24日 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

(15) Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Uetake R, Yamauchi A, Igarashi K, Toriyama Y, Tanaka M, Imai A, Liu T, Xian X, Shindo T. The 18th International Vascular Biology Meeting 2014年04月14日 京都

〔その他〕

ホームページ等

信州大学大学院医学系研究科循環病態学教室

<http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/>

信州大学大学院医学系博士課程 疾患予防医学系専攻 循環病態学

<http://www.shinshu-u.ac.jp/graduate/medicine/doctoral/m-science/saisei.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

桜井 敬之 (SAKURAI, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80317825

### (2)研究分担者

新藤 隆行 (SHINDO, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90345215