

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830131

研究課題名(和文)ゲノム編集を駆使してレアバリアントの機能をin vivoで解析する

研究課題名(英文)Translating human genetics into mouse with genome editing

## 研究代表者

相田 知海(Aida, Tomomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50540481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：疾患ゲノム解析から膨大な稀なヒト変異が同定されたが、大半は機能不明である。これらの機能解析にはヒト変異のノックインマウスが有用だが、作製は容易ではなかった。本研究で開発された独自の超高効率ゲノム編集技術により、ノックインマウス作製の飛躍的な効率化・簡便化・低コスト化が実現し、世界標準法の1つになりつつある。計画の全てのノックインマウスが作出され、ヒト変異が緑内障を引き起こす機構の一旦が個体レベルで明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in next generation sequencing technologies have revealed the landscape of human genetic diversity, which is comprised of millions of rare variants associated with health and disease. One possible approach to address the biological function of rare variants, as well as determining whether they are causal for the human phenotype of interest, is the use of precisely modified knockin mouse models carrying such human rare variants. We developed highly efficient, ultra-rapid, and cost-effective genome editing technologies for knockin mouse production. We generated a series of knockin mice carrying rare variants discovered from glaucoma patients. We found the pathogenic mechanism of these rare variant to glaucoma-like abnormalities in mice. Our results provide an useful approach to examining in vivo functional significance of rare variants.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ノックインマウス CRISPR TALEN ゲノム編集 疾患ゲノム レアバリアント 疾患モデル

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム解析技術の発展によりヒトゲノムの膨大な多様性が明らかにされつつある。高速シーケンシング技術は、患者一人一人で異なる膨大な数の稀な変異(レアバリエント)の存在を明らかにした。しかし、1つのレアバリエントが一人の患者にしか存在しない事も珍しくなく、また大半のレアバリエントはミスセンス・サイレント変異等で、機能への影響が直接的には推定し難い(Veltman & Brunner, Nat. Rev. Genet. 2012)。従って、レアバリエントの機能解析とその方法論が必要である。

(2) これらの機能解析には、ヒトのレアバリエントを正確に挿入したノックインマウスが強力なツールとなる。実際にヒト変異ノックインマウスを用いた、細胞では解析できない、個体レベルでの機能解明が報告されている(Sur et al., Science 2012; Kamberov et al., Cell 2013)。

(3) 一方、ノックインマウスの作製は、少なくとも1年以上の長期間、多額の費用(外注では500万円以上)、ターゲティングベクターの構築・ES細胞での相同組換え・キメラマウスの作製等の煩雑かつ多段階の操作が必須で、容易でない。

(4) ゲノム編集技術(TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nuclease や CRISPR/Cas: CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR-associated)の登場はこの状況を一変させた。どのような生物のどのようなゲノム配列であろうとも、任意の部分を自在に改変する事が可能になったのである。これは遺伝子を欠損させるノックアウトには極めて有効であるが、任意の遺伝子を挿入するノックインは極めて困難であった。ヒトのレアバリエントの機能を個体で解析するためには、これらのノックインマウスを、高効率に、迅速に、安価に作出する技術革新が必要であった。

(5) 緑内障は40歳以上の5%が罹患する失明原因第1位の遺伝性神経変性疾患であるが、その原因遺伝子は一部の例を除きほとんど不明である。数少ない例が緑内障家系の解析から同定されたオプチニューリン遺伝子のE50Kミスセンス変異であるが(Rezaie et al., Science 2002)、発見から10年以上経った今日でもその機能や病態への寄与は未だ明らかでない。我々は緑内障患者のゲノム解析により、種々の緑内障レアバリエントを同定して来た。しかしこれらの個体レベルでの生物学的意義、また緑内障発症における寄与は不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、ヒトのレアバリエントの機能を個体で解析するための、ヒトレアバリエントノックインマウスを、高効率に、迅速に、安価に作出する技術を開発する。この技術を用いて以下の点を明らかにして行く。

(2) 緑内障患者から同定された5つのレアバリエントをモデルとして、これらのノックインマウスを作製する。

(3) 作成したノックインマウスの網膜を用いて遺伝子発現や蛋白質局在・機能を評価する。病理学的・生理学的に緑内障様病態を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 自然変異の導入で高活性化したPlatinum TALENを用いて、各レアバリエントに対応する高活性TALENを作製する。TALEN mRNAを合成後、活性評価を指標に適切な濃度で、野生型マウス受精卵にインジェクションする。同時に、レアバリエント導入のドナーとなるオリゴDNAもインジェクションしてノックインマウスを作出する。産まれたマウスをジェノタイプ、ノックインマウスを同定、野生型と交配して増やす。

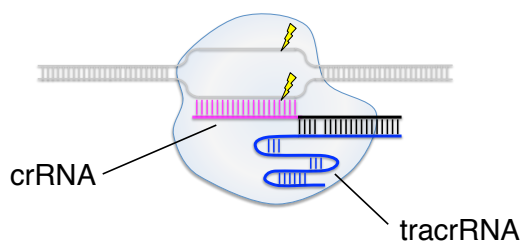
(2) 種々のCRISPR/Casシステムの検討を行う。Cas9(mRNA、タンパク質)、ガイドRNA(single guide RNA、及びcrispRNA(crRNA)とtrans-activating crispRNA(tracrRNA))が対象である。各レアバリエントに対応するガイドRNAを作製する。ガイドRNAの活性をin vitroで評価する。Cas9とガイドRNAの最適な組み合わせを野生型マウス受精卵へのインジェクションにより検討する。これらの最適化の後、レアバリエント導入のドナーとなるオリゴDNAまたはターゲティングベクターと一緒にCRISPRを野生型マウス受精卵へインジェクションしてノックインマウスを作出する。産まれたマウスをジェノタイプ、ノックインマウスを同定、野生型と交配して増やす。

(3) 作成したノックインマウスの網膜を用いて遺伝子発現や蛋白質局在・機能を評価する。病理学的・生理学的に緑内障様病態を解析する。第0世代のノックインマウスと野生型マウスを交配後、第1世代のヘテロノックインマウスを得る。次にこれらをかけ合わせ、第2世代のホモノックインマウスを得る。解析にはホモノックインマウス各系統と同腹の野生型マウスを用いる。網膜からmRNAを抽出し、リアルタイムPCRにより、各遺伝子のmRNAの発現量を計測する。網膜から各遺伝子の蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティングにより、蛋白質量を計測する。眼球切片と各種の細胞種マーカー免疫染

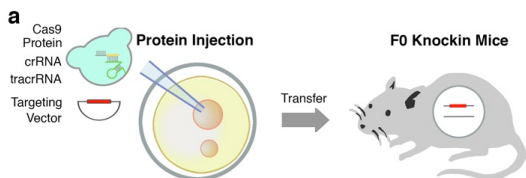
色により網膜内分布及び細胞内分布を野生型とノックインマウスで比較する。眼球のパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン-エオジン染色を行う。網膜神経節細胞（網膜神経節細胞層の細胞数）を、網膜全長に渡り計測する。網膜を水平に切り広げたフラットホルマウント標本を作製し、網膜神経節細胞の特異的マーカー抗体で染色する。蛍光顕微鏡観察により、網膜神経節細胞を定量する。

#### 4. 研究成果

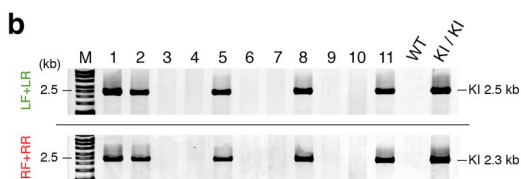
(1) Cas9 タンパク質と化学合成した 2 つのガイド RNA (crRNA と tracrRNA) を組み合わせたクローニングフリー CRISPR/Cas システムを開発した (下記図)。



本技術により従来煩雑であった CRISPR/Cas システムの調製が、一切ウェット実験を必要とせずウェブオーダーのみで可能になり、極めて簡便化された。また作製プロセスが不要になった事により、大幅な低コスト化が実現された。すなわちウェブオーダーのみで、届いた CRISPR/Cas を野生型マウス受精卵にインジェクションするだけで、ノックインマウス作製が可能になったのである。(下記図)



さらに最も重要な事は、従来用いられてきた CRISPR/Cas システムに比較して、クローニングフリー CRISPR/Cas システムは、ノックイン効率を飛躍的に高める事を可能にした (下記図)。



(2) 緑内障患者から同定された 5 つのレアバリエントについて、高活性の Platinum TALEN システムクローニングフリー CRISPR/Cas システムを用いて、これら

のノックインマウスの高効率な作製に成功した。作製したノックインマウスは野生型と交配して、次世代、次々世代を作出、解析に用いた。

(3) 上記の各ノックインマウスの網膜を解析に用いた。遺伝子発現や蛋白質局在等の基礎的解析、及び病理学的 (特に緑内障様病態) の解析を行った。ヒト患者におけるこれらのレアバリエントと緑内障との関連にも関わらず、あるレアバリエントのノックインマウスは緑内障様の異常を示し、また別のレアバリエントのノックインマウスでは異常は見られなかった。緑内障様の異常を示したレアバリエントのノックインマウスをさらに解析したところ、非常に興味深い疾患発症の分子機構が明らかになった。このレアバリエントが遺伝子機能に与える影響はそれほど大きくなかったものの、レアバリエント自身が mRNA のスプライシングを変化させる事により、遺伝子機能に重篤な変化をもたらす事が明らかになった。これは従来の培養細胞での解析では見過ごされて来た点であり、ノックインマウスの作出により初めて明らかになった。以上のように、本研究のアプローチは、ヒトのレアバリエントの機能、特に個体レベルでの疾患発症メカニズム、を解析するために有用である事が示された。

#### 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 1 件)

1. Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, Tanaka KF, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka K. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol.* 査読有り, 16:87 (2015). DOI: 10.1186/s13059-015-0653-x. 査読あり。

[学会発表] (計 11 件)

1. Aida T. Gene cassette knock-in in mice with cloning-free CRISPR/Cas system. 13th Transgenic Technology Meeting (International Society for Transgenic Technologies). 2016年3月23日, プラハ (チェコ). **招待講演**
2. 相田知海. クローニングフリー CRISPR/Cas システム. 日本薬理学会, 2016年3月11日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市). **招待講演**
3. Aida T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka K. Genome editing in mice with cloning-free CRISPR/Cas system. *Transposon and Genome Engineering 2015*. 2015年11月19日, 奈良春日野

国際フォーラム 薨〜I・RA・KA〜 (奈良県・奈良市) .

4. Aida T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka K. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting - Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution. 2015年9月24日, コールドスプリングハーバー (米国) .
5. Aida T. Cloning-free genome editing in mice. 第5回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム. 2015年3月5日, 新潟大学 (新潟県・新潟市)
6. Aida T, Chiyo K, Sakuma T, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Tanaka KF, Yamamoto T, Tanaka K. CRISPR/Cas mediated highly efficient generation of knockin mice carrying a gene cassette. Keystone Symposia - Precision Genome Engineering and Synthetic Biology. 2015年1月15日, モンタナ (米国) .
7. 相田知海, 張景閔, 佐久間哲史, 宇佐美貴子, 石久保春美, 今橋里沙, 田中謙二, 山本卓, 田中光一. 機能カセットノックインマウスのための CRISPR/Cas を用いた in vivo ゲノム編集. 日本分子生物学会年会. 2014年11月25日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) .
8. 今橋里沙, 相田知海, 柳澤美智子, 佐久間哲史, 宇佐美貴子, 石久保春美, 山本卓, 田中光一. グルタミン酸トランスポーターGLAST のヒトレアバリエントは網膜神経節細胞の脆弱性に in vivo で寄与する. 日本分子生物学会年会. 2014年11月26日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) .
9. 相田知海, 張景閔, 佐久間哲史, 宇佐美貴子, 石久保春美, 今橋里沙, 田中謙二, 山本卓, 田中光一. CRISPR/Cas によるノックインマウス作製の効率化. 第4回ゲノム編集研究会. 2014年10月6日, 広島国際会議場 (広島県・広島市) .
10. 今橋里沙, 相田知海, 柳澤美智子, 佐久間哲史, 宇佐美貴子, 石久保春美, 山本卓, 田中光一. Platinum TALEN による高速・高効率なノックインマウス作製とヒトゲノム多様性の個体レベルでの機能解釈. 第4回ゲノム編集研究会. 2014年10月6日, 広島国際会議場 (広島県・広島市) .
11. Aida T. In vivo genome editing for knockin mice production. Therapeutics Discovery Symposia USA 2014. 2014年5月6日, ボストン (米国) . **招待講演**

[図書] (計 4 件)

1. 相田知海, 田中光一. 日本生化学会.

CRISPR/Cas でマウスゲノムを自在に操る. 2016年. 生化学 88:119-123.

2. 相田知海. 羊土社. カタログを調べて、直して、証明. 2015年. 実験医学 33:918-919.
3. Aida T. Springer Publishing Company. Genome editing in mice using TALENs. Targeted Genome Editing Using Site-specific Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System. 2014. 167-182.
4. 相田知海, 宇佐美貴子, 石久保春美, 田中光一. 羊土社. マウスにおける TALEN を用いた遺伝子改変. 最強のステップ UP シリーズ 今すぐ始めるゲノム編集 TALEN&CRISPR/Cas9 の必須知識と実験プロトコル. 2014年. 実験医学別冊 83-94 (2014).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 簡便で高効率の遺伝子改変非ヒト哺乳動物の作製方法

発明者: 田中光一, 相田知海, 和田悠作

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学  
株式会社ファスマック

種類: 特許

番号: 特願 2014-232963 号

出願年月日: 平成 26 年 11 月 17 日

国内外の別: 国内及び PCT 出願

[その他]

ホームページ等

東京医科歯科大学

<http://www.tmd.ac.jp/mri/aud/>

東京医科歯科大学プレスリリース

<http://www.tmd.ac.jp/press-release/20150429/index.html>

Eureka! Alert プレスリリース

[http://www.eurekaalert.org/pub\\_releases/2015-04/tmad-hec043015.php](http://www.eurekaalert.org/pub_releases/2015-04/tmad-hec043015.php)

NHK 全国ニュース

<http://www9.nhk.or.jp/kabun-blog/200/215975.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相田 知海 (AIDA, Tomomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号: 50540481