

《様式B》

研究テーマ	「 ゲノム編集技術による次世代の疾患モデル創出 」		
研究責任者	所属機関名	名古屋市立大学大学院医学研究科	
	官職又は役職	教授	
	氏名	大石 久史	メールアドレス hoishi@med.nagoya-cu.ac.jp
共同研究者	所属機関名	名古屋大学動物実験支援センター	
	官職又は役職	教授	
	氏名	鬼頭 靖司	
共同研究者	所属機関名	日本エスエルシー株式会社	
	官職又は役職	代表取締役社長	
	氏名	高木 博隆	
共同研究者	所属機関名	名古屋市立大学 URA オフィス	
	官職又は役職	特任教授	
	氏名	服部 浩二	

(平成 29 年度募集) 第 30 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

平成 31 年 4 月から令和 2 年 3 月の 2 年間で、【1】自己免疫疾患を自然発症する MRL/lpr マウスのゲノム情報の詳細を明らかにし、その遺伝情報に基づいて【2】安定的マウス胚操作手技の確立と【3】ゲノム編集用ベクター、guide RNA の作製と改良へと発展させた。MRL/lpr マウスは、*Usp21*、*Cd72*、*Cd59* 遺伝子に変異を有しており、*Usp21* と *Cd72* について loss of function、*Cd59* は発現量の低下を来たすこと確認した。また、プロゲステロンレセプターの下流の標的遺伝子と考えられる *Tcf23* 転写因子に注目し、この遺伝子欠損マウスを作製したところ、子宮内膜の脱落膜化刺激に伴う脱落膜化が遅延しており、妊娠出産と自己免疫疾患の関わりに、なんらかの交差がある可能性が示唆された。さらに、これらの変異と疾患への関わりをマウス個体で再構築するために、安定的なマウス胚操作手技の確立を目的として、関節リウマチモデルである DBA/1 トランスジェニックマウス 3 系統の体外受精を行った。DBA/1 系統はこれまで胚操作結果が報告されておらず、従来 of 妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) に代わり hyperOVA (九動株式会社) を用いた過排卵を行って採卵、体外受精、胚移植を

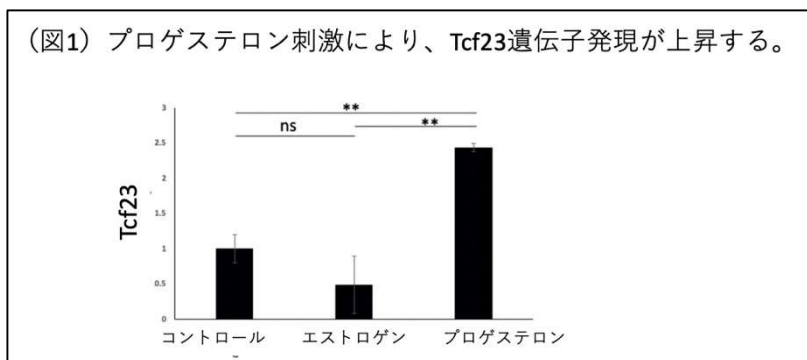
行ったところ、いずれも十分な個体数が得られ、世界で初めて DBA/1 系統のマウスの胚操作技術の確立に成功し、今後 MRL マウスを含むさまざまなマウス系統によらない胚操作手技への応用可能性を得た。またゲノム編集用ベクター、guide RNA の改良について、従来の Cas9 発現ベクターに代わり Cas9 タンパクを、RNA について、in vitro トランスクリプションに代わり化学合成した guide RNA を用いることで、効率よく遺伝子欠損マウスの作製することに成功した。この簡便かつ安定的に遺伝子改変マウスの作製が可能になったことは、遺伝子機能の解析が、従来の細胞レベルの解析が個体レベルにシフトしたことを意味し、次世代の疾患モデル作製を加速化したと言える。現在、新生児・小児医学分野と共同で、次世代シーケンサーで得られた患者情報を、素早くマウスで再現し、既存の治療薬を動物でスクリーニングする次世代疾患モデルの作製に取り掛かっており、実際、3C 症候群家系から得られた遺伝子変異の情報をマウスで一部再現した。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4で、5 ページ以内)

【1】自己免疫疾患を自然発症する MRL/lpr マウスのゲノム情報の詳細

次世代シーケンサーを用いて得られた MRL/lpr マウスゲノム情報について、エクソーム解析を行い、多型の認められた *Usp21*、*Cd72*、*Cd59* 遺伝子の詳細な解析を行った。リンパ球由来の mRNA および DNA を用いてサンガーシーケンスを行ったところ、3 遺伝子いずれも C57BL/6 マウスに対して変異を認め、*Usp21* と *Cd72* について loss of function、*Cd59* は発現量が低下していた。一方で、MRL/lpr マウスやヒトの自己免疫疾患は、メス (女性) の発症率が高率である。そこで、女性ホルモンの疾患発症へ関与についてより詳細な分子メカニズムを明らかにするために、プロゲステロンレセプターの下流の標的遺伝子と考えられる *Tcf23* 転写因子に注目し、この遺伝子欠損マウスを作製した。マウス子宮内膜細胞に対して、プロゲステロン刺激を行うと *Tcf23* の発現は優位に上昇し (図 1)、またその遺伝子欠損マウスは、2 ヶ月齢までに明らかな表現系を認めないものの、子宮内膜の脱落膜化刺激に伴う脱落膜化が遅延しており、細胞形態の異常、IGFBP1 等の脱落膜化マーカーの発現が減弱していた。さらに若年齢におけるホモ欠損マウスは、明らかな妊胞性、分娩に異常を認めないものの、6 ヶ月齢の妊娠マウスでは、分娩が遅延しており、胎仔が高率に子宮内死亡を引き起こすことを明らかにした。今後、*Tcf23* 遺伝子欠損を MRL/lpr マウスに導入することで、種々の自己免疫疾患への関与を直接に明らかにする予定である。

(図1) プロゲステロン刺激により、*Tcf23*遺伝子発現が上昇する。



【2】安定的マウス胚操作手技の確立

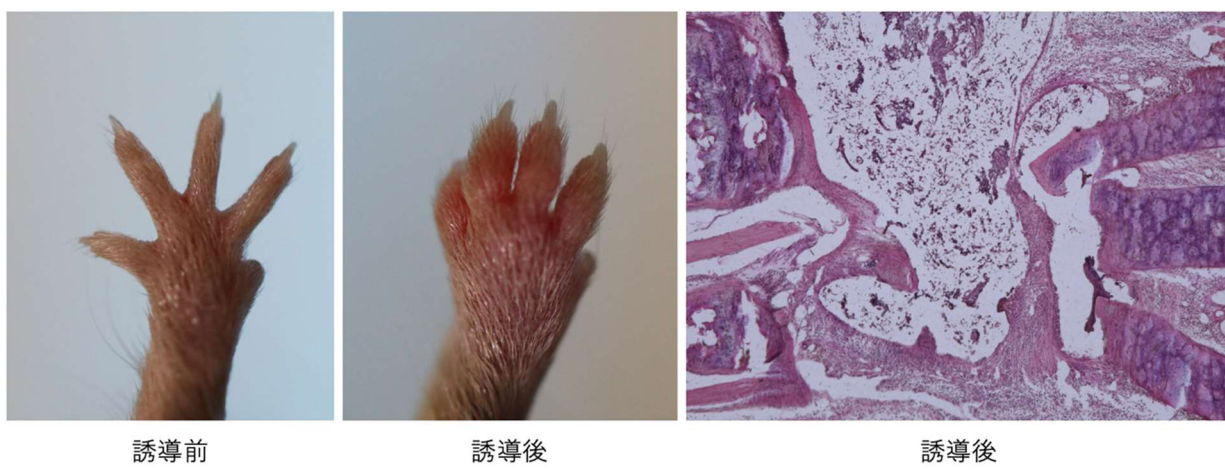
ゲノム編集の際の電氣的条件と、移植する胚について、至適条件の検討を行い安定的な遺伝子改変動物を得ることに成功した。すなわち、1 細胞期にエレクトロポレーションした胚は、そのほとんどが 2 細胞に分裂するものの 5-10% の割合で移植に適さない不良胚が生じること、また一方の子宮に 15 個の 2 細胞を移植することで、おおよそ

10-20%の仔が得られることが明らかとなった。一方で、従来、遺伝子改変が困難とされてきた DBA/1 を遺伝的背景とするトランスジェニックマウスについて、hyperOVA を用いた過排卵誘導に成功し、体外受精とその後の個体化に成功した（図2）。通常の C57BL/6 マウスに比較して移植卵数に対する産仔数はやや劣るものの、それぞれ 14.7%、14.8%、20.8%の出生率が得られ、今後 DBA/1 マウスを直接に遺伝子改変行う基盤が確立できた。DBA/1 マウス系統は、コラーゲン誘導性関節炎に高感受性で、関節リウマチ研究に重要なモデルである。体外受精後の個体に対して、コラーゲン誘導して関節炎の発症の有無を検討したところ、複数の指関節で肉眼的関節を発症し、関節炎モデルとして有効に利用できることを明らかにした（図3）。組織学的にも滑膜肥厚およびパニヌス形成を認めており、安定的マウス胚操作手技が確立できた。現在、本成果については、論文投稿準備を進めており、実験動物関連の専門誌に発表予定である。

(図2) DBA/1トランスジェニックマウスの体外受精結果

メス系統名	メス数	オス系統名	オス数	正常卵数	未受精卵数	総採卵数	受精率	平均採卵数	卵無匹数 (/全匹数)	移植卵数	産仔数	出産率	離乳匹数	離乳率
D1BC	13	D1BC	3	728	143	871	83.6	67.0	0	150	22	14.7	15	68.2
D1CC	7	D1CC	2	157	295	452	34.7	64.6	0	135	20	14.8	15	75.0
D1CC x D1BC	11	D1CC x D1BC	3	286	182	468	61.1	42.5	1	130	27	20.8	10	37.0

(図3) 体外受精後DBA/1トランスジェニックマウスの関節炎

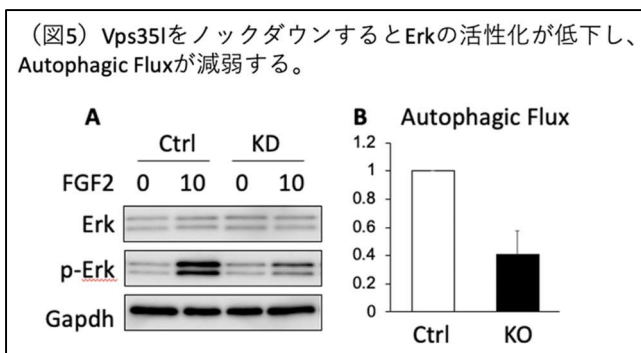


【3】ゲノム編集用ベクター、RNA の作製と改良

従来の Cas9 発現ベクターに代わり Cas9 タンパクを、RNA について、in vitro トランスクリプションに代わり化学合成した guide RNA を用いて、メラニン合成経路の最初のステップに関与するチロシナーゼ遺伝子欠損マウスの作製を試みたところ、誕生したマ

ウス9匹中、6匹がホモ欠損による白色毛、2匹がモザイク、1匹が変異を有さず、高効率に遺伝子改変マウスを作製することに成功した（図4）。

この成果を発展させ新規のモデル動物を作成すべく、小児先天性疾患の1つである3C症候群の家系解析から同定した *Vps35l* 遺伝子のミスセンス変異について、患者由来の変異をマウスに試みた。まず、*Vps35l* 遺伝子欠損マウスを作製したところ、このヘテロマウスでは、明らかな異常を認めないもののホモ欠損マウスは出生せず、子宮内死亡することを見出した。さらに、*Vps35l* ノックダウン細胞では、p-Erkの減少、Autophagic Fluxの低下を認めた（図5）。その後の解析でホモ欠損マウスの死亡時期は、胎生7.5日前後であることが明らかとなり、現在、その死因とp-ERKとの関わりについて解明を行っている（図6）。同様にヘテロマウスの詳細な表現系解析を追加してヒト症状（頭蓋顔面、小脳、心臓の異常）との関連について、マウスにおいて再現性が認められるか明らかにする。現時点では、ヒト3C症候群と同じ変異を導入したマウスは、ホモ欠損マウスと異なり、胎生10日を過ぎて子宮内死亡することが明らかとなり、この点、常染色体劣性遺伝形式を呈するヒト3C症候群とはやや異なるものの、齧歯類と哺乳類共に個体発生において、*Vps35l* 遺伝子変異が重要な役割を果たすことが明らかとなり、ヒト病態の一部を再現できた。



(図6) *Vps35l*ホモ欠損マウスは、胎生7.5日前後で死亡する。

Genotype	E7.5	E10.5	Postnatal
<i>Vps35l^{+/+}</i>	9	12	30
<i>Vps35l^{+/-}</i>	22	33	55
<i>Vps35l^{-/-}</i>	6	0	0
Total	37	45	85