

150. *in vivo* ゲノム編集効率評価系モデルマウス開発

三浦 浩美

東海大学 医学部 基礎医学系 分子生命科学

Key words : 遺伝子治療, CRISPR/Cas9, モデルマウス, *eGFP* トランスジェニックマウス

緒言

遺伝性疾患の治療法の一つに遺伝子治療がある。究極の遺伝子治療は疾患の原因変異そのものを修正することであり、その試みはいくつか報告されているものの、修復効率が極めて低い等の技術的な困難さが問題となっていた。従ってこれまでは、正常遺伝子発現ベクターを導入し、機能欠損遺伝子の働きを補う補充療法が主であった。しかし補充療法は、発現が一過性であるため定期的に投与しなければならない、ベクターがゲノムの不特定領域に挿入されることによる癌化の可能性等の問題点もある、などの点から、大半の遺伝子治療はまだ探索的なフェーズに留まっていた。

近年開発されたゲノム編集技術の一つである CRISPR 系は、標的ゲノム配列を自在に改変可能な技術として世界中の研究者に広く利用されてきている。CRISPR 系は、ゲノム改変効率が高く疾患の原因変異の正確な修復も可能であることから、上述した問題点を解決しうる遺伝子治療の新たなツールとして大きく注目されている¹⁾。既に動物モデルを用いた実験では、ジストロフィン異常症や遺伝性高チロシン血症など、いくつかの遺伝性疾患を対象とした成功例も報告されてきている^{2,3)}。従来法よりも効果的であることが明らかであるものの、他の遺伝性疾患を対象とした治療への応用には CRISPR 遺伝子改変効率の更なる改善が望まれている。

一方で、目的の核酸 (DNA/RNA) を如何に効率良く患部の細胞に届けるかに関する遺伝子デリバリー法や遺伝子導入法の研究も盛んに行われており、その効率改善が遺伝子治療成功の鍵の一つとなると考えられる。遺伝子導入法に関しては、物理的 (ハイドロダイナミクス法等)、化学的 (リポフェクション等)、生物学的 (ウイルス等) な様々な方法が開発・改良されているが、それぞれ一長一短があり、世界中で試行錯誤されている現状である⁴⁾。

遺伝子治療を目的として、遺伝子導入効率や CRISPR 遺伝子改変効率の改善を目指した研究が広く進められているものの、それらの結果として目的臓器・組織のどの程度の細胞で遺伝子が正確に修復されるのかについて、その遺伝子治療効率を *in vivo* で簡便に評価できるモデル系は国内外ともに開発されていなかった。そこで本研究では、遺伝子修復効率を蛍光で容易に確認可能なモデルマウス、すなわち、様々な遺伝子導入法やデリバリー法の比較検討や条件検討、CRISPR 系による遺伝子修復効率の各種条件検討に活用できる世界初のモデル動物の開発を目指した。

本研究では、遺伝子修復効率を蛍光で容易に確認可能なモデルマウスの開発と評価を行った (図 1)。そのために、まず *eGFP* トランスジェニック (Tg) マウスの *eGFP* 遺伝子の一部を破壊した ($\Delta eGFP$ Tg マウス作製)。次に、 $\Delta eGFP$ Tg マウスに CRISPR 系による遺伝子治療を (受精卵にて) 施し、*eGFP* 遺伝子が正確に修復されること、およびそれによる蛍光回復を確認することで、系が期待通りに働くことを確認した。また筋肉を対象とした遺伝子治療への応用を目指し、 $\Delta eGFP$ Tg マウスにエレクトロポレーション法を施して CRISPR 関連核酸を導入し、遺伝子修復の有無を蛍光発現を指標に評価した。

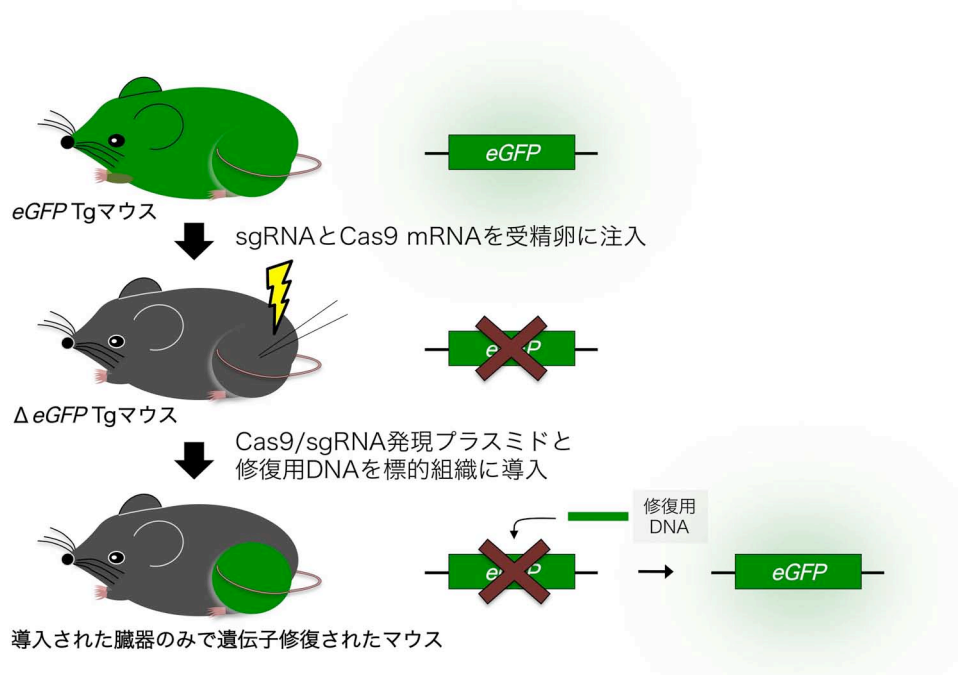


図1. 本研究の概念図
遺伝子治療評価系モデルマウスの開発とその評価。

方法

1. CRISPR系を用いた $\Delta eGFP$ Tg マウスの作製と系統樹立

まず、*eGFP* 遺伝子を標的とした sgRNA と Cas9 mRNA の合成を行った。次に、sgRNA と Cas9 mRNA の混合溶液を準備し、*eGFP* Tg マウス⁵⁾由来の受精卵 108 個に顕微注射した。注入卵を胚盤胞期まで培養後、仮親に移植して $\Delta eGFP$ Tg マウスの作出を試みた。得られた仔の耳片から DNA を抽出し、それを鋳型として PCR 増幅を行い、シーケンス解析を行うことで *eGFP* 遺伝子に変異が挿入されたか否かを確認した。*eGFP* 遺伝子領域内に変異を有するマウス ($\Delta eGFP$ Tg マウス)の一部を系統化するため、C57BL/6 マウスと交配して次世代への伝搬を確認した。更に得られたヘテロマウス同士を交配することにより、ホモマウスの作製、及び系統維持を試みた。

2. $\Delta eGFP$ Tg マウス受精卵を用いた修復の検討

次に、CRISPR/Cas9系による $\Delta eGFP$ 遺伝子の修復が可能であるかを検証する為、まずは樹立した $\Delta eGFP$ Tg マウス系統の $\Delta eGFP$ 遺伝子に特異的な sgRNA を設計し、*in vitro* 転写反応にて合成した。 $\Delta eGFP$ Tg マウス系統から得られた受精卵に、Cas9 mRNA と sgRNA、*eGFP* 遺伝子修復用 1 本鎖 DNA (ssODN) を含む溶液を顕微注射した。胚盤胞期まで発生させた後、蛍光観察を行い光回復しているか確認し、それら胚盤胞からゲノム DNA を抽出後、Nested PCR とその増幅産物のシーケンスにより遺伝子修復が正確に行われたか否かを確認した。

3. $\Delta eGFP$ Tg マウスを用いた CRISPR 遺伝子修復評価系の確立

本研究では、マウス大腿骨骨格筋における *in vivo* 遺伝子修復効率評価系の確立を目指した。そこで、まず大腿骨骨格筋への遺伝子導入条件を検討した。具体的には、ICR マウスへの *eGFP* 発現プラスミドの導入系を用いて、核酸溶液の注入方法、用いるプラスミド量、使用する電極、等の条件検討を行い、最適条件を見出すこととした。次に、見出した最適条件を用いて、 $\Delta eGFP$ Tg マウス成体の筋組織 (大腿骨付近) へ CRISPR/Cas9 関連核酸 (Cas9/sgRNA 発現プラスミドと ssODN) を直接注入してエレクトロポレーションを行うことにより、実際に筋肉で *eGFP* 遺伝子が修復されるか否かを蛍光により評価することとした。

結果および考察

1. CRISPR 系を用いた $\Delta eGFP$ Tg マウスの作製と系統樹立

全身で *eGFP* が強発現する *eGFP* Tg マウスから得た受精卵に CRISPR/Cas9 関連核酸を顕微注入した結果、得られた 6 個体全てが *eGFP* 蛍光を示さないこと (図 2A)、また脾臓細胞を用いた FACS 解析からも *eGFP* 蛍光が完全に消失していることが明らかになった (図 2B)。またそれらの *eGFP* 遺伝子のシーケンス解析から、*eGFP* 遺伝子内に 1 塩基から 18 塩基まで様々な変異を有することが分かった (図 2C)。次に、得られたマウスのうち 2 種類 (系統 1 [1 塩基欠損] と系統 3 [13 塩基欠損]) を系統化し、更にヘテロ接合体同士を交配することで、ホモ接合体マウスとして作製・維持することに成功した。

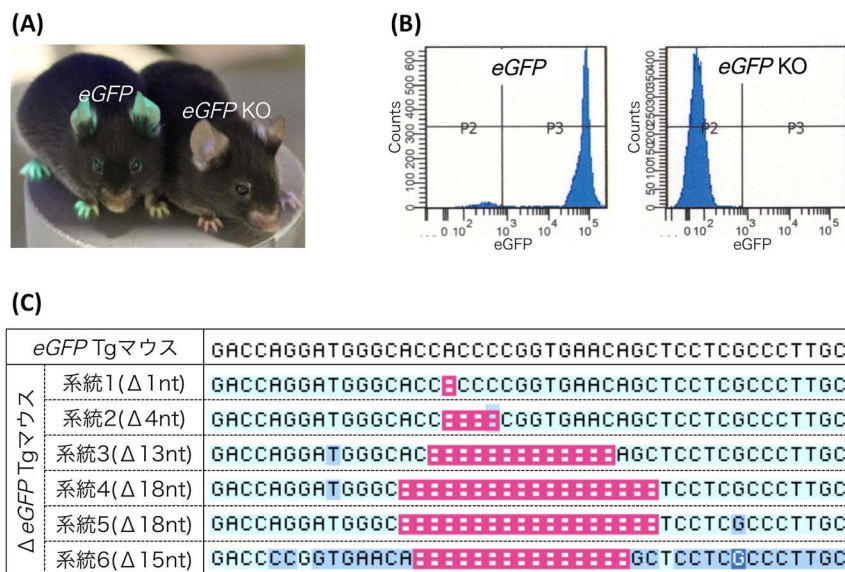


図 2. 作製した $\Delta eGFP$ Tg マウス

(A) ハンディー UV 下における *eGFP* Tg マウス (左) と $\Delta eGFP$ Tg (*eGFP* KO : 右) マウス : ハンディー UV (365 nm) 下における *eGFP* 蛍光消失の確認、(B) 脾臓細胞における *eGFP* 蛍光強度 : 横軸が *eGFP* 発現強度、縦軸が細胞数を示す。右 : *eGFP* Tg マウス、左 : $\Delta eGFP$ Tg マウス。(C) 得られた $\Delta eGFP$ Tg マウスの *eGFP* 遺伝子塩基配列。

2. $\Delta eGFP$ Tg マウス受精卵を用いた修復の検討

次に、CRISPR/Cas9 系による $\Delta eGFP$ 遺伝子の修復が可能であるか否かを、蛍光回復を指標に検証する為、樹立した $\Delta eGFP$ Tg マウス系統 (2 系統) から採取した受精卵に、CRISPR/Cas9 関連核酸 (Cas9 mRNA、 $\Delta eGFP$ に対する sgRNA、*eGFP* 遺伝子修復用 ssODN) 溶液の顕微注入を行った。胚盤胞期まで発生させた後、蛍光観察及びシーケンスにより遺伝子修復が正確に行われたか否かを確認した。その結果、実際に緑蛍光を示す胚が確認できたこと (図 3A)、また、これらの胚から回収した DNA の PCR とシーケンス解析から、実際に *eGFP* 遺伝子が修復されていることが明らかとなった (図 3B)。これにより、作製した $\Delta eGFP$ Tg マウス系統における *eGFP* 蛍光の回復を指標に遺伝子修復を評価できる可能性が示唆された。

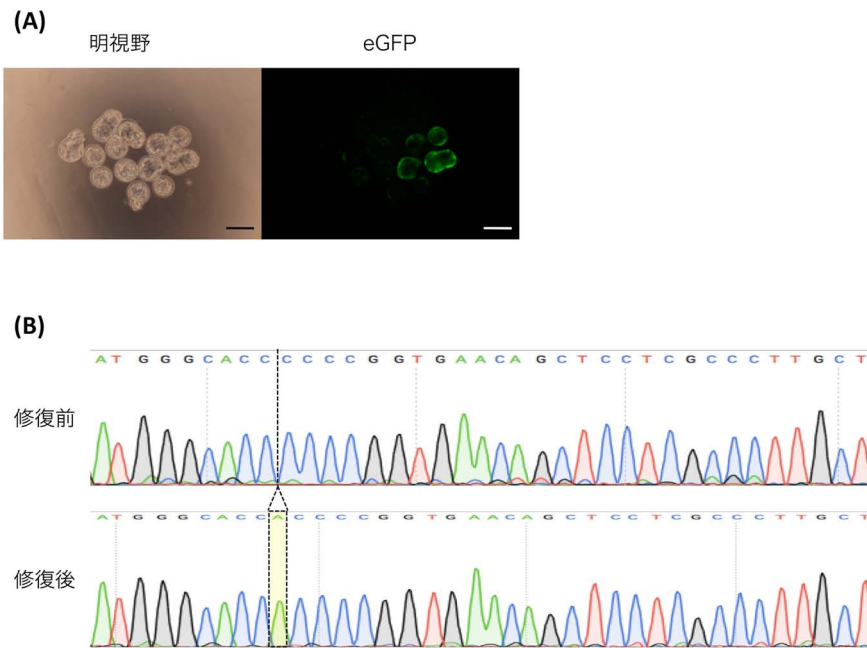


図3. 受精卵における eGFP 蛍光回復と遺伝子修復の確認

(A) CRISPR 関連核酸を注入した $\Delta eGFP$ Tg マウス由来受精卵における eGFP 蛍光。

Scale bar = 100 μ m (B) A の受精卵の塩基配列解析による $eGFP$ 遺伝子修復の確認。

3. $\Delta eGFP$ Tg マウスを用いた CRISPR 遺伝子修復評価系の確立

筋肉における *in vivo* 遺伝子修復評価系の確立を行うにあたり、まずは野生型マウスに $eGFP$ 発現プラスミドを導入する系を用いて遺伝子導入条件の検討を行った。その結果、ヒアルロニダーゼの投与 30 分後に、核酸溶液 (100 μ l) を筋肉用電極 (Nepagene、CUY568-4) により表皮から 1.5~3.5 mm の深さで注入し、エレクトロポレーションを行うことで比較的再現性良く筋肉で eGFP 蛍光を確認できることが分かった。そこで次に、 $\Delta eGFP$ Tg マウスの筋肉に CRISPR/Cas9 関連核酸を直接導入することで、筋肉において $eGFP$ 遺伝子が修復されるかを検討した。その結果、個体間で蛍光の確認できた範囲にばらつきがあるものの、全ての個体の筋肉において緑蛍光を確認することができた (図 4)。

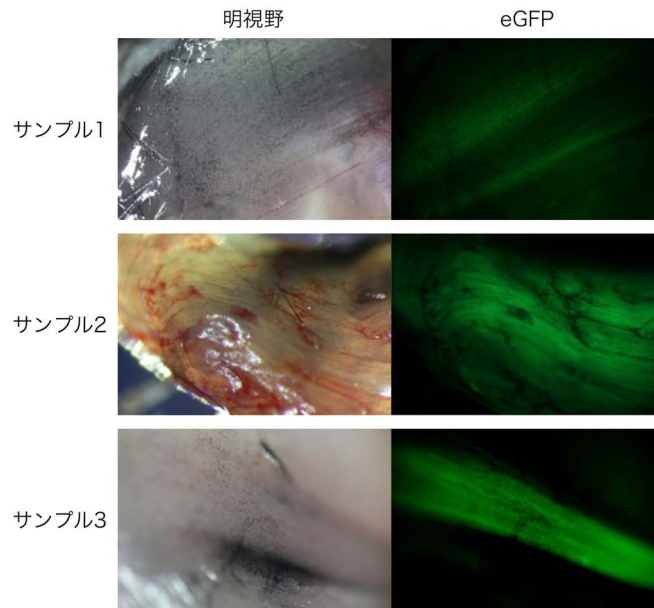


図4. $\Delta eGFP$ マウス筋肉における *eGFP* 遺伝子修復
eGFP 遺伝子修復を試みた $\Delta eGFP$ マウス筋肉における *eGFP* 蛍光。
 サンプル 1-3 は独立した個体である。

これにより、開発した $\Delta eGFP$ Tg マウス、及び一連のリソースが期待通りに働くことを確認することができ、遺伝子治療の評価系（様々な遺伝子導入法やデリバリー法の比較検討や条件検討、CRISPR 系による遺伝子修復効率の各種条件検討等）に使用できる可能性が示唆されたと言える。

文 献

- 1) Lombardo, A. and L. Naldini, Genome editing: a tool for research and therapy: targeted genome editing hits the clinic. *Nat Med*, 2014. 20(10): p. 1101-3. doi: 10.1038/nm.3721. PubMed PMID: 25295939.
- 2) Long, C., et al., Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 2014. 345(6201): p. 1184-8. doi: 10.1126/science.1254445. PubMed PMID: 25123483.
- 3) Yin, H., et al., Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014. 32(6): p. 551-3. doi: 10.1038/nbt.2884. PubMed PMID: 24681508.
- 4) Yin, H., et al., Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, 2014. 15(8): p. 541-55. doi: 10.1038/nrg3763. PubMed PMID: 25022906.
- 5) Ohtsuka, M., et al., Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(22): p. e198. doi: 10.1093/nar/gkq860. PubMed PMID: 20880997.