

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870077

研究課題名(和文)CRISPITT法によるオーダーメイド型免疫系ヒト化NOGマウスの開発

研究課題名(英文)Genetic humanized Mouse production by CRISPITT

研究代表者

水野 聖哉(MIZUNO, Seiya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10633141

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)：ゲノム編集技術は目的の変異をもつマウスを迅速かつ簡便に作製できる。特にCRISPR/Cas9システムは受精卵にsingle guide RNAとCas9を導入するだけで、目的遺伝子座に変異を導入することができるために、大きな注目を集めている。更に、single guide RNA、Cas9とともに切断部位近傍と相同な配列に間に導入したい遺伝子を配置したドナーDNAを導入するとノックインマウスが作製できる。このノックインマウスは、様々なヒト疾患の大変有用なモデル動物となり得る。本研究では、ノックインの導入効率を上げ、ヒト遺伝子を有する優れたモデルマウス等を作出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In the past, the mice carried targeted gene mutation was produced by gene-targeting method using with embryonic stem cells. This way is reliable but long time and big money were required. Genome editing technology are changing the way to produce the gene targeted mouse. This make it possible to produce the mice carried desired mutation just by embryo-microinjection. Especially, CRISPR/Cas9 is most powerful tool. We can make not only knock-out but also knock-in mouse. To produce knock-in mouse by embryo-based genome editing, single guide RNA, Cas9, and donor DNA were co-microinjected. For short tag (e.g. FLAG, HA, V5) knock-in, single strand oligo DNA donor have been used. In contrast, double strand DNA vectors were used for gene fragment knock-in. In this study, we validated the several way to produce knock-in by embryo-based genome editing and succeed to produce more than 70 bp knock-in with synthesized single strand DNA and more than 7 kb fragment knock-in with plasmid donor.

研究分野：発生工学、実験動物

キーワード：ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術の登場によって、遺伝子改変マウスの作製手法は一変した。従来は確率が非常に低い自然発生的な相同組換えを利用した方法で標的遺伝子に変異を加える必要があった。そのため、受精卵ではなく、自己増殖が可能である胚性幹細胞を利用しなくてはいけなかった。胚性幹細胞の樹立には、年単位の時間が必要であるばかりでなく、たとえ樹立されても、染色体異数性の問題や生殖細胞へと移行しないなどのトラブルが生じやすい。また、実験用マウスの系統によって、樹立率や生殖細胞への移行度が大きく異なる。以上の理由から、実績のある限られた系統の胚性幹細胞だけが遺伝子ターゲティングに使用されていた。これはすなわち、限られた遺伝背景を持つ遺伝子欠損マウスしか誕生しないことを意味する。しかしながら、実験用マウスにはそれぞれの研究分野に強みをもつ多数の有用な系統が存在する。これらのなかの胚性幹細胞が樹立されにくいマウス系統で遺伝子改変が可能となれば、*in vivo* 研究を大きく推進することができる。本研究が開始された当時は、遺伝子改変マウス作製の手法が従来の胚性幹細胞を用いた手法からゲノム編集技術、特に CRISPR/Cas9 を利用した手法へと変化していく過渡期であった。この CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子改変マウスの最大の特徴は、受精卵ベースで様々な遺伝子変異様式を導入できる点である。すなわち、遺伝子欠損 (Knock-out, KO) のみならず遺伝子導入 (Knock-in, KI)、一塩基置換、条件付き KO (conditional KO, cKO) 変異を胚性幹細胞の培養なしで目的の遺伝子座に導入できる。この受精卵ベースでの遺伝子改変動物作製は、時間短縮やコスト削減だけでなく、様々な遺伝背景に多様な遺伝子変異を導入することを可能にする。ヒト化マウスはヒトの組織や遺伝子をもつマウスであり、すぐれたヒトの病態モデルになることが期待されている。マウス体内にヒトの組織を生着させるためには、移植されたヒト組織が免疫的に拒絶されないことが重要である。より良いヒト化マウスを樹立するために、様々な免疫不全マウスが確立されているが、中でも NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Sug</sup>/ShiJic (NOG) マウスは最もヒト化マウスに向けた系統であると注目を集めている。

### 2. 研究の目的

上述の通り、CRISPR/Cas9 を用いた受精卵ベースの遺伝子改変マウス作製は、従来法に比べあらゆる面で非常に有用な方法であるが、KO 変異以外の変異については、変異誘導効率が低いことが明らかになっている。そこで本研究では、KI、一塩基変異、cKO 変異を効率的に誘導する方法を確立することを一つの目標とした。

更に、この一つの目標が達成された場合には、NOG マウスにおいてもこれらの変異が誘導できる方法を確立し、ヒト各個人の遺伝子が導入された遺伝的ヒト化マウスにそのヒト組織を移植できるオーダーメイド型ヒト化マウスを作出することを目的とした研究を行うこととした。

### 3. 研究の方法

KI マウスまたは一塩基変異マウスの作製について:

受精卵ベースのゲノム編集で KI マウスまたは一塩基変異マウスを作出するためには、ゲノムを切断する CRISPR/Cas9 などのエフェクターだけでなく、切断部位の上下流と相同なホモロジーアームと呼ばれる DNA 配列の間に導入したい (KI マウス作製)、もしくは一塩基置換したい (一塩基変異マウス作製) 遺伝子配列 (インサート) が設置されたドナー DNA を受精卵に同時的に導入する方法が一般的である。インサートが数から数十塩基対であれば、一本鎖 DNA がドナーとして利用され、それ以上の長さであれば二本鎖 DNA が使用される。本研究では、この二条件の両方を検討した。具体的な方法について、以下に記載する。DNA をインジェクションする受精卵は最もよく使用されているマウス近交系統である C57BL/6J (B6J) を主に利用した。5 units の pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) と 5 units の human chorionic gonadotropin (hCG) を 48 時間のインターバルにおいて B6J メスマウス投与後、オスマウスと交配させた。交配が確認されたメスの卵管より受精卵 (前核期) を灌流により採取した。インジェクションするタイミングは PN4 ないし PN5 のサブステージとした。CRISPR/Cas9 については、single guide RNA (sgRNA) と Cas9 の両者を発現する pX330 ベクターを使用した。なお、受精卵の導入に先立ち、各 pX330 ベクターの切断活性は EGxxFP システムに *in vitro* で評価した。すなわち、目的の遺伝子部位を認識する guide RNA 配列を付加して各 pX330 ベクターとその配列を含む 350 から 700 塩基対が導入された pCAG-EGxxFP ベクターを HEK294T 細胞に co-transfection し、24 時間後に EGFP 発現細胞の出現率を評価した。一本鎖 DNA ドナー (single strand oligo DNA donor, ssODN) については、インサート配列を 1 mer から 72 mer とし、その左右に相同アーム配列として 45 mer から 99 mer を設置するデザインとした。なお、本研究で使用した ssODN は全て化学的に合成したものである。二本鎖 DNA ドナーに関しては、インサート配列に約 0.2 から 7.8 千塩基対 (kilo base pair, kb) とし、その左右に 0.7 から 7.2 kbp を設置した。なお、二本鎖 DNA ドナーは大腸菌を利用した一般的な分子生物学的手法で構築した。pX330 は滅菌蒸留水で 5 ng/ $\mu$ l に、ssODN と二本鎖 DNA ドナープラスミド

は滅菌蒸留水で 10 ng/ $\mu$ l は滅菌蒸留水で 10 ng/ $\mu$ l に希釈した。pX330 と ssODN、もしくは pX330 と二本鎖 DNA の混合液を上述の方法で得た受精卵の雄性前核に microinjection 法で導入した。遺伝子が導入された受精卵は、2 から 5 時間 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、生存していた受精卵を偽妊娠状態の麻酔下の ICR マウスの卵管に移植し、19 日から 20 日後に出産を確認した。なお、自然分娩しなかった場合は、帝王切開で新生児を子宮より取り出した。誕生した個体は 3 週齢まで発育した段階で、軽麻酔下にて、尾部を採取し、一晩、proteinase K/SDS in Tris-HCl バッファーで溶解したのち、ゲノム DNA をフェノール・クロロフォルムで抽出、イソプロパノール・エタノールで精製した。これらの精製ゲノム DNA を鋳型とした PCR 解析にて標的遺伝子座に KI または一塩基変異が導入されたどうかを確認した。また、pX330 ベクターに存在する Cas9 遺伝子や二本鎖 DNA ドナープラスミドのバックボーンに存在するアンピシリン耐性遺伝子についても PCR 解析でその存在を確認し、これらのベクターが染色体にランダムインテグレーションしていないかを検査した。更に作製された一部の系統については、得られたファウンダーマウスと野生型マウスを交配することで F1 個体を作成し、KI または一塩基変異遺伝子の次世代への移行も確認した。

cKO マウスの作製について:

目的の内在性遺伝子領域を loxP 配列で挟み込んだ cKO アレルを作成するために、以下の二つの方法を検討した。一つ目は、それぞれ目的遺伝子領域の上下流を切断する二種類の pX330 とそれぞれに 34 mer の loxP 配列を挿入するための二種類の ssODN の計 4 種類の DNA を同時に受精卵に導入する 2cr+2ss 法である。もう一つは、上下流を切断する二種類の pX330 と、目的の遺伝子配列が loxP で挟まれた配列を挿入として持つ二本鎖 DNA ドナープラスミドの計 3 種類の DNA を受精卵に同時に導入する 2cr+1ds 法である。なお、その他の条件については、KI または一塩基変異マウス作製と同一とした。

次に第二の目的である NOG 遺伝子背景での受精卵ベースでのゲノム編集についてだが、CRISPR やドナー DNA の調整に関しては前述の方法と同じ条件とし、NOG マウスの基盤系統である NOD マウスやその他の系統におけるゲノム編集効率の検討を行った。

#### 4. 研究成果

ssODN の利用した KI マウスの作製を 6 遺伝子座に対して行った。うち 5 遺伝子座では目的の変異アレルを持つ個体を作成することに成功した。その詳細であるが、プロジェクト平均 335 個の受精卵にインジェクションを行い、そのうちの平均 303 個が生存していた。これらの受精卵を卵管に移植することで平

均 69 匹のマウスが誕生した。PCR 解析とシーケンス解析の結果、KI 個体の出現率(KI 変異遺伝子座保持個体数/出生個体数)は 0% から 20% であった。挿入配列の多くは FLAG 等のエピトープタグであるが、遺伝性を解析した全ての KI 系統で変異アレルの次世代への移行が認められた。加えて、系統化後にそのエピトープタグに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、解析した全ての個体で目的のサイズのバンドが検出された。なお、本研究においては、ssODN を利用した受精卵ベースのゲノム編集で KI できた最長の挿入長は 72 塩基対(3×FLAG+制限酵素認識配列)であった。二本鎖 DNA ドナープラスミドを用いた KI 個体の作出であるが、45 遺伝子座に対して行い、うち 39 遺伝子座に目的の挿入を導入することに成功した。詳細は、平均 328 個の受精卵に micro-injection し、うち平均 290 個が生存し移植、平均 76 匹の新生児を得た。KI マウスの出現効率は平均 5.3% であった。成功した最長の挿入長は 7.8 kb であった。興味深いことに、EGxxFP にて高い切断活性を示した pX330 を利用すると、効率よく KI が生じることが明らかとなった。また、挿入長が短いほど KI 効率が上昇するとの報告があるが、本研究においては挿入長と KI 効率間に明確な相関は認められなかった。また、ssODN を用いた場合と二本鎖 DNA ドナープラスミドを用いた場合で、KI 効率の大きく差異は認められなかった。

一塩基変異マウス作製では、43 遺伝子座中 35 遺伝子座で目的の変異アレルを持つマウスが得ることができた。具体的には、平均 319 個の受精卵にインジェクションし、平均 288 個が生存、そこから平均 77 匹が新生児へと発生した。そのうち、目的の変異アレルを持つ個体は平均 6.5% であった。一塩基変異を導入する場合は、変異させたい塩基を CRISPR の標的配列中に含まれるようにデザインすることで、再切断を生じさせない様にする。そのため、標的一塩基部位を含むような CRISPR 標的配列が存在しない場合、もしくは切断活性が低い場合には、標的一塩基変異を導入することが困難であった。この問題を解決する手段として、二本鎖 DNA ドナープラスミドを使用する方法の確立に挑戦した。この方法は、標的一塩基変異部位の上下流近傍を切断し得る高切断活性の CRISPR 遺伝子を発現する pX330 と、標的一塩基変異配列の含む数百塩基対のセントラルアームとその上下流に各 1 kb 前後の相同配列が設置された二本鎖 DNA ドナープラスミドの計 3 つのベクターをマウス受精卵に共導入ものである。なお、その上下流の切断部位には非同義置換が導入される様に二本鎖 DNA ドナープラスミドの配列をデザインし、余計な変異が生じない様に工夫した。その結果、通常の pX330+ssODN では作出する

ことが出来なかった変異マウスの得ることに成功した。

cKO マウスの作製では、まず 2cr+2ss 法について検討したが、挑戦した 14 遺伝子座のうち 1 遺伝子座でしか目的の cKO マウスを得ることが出来なかった。その一方で、2cr+1ds 法では、18 遺伝子座中 17 遺伝子座で cKO アレルを有する個体を得ることができた。効率の詳細だが、平均 263 個にインジェクションし、平均 239 個移植した結果平均 76 匹の新生児が得られ、うち 3 匹が cKO アレルを有していた。

以上は B6J 系統のデータであるがその他の系統では、BALB/c 系統や C3H 系統では B6J とほぼ同じ編集効率であった。その一方、ICR 系統は採卵効率が高いものの編集効率が B6J に比べ 1/3 程度に留まることや、NOD 系統ではインジェクションにより発生を停止してしまう胚の割合が多いなどの問題があり、更なる実験条件検討が必要であることが判明した。

#### 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 6 件)

1. SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells. Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y, Hara K, Mizuguchi H, Sato T, Taketo MM, Sugiyama F, Ogawa T, Kobayashi S, Ueno N, Takahashi S, Takada S, Yoshida S. **Stem Cell Reports**. 8:561-575. 2017.

doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.006.

2. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. Funato H, ..., Mizuno S (37 人中 21 番目), ..., Sugiyama F (37 人中 29 番目), ..., Yanagisawa M. **Nature**. 539:378-383, 2016.

doi: 10.1038/nature20142.

3. Generation of CRISPR/Cas9-mediated bicistronic knock-in ins1-cre driver mice. Hasegawa Y, Hoshino Y, Ibrahim AE, Kato K, Daitoku Y, Tanimoto Y, Ikeda Y, Oishi H, Takahashi S, Yoshiki A, Yagami K, Iseki H, Mizuno S, Sugiyama F. **Exp Anim**. 65:319-27, 2016.

doi: 10.1538/expanim.16-0016.

4. Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific CREB3L3 knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system. Nakagawa Y, Oikawa F, Mizuno S, Ohno H, Yagishita Y, Satoh A, Osaki Y, Takei K, Kikuchi T, Han SI, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Yahagi N, Isaka M,

Suzuki H, Sone H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. **Sci Rep**. 6:27857, 2016.

doi: 10.1038/srep27857.

5. Lineage-affiliated transcription factors bind the Gata3 Tce1 enhancer to mediate lineage-specific programs. Ohmura S, Mizuno S, Oishi H, Ku CJ, Hermann M, Hosoya T, Takahashi S, Engel JD. **J Clin Invest**. 126:865-78. 2016.

doi: 10.1172/JCI83894.

6. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. Mizuno S, Dinh TT, Kato K, Iijima S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Hoshino Y, Ikawa M, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K. **Mamm Genome**. 25:327-34. 2014.

doi: 10.1007/s00335-014-9524-0.

[学会発表](計 4 件)

1. 水野 聖哉、高橋 智、杉山 文博. CRISPR/Cas9 システムを用いた多様な遺伝子改変マウス作製の実際. 第 89 回日本生化学会大会. 仙台国際センター. 宮城県仙台市. 2016 年 9 月 25 日.

2. 水野 聖哉. 順・逆遺伝学的手法を駆使した変異マウスの異常形質原因遺伝子の解析. 第 63 回日本実験動物学会. ミューザ川崎シンフォニーホール. 神奈川県川崎市. 2016 年 5 月 19 日.

3. 水野 聖哉、高橋 智、杉山 文博、八神 健一. CRISPR/Cas を用いたマウスゲノム編集の実際. 第 121 回日本解剖学会総会. ビッグパレット. 福島県郡山市. 2016 年 3 月 28 日.

4. 水野 聖哉、加藤花名子、飯島沙織、Dinh Thi Huong Tra、谷本陽子、大徳陽子、石田みゆき、依馬正次、伊川正人、高橋智、杉山 文博、八神健一. CRISPR/Cas9 プラスミドを介したマウスゲノム編集の応用. 第 61 回日本実験動物学会. 札幌コンベンションセンター. 北海道札幌市. 2014 年 5 月 16 日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権] なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/lab-animal/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 聖哉 (Mizuno Seiya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10633141

(2)研究分担者

なし

(3) 研究協力者

杉山 文博 (Sugiyama Fumihiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号： 90226481

高橋 武司 (Takahashi Takeshi)

実験動物中央研究所・免疫研究室・室長

研究者番号： 80335215

飯島 沙織 (Iijima Saori)

ディン・ティ・ホン・チャ (Dinh Thi Huong  
Tra)