

課題名	ゲノム編集による難治疾患モデル整備のための基盤技術開発
課題管理者	吉木 淳 国立研究開発法人理化学研究所 バイオリソースセンター
実施期間	2016 年度
概要・実施体制	<p>本課題は、改変型の CRISPR/Cas9 システムを用いた効率的なノックインマウス作製法を確立し、難治疾患モデル整備へ結びつく基盤技術の開発を目的とする。申請者らは、改変型の Cas9 機能分子を作製し、受精卵ベースでのゲノム編集ノックインマウス作出法を開発する。さらに、開発した技術を用いて難治性癌のモデル系統を作出して技術の検証を行うとともに得られた知識をゲノム編集ノックインマウスの遺伝品質管理に活かす。ノックイン技術および作出したマウスリソースは、研究コミュニティに広く普及するだけでなく、中核機関における既存リソースの付加価値向上や疾患モデル品揃えの拡充に活用する。</p>
成果	<ol style="list-style-type: none"> 1. マウス受精卵で相同組換え効率を最大化するため、筑波大・杉山教授との共同研究でゲノム編集酵素である Cas9 の改変を行い、改変 Cas9 発現ベクターを構築した。 2. ノックインのためのターゲティングベクターの構築を行った。コンディショナル p53 ノックアウト、Pdx1 遺伝子座への CreERT2 ノックイン (Pdx1-CreERT2)、ROSA26 遺伝子座へのコンディショナル高輝度ルシフェラーゼ遺伝子ノックイン、Kras 疾患変異を有するコンディショナルノックインベクターの4種類すべてを完成した。 3. マウス受精卵に対し DNA マイクロインジェクションを行い、ゲノム編集によるノックインマウスのファウンダー作出を行った。4種類のターゲティングベクターを用い、各種マイクロインジェクション条件の比較を行い、1回の受精卵への DNA マイクロインジェクションでノックインマウスが得られる条件を検討した。改変型 Cas9 を用いた場合に、コンディショナル p53 ノックアウトと Pdx1-CreERT2 のターゲティングベクターでノックインマウスの候補が高効率で得られた。同様な試みを行なった ROSA26 と Kras 遺伝子座へのターゲティングベクターについては、1回の DNA マイクロインジェクションではノックインマウスの候補が得られなかった。ES 細胞でのゲノム編集によるノックイン効率について、筑波大・杉山教授との共同研究により検討したところ、コンディショナル p53 ノックアウトと Pdx1-CreERT2 のターゲティングベクターでは、ノックインされた ES 細胞のクローンが高い効率で得られた。一方、ROSA26 と Kras 遺伝子座へのノックイン効率は、10 倍以上低いことがわかり、DNA マイクロインジェクションによるノックインマウス作出の成否と相関関係があることが判明した。ノックインマウスの候補が得られなかった ROSA26 と Kras 遺伝子座へのノックインについては、ターゲティングベクターの変更やマイクロインジェクションの条件をさらに検討することにより、ノックインマウス樹立の試みを継続する。 4. ゲノム編集技術によって作出されるノックインマウスに付随する、見過ごされがちな予期せぬ変異導入事例に遭遇した。ポジティブ・ネガティブ選別を経ない受精卵への DNA マイクロインジェクションでは、ノックインマウスのファウンダー候補個体にベクターバックボーンが導入されるケースが見受けられた。ベクターバックボーンがゲノム上のターゲット遺伝子座にリンクした挿入であるか否かの判別は、次世代の遺伝解析結果を得るまでわからないが、リソースセンターとしてゲノム編集技術によって作出されたノックインマウスの遺伝品質を管理する上で、新たな注意点を見いだすことができた。今後の品質管理項目に反映させる。 5. 既に得られているコンディショナル p53 と Pdx1-CreERT2 ノックインマウスの候補は、ファウンダーマウスとして C57BL/6 系統に戻し交配を行い、系統を樹立する。 6. ES 細胞を用いた Kras 遺伝子座へのノックインでは、ターゲティングベクターに含まれる点変異を同時に導入できることが確認された。ターゲティングベクターの受精卵へのマイクロインジェクションにおいて、ノックインはできても点変異を導入できなかった場合には、再度、点変異導入のためのマイクロインジェクションを実施する。ES 細胞からのマウス系統の樹立も考慮する。 7. 改変 Cas9 発現ベクターは、投稿中の論文が受理されたのちに BRC から公開する。ターゲティングベクターや各種ノックインマウスに関しても、系統の樹立と並行して公開手続きを進める。