

「ゲノム編集法のモデル動物作製と遺伝子治療等への応用を目指した研究」

【研究概要】

今回、以下の2点について報告する。

<独自のTgマウス作製技術(PITT法)のコンディショナル遺伝子発現システムへの応用>

我々はこれまでに、マウス受精卵への顕微注入法を介して、予め指定された遺伝子座位(Rosa26座位)にDNAコンストラクトを挿入させる新規トランスジェニック(Tg)マウス作製法“pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) 法”を開発してきた。これは、従来のランダム挿入に基づくTgマウスの欠点(系統間の発現の安定性及び再現性が得られない)を克服するものであり、コスト・労力的にも優れている。2010年と2015年に代表的な論文を発表してきたが(PITT法:Nucleic Acids Res.; 38(22):e198, 2010, i-PITT法:BMC Genomics; 16:274, 2015)、Cre-loxP組換え系を使用したPITT法ではloxP配列を含むコンディショナル遺伝子発現カセットを挿入することができないことから、これまでに研究者のニーズの高いコンディショナル遺伝子発現システムに本手法を応用したことはなかった。そこでPITT法によるコンディショナル遺伝子発現Tgマウス作製を可能にするため、Cre-loxP系ではなくPhiC31インテグラーゼとFLP組換え系を同時に使用する独自の手法(図1)を用いることとし、実際に複数系統のTgマウス作製に成功した(表1)。

<i-GONAD法の普及を目的とした技術講習会>

独自のゲノム編集マウス作製法であるi-GONAD法の普及を目指し、2023年度は、アメリカのミシガン州のVan Andel Instituteでの講習会(海外)(図2)、および日本ゲノム編集学会主催のi-GONAD法講習会(国内)を開催した。

【研究成果】

<独自のTgマウス作製技術(PITT法)のコンディショナル遺伝子発現システムへの応用>

まずPhiC31とFLPを併用するシステムの確立を行なった(図1)。PhiC31o インテグラーゼ mRNA の至適濃度は以前に標準化しているので、今回はFLPo mRNA の至適濃度を調べた。その結果、8.4 ng/μl と 16.9 ng/μl のFLPo mRNA を用いた場合に挿入効率が向上することが示唆された。そこで、以降の実験では2つの濃度のほぼ中間である11.3ng/μlのFLPo mRNAを使用することにした。実験をさらに4回繰り返し、PhiC31oとFLPo mRNAの共注入が一貫した結果をもたらすか否かを検証したところ、PhiC31o単独でもPhiC31oとFLPoの併用でも挿入は可能であるものの、挿入効率は両方のmRNAを注入した方がわずかに高い傾向が見られた。

次に、実際に本手法を3.3~9.7kbの遺伝子発現カセットを有するコンディショナル遺伝子発現Tgマウス作製に応用した。総医研所員も含む学内外の共同研究者が必要とするTgマウス作製に用いたところ、全ての系統のTgマウスの作製に成功した。挿入効率は、出産仔あたり13.7%(53/388)、注入卵あたり2.2%(53/2440)であり、PhiC31とFLPを同時に使用することにより、実用的な効率でコンディショナル遺伝子発現カセットを挿入することが可能であることが分かった(表1)。また、Cre発現マウスと交配することにより目的遺伝子が期待通りに発現することが、共同研究者によって確認された。

本成果を英文原著論文として投稿し、受理されたところである。

<i-GONAD法の普及を目的とした技術講習会>

国内外でi-GONAD法の技術講習会を開催した(図2)。講習会後のアンケートでは、技術解説・実習共に全て「大変良かった」または「良かった」の評価を得ることができ、「講習会を他の研究者にも勧めたい」という内容も含め、総じてポジティブなコメントをいただくことができた。

【今後の展望】

コンディショナル遺伝子発現Tgマウスのニーズは高く、今後も今回確立した手法を応用して学内外の共同研究者が要するTgマウスを作製していく予定である。PITT法を行うためには、ゲノム上の指定された遺伝子座位に予めタグが挿入された種マウスを維持・使用する必要があるが、今後は種マウスを必要とせず、よりシンプルで短期間に目的のTgマウスが作製できる新規Tgマウス作製法を開発していきたい。

またi-GONAD法講習会については、現時点でも多数の参加希望者がいることを聞いており、更なる普及を目指し、技術改良も行いつつより満足いただける内容の講習会を引き続き開催していく予定である。

ゲノム解析研究部門

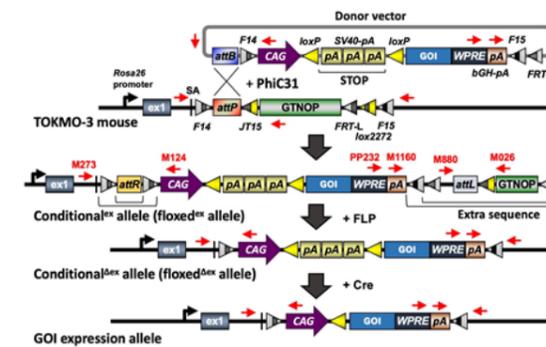


図1 コンディショナル発現カセットを挿入するための PITT 法の概略図

表1. i-PITT experiments for integration of conditional expression cassettes using PhiC31o and FLPo mRNA

Project ID	Zygotes injected	Zygotes transferred	Live born offspring obtained	Targeted integration (%)
1	280	216	27	4 (14.8)
2	284	216	23	2 (8.6)
3	241	219	11	1 (9.0)
4	150	141	22	2 (9.0)
5	207	180	58	4 (6.8)
6	173	160	20	2 (10.0)
7	193	167	28	5 (17.8)
8	201	171	35	5 (14.2)
9	296	267	68	11 (16.1)
10	201	176	46	8 (17.3)
11	214	195	50	9 (18.0)
total	2440	2108	388	53 (13.6)



図2 2023年12月13-15日にVan Andel Instituteで開催されたWorkshop on CRISPR Genome Editing in Mice: GONAD and microinjection



プロジェクトリーダー: 大塚正人
Ohtsuka Masato
医学部医学科基礎医学系分子生命科学 教授
疾患モデル基礎研究センター センター長
研究イノベーションセンター次長



三浦浩美
Miura Hiromi
分子生命科学 助教



黒崎亜希
Kurosaki Aki
分子生命科学 実験補助員

Selected Papers,

1.Hiroshi Arakawa, Hiromi Miura, Rolen M Quadros, Masato Ohtsuka, Channabasavaiah B Gurumurthy, Cross-contamination of CRISPR guides and other unrelated nucleotide sequences among commercial oligonucleotides, Nucleic Acids Research, 2024, gkae068

2.Takeshi Yokoo, Kenya Kamimura, Ryosuke Nozawa, Moeno Sugita, Osamu Shibata, Yuji Kobayashi, Hiroyuki Abe, Hiromi Miura, Masato Ohtsuka, Shuji Terai, "Therapeutic Effect of Hydrodynamics-Based Delivery of Matrix Metalloproteinase-13 Gene on Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Rats", Advances in Cell and Gene Therapy, vol. 2023, Article ID 8842424, 8 pages, 2023.

3.Sato M, Morohoshi K, Ohtsuka M, Takabayashi S, Inada E, Saitoh I, Watanabe S, Nakamura S. Recent Advances in the Production of Genome-Edited Animals Using i-GONAD, a Novel in vivo Genome Editing System, and Its Possible Use for the Study of Female Reproductive Systems. OBM Genetics 2023; 7(4): 207

4.Iura H, Kobayakawa K, Saiwai H, Konno D, Tanaka M, Hata K, Tamaru T, Haruta Y, Ono G, Kitade K, Kijima K, Kubota K, Inagaki Y, Ohtsuka M, Okazaki K, Murakami K, Matsuda S, Tokunaga M, Yoshimoto T, Maeda T, Nakashima Y, Okada S. Bone marrow-derived fibroblast migration via periostin causes irreversible arthrogenic contracture after joint immobilization. FASEB J. May;37(5):e22842. (2023)