

染色体異常の高精度な修復を目指した新規ゲノム編集法の開発

1. 研究の目的

がんや先天性疾患の原因となる染色体再編成を正確に誘導する技術開発は、疾患モデル動物の作製だけでなく、染色体異常の治療に展開するうえでも社会的ニーズが見込まれる。しかしながら、従来のゲノム編集技術による染色体再編成マウスの誘導法では、予期せぬ構造をとるケースがあり、多くは胎生致死となることが課題であった。

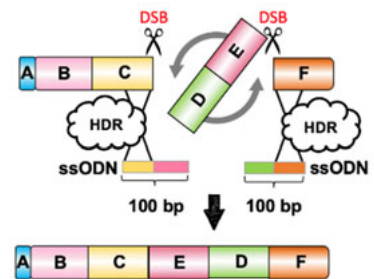
本研究では、これまでの成果 (*Cell Rep* 2018, *Sci Rep* 2019) をもとに、相同組換え効率が向上するようゲノム安定性制御分子を遺伝的に改変したマウス系統を用いることで、正確に染色体再編成を誘導する新規ゲノム編集法の確立と応用に挑戦する。さらに、将来的には本手法をベースとした染色体異常の正確な修復に取り組み、臨床応用への展開も見据えた汎用型プロトコルを開発する。

2. 研究の計画

(1) *Recq15^{em1Cu}*を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

①染色体逆位*HMG2:NR2C1*を誘導するCRISPR/Cas系の設計

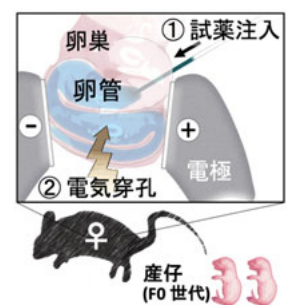
正確かつ高効率に染色体再編成を誘導する新手法を確立するために、本計画では従来報告の5倍以上の長さとなる30Mbの巨大な逆位*HMG2:NR2C1*を標的とする。この逆位遺伝子はヒトの唾液腺腫瘍や乳腺筋上皮腫のドライバー遺伝子として知られているが (Unachukwu et al. *Int J Mol Sci.* 2020 ;21(9):3151.)、それを再現したモデル動物は確立されておらず、このような広範囲な人工逆位誘導が可能になれば、有意義な癌疾患モデルマウスとなると考える。標的guide RNA (gRNA) 設計のために、融合遺伝子データベース



FusionGDB (ccsm.uth.edu/FusionGDB/) より *HMG2:NR2C1* の配列情報を入手し、Double-strand break (DSB) により生じた2箇所のゲノム断端がHDRを介して互いに反対方向に連結するように、必要なり付け配列であるssODN (一本鎖オリゴ) をDNA配列編集ソフト (ApE) で設計する (右図)。更に、ssODNの各末端をS化 (硫黄化) することで細胞内に存在する核酸分解酵素への耐性を付与する実験条件も加え、染色体再編効率への影響を調べる。

② *in vivo*電気穿孔法によるゲノム編集

右図のように妊娠雌マウスの卵管にガラスピペットを用いてゲノム編集試薬を注入し、ピンセット型電極により電気穿孔することで卵管内に存在する受精卵にゲノム編集を行う。本研究ではDNA修復の過程でRad51 (HDR因子) を分解する*Recq15*に変異を導入した*Recq15^{em1Cu}*マウスおよびコントロールの野生型マウスに施術し、*Recq15*の抑制による長い染色体領域の正確なHDRへの寄与を比較検討する。



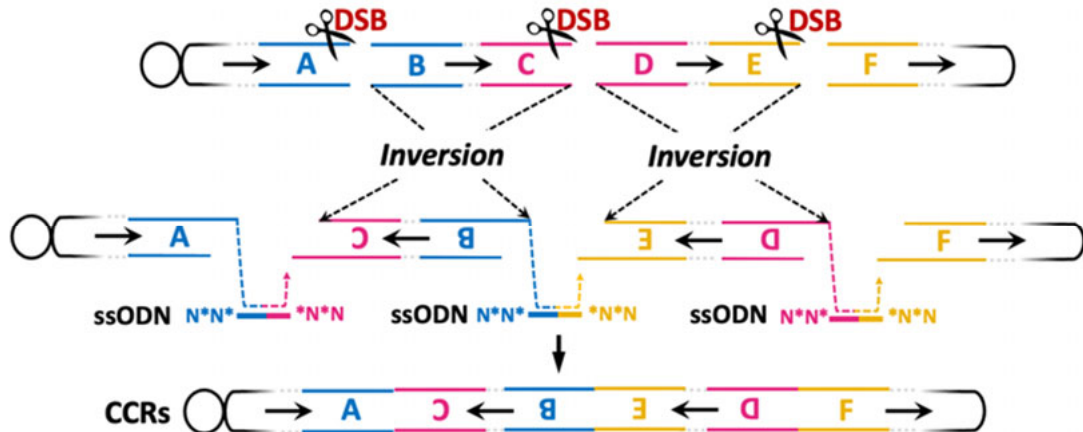
産仔 (F0世代) の遺伝子型検査は、①PCR法、②サンガーシーケンスにより検証する。また、F1世代への染色体再編成の伝達を確認し、予期せぬ構造がないか次世代シーケンサーによる解析も行う。以上の解析から正確かつ高効率に染色体再編成を誘導する最適条件を見出す。

(2) *Recq15^{em1Cu}*を用いたクロモスリプシス様の染色体再編成の誘導と解析

近年の次世代シーケンス技術の進歩により、2つ以上の染色体、または3つ以上の染色体断端からなる複雑な染色体再編成 (CCRs) が、がんや先天性疾患の患者のゲノムで相次いで検出されている。しかしながら、現時点では臨床検体においてCCRsが生じているというゲノム解析の結果論にとどまっており、疾患発症メカニズムは殆ど不明である。それ故、CCRsを高精度かつ効率良く誘導する事を可能にする実験系を構築することが急務である。

①CCRsを誘導するCRISPR/Cas9系の設計

上記(1)で樹立した手法を応用し高精度に意図したCCRsが誘導できるか試みる。それぞれgRNA及び染色体断端が再度連結するために必要なssODNを3つ設計、(1)-②の*in vivo*電気穿孔法を用いて狙った位置にCCRsを誘導する。



②CCRsの遺伝子型検査と解析

得られた産仔 (F0世代) の遺伝子型検査は、①PCR法、②サンガーシーケンスにより検証する。また、CCRsは染色体断端の位置によらず不妊を呈する事実が示唆されているため (Kim et al. *Fertil Steril.* 2011;95(1):349-52, 352.), CCRsによる癌や妊孕(よう)性への影響を解析 (交配試験、精巣・卵巣の病理形態解析) する。

3. 研究の成果

(1) *Recq15^{em1Cu}*を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

これまでに、我々が以前報告した約 7.67 Mb に及ぶ染色体逆位 (Iwata et al. *Sci Rep* 2019) を、DNA 修復の過程で Rad51 (HDR 因子) を分解する *Recq15* に変異を導入した *Recq15^{em1Cu}* マウスを用いる事により、indel を含まない正確な結合部位で再現する事に成功し、更に *Recq15^{em1Cu}* マウスを用いて indel を含まない結合部位を持つ 0.9 Mb の逆位からなるがん融合遺伝子 *HMG2:WIF1* (Persson et al. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009; 48, 69-82) マウスの樹立にも成功している。しかしながら、本報告書作成時点で、30 Mb の巨大な逆位 *HMG2:NR2C1* は得られていない。gRNA/ssODN の再設計や電気穿孔の条件、試薬濃度等を再検討しており、CRISPR/Cpf1 によるマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) も 2023 年度に検討する予定である。また、効率を上げるために、ストレプトアビジン Cas9 とビオチン DNA を用いる計画をしており、2023 年度内に作製を目指す。

(2) *Recq15^{em1Cu}*を用いたクロモスリプシス様の染色体再編成の誘導と解析

採卵・移植が不要なゲノム編集技術 *i-GONAD* 法を用いた染色体逆位マウスの作製法 (Iwata et al., *Sci Rep* 2019) を基盤とし、*Recq15^{em1Cu}* マウスに対してクロモスリプシス様の染色体再編成を誘導した。標的は、がんや発生異常を起こす変異が集中する領域に焦点を絞り、3ヶ所のゲノム領域が同時に二本鎖切断 (DSB) するように guide RNA を設計した。さらに、3ヶ所の DSB により生じた2つの染色体断片が HDR を介して互いに反対方向に連結するように、必要のり付け配列である一本鎖オリゴ (ssODN) を DNA 配列編集ソフト ApE で設計した。ssODN は HDR 効率を向上させるため、両末端に2つのホスホロチオエート (PS) 結合を施した。

野生型マウスを用いた実験では CCRs の誘導が困難な一方、*Recq15^{em1Cu}* マウスではメガベース (100 万塩基対) 単位の染色体逆位や、*Hmga2-Wif1*, *Hmga2-Rassf3*, *Wif1-Rassf3* という3つの融合遺伝子を発現する CCRs モデルマウスが高効率に作製できた。ホモ接合型 CCRs は *Hmga2* 遺伝子の変異により重度の成長遅延と不妊症を呈したが、解析期間内に腫瘍の発生は観察されなかった。これらの所見は、*Hmga2-Wif1* 融合タンパク質の発現がマウスにおいて必ずしも腫瘍促進の役割を果たしていないことを示唆しているが、この可能性を評価するには長期間にわたる観察が必要である。また、次世代シーケンス解析により、いくつかの CCRs 系統ではマイクロホモロジーを介した鋳型交換機構 (fork stalling and template switching: FoSTeS/microhomology-mediated break-induced replication: MMBIR) という特殊な DNA 修復メカニズムの関与が確認された。この染色体構造異常は、新たに提唱された

ゲノム現象 “染色体再構成 (chromoanasythesis)” を彷彿とさせる。このように *Recq15^{em1Cu}* は CCRs モデルマウスを効率的に作製できる可能性を示しただけでなく、chromoanasythesis というメカニズムがよく分かっていない現象を解析するための新しい強力なツールとなることが示された。本研究成果はプレプリント論文として *bioRxiv* で公開した (<https://doi.org/10.1101/2023.04.06.535871>)。

4. 研究の反省・考察

(1) *Recq15^{em1Cu}* を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

巨大な染色体逆位の誘導を試みると逆位領域に含まれる essential 遺伝子が欠失するリスクが増し、生存や発生に深刻な影響を及ぼすことが予想される。したがって、ゲノム編集技術で巨大な染色体逆位を誘導する際、逆位が essential 遺伝子に影響を与えないよう遺伝子の配置や機能、調節領域などに考慮した gRNA の設計が必要である。

(2) *Recq15^{em1Cu}* を用いたクロモスリプシス様の染色体再編成の誘導と解析

本研究では *Recq15^{em1Cu}* マウスを用いた新たなゲノム編集法を開発し、マウス接合体において CCRs を効率的に誘導できることを示した。この手法には大きな可能性があるが、FoSTeS/MMBIR のような予期せぬ DSB 修復機構も伴った。FoSTeS や MMBIR モデルでは、HDR の際に相同テンプレートが存在しないため、よりエラーを起こしやすい DNA 修復が行われる可能性がある。したがって、このような技術をゲノム治療に応用する際には、これらの要因を注意深く考慮する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、マウス胚における chromoanasythesis 様(よう)の複雑な染色体再編成の効率的誘導、日本遺伝学会 第94回大会、2022年9月14日

② **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、ゲノム安定性制御による染色体再構成 (chromoanasythesis) の効果的誘導、日本宇宙生物科学会 第36回大会、2022年9月17日、
★優秀発表賞

ポスター発表

① **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、ゲノム安定性制御によるマウス胚の多重染色体編集法の開発、第69回 日本実験動物学会総会、2022年5月18日

② **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、マウス受精卵における複雑な染色体再編成 (Complex Chromosome Rearrangements: CCRs) 誘導法の開発、日本ゲノム編集学会 第7回大会、2022年6月7日

(3) 出版物

なし