

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	中 部 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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		研 究 分 野 理 学 (生物学系)
キ ー ワ ー ド	①ゲノム編集 ②染色体再編成 ③染色体逆位 ④遺伝子改変マウス ⑤相同組み換え ⑥がん ⑦RecQヘリカーゼ		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 田 悟	中 部 大 学 実験動物教育研究センター	講 師	研究の総括・受精卵ゲノム編集による遺伝子改変 マウスの作成・系統維持および解析

○研究分担者

[illegible]

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こまれる。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。

そこで我々は相同組換え効率が向上する目的でゲノム安定性制御分子 *Recq15* を遺伝的に改変した *Recq15^{em1Cu}* を樹立し、そのマウス受精卵を用いたゲノム編集によりゲノム編集による手段として既存の報告では最長の逆位変異マウスを作成することに成功した。更に複雑な染色体再編成 (CCRs) を複数誘導することにも成功した (Iwata et al. *Genetics*, 2024)。以上を踏まえて本研究では大きく以下の二つに注力して研究を進める。

1) ゲノム編集技術の進歩により、生体の *ex vivo* で遺伝子異常を修復して癌を治療しようとする試みは主に血球で、更に肺や肝臓等の臓器でも進行している。これらの遺伝子の delivery にはウイルスベクターが主として使われているが、ウイルスベクターには予期せぬ insertional mutagenesis や過剰免疫応答等のリスクもあり、より安全な核酸 delivery システムの開発が必要と考える。子宮体がん、特に子宮内膜がんはリンチ症候群のような DNA ミスマッチ修復遺伝子異常による遺伝性染色体異常の関与が明らかにされている。そこで本研究では子宮内膜上皮に *ex vivo* で効率よくゲノム編集を行う技術確立し、子宮体がんの遺伝子治療の基盤形成を目指す。

2) 現在までのところ *Recq15^{em1Cu}* マウスに癌等の異常はみられていない。しかしながらこの系統のマウスを用いた研究では *Recq15* 変異による予期せぬ表現型の異常の関与を全くは否定することは出来ない。そこで本研究では、ゲノム編集時に *Recq15* の siRNA あるいは dominant negative *Recq15* を導入することにより一時的にのみ *Recq15* 遺伝子発現を抑えてゲノム編集効率を高めることが出来ないかを検討する。

2. 研究の計画

1) 子宮内膜上皮への *ex vivo* でのゲノム編集技術の開発

- ① C57BL/6N系統のマウス子宮にCRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) をガラスキャピラリーを用いて送達し、電気穿孔法により染色体編集を実施した。
- ② 標的は、3箇所の染色体領域が同時に二本鎖切断 (DSB) されるように設計したguide RNAを使用した。DNA配列編集ソフトApEを用いて相同組換え修復 (HR) によって3つの染色体断片が互いに所定の方法に連結するように、必要な接着配列として一本鎖オリ

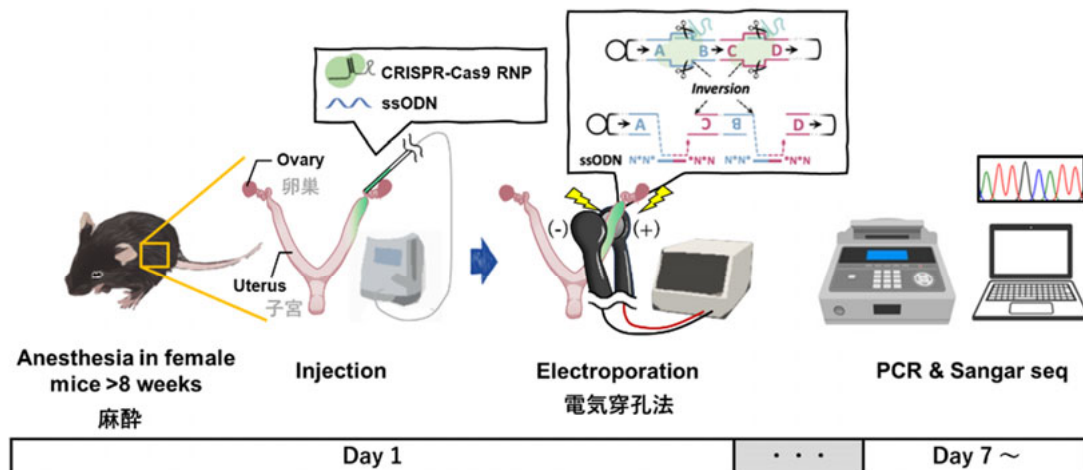


図1 マウス子宮の染色体再編成の誘導手順

ゴ (ssODN) を設計した。

- ③ *Recql15^{em1Cu}*マウスを使用して染色体編集効率を野生型と比較した。

2) 一時的な*Recql15*遺伝子の発現低下によるゲノム編集効率の改善手法の確立

- ① 将来的に遺伝子治療を目指す場合 受精卵より臓器の*ex vivo*遺伝子導入の方が倫理的観点からより実用化しやすいと考え、標的をマウス受精卵から子宮内膜上皮に変更した。
- ② 体細胞への遺伝子導入の場合、モザイク状に導入される可能性が高く、組織をバルクで解析するより、子宮内膜の個々の細胞レベルでの発現解析を目指すことが出来れば望ましい。その為に、容易に顕微鏡下で一細胞レベルで*Recql15*遺伝子の発現低下が確認出来る系を開発する事を計画した。
- ③ *Recql15*遺伝子の第19エクソン下流にin frameにGFPよりも圧倒的に蛍光強度の強いmNeonGreen遺伝子をノックインで導入し、*Recql15*遺伝子の発現をmNeonGreenの発光強度で解析出来るマウスの樹立を計画した。
- ④ 具体的にはmNeonGreen遺伝子711塩基の両側にマウス*Recql15*基遺伝子に相補的な150塩基をつないだ塩基配列をプラスミドベクターに挿入し、Guide-it Long ssDNA Strandase Kitを用いてmNeonGreen長鎖一本鎖DNA (ssDNA)を調製し、CRISPR/Cas9のノックインドナー用DNAとして使用した。

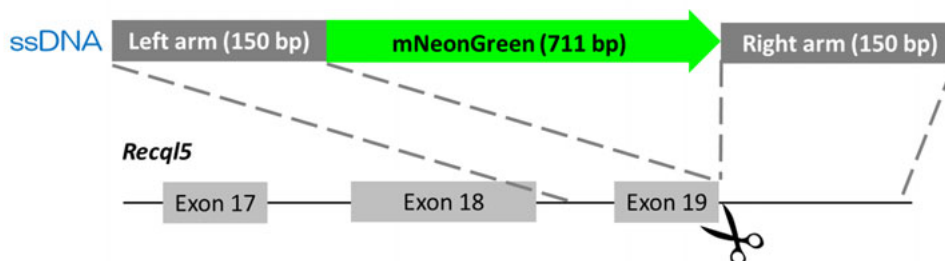


図2 一本鎖DNA (ssDNA) を用いた長鎖遺伝子ノックインマウスの作製

3. 研究の成果

1) 子宮内膜上皮への*ex vivo*でのゲノム編集結果

- ① 10番染色体のがんドライバー遺伝子を標的とした染色体再編成 (CCRs) の誘導。具体的な改変染色体を図3に示す。マウス受精卵を用いた同じ実験では、*Recql15^{em1Cu}*マウスを用いた場合の方が有意に効率が良かったが、子宮内膜上皮での実験では*Recql15^{em1Cu}*マウスと野生型マウスともに、最大40%程度の確率で両端の breakpoints が確認されて CCRs の誘導に成功した事が確認された。ただ、両者の間で有意な差は認められなかった。また、各連結部位のサンガーシーケンスの結果、非相同末端結合 (NHEJ), マイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ), 相同組み換え (HR) が認められたが、初期胚の実験で高頻度に観察された FosTes/MMBIR のような不規則なゲノムイベントは殆ど検出されなかった。

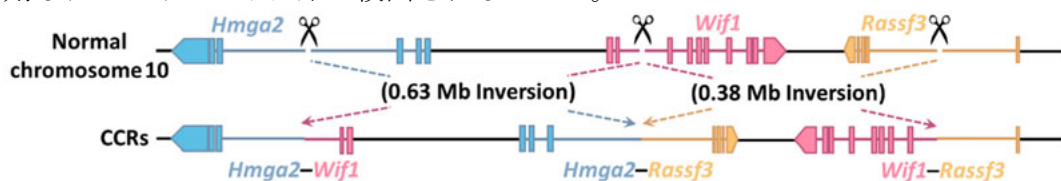


図3 がんドライバー遺伝子を標的とした複雑な染色体再編成 (CCRs) の誘導

- ② 現在まで我々はマウス受精卵では染色体転座の誘導に成功していない。本研究では核内でRNAクラウドを形成するFirme遺伝子座による染色体間結合に関与している

染色体 9 と染色体 15 は転座を起こしやすいと考え、それら二つを標的として転座の誘導を試みた。その結果、*Recql5^{em1Cu}* マウスと野生型マウスともに最大 60%程度で成功した。

- ③ 将来的な染色体異常の修復に応用すべく、In(6)1J と呼ばれる、2006 年に C3H/HeJ 系統で確認され、2021 年に我々がブレイクポイントを同定した 57.8 Mb の巨大な逆位修復を試みた。その結果、両系統において逆位の修復が見られたが、意外なことに、*Recql5^{em1Cu}* マウスでは野生型に比べて低かった。

2) mNeoGreen 遺伝子ノックインマウスの作成

精製した mNeoGreen 遺伝子のセンス鎖およびアンチセンス鎖を Gonad 法でマウス受精卵に導入したが、現在までのところノックインマウスが得られていない。

4. 研究の反省・考察

1) 子宮内膜上皮への *ex vivo* でのゲノム編集技術の確立

我々はマウス受精卵において CCRs を誘導することに成功してきたが、今回、子宮内膜上皮においても CCRs を誘導することに成功した。また、マウス受精卵において成功していなかった転座についても成功した。更に、57.8 Mb の巨大な逆位の修復についても成功し、将来的な子宮体がんでの遺伝子治療のための染色体改変技術の基礎固めになったと考えている。

しかし、今まで報告してきたマウス受精卵での染色体再編成と比較すると色々な点で異なっていて、ゲノム編集による染色体改変が生体の組織や発生過程で大きく条件が異なることが示唆された。まず、受精卵で見られた FosTes/MMBIR のような不規則な遺伝子の修復は両系統とも殆ど見られなかった。また、野生型マウスでも高いゲノム編集効率が得られて、染色体転座も成功し、*Recql5^{em1Cu}* マウスとの間に明らかな差は認められなかった。逆に、巨大逆位の修復効率では野生型の方が *Recql5^{em1Cu}* マウスより効率が高かった。これらの結果の一部は、プレプリント論文として *bioRxiv* で公開すると同時に (Iwata et al. *bioRxiv* 2025)、現在国際学術誌に投稿中である。

これらの受精卵との違いの原因は現時点では推測の域を出ないが、一つは組織でのゲノム編集は対象とする細胞数が多いので、単純に染色体改変が成功する確率が上がることが考えられる。また、体細胞では細胞周期が長く、十分な修復時間を確保できるため、意図した染色体再編が効率的に進行する可能性がある。また、FosTes/MMBIR が殆ど確認出来なかった理由としては S 期が短く、チェックポイントが厳密に制御されている可能性を考えている。

今回の研究結果を踏まえ、今後、他の臓器においても検討し、各臓器の各発育段階における *ex vivo* の染色体改変の効率の検討や分子メカニズムの解明をする必要がある。

しかしながら、体細胞における電気穿孔法で高い効率で染色体改変が行えたことは、将来的なヒトのがん治療への応用へむけた第一歩になると考えられる。

2) 一時的な *Recql5* 遺伝子の発現低下によるゲノム編集効率の改善手法の確立

Recql5 遺伝子の発現低下を容易にモニター出来るノックインマウスの樹立を試みたが、現時点で成功していない。現在、導入する ssDNA の量を増加してトライしている。これらの試みで解決されない場合は、guideRNA のデザインを再設計する、あるいはノックインのデザインを変更することを検討している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Iwata S, Miura Y, Iwamoto T. Development of an *in vivo* electroporation-based chromosomal engineering technique in the murine uterine epithelium. *bioRxiv* 2025. 02. 25. 640089, 2025

(2) 口頭発表

- ① 岩田 悟、長原美樹、岩本隆司、*Recql5* 変異マウスを用いた染色体再編成時の DSB 修復機構

の*ex vivo*解析、日本遺伝学会第96回大会、2024年9月4日
ポスター発表

- ① **岩田悟**、井戸理沙子、岩本隆司、*Recql5*遺伝子を活用したマウス前立腺/子宮の効率的な染色体編集、第71回日本実験動物学会総会、2024年5月29日
- ② **岩田悟**、井戸理沙子、岩本隆司、マウス前立腺/子宮の効率的な染色体編集、日本ゲノム編集学会 第9回大会、2024年6月17日
- ③ **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、*Ex vivo*解析によるマウス子宮の染色体再編成とDSB修復動態、第47回日本分子生物学会年会、2024年11月27日

(3) 出版物

なし

(4) その他

理研BRC「今月のマウス」 2025年4月 *Recql5*遺伝子変異マウスを用いた染色体断片化後再合成の誘発 (https://mus.brc.riken.jp/ja/mouse_of_month/apr_2025_mm)