

# 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



## I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業  
(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間: 平成 29年 8月 25日～令和 4年 3月 31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 中山 学  
(英語) Manabu Nakayama

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部 オミックス医科学研究室・主任研究員  
(英語) Kazusa DNA Research Institute, Department of Frontier Research and Development, Laboratory of Medical Omics Research, Senior Research Scientist

## II 補助事業の概要

ヒト疾患ゲノム情報に基づいて作製された疾患モデルマウスは、変異と疾患の関連性を直接的に示す証拠となるだけでなく、発症機構の解明を介して創薬標的の発見を加速し、新規治療薬の開発スピードを著しく向上させる重要なツールとなる。公益財団法人かずさDNA研究所は、理研・生命医科学研究センター(IMS)との共同研究により、効率的に遺伝子改変マウスを作製するパイプラインを開発し、年間 60種類以上のペース(近年6年間で合計 388種類)で遺伝子改変マウスを作製してきた。DNA組み換え技術の改善や新規技術の開発、より良いES細胞の樹立、キメラ作製技術の改善、CRISPR/Cas9技術の導入、全体の作業効率管理、生物資源・知財管理など様々な工夫を取り入れて、パイプラインの効率化と安定化を図ってきた。その結果、ミスセンス変異ノックインによるアトピー性皮膚炎疾患モデルマウスを始め、多くの疾患モデルマウスを発表してきた。本課題では、このパイプラインを創薬を目指す研究者コミュニティと共有し、それによりパイプラインをよりアクセシブルかつ高度化し、疾患モデルマウスなどの生物資源の安定提供を目指した。

支援においては、支援依頼者の要求に添いながら効率的かつ安定に疾患モデルとなる変異を導入したマウスを作製・供給することを目指して支援を行った。過去5年度(2017-2021年度)の支援では、コンディショナルノックアウトマウスが20件、ノックインマウスが44件、コンディショナルノックインマウスが8件、BACトランスジェニックマウスが3件、CRISPR/Cas9法による遺伝子改変マウスが22件の合計97件の作製依頼を受けた。比較的複雑なマウスの作製の依頼に関しては、従来のES細胞を用いた

相同組み換え法を用いて行なった。順次ターゲティングベクターの作製、ES 細胞への形質転換、相同組み換え陽性クローンのスクリーニング、キメラマウス化を進めた。比較的シンプルな CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウスの作製依頼に関しては、マウス受精卵に直接 Cas9 蛋白質と gRNA とドナーDNA を導入して CRISPR 遺伝子改変マウスを作製している。遺伝子改変マウスの作製は作業工程が長いため、順次各ステップを進めているが、97 件の支援依頼中、既に 93 件完了し、遺伝子改変マウスを依頼者へ移送した。残りの 4 件に関しては継続課題として、支援を継続している。

遺伝子や変異の種類によっては、Cre/loxP 組み換えシステムを用いたコンディショナルノックアウトを用いて、時期特異的や組織特異的に遺伝子欠損を起こさせた方が疾患モデルマウスに近道である場合があり、多くの疾患モデルマウスが作製されてきた。一方、患者由来のミスセンス変異をマウスの遺伝子に導入した場合に、影響が大きすぎて胚性致死を引き起こしてしまうアミノ酸置換も存在する。そのような場合には時期特異的や組織特異的にミスセンス変異を発現させるコンディショナルノックインが必要となる。コンディショナルノックインは大きく 2 つに分けて、1) アミノ酸置換変異を持つエクソンの上流のイントロン部分に、転写がストップされる STOP カセットを挿入しておき、STOP カセットの両端に配置した loxP サイトで Cre/loxP で STOP カセットが除かれると、変異遺伝子が発現するようにする方法と、2) アミノ酸置換が導入されたエクソンを逆向きに配置しておき、FLEX switch 法と呼ばれる loxP と変異 loxP サイト (lox2272) を互い違いの状態に配置することで、Cre 酵素でゲノム上の逆向きのエクソンが反転されて、変異遺伝子が発現するようにする方法が存在する。支援依頼内容と遺伝子の機能、遺伝様式に応じて、それぞれに適した手法で作製した。

遺伝子改変マウスで汎用される Cre/loxP や Flp/FRT システムと認識サイトが異なるために、クロス反応が起きず、同時に使用できる新しい部位特異的組み換え酵素システムを開発してきた (特許第 5336592 号、特許第 5336676 号)。VCre 発現マウス、VCre レポーターマウス、SCre 発現マウス、SCre レポーターマウスは作製済みであり、マウス個体内でも VCre/VloxP と SCre/SloxP の特異的な組み換え反応と高い組み換え効率が確認できている。既存の Cre/loxP マウスや Flp/FRT マウスと組み合わせることにより、より緻密なゲノムエンジニアリングを行なうことができる。CreERT2 マウスはタモキシフェンを投与することにより Cre 活性の誘導ができることが知られているが、VCre でも同様に VCreERT2 とすることでタモキシフェン誘導系マウスを作り出すことができる可能性がある。強力に全身で発現させる CAG プロモーター制御下に VCreERT2 を発現させる VCreERT2 マウスを作製した。更にタモキシフェン誘導以外の VCre 発現誘導系マウスの作製依頼を受け、ドキシサイクリン投与により VCre 発現が誘導されるマウスの作製を進めた。変異型 Tet リプレッサー蛋白質 (TetR) と VP16 活性化ドメイン (AD) より構成された融合蛋白質 rtTA が CAG プロモーター制御下で恒常的に発現する。ドキシサイクリン (Dox) の投与後に、ゲノム上の発現制御領域の TetO 配列に結合することにより VCre 蛋白質を発現させる。この発現カセットは、マウス内で安定的に働くことが知られている H11 領域 (マウス chr. 11) にノックインさせた。汎用される ROSA26 遺伝子座はマウス chr. 6 であるので、組み合わせて使用することができる。このように複数の部位特異的な組み換え酵素システムをマウス個体で使用することで、より複雑な調節や緻密なゲノムの制御を行なうことが出来るようになった。

上記のようにタモキシフェン誘導以外の VCre 発現誘導系マウスの作製依頼を受け、ドキシサイクリン投与により VCre 発現が誘導されるマウスの作製を進めている。一方、別の支援依頼者からある遺伝子の正常型から、変異型への置換後に、再度正常型に戻るマウスが可能かどうかの相談を受けた。最初タモキシフェン投与で Cre が活性化し、FLEX switch 法で DNA 領域を反転させて、変異型を発現させる。次にドキシサイクリン投与により VCre 発現が発現されることで、VloxP と Vlox2272 の組み合わせの FLEX switch 法で再度反転が行われて、再び正常型に戻るシステムを提案し、現在作製を行っている。複数の

部位特異的な組み換え酵素システムをマウス個体で使用することで、より複雑な調節や緻密なゲノムの制御を行なうことが出来るため、支援依頼者に積極的に提案し、支援と高度化が重なっている部分のプロジェクトとして新規部位特異的組み換え酵素システム (VCre/VloxP と SCre/SloxP システム) を用いた遺伝子改変マウスの作製を行なった。このように新規部位特異的組み換え酵素システムを中心に、VCre や SCre 関連のマウスを作製していきながら、マウスのバイオリソースを増やしていき、次第に支援依頼者のより高度で緻密なリクエストに対応できるように進めるとともに、応用例として多数の遺伝子改変マウスの作製を実施した。

Although physicians and medical researchers have identified many gene mutations in patients via next-generation DNA sequencing, the production and characterization of genetically modified mice are indispensable for demonstrating how the identified gene mutations cause diseases. Mouse models of human diseases with the same mutations will elucidate pathogenic mechanisms and accelerate drug discovery. Our research group comprises the Kazusa DNA Research Institute and RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS). We have collaborated for over 20 years to produce genetically modified mice. Since the introduction of several technologies for high-throughput production of genetically modified mice via the use of embryonic stem (ES) cells to produce chimeras, we have developed an efficient pipeline to produce genetically modified mice. We have previously reported many genetically modified mice, including a mutant mouse that spontaneously develops pruritic dermatitis. In the BINDS project, we received 97 requests to produce genetically modified mice, including 20 conditional knockout mice, 44 knock-in mice, 8 conditional knock-in mice, 3 BAC transgenic mice, and 22 CRISPR/Cas9 gene-editing mice. We have completed 93 requests and we continue to produce and support the remaining four genetically modified mice.

Although the Cre/loxP system is the gold standard technique used to perform conditional gene knockouts in mice, more than one Cre/loxP cannot be used within the same construct. To address this problem, we developed two novel site-specific recombination systems: VCre/VloxP and SCre/SloxP. These new tools are useful for performing more complicated and fine genome engineering manipulations. In line with this, we established four novel knock-in (KI) mouse strains in which the CAG-VCre, CAG-SCre, VloxP-STOP-VloxP-EGFP, and SloxP-STOP-SloxP-tdTomato genes were inserted into the ROSA26 locus. CAG-VCre and CAG-SCre KI mice carry VCre or SCre genes that are ubiquitously expressed via the CAG promoter. VloxP-STOP-VloxP-EGFP and SloxP-STOP-SloxP-tdTomato KI mice were reporter mice carrying EGFP or tdTomato genes posterior to the STOP cassette, which are floxed by VloxP and SloxP sites, respectively. We crossed these two reporter mice with three different deleter mice (CAG-VCre KI, CAG-SCre KI, or Cre-expressing transgenic mice). The results demonstrated that VCre/VloxP and SCre/SloxP functioned similarly to Cre/loxP in mice, and that the two recombinases exhibited tight specificity for their recognition sequences. There are two major inducible Cre systems: CreERT2, which is induced by the addition of tamoxifen, and the TET on/TET off system, which is induced by the addition of doxycycline. Inducible VCre systems can be potentially very useful and powerful tools, especially if both tamoxifen-inducible Cre and doxycycline-inducible VCre are present in the same cells of a particular mouse or in the reverse combination. We attempted to create tamoxifen-inducible

VCre fused to ERT2 and doxycycline-inducible VCre based on TET. Taken together, VCre/VloxP and SCre/SloxP in combination with both Cre/loxP and Flp/FRT will serve as powerful tools for genome engineering, especially for applications requiring genetic modification of both alleles of a gene of interest in mice or multiple targeted deletions in the same cell at different times.