

## 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) 次世代型疾患モデル動物作出  
(プログラム名) (英語) Creation of next-generation disease model animals

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) 畑田 出穂  
(英語) Izuho Hatada

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人群馬大学・生体調節研究所・教授  
(英語) Gunma University・Institute for Molecular and Cellular Regulation・Professor

### II 補助事業の概要

#### 支援

創薬研究やライフサイエンス研究において必須である疾患モデル動物 (Flox, KO, KI マウス) 作製支援を、我々が開発した高速 Flox マウス作製法 (2ステップ法: Horii T et al. Sci. Rep. 2017) などを用いて79件おこなった。リソースの保存のため2019年度から依頼者に RIKEN BRC への寄託を要請しており寄託済・中のものが現在3系統ある。支援動物による成果発表については未発表のものが多いが論文6報、学会発表14演題である。

#### 高度化

##### 2ステップ法の改善

我々の高速 Flox マウス作製法では1細胞胚、2細胞胚と2ステップのエレクトロポレーションでエクソンの両側に交互に loxP サイトを挿入する。しかし2ステップ目のエレクトロポレーションで2細胞期胚が電場と同方向に並んでいる場合は、細胞が隣接する細胞膜に微小孔ができ融合してしまうため4倍体を形成し胚発生が停止するという問題があった。そこで接着因子のカドヘリンを阻害すれば接着面を減らし融合を防げるのではと考え、カドヘリンの接着に必要なカルシウムを除く方法と、アクチン重合阻害剤によりカドヘリンの裏打ちをするアクチン繊維を破壊する方法を試みた。その結果、どちらの方法でも割球間の接着面が減り、細胞融合も格段に減少、発生率、ノックイン効率も変化せず非常に良好な結果を得ることができた (Horii T et al. Cells 2020)。

## 組織特異的 Cre 一括導入法の開発

コンディショナル KO マウス作出には Flox マウスと組織特異的 Cre 発現マウスとの交配が必要であるが、作成時に Cre 遺伝子を同時に導入し、いっきにコンディショナル KO マウス作製する方法を試みた。Cre 遺伝子はドナーオリゴと比較して鎖長が長いため電圧ポレーションでは胚に導入しにくい。そこでマイクロインジェクションと電圧ポレーションを組み合わせた。1 ステップ目に Left loxP を電圧ポレーション、2 ステップ目は Cre 遺伝子をインジェクション、3 ステップ目の Right loxP を電圧ポレーションで導入した。その結果、16.6%の効率で Cre-Flox マウスを得ることができ、組織特異的 Cre 一括導入法の開発を可能にした。

## エピゲノム疾患モデルマウス作出

我々が開発したエピゲノム編集技術 (Morita S et al. Nat. Biotech 2016) は遺伝子切断活性欠損の Cas9 (dCas9) を用いて標的にエピゲノム因子をリクルートすることによりエピゲノムを操作する技術である。エピゲノム因子として TET1 を用いると標的の DNA 脱メチル化をおこなうことができる。我々はこの技術をさらに発展させ個体レベルで特定のエピゲノムだけを改変した動物の作製を試みた。それにより特定のエピゲノム変化が疾患を起こせるかを検証できるようになり、エピゲノムの実証研究が可能となる。エピゲノム疾患である Silver-Russell 症候群のモデル作製の対象とした。この疾患は H19 遺伝子のエピゲノムの変異が原因と考えられている。健常者 (WT) の母親由来のアレルでは Insulator に CTCF が結合するため Enhancer が IGF2 に働かず IGF2 は発現せず H19 が発現する (図 1)。それに対し父親由来のアレルは Insulator がメチル化され CTCF が結合しないため Enhancer が IGF2 に働き IGF2 が発現する。Silver-Russell 症候群の患者では父親由来のアレルが脱メチル化されており、Insulator に CTCF が結合するため Enhancer が IGF2 に働かず IGF2 の発現がまったくなくなり子宮内発育遅延 (IUGR) を引き起こすと考えられている。そこでエピゲノム編集により CTCF 結合部位を脱メチル化し、Silver-Russell 症候群モデルマウスを 3 通りの方法 (図 2) で作製した。テトラプロイドレスキュー法 (図 2-1) では ES 細胞に一過的に脱メチル化編集システムを発現させ、エピゲノムのみを変化させた後、テトラプロイドレスキュー法を利用して個体を作製した。四倍体胚と二倍体の ES 細胞をキメラ胚にすると、四倍体細胞は胎仔にはほとんど寄与しない。その結果、胎仔は 2 倍体細胞によって形成され、ES 細胞のみからなる個体を得ることができる。作製したマウスのメチル化と発現を解析したところ CTCF 結合部位は完全に脱メチル化し、IGF2 の発現が抑制されていたが、テトラプロイドレスキュー法で産仔が得られる確率はかなり低いため、次に受精卵にエピゲノム編集システムの RNA (図 2-2) あるいは DNA (図 2-3) を注入して個体を作製することにより作製の効率化をはかった。その結果 RNA を受精卵に導入する方法では、産仔は十分得られたが、エピゲノム編集された個体の数は少なかった。それに対し DNA を受精卵に導入する方法では、産仔は十分得られ導入した DNA が染色体に組込まれた個体では効率よくエピゲノム編集が起きていた。そこでこのマウスを用いて表現型解析をおこなったところ、Silver-Russell 症候群の患者でみられる症状のうち、胎児の発育遅延、

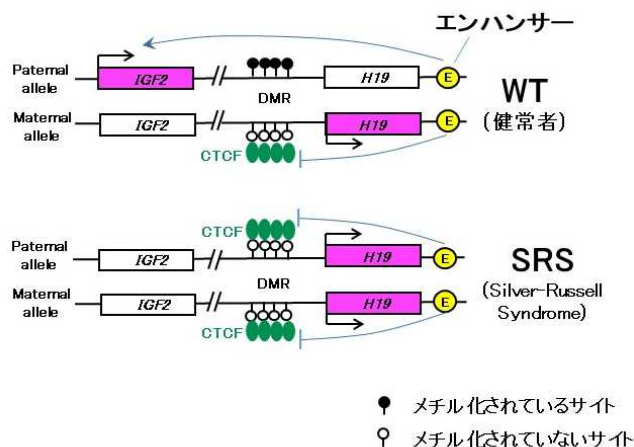
出生後の成長障害、顔貌の異常、食欲不振、低血糖、心臓の異常（線維化）、身体の左右非対称、頭が体の割に大きい、など多くの症状を再現しており、H19のエピゲノム変異がSilver-Russell症候群の原因であることを実証できた (Horii T et al. Genome Biology 2020)。

### エピゲノム疾患モデルマウス作製法の効率化

エピゲノム疾患マウス作製において、10kb以上の直鎖DNAをマイクロインジェクションで導入するため、染色体に外来DNAが挿入される効率は低かった。そこでPiggyBacを用いることにより挿入効率をおこなった。PiggyBacはトランスポゾンを利用したシステムであり、トランスポゼースがベクター上のITRを認識し、導入遺伝子をゲノム中のTTAA部位に挿入する。そこでエピゲノム編集システムをITRではさんだベクターを構築し、in vitro合成したトランスポゼースとともにインジェクションすることにより作製効率は、13%から37%と3倍上げることに成功した。

### 汎用性の高いエピゲノム疾患モデルマウス作製法

図1 Silver-Russell症候群(SRS)

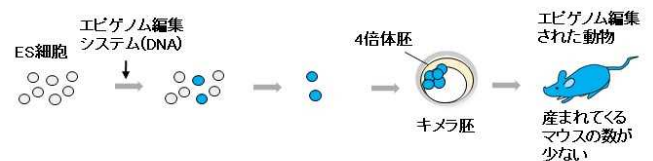


### の開発

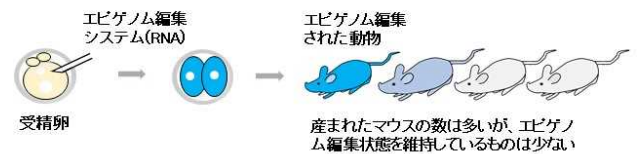
エピゲノム編集に必要なコンポーネントの中で特異性を決めているのはガイドRNA (gRNA)である。そこでガイドRNA以外のコンポーネントの遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、その動物にガイドRNAを導入できれば簡便に任意の遺伝子のエピゲノム編集をおこなうことができる。dCas9やエピゲノム因子などを含むコンポーネントをトランスジーンとして染色体に挿入されたマウスを作製した。この段階ではこれらのシステムは発現しないようプロモーター下流にDsRedとPolyA signalを配置しているため、マウスは赤色に光る。次にエピゲノム編集をおこないたい臓器にCreと自分が選んだ標的のgRNAを導入するとloxP間で組換えがおこりDsRedとPolyA signalが除去され、エピゲノム編集システムが働くと同時にGFPも発現しエピゲノム編集された臓器が緑色に光る。作製したマウスを用いると簡便に選んだ標的を臓器でエピゲノム編集することができる。実際に作製したマウスでエピゲノム編集システムが誘導できるかを確認したところ、Creに誘導されて緑色に光る細胞が観察された。また導入したH19のgRNAに対応するゲノムのメチル化を調べたところ脱メチル化されていることがわかった。以上のようにエピゲノムの変化を誘導するシステムを確立できた。

図2 エピゲノム編集によるモデル動物の作製法

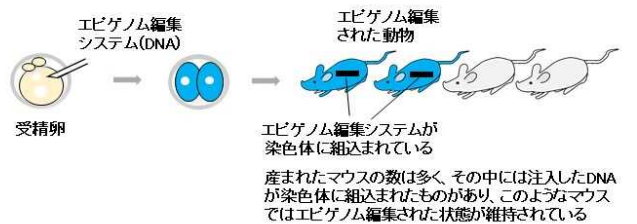
#### (1) テトラプロイドレスキュー法



#### (2) RNAを受精卵に導入する方法



#### (3) DNAを受精卵に導入する方法



## Support

We supported the creation of disease model animals (Flox, KO, and KI mice), which are essential for drug discovery and life science research, using our fast Flox mouse creation method (2-step method). 79 cases were performed. The number of publications is 6 papers and 14 presentations at conferences, although many of them have not been published yet.

## Advancement

### Improvement of the 2-Step Method

The 2-step method had a problem of cell fusion which would occur if the two-cell stage embryos were aligned in the same direction as the direction of the electric field during the second step of electroporation. We solved this problem by inhibiting the adhesion factor cadherin.

### Production of conditional KO mice at once

We have developed a method to simultaneously introduce the Cre gene at the time of creation of Flox mice.

## Creation of Mouse Models of Epigenomic Diseases

We attempted to develop epigenome editing technology to create animals in which only specific epigenomes were modified at the individual level. We have chosen Silver-Russell syndrome, an epigenomic disease, as a model for our study. This disease is thought to be caused by epimutations in the H19 gene. We demethylated the H19 gene by epigenome editing and generated Silver-Russell syndrome model mice in three different ways. In the first method, ES cells were transiently transfected with the demethylation editing system and only the epigenome was altered, and then individuals were generated using the tetraploid rescue method. However, the probability of producing pups by the tetraploid rescue method was quite low. Next, we tried two methods to inject RNA or DNA of the epigenome-editing system into fertilized eggs to produce individuals more efficiently. The RNA injection method produced enough offspring, but the number of epigenome-edited individuals was low. In contrast, the DNA injection method produced enough offspring, and epigenome editing occurred efficiently in individuals in which the introduced DNA was incorporated into the chromosomes.

### Improved Method for Generating Mice Models of Epigenomic Diseases

In the creation of mice with epigenomic diseases, the insertion efficiency of foreign DNA into chromosomes was low because linear DNA of 10 kb or more was introduced by microinjection. We succeeded in increasing the insertion efficiency by 3-fold by using PiggyBac vector.

## Development of a Versatile Epigenomic Disease Model Mouse

Among the components necessary for epigenome editing, guide RNA is the one that determines specificity. We developed a transgenic mouse with genes for components other than guide RNA which can be used for epigenome editing of any genes when guide RNAs are introduced into this animal.