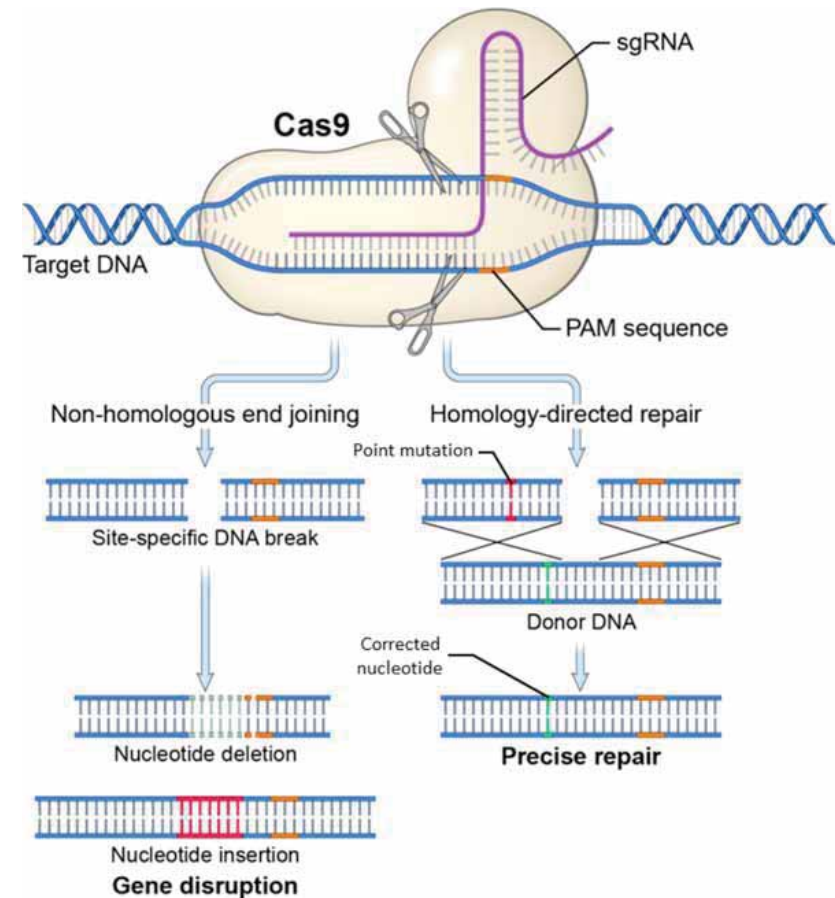
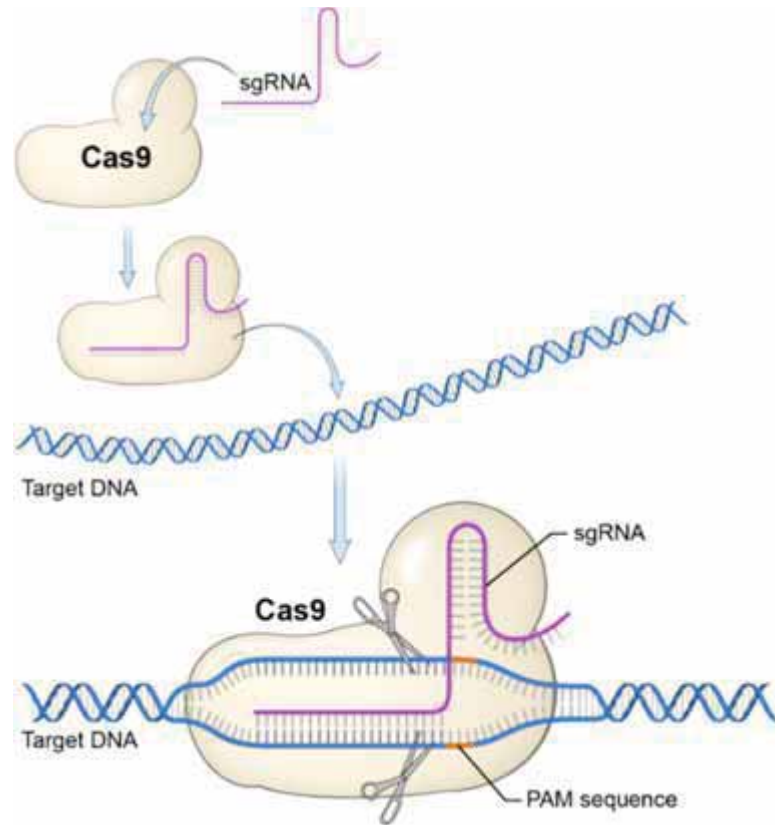


『動物胚ゲノム編集の現状』

大阪大学微生物病研究所
伊川 正人

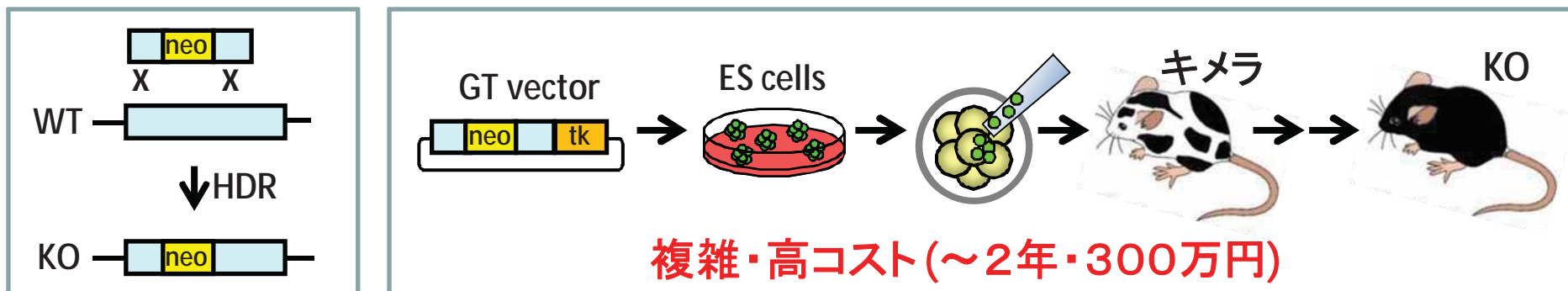
1. ゲノム編集技術の最新知見 (遺伝子改変マウス作製のパラダイムシフト)



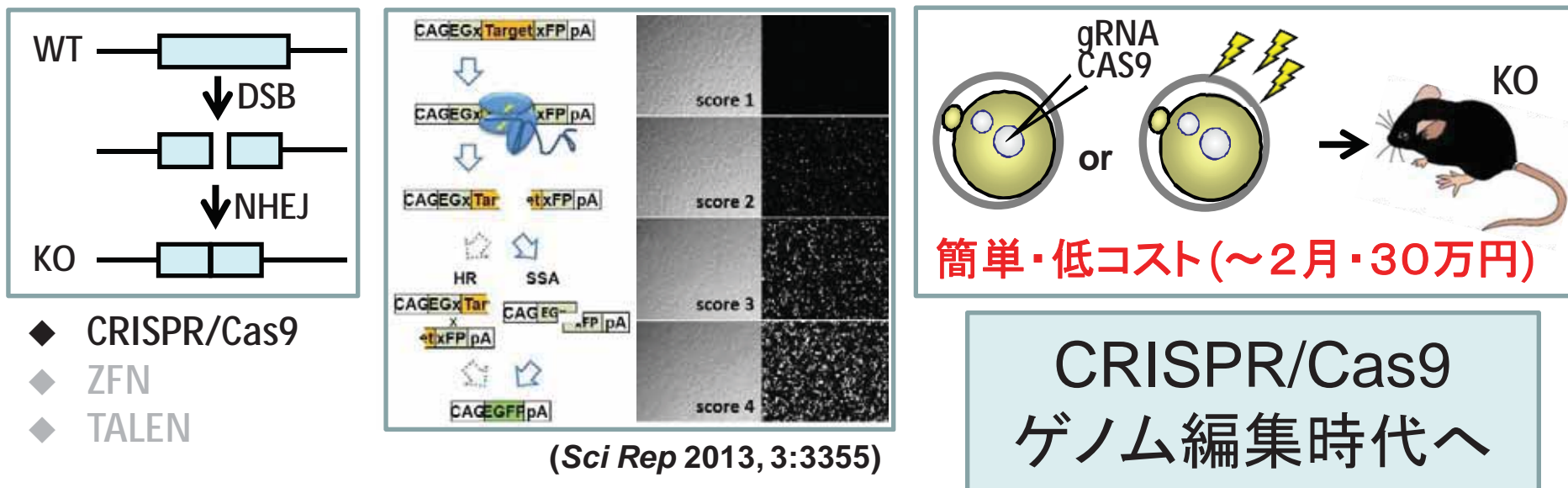
ほぼすべての
動物種に応用可能

ノックアウト (KO) マウス作製のパラダイムシフト

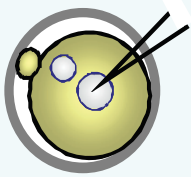

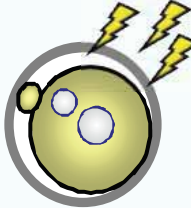

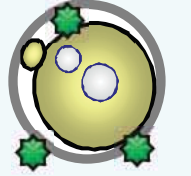
従来法 (相同組換え)



ゲノム編集 (欠損・挿入・置換)



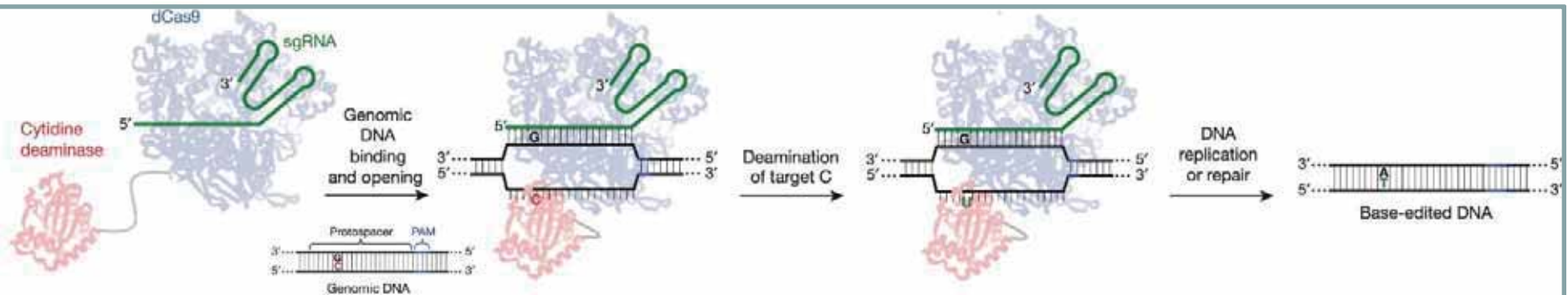
受精胚ゲノム編集法の開発・改良

方法	概念図	設備	特徴	受精胚応用
顕微注入法		<p>~1000万円</p> 	<p>手技: 難しい 生存率: 約90% 微細変異: 可 長鎖KI: 可</p>	<p>動物: 実績多い ヒト: 実績あり</p>
電気穿孔法 (EP法)		<p>~200万円</p> 	<p>手技: 簡易 生存率: 約95% 微細変異: 可 長鎖KI: 不可</p>	<p>動物: 実績多い ヒト: 未知</p>
ウイルスベクター法		<p>現場では不要</p>	<p>手技: 簡便 生存率: 約95% 微細変異: 可 長鎖KI: 可</p>	<p>動物: 実績少 ヒト: 未知</p>

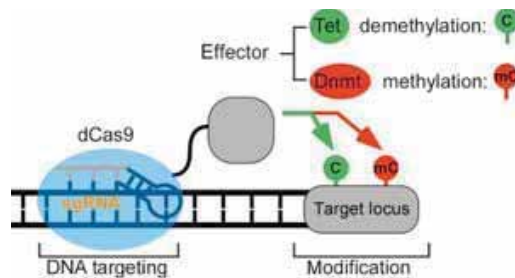
実験動物では、従来の顕微注入からEP法が主流になりつつある。
ウイルスベクター(LV、AAV)の活用も期待されている。

新たなゲノム・エピゲノム編集技術の開発

主な原理：DNA切断活性を持たないCAS9に酵素を繋ぎ、gRNAを用いて標的遺伝子座に運んで作用させる。



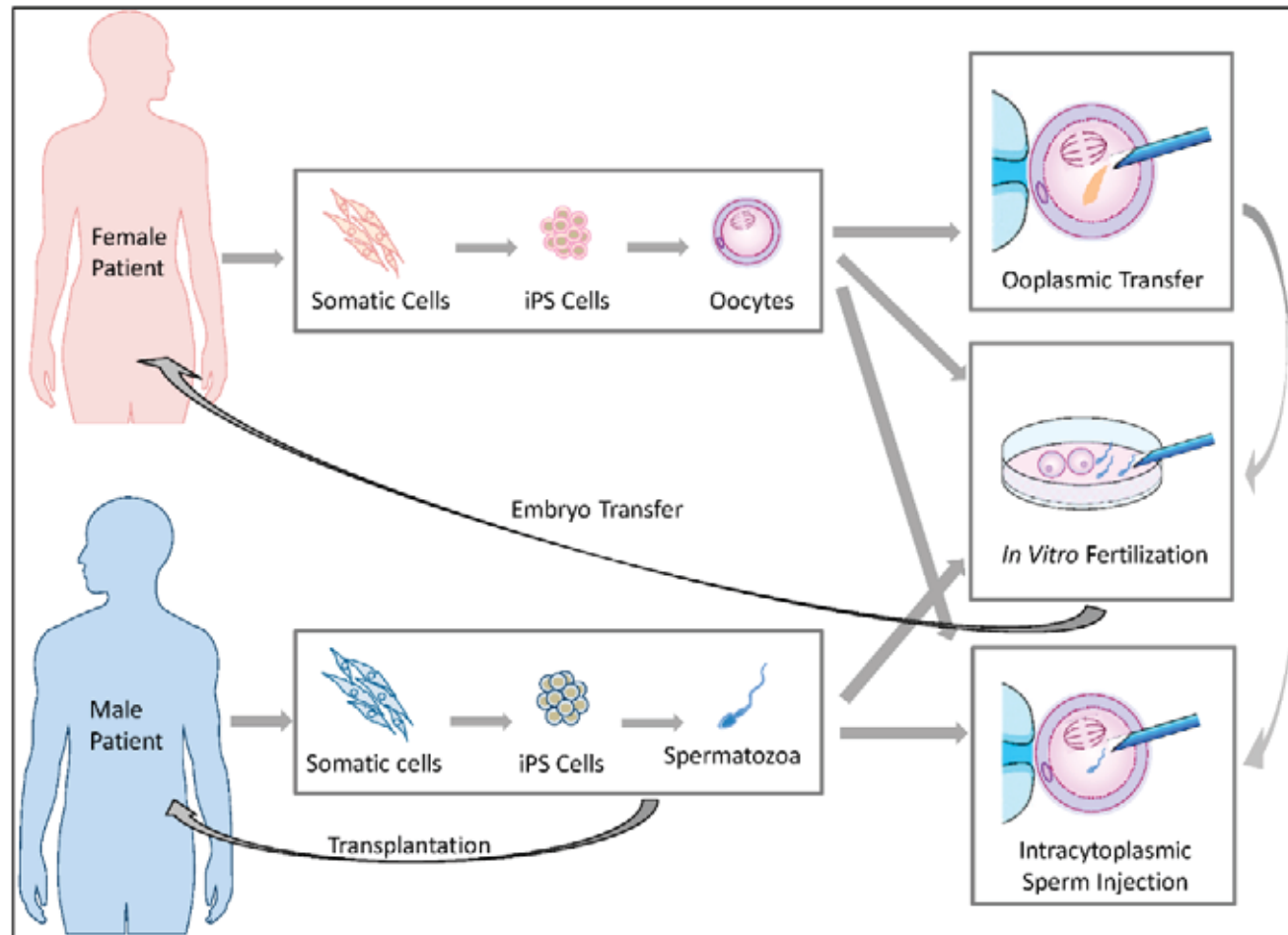
【図1】CRISPR/Cas9を改変した、切らないゲノム編集。シトシン(C)をウラシル(U)に変換するCytidine deaminaseという酵素を使って、標的配列をG Aに変換することができる。(Nature, 2016, 533; 420)



【図2】CRISPR/Cas9を改変したエピゲノム編集。標的配列のメチル化・脱メチル化ができる(正確性に難点)。(Nature Biotech 2018, 36;315)

他に、光・薬剤応答性など、新たな遺伝情報改変技術開発が盛ん。

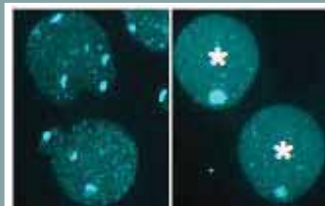
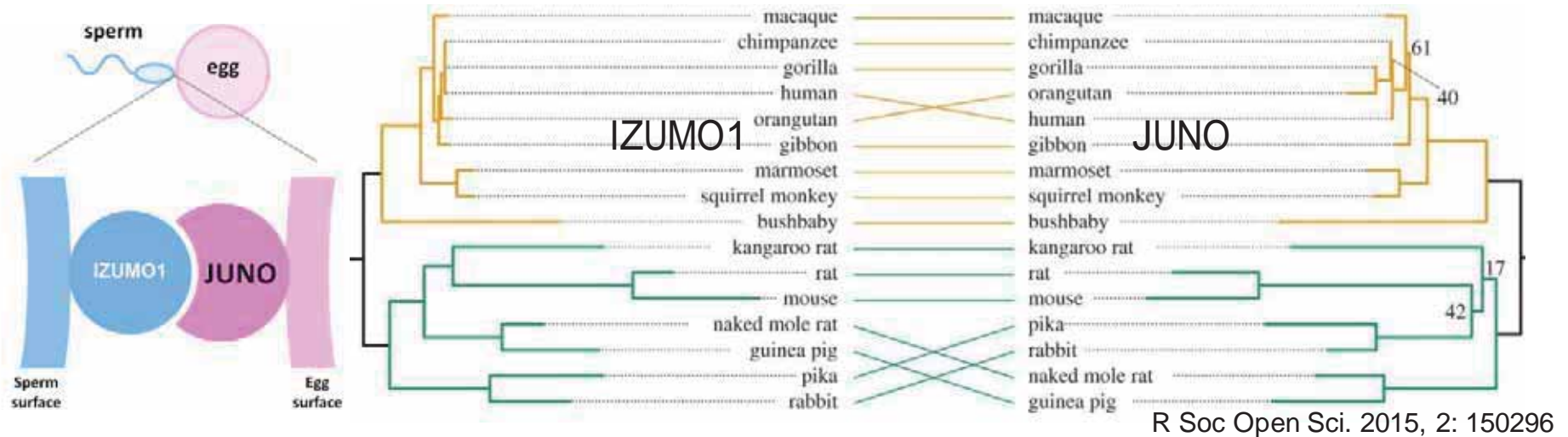
2. ヒト胚ゲノム編集に類似する 動物胚ゲノム編集研究



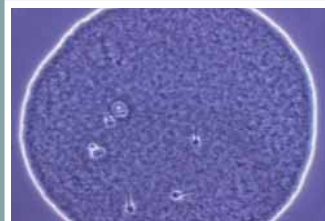
マウスES/iPS細胞から試験管内卵子形成が実現
試験管内ヒト精子・卵子形成の研究が進展中

ES/iPS細胞由来の配偶子
を用いた受精胚も対象？

受精関連分子進化と生殖隔離



IZUMO1とJUNOが卵子と精子の融合に必須(マウス)。
受精関連分子の分子進化は生殖隔離による種特異性にも関連する。
ヒト不妊症の原因遺伝子となるか、検証が待たれる。

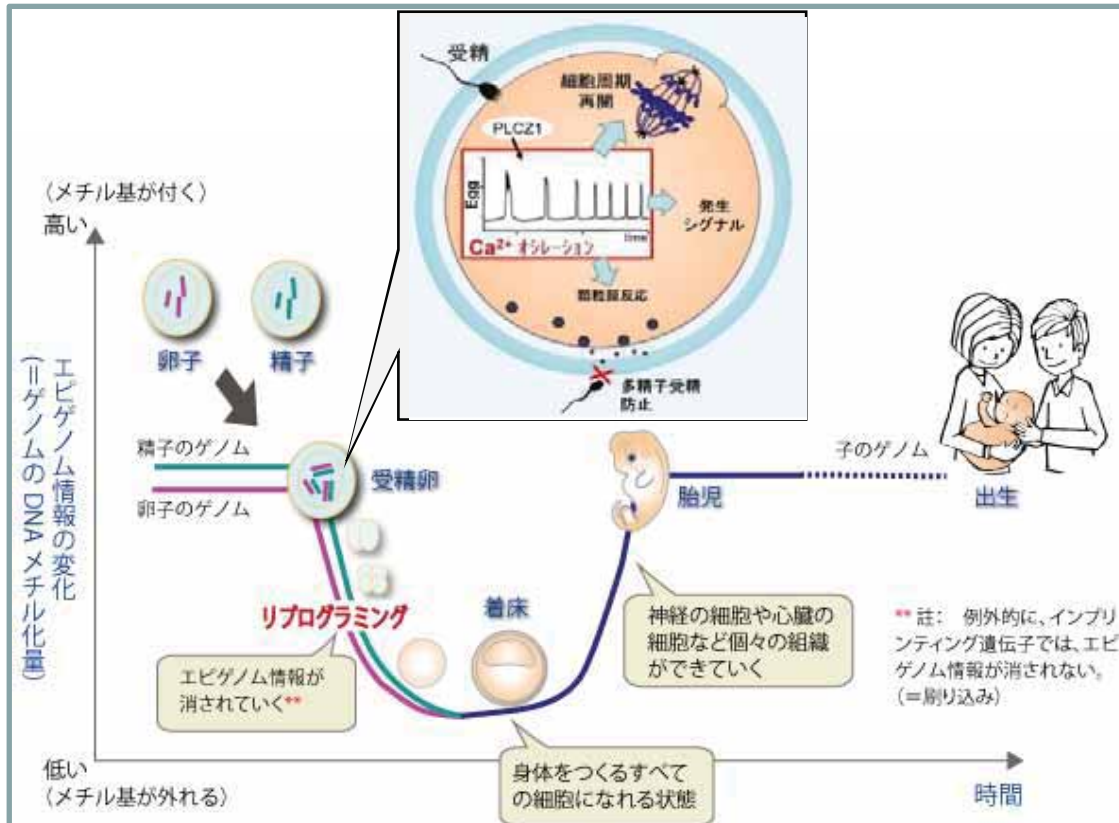


ハムスターテスト: 以前は、透明帯を除去したハムスター卵子が異種精子と融合できることを利用してヒト精子受精能が検討されていた。発生することはなく、多精子受精となる(日本では、クローン技術規制法に基づく特定胚指針においてヒト動物交雑胚作成を禁止)。

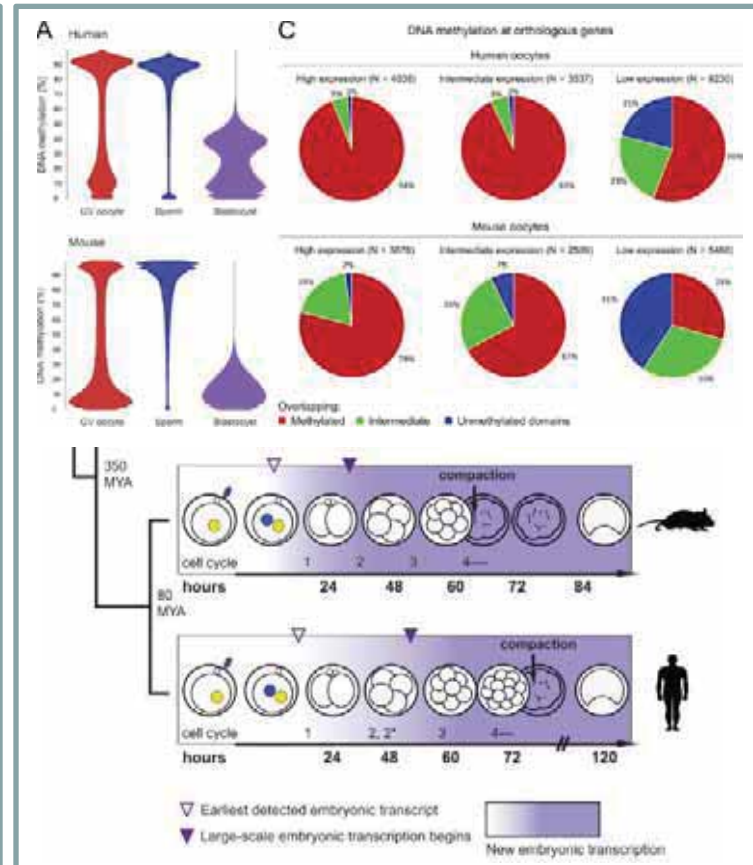
ヒト受精研究は実験動物では限界がある。
ヒト動物交雑胚の作成は指針で禁止されている。

ゲノム編集配偶子を用いた
新規胚作製の必要性

受精前後のエピゲノム修飾と遺伝子発現



【図1】精子・卵子エピゲノムは、受精後、数時間の間に初期化(リプログラミング)される。不妊治療で問題となる卵子活性化なども含めた研究が必要。
(http://crest-ihec.jp/public/epigenome_health.html)

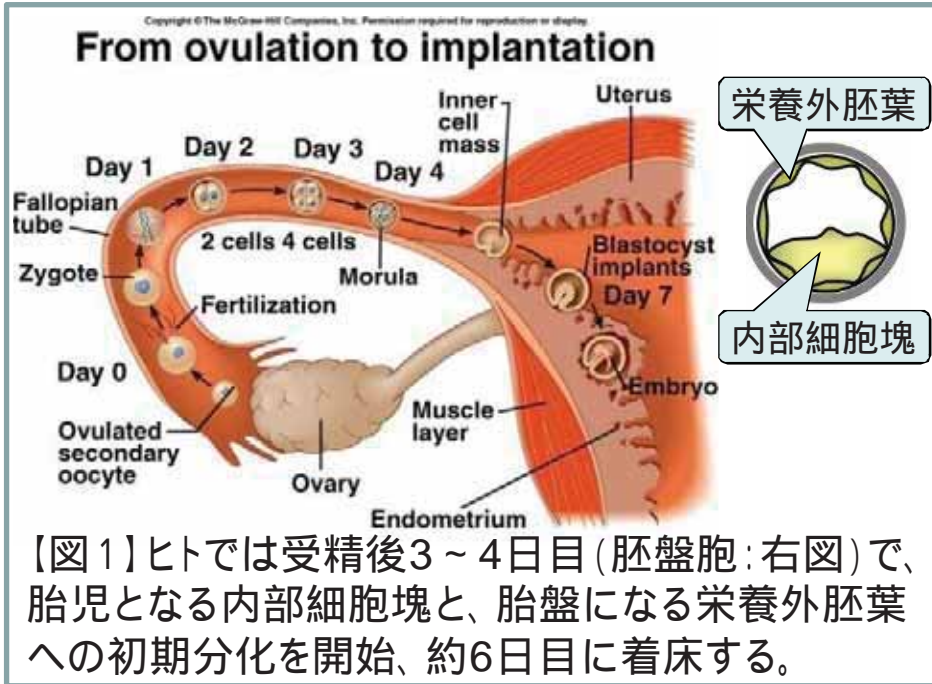


【図2】受精前後のエピゲノム修飾、受精後遺伝子発現はヒトとマウスで異なる。
(Hum Reprod Update. 2018, 24: 556
Dev Cell. 2017, 42: 316)

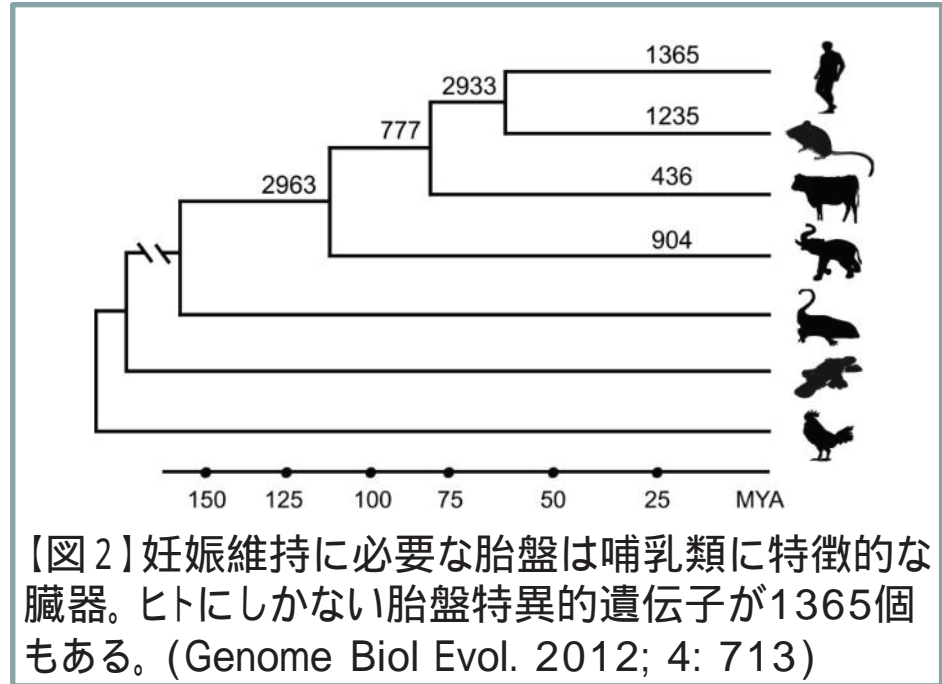
受精前後のエピゲノム変化は著しい。
余剰胚では受精時・直後の解析ができない。

ゲノム・エピゲノム編集配偶子を用いた新規胚作製の必要性

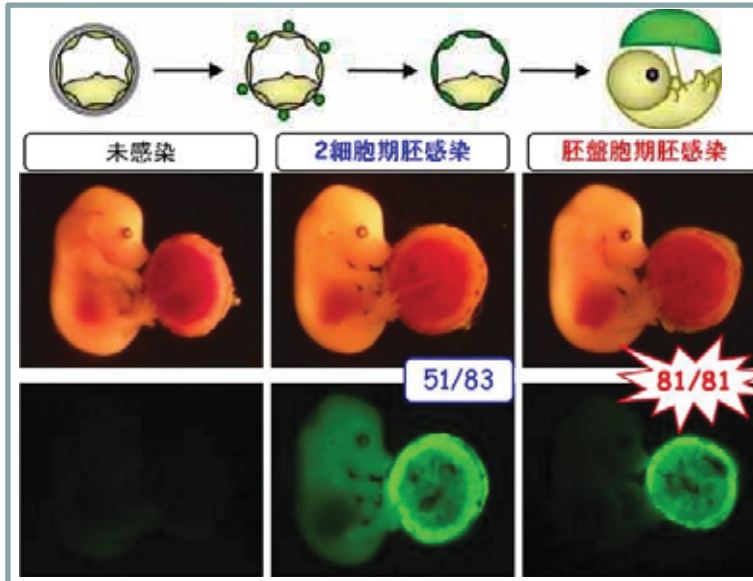
初期発生分化と着床・胎盤形成



【図1】ヒトでは受精後3～4日目(胚盤胞:右図)で、胎児となる内部細胞塊と、胎盤になる栄養外胚葉への初期分化を開始、約6日目に着床する。



【図2】妊娠維持に必要な胎盤は哺乳類に特徴的な臓器。ヒトにしかない胎盤特異的遺伝子が1365個もある。(Genome Biol Evol. 2012; 4: 713)



【図3】胚盤胞期胚へのウイルスベクター感染で胎児の遺伝子を改変することなく胎盤特異的遺伝子操作が可能(Nat Biotech 2007, 25: 233)

胎盤異常が原因の致死遺伝子はマウスで100以上知られている。20%を超えるヒト流産の原因究明へ。

余剰胚を用いた着床不全・不育の原因究明や治療研究の可能性

着床前診断による選別 vs ゲノム編集治療

着床前診断の流れ

妻

夫

卵子

精子

体外受精

受精卵

発育した受精卵

一部の細胞を取り出し、
遺伝子や染色体を検査

異常がない受精卵を子宮に戻す

【図1】着床前胚の一部細胞を用いて、遺伝子診断すれば、正常胚を選別して移植できる(優性、劣性により遺伝リスクが異なる)。遺伝子診断後に残った胚は既に多細胞であるためゲノム編集治療が難しい。診断せずにゲノム編集を先に施すと正常胚まで操作するリスクがある。

着床前診断とゲノム編集治療
の比較検討が必要

<https://www.asahi.com/articles/SDI201711107067.html>

ゲノム編集胚

未処理胚

比較

【図2】遺伝情報が全く同じ一卵性双生児は、2細胞期胚で割球が分離することで生まれる。2細胞期胚を人為的に分離すれば、着床前診断とゲノム編集治療を併用できる可能性がある。(日本では、クローン技術規制法に基づく特定胚指針においてヒト胚分割胚作成を禁止)

2細胞期胚ゲノム編集の研究

まとめ

受精胚ゲノム編集技術開発

受精胚の種や導入時期によって、遺伝子導入およびゲノム編集効率が異なる。ヒト余剰胚を用いて安全で高確率のゲノム編集ツールを開発することに加え、新規胚を用いた最終確認が必要。

基礎研究(生殖)

生殖機構は動物種により異なるために、実験動物を用いた解析には限界がある。特に受精や卵活性化、配偶子エピゲノム初期化メカニズムは、新規胚を用いた研究が必要となる。なお胎児に寄与しない栄養外胚葉系統でのゲノム編集なども有用性が高い。

応用研究(遺伝子治療)

着床前受精診断との使い分けが課題。オフターゲット切断リスクなどは動物種や細胞種により異なるため、ヒト余剰胚の活用が期待される。

その他

試験管内ヒト配偶子形成が実現すれば、新規胚作製、ゲノム編集技術適用の是非が問われる(生体移植後の配偶子形成・妊娠の扱いは?)。