

光応答性 CRISPR/Cas9システムを用いたマウス子宮における胚着床の *in vivo* 制御

高尾 知佳^{1,2)}, 升田 博隆²⁾, 佐藤 守俊³⁾, 丸山 哲夫²⁾

1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

2) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

3) 東京大学大学院総合文化研究科

はじめに

2012年、画期的なゲノム編集システム CRISPR-Cas9 が報告されて以来、瞬く間にこの技術は広まり現在まで世界中の研究室で利用されている。CRISPR-Cas9システムは、20bpの single-guide RNA (sgRNA) を用いてゲノム上の狙った DNA 配列を切断する Cas9 酵素によって、2本鎖 DNA の破壊が生じて非相同性末端結合あるいは相同性組換えを起こす^{1,2)} (図1)。Cas9の誘導方法には、プラスミド DNA や蛋白質 Cas9 を導入する方法やラパマイシンなどの薬剤を用いて、時間的に誘導する方法が知られている³⁾。しかしながら、Cas9は DNA 切断活性が常に On であり、発現するコントロールは可能だったとしても分解能力には限界があり、Cas9の On/Off を制御することはできなかった。そのため sgRNA が非特異的に結合し、別の標的を破壊するオフターゲット効果も問題となっている⁴⁾。そのため薬剤などの侵襲もなく、狙った組織や時間での時空間的なゲノム編集には限界があった。しかしながら、2015年、共著者の佐藤守俊教授の研究室より青色 LED 光照射により Cas9 の発現を制御可能な光応答性 CRISPR/Cas9 システム (以下光 Cas9) が報告された^{5,6)}。光 Cas9 システムとは二分割した不活化 Cas9 蛋白質に N 末端および C 末端側断片に光スイッチ蛋白質である Magnet システム (pMag および nMag) を連結し、青色光を照射すると Magnet の結合に伴い、断片化 Cas9 も互いに近接して結合し活性化 Cas9 となり DNA 切断活性を回復し、標的配列を切断できるようになる。さらに光照射をやめると Magnet は結合力を失い、Cas9 は元の不活化 Cas9 断片に戻り、DNA 切断活性を失う (図1)。このように光 Cas9 は光照射のみで Cas9 の発現や消失を非侵襲的に自在に操れて、か

つオフターゲット効果の減弱も期待できる画期的なシステムである。

子宮は月経周期毎に時間的ダイナミックな変動する組織で、とくに着床期には受精卵が着床するための最適な時期である implantation window が存在し、さまざまなホルモンやサイトカインの動態により制御されている⁷⁾。この時期に自由に Cas9 を誘導できれば時空間特異性をもった制御が可能となり、女性生殖器の生殖能さえも光照射により時間的制御が可能になると考えられた。本研究では、この光 Cas9 システムが実際に Cas9 として機能するのか、さらにはマウス胚着床を制御することが可能かについて検討を行うことにした。

方法

光 Cas9 システムが実際に機能するかについて、子宮体癌細胞株 Ishikawa (IK) 細胞に上皮マーカーである EpCAM プロモーター Ep-Pr を挿入した Luciferase 誘導細胞株として IK-Ep-Pr 細胞を作製した。この EpCAM プロモーターに対し特異的な sgRNA (sgProm) と対照群のコントロール sgRNA (sgCtrl) を作製した。In vitro 検討では IK-Ep-Pr 細胞に光 Cas9 プラスミドと sgProm または sgCtrl をトランスフェクションし、48時間後に青色光 ($470 \pm 20 \text{ nm}$; 1.2 Wm^{-2}) を24時間照射し、Luciferase 活性を確認した。in vivo 検討では免疫不全マウスに IK-Ep-Pr 細胞とマトリゲルの混合ゲルを皮下移植し、3-4週間後腫瘍形成を *in vivo* 2D/3D imaging system (IVIS) で Luciferase 活性を確認した後、腫瘍内または腹腔内に光 Cas9 プラスミドと sgProm を in vivo トランスフェクションし、24時間青色光で照射した後、IVIS で Luciferase 活性を検出した。

光 Cas9 胚着床モデルを作るために、着床期に特異的に発現し、着床を制御する leukemia inhibitory factor (LIF) に対する gRNA (sgLif) を作成した。交配確認後、ICR 雌マウス 2.5dpc に光 Cas9 プラスミドに加えて sgLif あ

連絡先: 高尾知佳, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2日5番1号
TEL: 086-235-7409
FAX: 086-235-7412
E-mail: ttakao@okayama-u.ac.jp

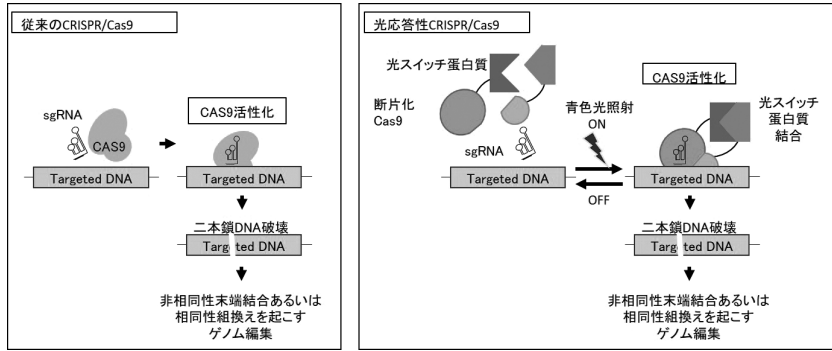


図1 従来のCRISPR/Cas9と光Cas9の違い
2点の明らかに異なる部分は、従来法ではCas9は分解消失するまでその活性を維持し続けるが、光Cas9の場合、照射をやめることにより光スイッチ蛋白質の結合が外れるため、Cas9も断片化し、不活化することである。

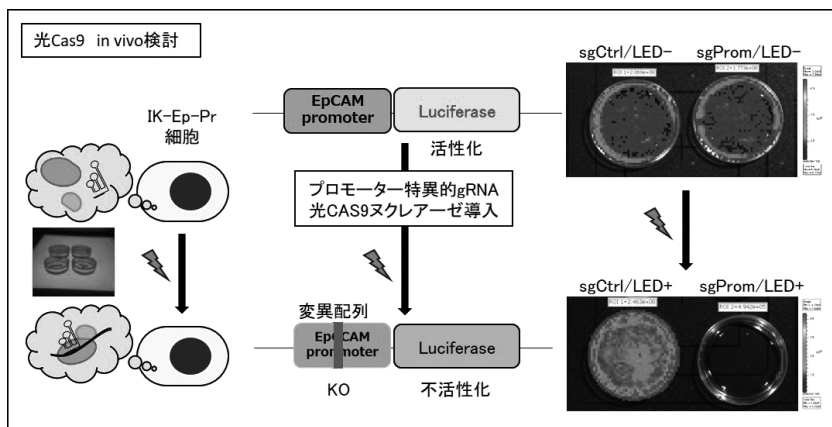


図2 IK-Ep-Pr細胞による光Cas9を用いたin vitro検討
EpCAMプロモーター-特異的なsgRNA (sgProm)を導入し光を照射するとLuciferase活性が抑制されていることがわかる。

るいはsgCtrlを腹腔内投与し、3-3.5dpcに青色LED (470±20 nm; 132 Wm⁻²)をマウス全体に24時間照射した。4.5dpcでLIFの発現を確認し、7.5dpcで着床数を検討した。さらにレスキュー実験として、sgLif投与群のLED照射前にリコンビナントLIF (recLIF)を子宮内へ投与し、7.5dpcで着床数の検討を行った。

光Cas9 in vitro 検討

光Cas9がin vitroで実際にCas9として機能をするかについて検討するため、EpCAMプロモーター搭載のLuciferase活性をもつIK-Ep-Pr細胞に光Cas9プラスミドとsgPromまたはsgCtrlをトランスフェクションし、青色光照射後Luciferase活性を確認した。図2に示すように、CtrlではLuciferase活性は維持されていたが、EpCAMプロモーター-特異的なsgRNAを導入した細胞では著しくLuciferase活性が抑制されていた。このことか

ら、in vitroで光Cas9は機能することがわかった。

光Cas9 in vivo 検討

次にIK-Ep-Pr細胞を用いてin vivo腫瘍マウスを複製し、その腫瘍内または腹腔内へ、先ほどと同様に光Cas9プラスミドとsgPromまたはsgCtrlをin vivoトランスフェクションした。青色光照射後、Luciferinを腹腔内投与し、IVISでLuciferase活性を確認した(図3)。その結果、腫瘍内および腹腔内両者ともにLuciferase活性が抑制されていることが確認できた(図4)。以上の結果より、in vitroおよびin vivoともに光Cas9が機能することが明らかとなった。

光Cas9着床モデル

これらの検討を踏まえ、光Cas9で制御される胚着床

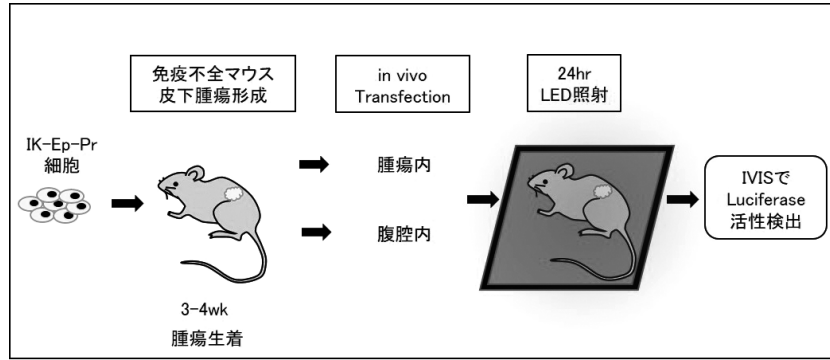


図3 K-Ep-Pr細胞による腫瘍に対する光 Cas9を用いた in vivo 検討のシエマ

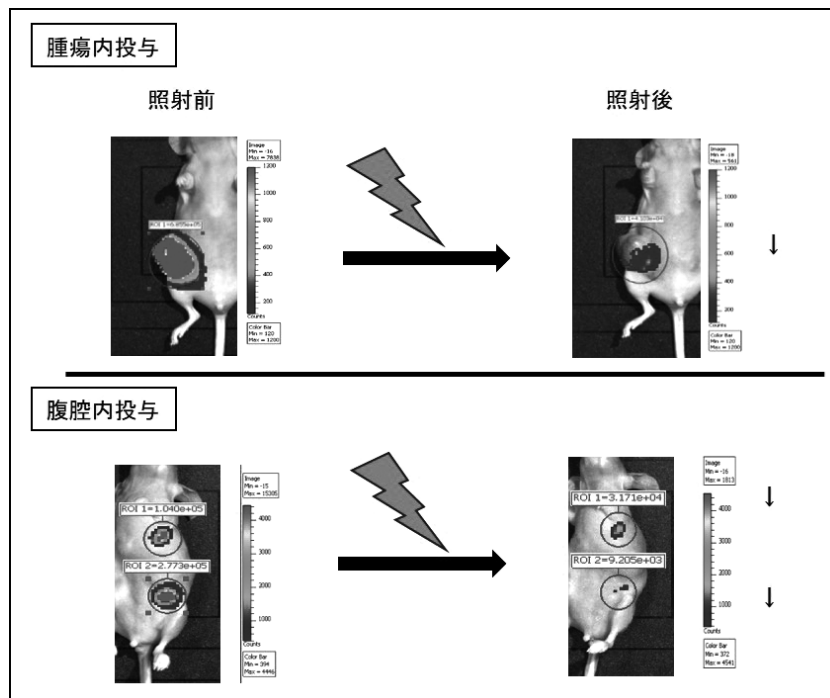


図4 腫瘍マウスに対する光 Cas9を用いた in vivo 検討
光 Cas9 および sgRNA を腫瘍内または腹腔内投与し光照射によりとも Luciferase 活性が抑制された。

モデルの作製を行った. このモデルを作製するにあたり, マウスの implantation window に匹敵する時期に発現ピークを迎え, 着床を制御することがすでに知られている Lif 遺伝子を標的遺伝子とした. Lif のコンディショナルノックアウトマウスでは脱落膜化形成ができないことから, 着床不全になることが知られている⁸⁾. さらに, Lif 分泌ピーク前日に Lif 阻害剤を腹腔内投与することで, 着床が阻害されることもすでにわかっている⁹⁾. 光 Cas9を用いてこれらと同様の結果が得られるか検討を行った. 実際の光 Cas9胚着床モデル作製の流れを図5に示す. 交配後プラグチェックした日を0.5日目とし, 2.5日目に光 Cas9および sgLif あるいは sgCtrl を腹腔内投与する. 3-3.5日目に青色光を下部全体から照射し, 4.5

日目および7.5日目に子宮を採取し Lif 発現および着床数を検討した. この際, 妊娠コントロール群を sgCtrl + 青色光照射群および sgLif + 青色光非照射群とし, ノックアウト群を sgLif + 青色光照射群とした. 4.5日目のマウス子宮を調べた結果, 妊娠コントロール群で強い LIF 発現が認められたが, LED 照射を行ったノックアウト群では LIF の発現が減少した (data not shown). さらに, 7.5日目のマウス子宮内胎児数では, 妊娠コントロール群に比較してノックアウト群では, その数が有意に減少した (妊娠コントロール群① sgCtrl/LED + : 13.6 ± 1.50 , ② sgLif/LED - : 14.8 ± 2.64 , ノックアウト群 sgLif/LED + : 1.8 ± 1.6 (各々 n = 5), 妊娠コントロール①, 妊娠コントロール② vs. ノックアウト群,

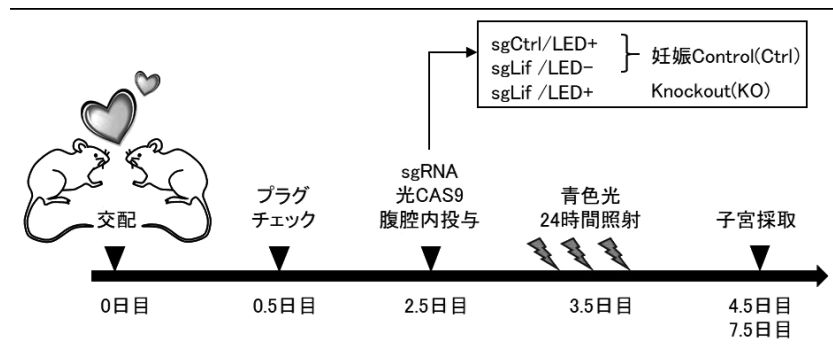


図5 光 Cas9による in vivo 胚着床モデル作製のシエマ

各 $p < 0.01$).

次に, Lif は分泌タンパク質であることから, *sgLif* によるノックアウトマウスがリコンビナント Lif (*recLif*) によりレスキューできるかを検討するため, 図5のシエマに加え, 青色光照射直前に PBS 投与群 (KO-PBS) と *recLIF* 投与群 (KO-*recLIF*) を作製し, 7.5日目の着床数を検討した. 結果として, *recLIF* 投与により *sgLif* 群による着床数の減少がキャンセルされ, 妊孕能が回復した (KO-PBS 群: 1 ± 1.41 , KO-*recLIF* 群: 8.86 ± 5.72 , $p < 0.05$).

終わりに

本研究では, 光 Cas9を用いて in vivo 胚着床モデルの作製に成功した. 明らかに機能がわかっていた Lif を用いることで, 光 Cas9の有用性が証明できた. このモデルで明らかとなったことは, 青色光の生体組織透過性が不確かであるなか, 光 Cas9は感度が高いことから子宮への外部光源照射で結果が得られたことである. 光 Cas9は Cas9で問題になっている DNA 切断活性の持続性を短く制御できることから, オフターゲット効果に関する問題も低減できるかもしれない. また, 今回は腹腔内投与での結果であるが, 子宮にかかわらずさまざまな組織での応用を考えると静脈投与法を用いることも可能である. 今後これらの手法を用いてこれまで明らかとなっていなかった着床関連の遺伝子解析や implantation window での重要性などを非侵襲的かつ時空間的に解析することが可能となるだろう. また, 本執筆者は PA-Cas9と同じ光遺伝学手法を用いたテトラサイクリン誘導発現系 TRE-PA-Cre (光応答性 Cre-loxP システム) マウスの開発¹⁰⁾にも携っており, 今後, さまざまなゲノム編集や遺伝子改変システムが光遺伝学とともに進歩することを期待している.

謝辞

本稿は, 令和元年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものです. 本稿を執筆する機会を与えてくださいました, 日本生殖内分泌学会理事長 緒方勤教授, 第24回学術集会会長 市川智彦教授ならびに本誌編集委員の先生方に心から感謝申し上げます.

引用文献

1. Mali P, Esvelt K M & Church G M (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10, 957-963.
2. Perez-Pinera P et al (2013) RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* 10, 973-976.
3. Gupta M B & Jansson T (2019) Novel roles of mechanistic target of rapamycin signaling in regulating fetal growth-dagger. *Biol Reprod* 100, 872-884.
4. Naito Y, Hino K, Bono H & Ui-Tei K (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* 31, 1120-1123.
5. Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T & Sato M (2015) Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol* 33, 755-760.
6. Nihongaki Y, Yamamoto S, Kawano F, Suzuki H & Sato M (2015) CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem Biol* 22, 169-174.
7. Kao L C et al (2002) Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143, 2119-2138.
8. Kimber SJ (2005) Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 130, 131-145.
9. White C A et al (2007) Blocking LIF action in the uterus by using a PEGylated antagonist prevents implantation: a nonhormonal contraceptive strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19357-19362.
10. Takao T, Hiraoka Y, Kawabe K, Yamada D, Ming L, Tanaka K, Sato M, Takarada T (2020) Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. pii: S0006-291X (20) 30485-X, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.015.