

ゲノム、エピゲノム編集による 生体制御

群馬大学 生体調節研究所
ゲノム科学リソース分野
教授 畑田 出穂

2024年10月22日

1. 脱メチル化酵素と転写関連因子またはクロマチン
関連因子を用いた特定遺伝子の相乗的発現誘導法
2. 子宮がんモデル非ヒト動物の製造方法

1. 脱メチル化酵素と転写関連因子またはクロマチン
関連因子を用いた特定遺伝子の相乗的発現誘導法
2. 子宮がんモデル非ヒト動物の製造方法

従来技術とその問題点

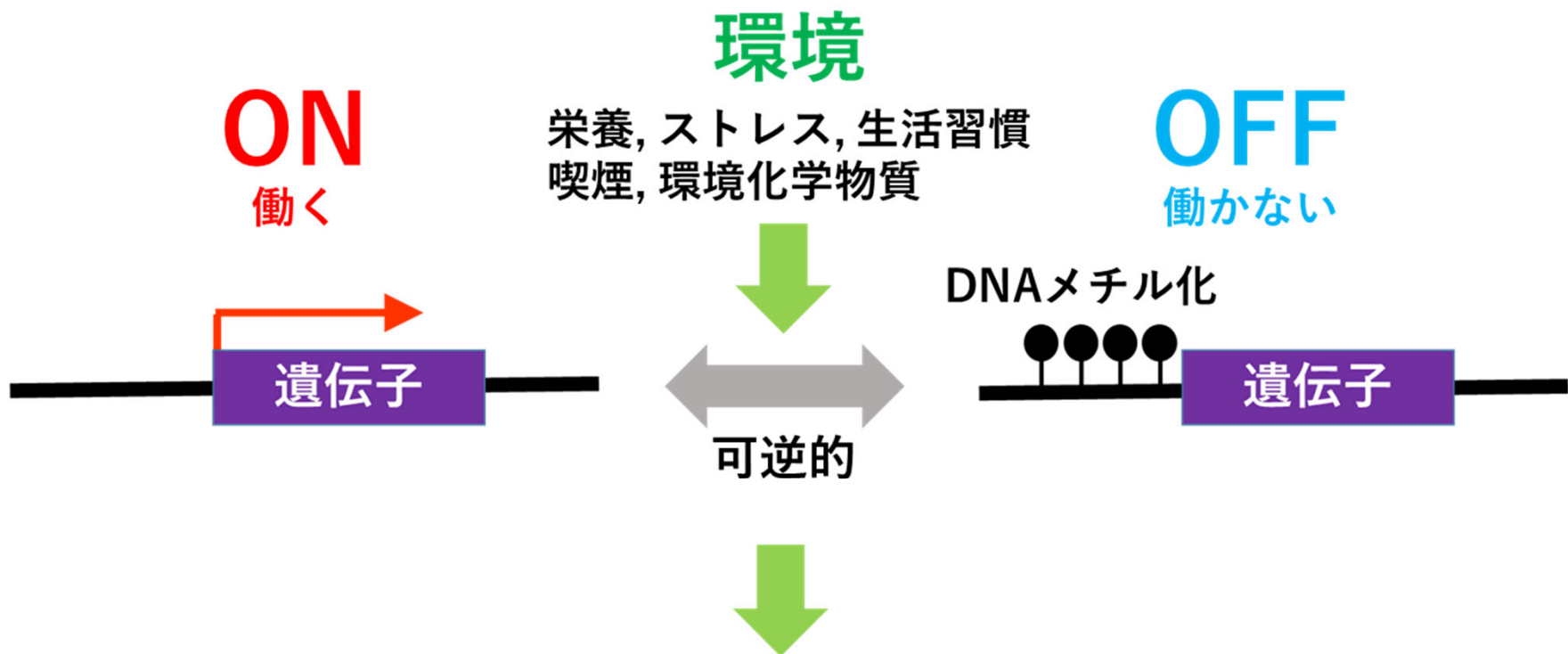
既に実用化されているものには、我々が以前に開発した「DNAメチル化編集用キットおよびDNAメチル化編集方法」(特許第6500293号)等があるが、

発現誘導の程度が小さい

等の問題がある。

エピゲノムとは？

エピゲノムは遺伝子のスイッチのようなもので、遺伝子の働きを調整する。エピゲノムにはDNAのメチル化とヒストンの修飾がある。



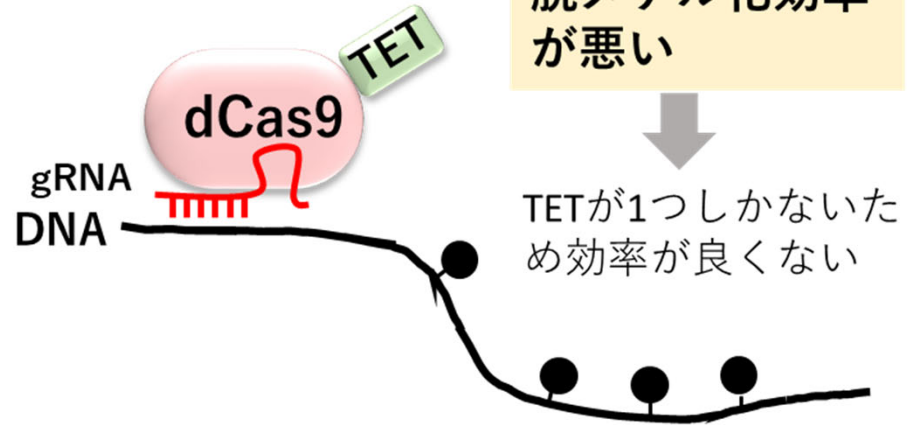
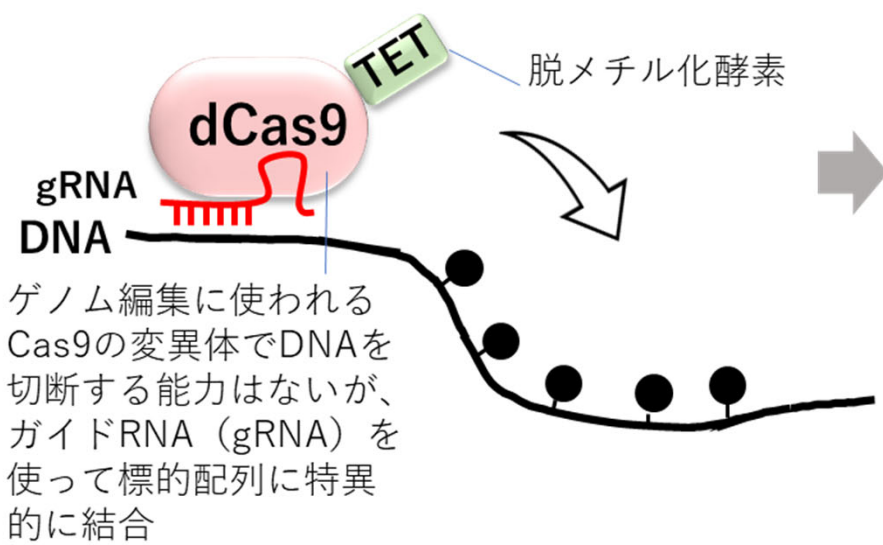
がん・肥満・糖尿病・動脈硬化・精神疾患・
自己免疫疾患・アレルギー疾患・依存症・自閉症

従来の特定領域のエピゲノムを操作する技術

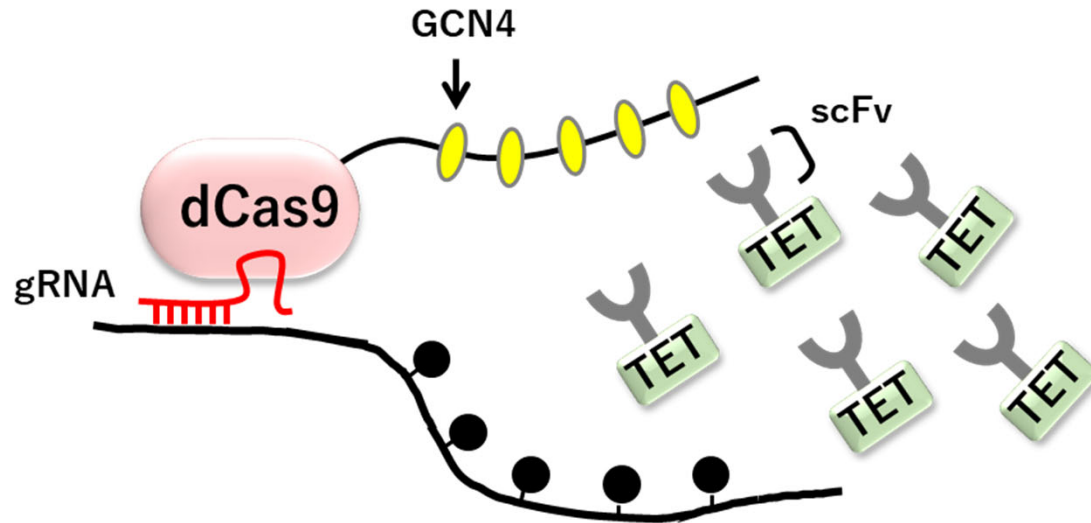
直結型

dCas9と脱メチル化酵素であるTETを結合させたタンパク質を作り、標的にリクルート

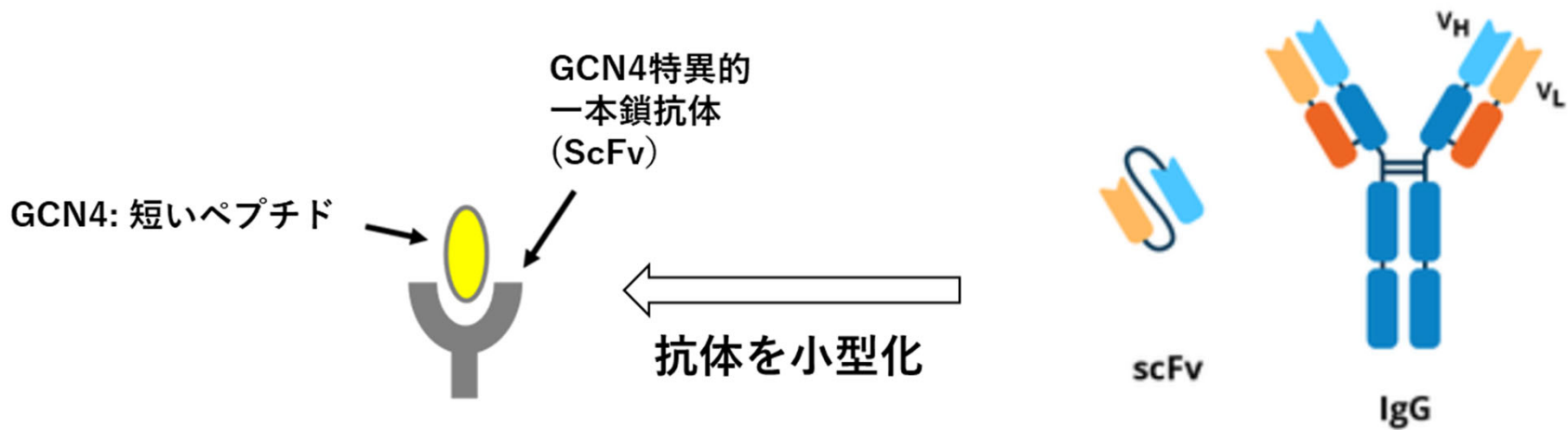
直結型では
脱メチル化効率
が悪い



dCas9に多くのTETをリクルート

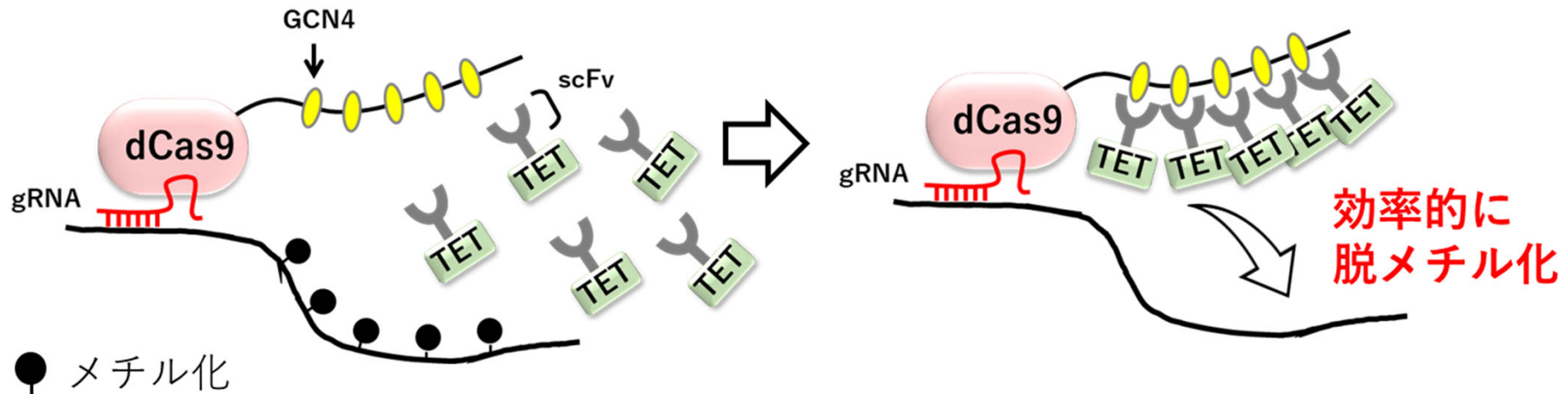


エピトープと一本鎖抗体(scFv)を利用した増幅法



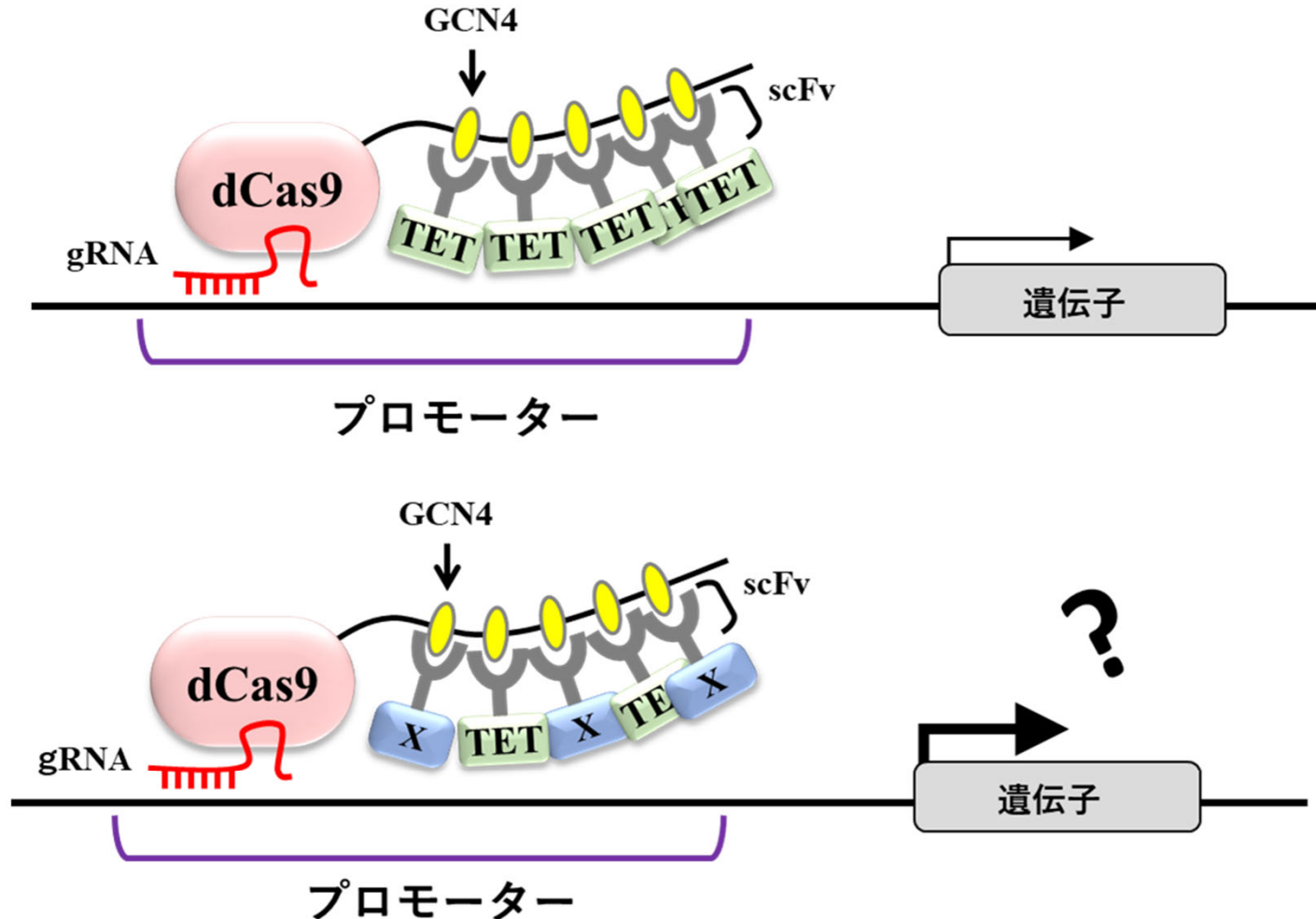
<https://blog.addgene.org/antibodies-101-single-chain-fragment-variables-scFvs>

dCas9の後ろに複数のGCN4をつなげたものと、一本鎖抗体にTETを融合させたものを使用することで、標的に多くのTETをリクルートし、効率的に脱メチル化



Morita S et al. Nat Biotechnol. 2016 34:1060-1065.
特許第6500293号

特定の遺伝子の発現を効率的に上昇させるには？



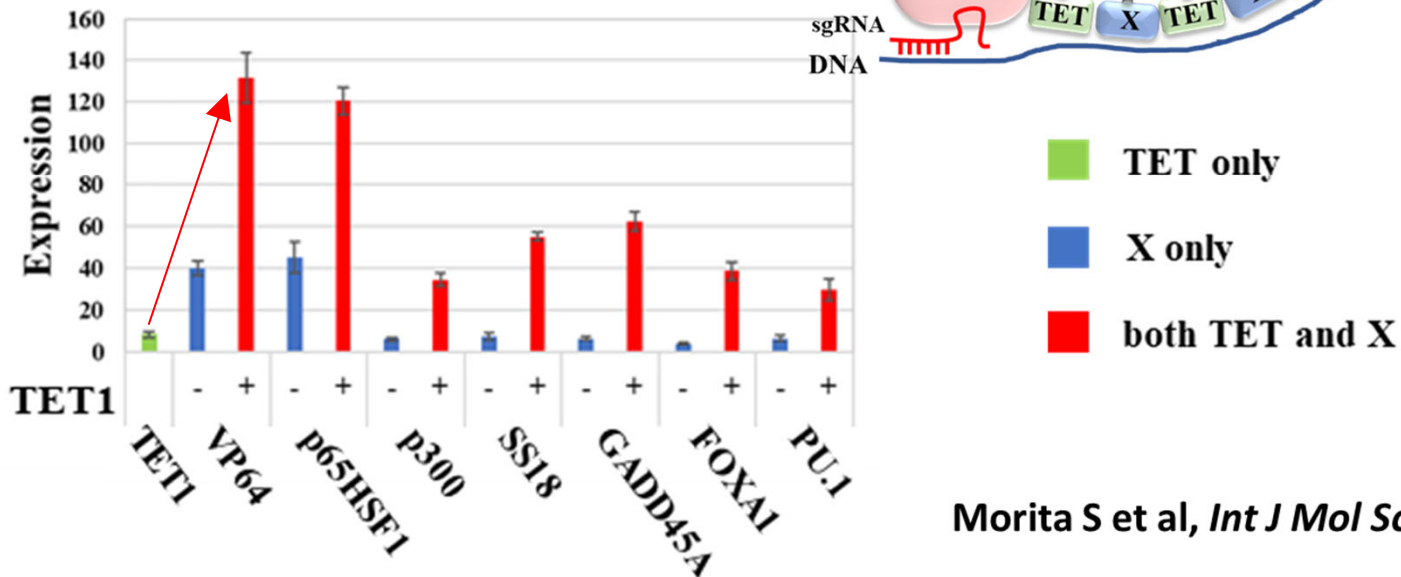
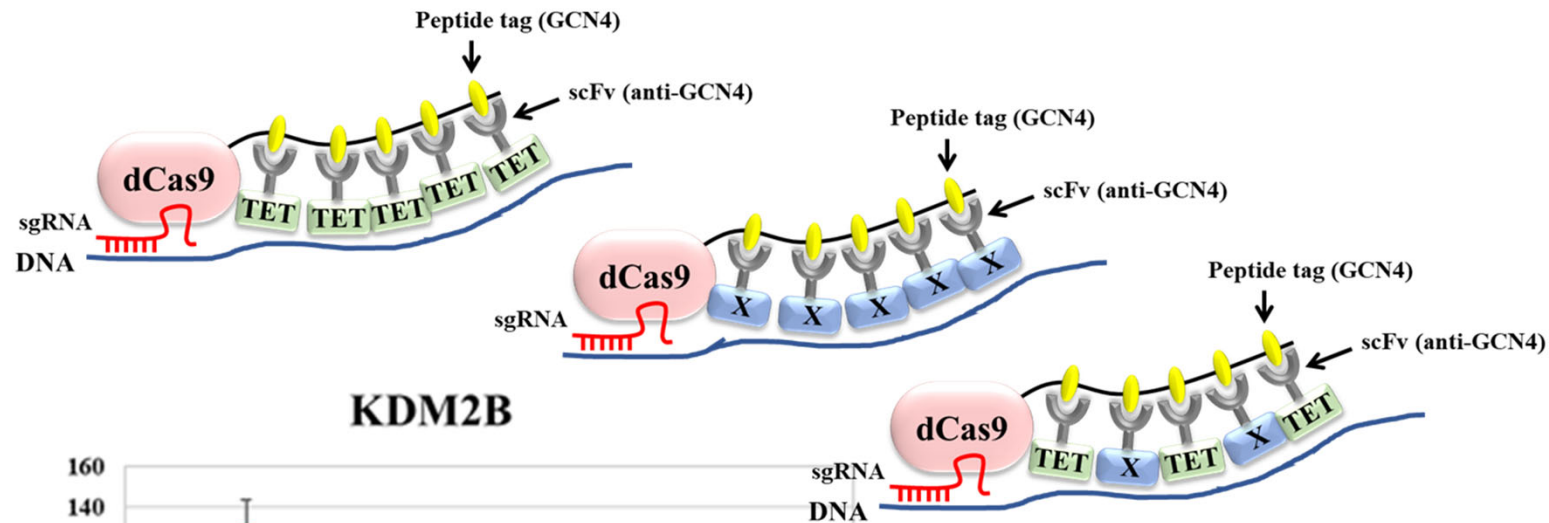
Factor X

VP64, p65HSF1, p300, SS18, GADD45A, FOXA1, PU.1

TET1とFactor Xに相乗効果がみられる

Factor X

VP64, p65HSF1, p300, SS18, GADD45A, FOXA1, PU.1



Morita S et al, *Int J Mol Sci.*, 2020

TET1と転写因子の組み合わせは相乗効果が高い

遺伝子

		遺伝子										
		CARD9	KDM2B	RAB19	CNKSR1	SBNO2	SPARC	CLEC11A	HGF	TCF21	TINAGL1	
転写因子	VP64	■	■	■	■	■	■	■	■			
	p65HSF1	■	■	■		■	■					
ヒストンアセチル化酵素	p300	■	■									
クロマチンリモデリング因子	SS18	■	■				■					
ヘテロクロマチン因子リラクサー	GADD45A		■									
パイオニア因子	FOXA1	■	■									
	PU.1		■									

TET1は1.5- 78 x の発現誘導

TET1+VP64は3.5- 1139 x の発現誘導

1.8x - 21x (平均6.5 x)の相乗効果

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、発現誘導の程度を改良することに成功した。従来法では最大7.8倍の発現誘導だったものが1.139倍まで発現誘導を改善できた。

想定される用途

- CRISPRスクリーニングで標的遺伝子の発現を効率的に上昇させることができる。

CRISPRスクリーニングは、特定の生物学的プロセスや病気の状態における遺伝子の役割を特定するために、ゲノム全体の遺伝子を体系的にノックアウト（機能を停止）または活性化する技術。この方法は、特定のDNA配列をターゲットにするためにガイドRNAを使用してプログラムできるCRISPR-Cas9システムを利用する。これにより、遺伝子をオンまたはオフにする効果を研究することが可能。

CRISPRスクリーニングは、遺伝子機能のハイスループット解析を可能にし、遺伝学、病気のメカニズム、および潜在的な治療ターゲットの発見につながる可能性がある。

企業への期待

- 遺伝子のスクリーニングを考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 脱メチル化酵素と転写関連因子またはクロマチン関連因子を用いた特定遺伝子の相乗的発現誘導法
- 出願番号 : 特願2020-028694
- 出願人 : 群馬大学
- 発明者 : 畑田 出穂、森田 純代

1. 脱メチル化酵素と転写関連因子またはクロマチン
関連因子を用いた特定遺伝子の相乗的発現誘導法
2. 子宮がんモデル非ヒト動物の製造方法

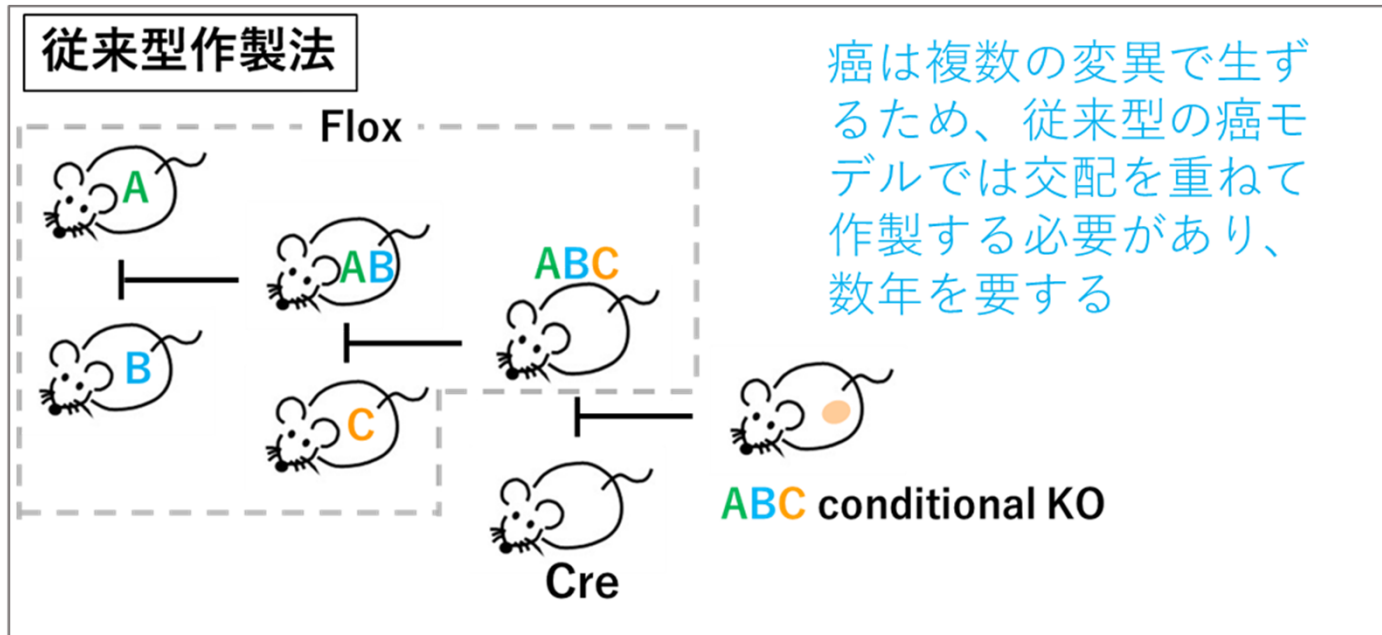
従来技術とその問題点

発がんモデルマウス作製で既に実用化されているものには、コンディショナルノックアウト法等があるが、

マウス作製に時間がかかりすぎる

等の問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

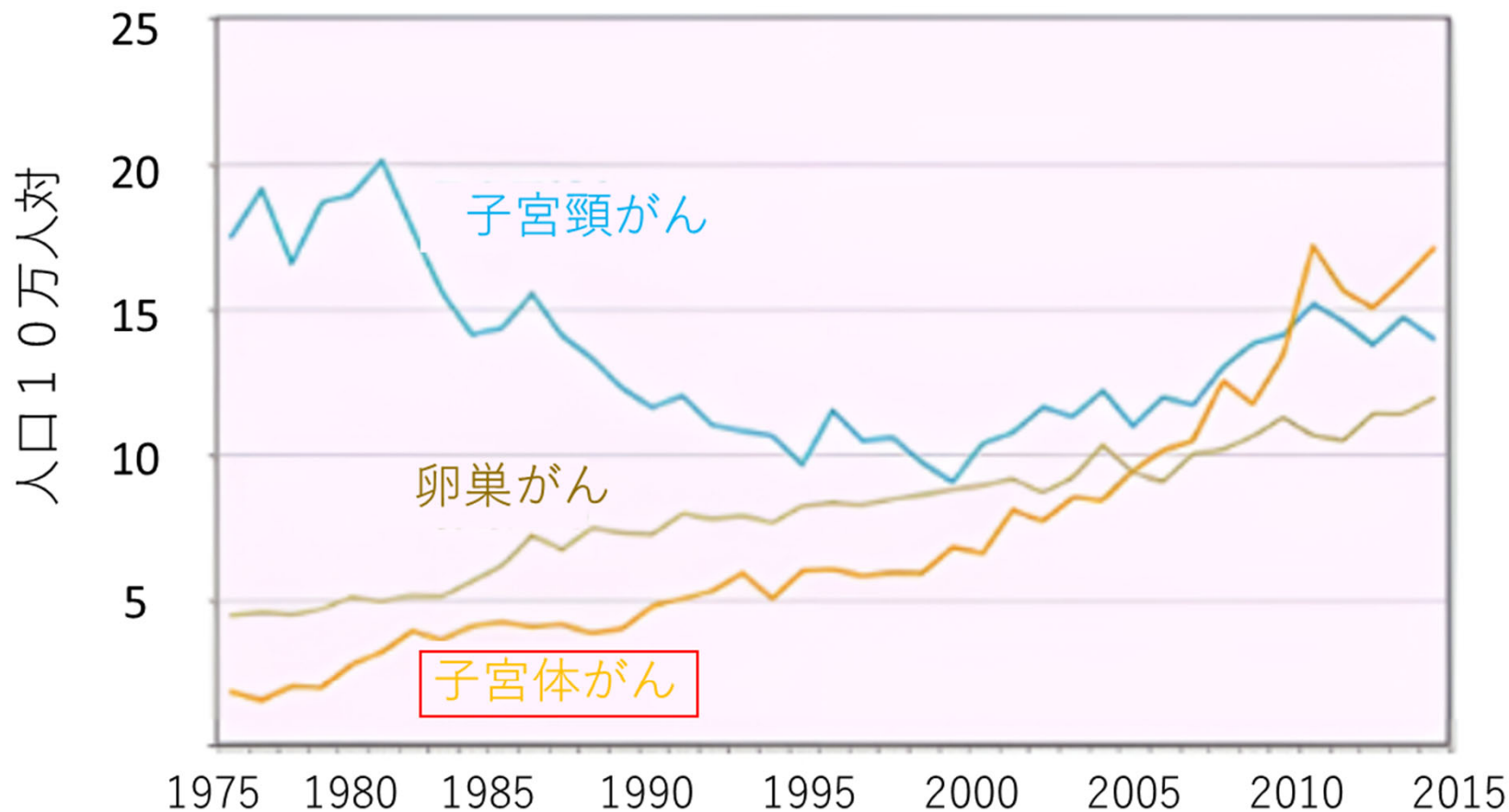
癌モデルマウスの問題点と解決法



*In vivo*エレクトロポレーションで
A,B,C Conditional KOを作製

マウスの体細胞に対し複数の
遺伝子を標的とした*in vivo*ゲノ
ム編集を実行し、迅速に複数の
遺伝子変異を有する癌モデル
マウスの作製

子宮体癌: 婦人科悪性腫瘍の罹患者数第1位



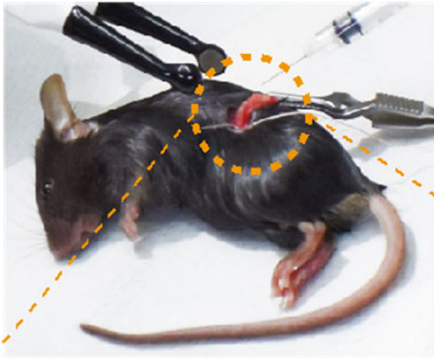
国立がんセンター資料

<https://jsgo.or.jp/public/introduction.html>

In vivoエレクトロポレーションによる子宮内膜上皮のゲノム編集

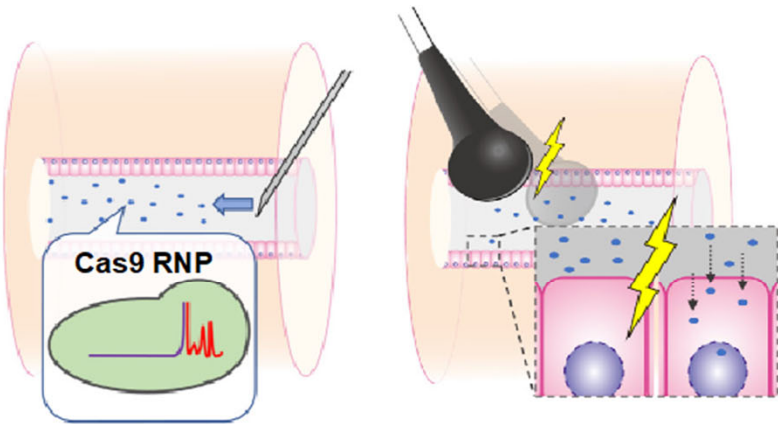
(A)

① Tying up with sutures



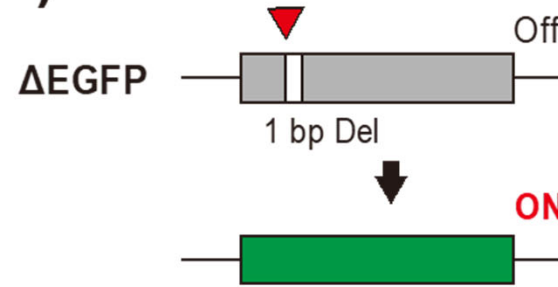
② Injection with RNPs

③ Applying EP



(B)

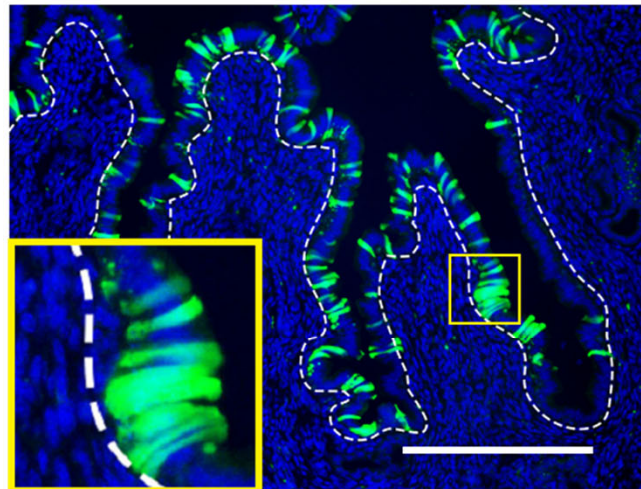
GFP遺伝子にフレームシフト変異を有するマウスで評価



Fluorescence restoration by NHEJ

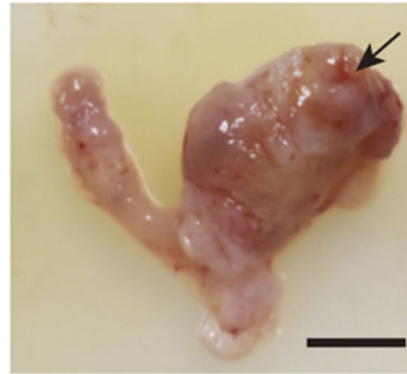
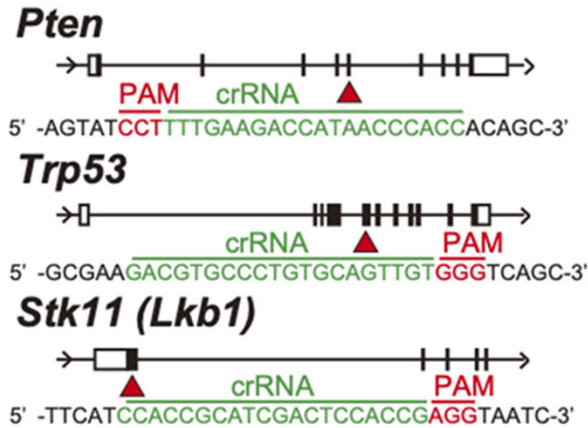
Cas9, GFP gRNAが導入されると、GFP遺伝子が修復され緑色に光る

(C)



上皮細胞のみGFP陽性細胞が出現
間質細胞には出現せず

In vivoゲノム編集による発がんモデル

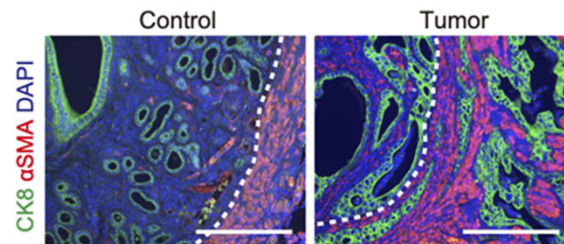


腫瘍発生率

	CRISPR Target			n	3 month		
	<i>Pten</i>	<i>Trp53</i>	<i>Lkb1</i>		Macroscopic lesion	Myometrial invasion	Squamous differentiation
Single	○	---	---	5	0	0	0
	---	○	---	5	0	0	0
	---	---	○	5	0	1 (20%)	0
Double	○	○	---	5	0	0	0
	---	○	○	5	0	0	0
	○	---	○	9	4 (44%)	5 (56%)	2 (22%)
Triple	○	○	○	10	7 (70%)	9 (90%)	5 (50%)

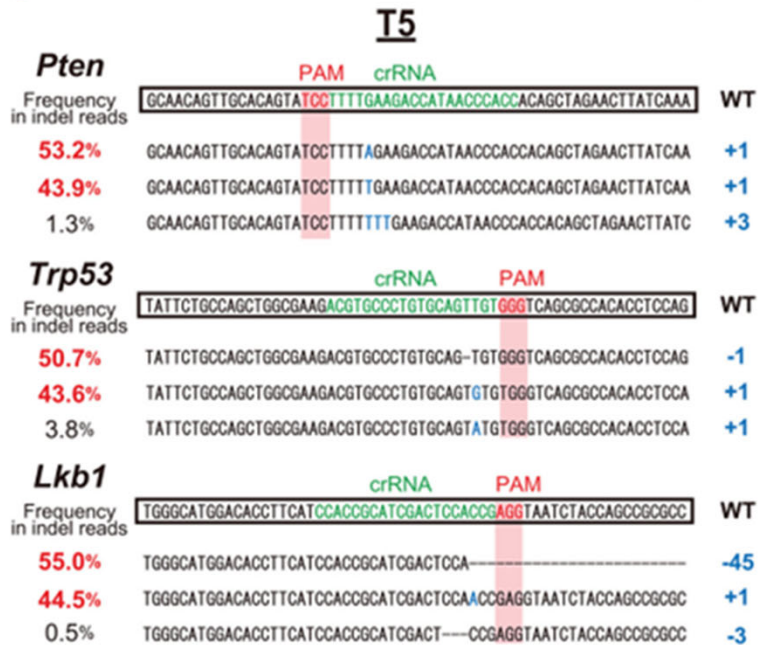
腫瘍発生率

Pten/Trp53/Lkb1: 90%
Pten/Lkb1: 56%

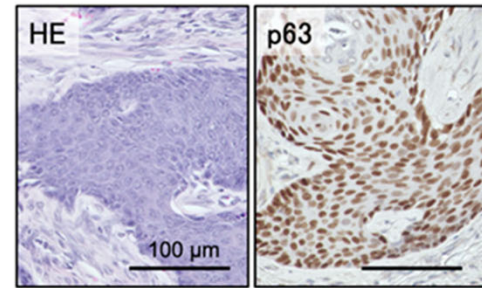


In vivoゲノム編集による発がんモデルとヒト子宮体癌との類似点

①腫瘍が複数のクローンに由来する



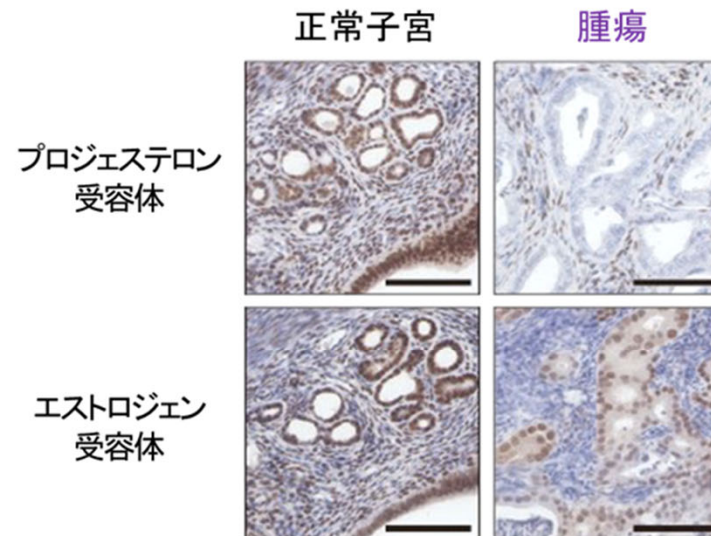
②重層扁平上皮化生



p63 = 重層扁平上皮マーカー

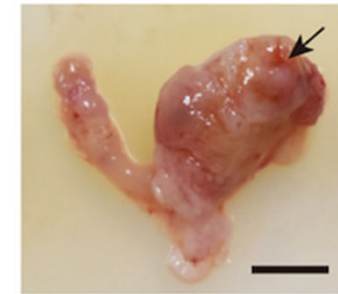
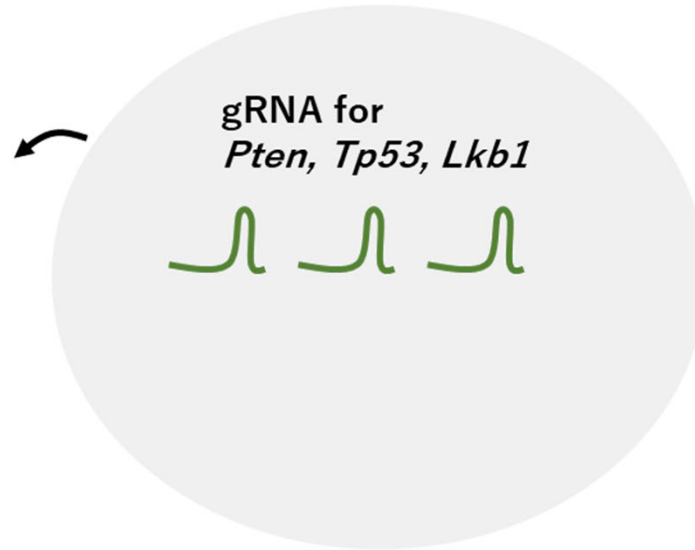
※正常子宮にはp63+重層扁平上皮は存在しない

③プロゲステロン受容体の発現が消失

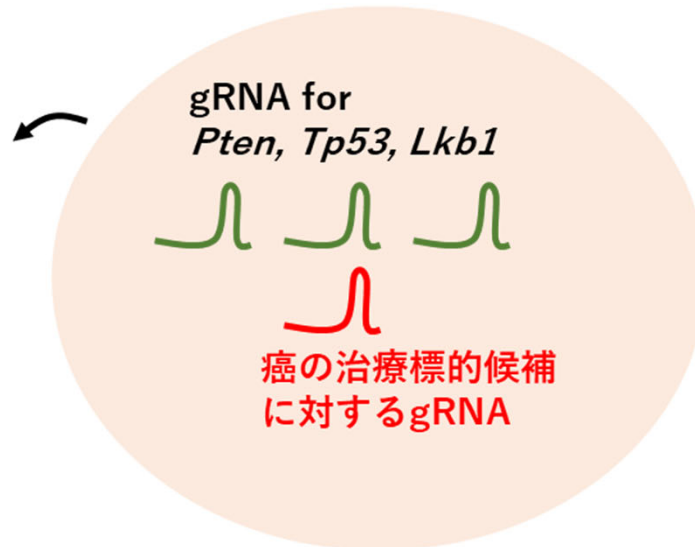
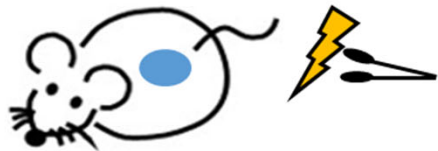


癌治療標的候補の生体スクリーニングシステム

*In vivo*ゲノム編集による
通常子宮癌の誘導



3ヶ月で発癌



癌を抑制？

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術のコンディショナルノックアウト法では交配などに数年かかった子宮体癌モデルマウスを3か月で作製可能
- コンディショナルノックアウト作製の手間がいらず野生型のマウス、Cas9、gRNAを購入してエレクトロポレーションするだけで3か月後に癌モデルマウスを得ることが可能

想定される用途

- 抗がん剤の動物試験
- 新たな創薬標的遺伝子の検証

実用化に向けた課題

- 現在、新たな創薬標的遺伝子の検証に用いられるか検討中。
- 今後、子宮体癌以外（例：すい臓がん）についても検討を行う。

企業への期待

- 子宮体癌の治療薬を開発をおこなう企業との共同研究を希望。
- また、抗がん剤を開発中の企業、分子標的薬分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術による発現モデルマウスの作製は簡便で高速なため、研究のコスト削減、モデルマウス作製時間を短縮することでより企業に貢献できると考えている。
- 本格導入にあたっての技術指導等

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 子宮がんモデル非ヒト動物の製造方法、子宮がんモデル非ヒト動物、および被検物質の評価方法
- 出願番号 : 特願2021-189718
- 出願人 : 群馬大学
- 発明者 : 畑田 出穂、小林 良祐

産学連携の経歴

- 2001年 (株)DNAチップ研究所とDNAチップを用いたメチル化解析法に関する特許を共同出願
- 2006年 JST A-Step事業に採択
- 2006年 (株)DNAチップ研究所にてDNAチップを用いたメチル化解析法の受託解析を開始
- 2019～2023年 製薬企業とエピゲノム編集で共同研究

お問い合わせ先

群馬大学
産学連携・知的財産活用センター

T E L : 0277-30-1171~1175

F A X : 0277-30-1178

e-mail : tlo@ml.gunma-u.ac.jp