

疾患モデル動物を用いた循環器病研究の最前線

藤原祥高[†] 望月直樹

IRYO Vol. 75 No. 2 (111–116) 2021

要旨

ヒトゲノムプロジェクトが完了し、およそ2万ある遺伝子の中から遺伝性疾患の原因遺伝子や変異を効率よく探索できるようになった。しかし、探索からみつかった変異と疾患との因果関係を証明するためには、遺伝子組換え動物を用いた解析が必須である。従来では、遺伝子を欠損させたノックアウト (KO) に比べて、点変異やノックインなどの改変は難しかった。そのような状況の中、2012年に発表されたゲノム編集技術CRISPR/Cas 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9) の登場によって大変革がおこった。本稿では、トランスジェニック (Tg) やKO技術により開発された循環器疾患モデル動物について概説し、2020年ノーベル化学賞を受賞したCRISPR/Casなどのゲノム編集技術の現状についても紹介する。

キーワード 遺伝子組換え動物, ゲノム編集, CRISPR/Cas, 循環器疾患

はじめに

循環器病は、わが国の三大死因のうちの二つ (心臓病, 脳卒中) を占めている。ナショナルセンターのひとつである国立循環器病研究センター (当センター) では、40年以上にわたって「循環器疾患の究明と制圧」を目指して研究開発を推進してきた。本稿では、その一端として研究所が進めている遺伝子改変疾患モデル動物を用いた循環器病研究について、マウスに焦点をあてこれまでの動向を概説する。

1. 遺伝子改変による循環器疾患モデル動物の開発と機能解析

循環器系の心臓や血管の構造そして血圧は、ヒト

とマウスでは基本的に同じである。一方で、マウスの心拍はヒトのおよそ10倍にあたる毎分600回と非常に高い心拍数であることが知られている。これまでに多くの循環器疾患を示す遺伝子改変マウスが開発されてきたが、1990年代には多発家系のゲノム解析から原因遺伝子の探索や変異の同定が進められた。1990年には肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy : HCM) の原因遺伝子として *MYH7* (myosin heavy chain 7) 遺伝子、1998年には拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy: DCM) の原因として *ACTC1* (actin alpha cardiac muscle 1) 遺伝子の突然変異が初めて同定された¹⁾²⁾。現在までにHCMとDCMだけでも50以上の原因遺伝子が存在することが明らかになり、疾患モデル動物を使っ

国立循環器病研究センター研究所 分子生物学部 [†]研究職

著者連絡先: 藤原祥高 国立循環器病研究センター研究所 分子生物学部 室長 〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町 6-1

e-mail : fujihara@ncvc.go.jp

(2020年11月11日受付, 2020年12月11日受理)

Recent Advances in Cardiovascular Disease Researches using Genetically Modified Animals

Yoshitaka Fujihara and Naoki Mochizuki, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

(Received Nov. 11, 2020, Accepted Dec. 11, 2020)

Key Words : genetically modified animals, genome editing, CRISPR/Cas, cardiovascular disease

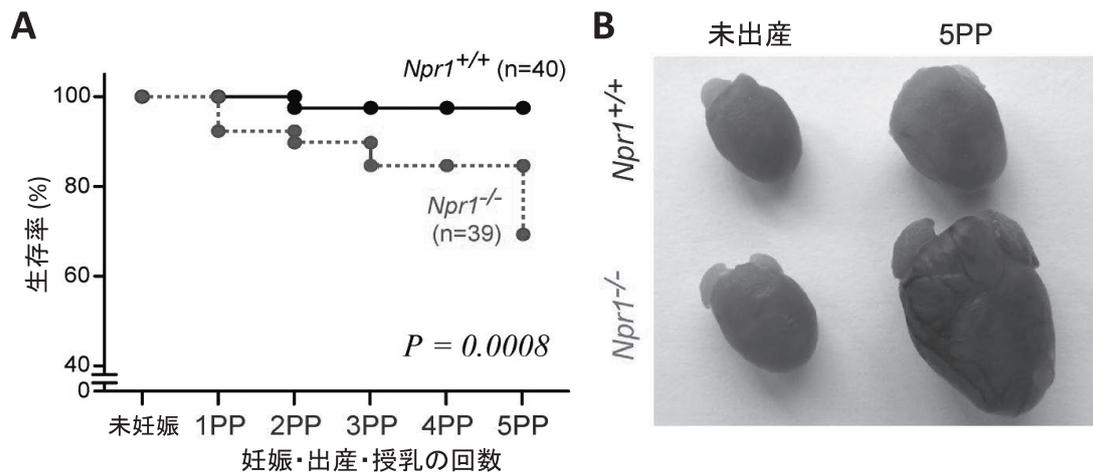


図1 *Npr1*遺伝子欠損による周産期心筋症モデルマウスの開発

A: *Npr1*-KOマウス(点線)は妊娠・出産・授乳を繰り返すことで、野生型(+/+)マウス(実線)に比べて生存率が顕著に低下した。PPはpostpartumの略。B: 妊娠・出産・授乳を5回経験(5PP)した*Npr1*-KOマウスの心臓を観察したところ、明らかな心肥大が観察された。未出産と5PPでは心臓重量が約2倍ほど異なっていた。さらに、この心肥大の主な原因は妊娠・出産・授乳の中でも、授乳によって引き起こされていることがわかった。(文献7より引用改変)

た病態解明が進められている。心筋梗塞や拡張期心不全の表現型を示す代表的なモデル動物として、n/i/eNOS(nitric oxide synthase)の三重欠損マウスが開発され、アンジオテンシン1型(AT₁)受容体拮抗薬Olmesartanの長期投与により心不全の有意な改善がみられた³⁾⁴⁾。ヒトとマウスでは心電図や活動電位の波形が異なるが、LQT1(long QT syndrome type-1)の原因遺伝子*KCNQ1*(potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1)を過剰発現させたTgマウスではヒトの不整脈と類似した波形を再現し、パッチクランプ法からLQT3の原因遺伝子としてみつかった*SCN5A*(sodium voltage-gated channel alpha subunit 5)がノックアウト(KO)マウス解析により証明された⁵⁾⁶⁾。現在では、先天性LQT症候群の原因遺伝子のおよそ90%を*KCNQ1*、*KCNH2*、*SCN5A*遺伝子の3つが占めていることが知られている。

当センターでも最近、*Npr1*(natriuretic peptide receptor 1)KOマウスが周産期心筋症を示すことを発見し、授乳期に発症する心肥大をミネラルコルチコイド受容体拮抗薬や抗インターロイキン6受容体抗体の投与により症状を抑制することに成功した(図1)⁷⁾。

そのほかに代表的なモデル動物として、血圧を指標に選択交配から確立された系統である自然発症高

血圧ラット(SHR:spontaneously hypertension rat)が有名で降圧剤の開発研究に大きく貢献してきた。しかし、原因遺伝子や変異が複数の遺伝子座に存在し現在もすべての同定には至っていないことから詳細な解析が待たれる。

2. レンチウイルスベクターを用いた妊娠高血圧症候群モデルマウスの開発

わが国では、およそ6組に1組のカップルが不妊の検査や治療を受けており不妊症は社会問題のひとつになっている。さらに近年の晩婚化などのライフスタイルの変化にともなって妊娠に至っても流産や死産を繰り返し、子どもを持たない不育症のカップルも増え、不妊不育症は少子化原因のひとつと考えられている。そして、日本産婦人科学会によると妊婦の約20人に1人の割合で発症する妊娠高血圧症候群は、妊婦と胎児の両方にリスクをとまなう疾患で現在も根本的な治療法はみつかっていない。妊娠高血圧症候群は胎盤の機能不全に起因する疾患であり、最適な疾患モデル動物の開発が求められていた。大阪大学の伊川正人教授の研究グループが2007年に開発したレンチウイルス(LV)ベクターを用いた胎盤特異的な遺伝子導入法⁸⁾を用いることで、妊娠高血圧症候群モデルマウスの開発に成功した⁹⁾。彼らはまず初めに、血管増殖因子受容体VEGFR

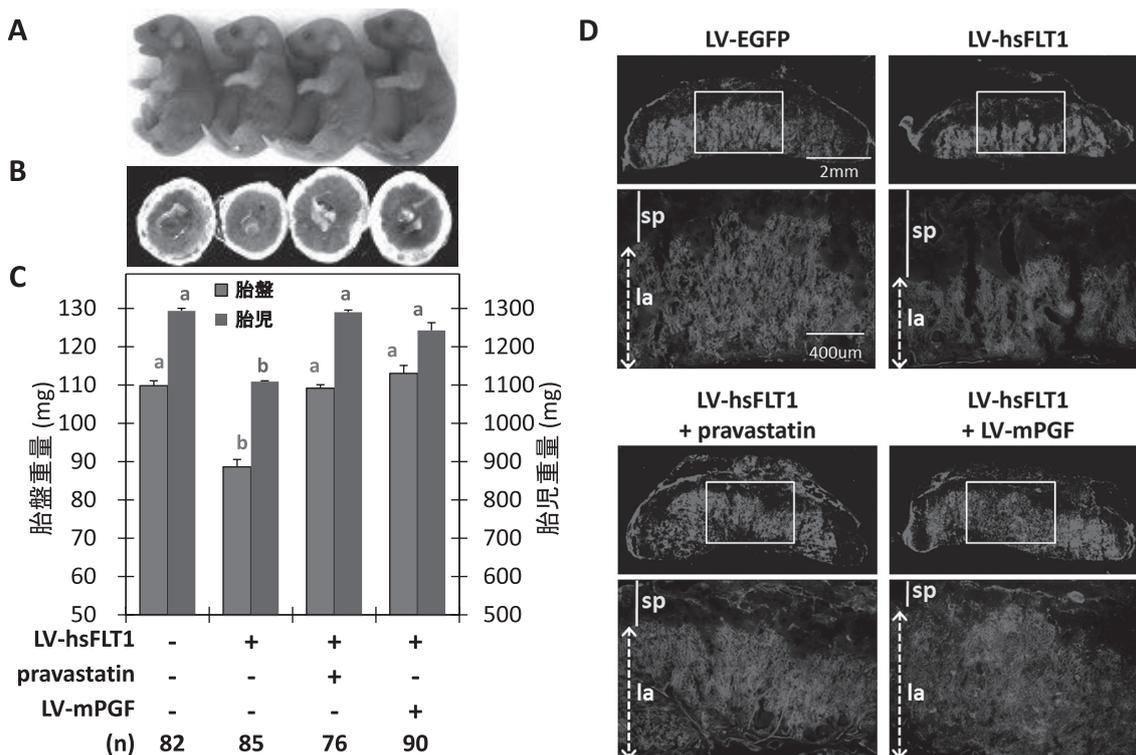


図2 LVベクターを用いた胎盤特異的遺伝子導入法による妊娠高血圧症候群モデルマウスの開発

A, B: 胎生18.5日目のマウス胎児と胎盤の写真. C: 胎生18.5日目のマウス胎児と胎盤の平均重量. 左棒グラフが胎盤重量, 右棒グラフが胎児重量を示す. D: 胎生13.5日目のマウス胎盤を用いてCD31抗体(写真では白色)による蛍光免疫染色で胎盤内の血管形成を観察した. spは海綿状栄養膜細胞(spongiotrophoblast)の略. LV-EGFPはネガティブコントロールを示す.

ヒトsFLT1 (hsFLT1) をレンチウイルス (LV) ベクターを介して胎盤特異的に過剰発現させたところ, 母マウスの血圧上昇と尿タンパクの有意な増加が認められた. さらに, 胎盤迷路層 (labyrinth layer: la) の血管形成が阻害され胎盤重量の低下とともに胎児の発育不全が観察された (A, B, Cの左から2列目, Dの右上). HMG-CoA還元酵素阻害薬プラバスタチン (pravastatin) を妊娠7.5日目から母マウスに毎日投与, もしくはhsFLT1とマウス胎盤増殖因子 (mouse placental growth factor:mPGF) をLVベクターで胎盤特異的に過剰発現させることで, 胎盤および胎児重量が回復し母マウスの妊娠高血圧症候群様の症状も改善された (A, B, Cの右側2列, Dの下段). (文献9より引用改変)

(vascular endothelial growth factor receptor) の可溶性sFLT1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) の過剰発現が妊娠高血圧症候群の有力な病因であるという疫学調査結果に着目した. そこで, ヒトsFLT1 (hsFLT1) を発現するLVベクターを作製し, 着床前の胚盤胞期胚の透明帯を除去し感染させ胚移植することで, 胎盤特異的にhsFLT1を過剰発現させた. その結果, 妊娠後期に当たる妊娠16.5日目以降に母体の血圧上昇がみられ分娩とともに正常値まで回復し尿タンパクの有意な増加も認められた. さらに, 感染させたマウス胎盤では迷路層 (labyrinth layer) における血管形成が阻害され, 胎盤だけでなく胎児の発育不全も観察されたことから妊娠高血圧症候群の病態の再現に成功した. このモデルマウスを利用することで, HMG-CoA還元酵

素阻害薬 (プラバスタチン) やプロトンポンプ阻害剤が治療薬の有力候補として報告されている (図2)⁹⁾¹⁰⁾.

そのほかには, 妊娠高血圧症候群の胎盤ではオートファジーが低下することが知られており, オートファジー必須遺伝子Atg7 (autophagy related 7) に対してLVベクターを用いて胎盤特異的に欠損させると, 母体・胎児ともに妊娠高血圧症候群に酷似した表現型を示したことから, オートファジー異常が妊娠高血圧症候群の一因である可能性がマウス実験により証明された¹¹⁾. また, ラット胎盤はマウスよりも栄養膜細胞 (trophoblast cells) の浸潤がよりやすくヒト胎盤との構造上の共通点も多いことから, 遺伝子改変技術を用いた妊娠高血圧症候群モデルラットの開発を進めている. 病態を正確に再現で

きる疾患モデル動物の開発から、検査・解析法の確立や有効な治療戦略への糸口を探りたい。

3. CRISPR/Casの登場とKOマウスを用いた必須遺伝子スクリーニング

遺伝子組換えマウスの歴史は長く、外来遺伝子を導入したTgマウスの誕生からおよそ半世紀、そして特定の遺伝子を欠損させたKOマウスの誕生から四半世紀が経った2012年に新たなゲノム編集ツールCRISPR/Cas 9が開発された¹²⁾。その翌年には哺乳類ゲノムにも適用できることが報告され、現在では遺伝子改変技術の主役になっている¹³⁾¹⁴⁾。この技術開発に対して、2020年にノーベル化学賞が授与されたことは記憶に新しい。そのほかの有名なゲノム編集ツールとしてZFN (zinc finger nuclease) やTALEN (transcription activator-like effector nuclease) があるが、CRISPR/Casは変異導入効率や汎用性、そして簡便さなどに優れている点がノーベル賞に選ばれた要因のひとつになっている。著者らもいち早く導入し、CRISPR/Cas 9を用いた遺伝子改変マウス開発法を確立した¹⁵⁾。さらに、CRISPR/Casの適用例は欠失・挿入変異、点変異、ノックインなどの遺伝子改変だけにとどまらず、ヌクレアーゼ活性を欠損させた不活性型Cas 9 (dead Cas 9: dCas 9) を用いることで目的のDNAやRNAに結合し転写調節やエピゲノム修飾、そしてイメージングすることも可能で幅広い用途で利用できる点も特徴のひとつである¹⁶⁾。最近では、Cas 9のPAM (proto-spacer adjacent motif) 配列と認識塩基が異なるCas12a (Cpf 1)¹⁷⁾、Cas13¹⁸⁾、Cas14¹⁹⁾、そしてCas3²⁰⁾なども報告され、さらには鋳型DNAを用いない塩基置換法²¹⁾²²⁾なども登場しゲノム編集技術は日進月歩である。

2006年に欧米協働で始まったKO-ES細胞クローンの網羅的樹立とKOマウス開発という国際プロジェクト (International knockout mouse consortium : IKMC) は、2011年には規模を拡大して世界標準の網羅的表現型解析プロジェクト (International mouse phenotyping consortium : IMPC) へとシフトした。現時点で6,000遺伝子を超えるKOマウスの表現型解析が完了しており、それらの結果はデータベース化され公開されている (<https://www.mousephenotype.org/>)。しかしながら、マウスの遺伝子数はおよそ2万と考えられているので、未解析の遺伝子がまだ残されている。著者

らも国際プロジェクトとは独立して、組織特異的な遺伝子を対象にCRISPR/Cas 9を用いたKOマウス開発と必須遺伝子スクリーニングを行ってきた²³⁾。KO遺伝子の選定には、IMPCのデータベースも参考に既報の遺伝子を除いた候補遺伝子リストを作成して、網羅的にKOマウスを開発している。その結果、250遺伝子のうち25%程度のKOマウスに何かしらの表現型が発見され、それらの遺伝子機能についてより深い解析を進めており、最近その一部について報告した²⁴⁾²⁵⁾。以上より、この研究戦略で一定の成果を挙げられることが実証できたので、現在は未知の循環器疾患原因遺伝子の探索を目的にCRISPR/Casを用いた必須遺伝子スクリーニングを鋭意推進している (図3)。

まとめ

生命科学研究において、遺伝子組換え動物の貢献度は非常に大きい。生体での遺伝子等に着目したゲノム研究は、約半世紀前に誕生したTgマウスを発端に遺伝子改変技術の発展と共に推進してきたといっても過言ではない。そして、2013年にはCRISPR/Cas 9を介したゲノム編集マウスの誕生によって、マウス開発期間が年単位から月単位になり研究スピードが飛躍的に上昇した。さらに、CRISPR/Casによるゲノム編集の自由度と効率化の恩恵はマウスだけでなく、これまで遺伝子改変が難しかった多くの生物種も受けることができたのがノーベル賞へと繋がったと考えられる。すでに欧米では、遺伝子治療からゲノム編集治療へと名前を変えて臨床試験が開始されていて今後の進展が期待される。当センターにおいても、ゲノム編集などの最新技術を取り入れつつ基礎研究と臨床研究が強力に協働関係を築くことで、今後も「循環器疾患の究明と制圧」に向けて邁進していく。

著者の利益相反：本論文発表内容に関連して申告なし。

[文献]

- 1) Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990 ; 62 : 999-1006.

- model. *Proc Natl Acad Sci* 2011 ; **108** : 1451–5.
- 10) Onda K, Tong S, Beard S et al. Proton pump inhibitors decrease soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin secretion, decrease hypertension, and rescue endothelial dysfunction. *Hypertension* 2017 ; **69** : 457–68.
 - 11) Aoki A, Nakashima A, Kusabiraki T et al. Trophoblast-Specific Conditional Atg7 Knockout Mice Develop Gestational Hypertension. *Am J Pathol* 2018 ; **188** : 2474–86.
 - 12) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012 ; **337** : 816–21.
 - 13) Cong L, Ran FA, Cox D et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013 ; **339** : 819–23.
 - 14) Mali P, Yang L, Esvelt KM et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013 ; **339** : 823–6.
 - 15) Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y et al. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas 9 and single guided RNA. *Sci Rep* 2013 ; **3** : 3355.
 - 16) Knott GJ and Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science* 2018 ; **361** : 866–9.
 - 17) Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015 ; **163** : 759–71.
 - 18) Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 2017 ; **550** : 280–4.
 - 19) Harrington LB, Burstein D, Chen JS et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science* 2018 ; **362** : 839–42.
 - 20) Morisaka H, Yoshimi K, Okuzaki Y et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun* 2019 ; **10** : 5302.
 - 21) Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA et al. Programmable base editing of A · T to G · C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017 ; **551** : 464–71.
 - 22) Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019 ; **576** : 149–57.
 - 23) Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y et al. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2016 ; **113** : 7704–10.
 - 24) Fujihara Y, Noda T, Kobayashi K et al. Identification of multiple male reproductive tract-specific proteins that regulate sperm migration through the oviduct in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2019 ; **116** : 18498–506.
 - 25) Fujihara Y, Lu Y, Noda T et al. Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2020 ; **117** : 9393–400.