

ゲノム編集を用いた挿入変異マウスの作製効率

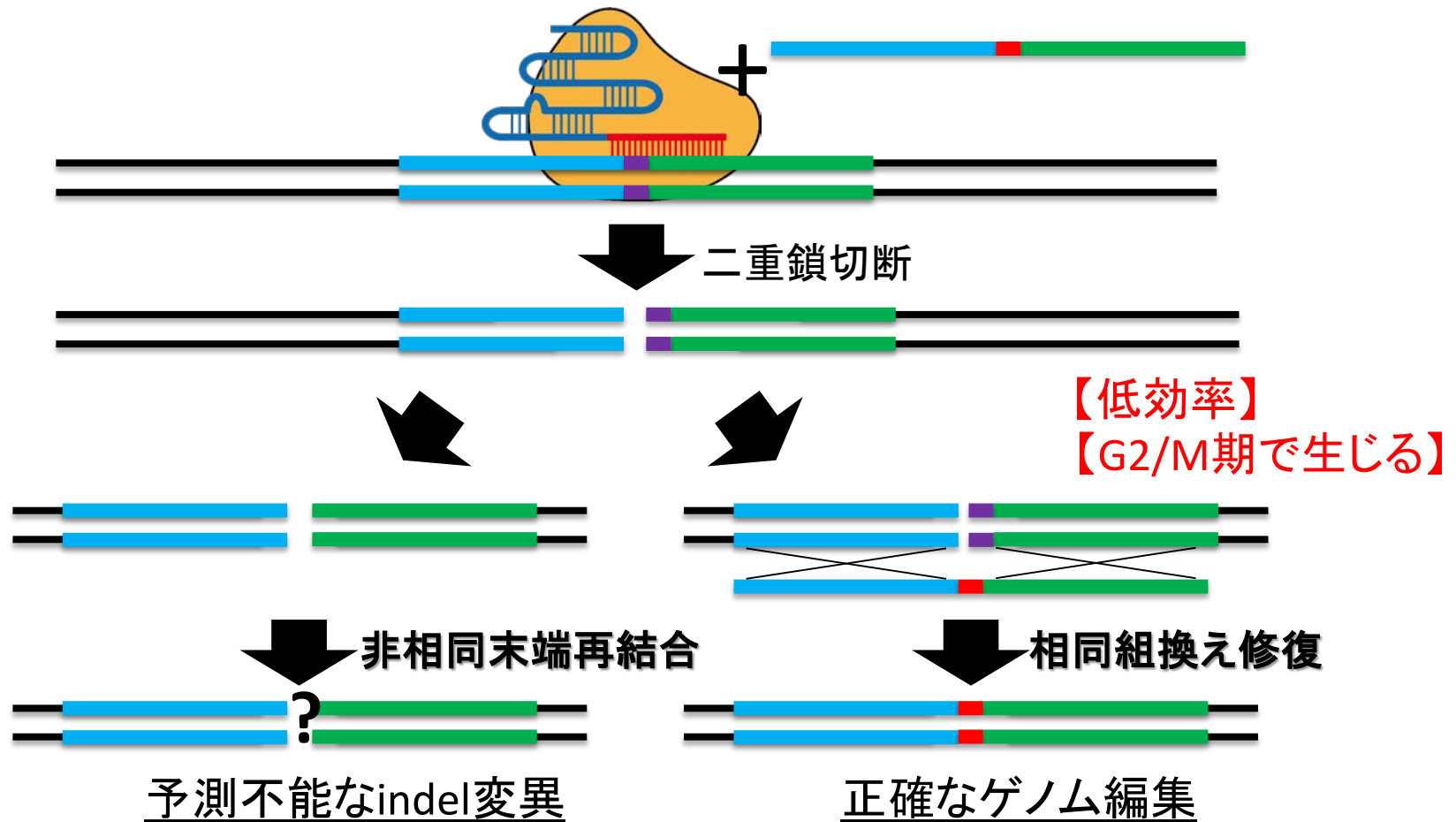
筑波大学 生命科学動物資源センター
筑波大学 医学医療系 解剖学発生学研究室
WPI-IIIIS 筑波大学 国際睡眠医科学研究機構
筑波大学 生命領域学際研究(TARA)センター

高橋 智

ゲノムDNA二重鎖切断後の2つの修復経路

非相同末端結合 Non-homologous end joining (NHEJ)

相同組換え修復 Homology directed repair (HDR)



CRISPR/Cas9によるヒトがん遺伝子異常の再現

LETTER

doi:10.1038/nature18294

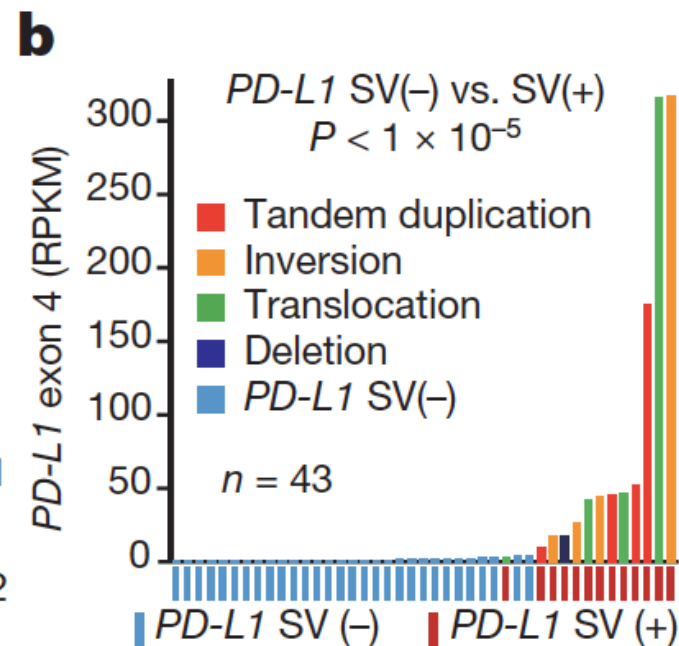
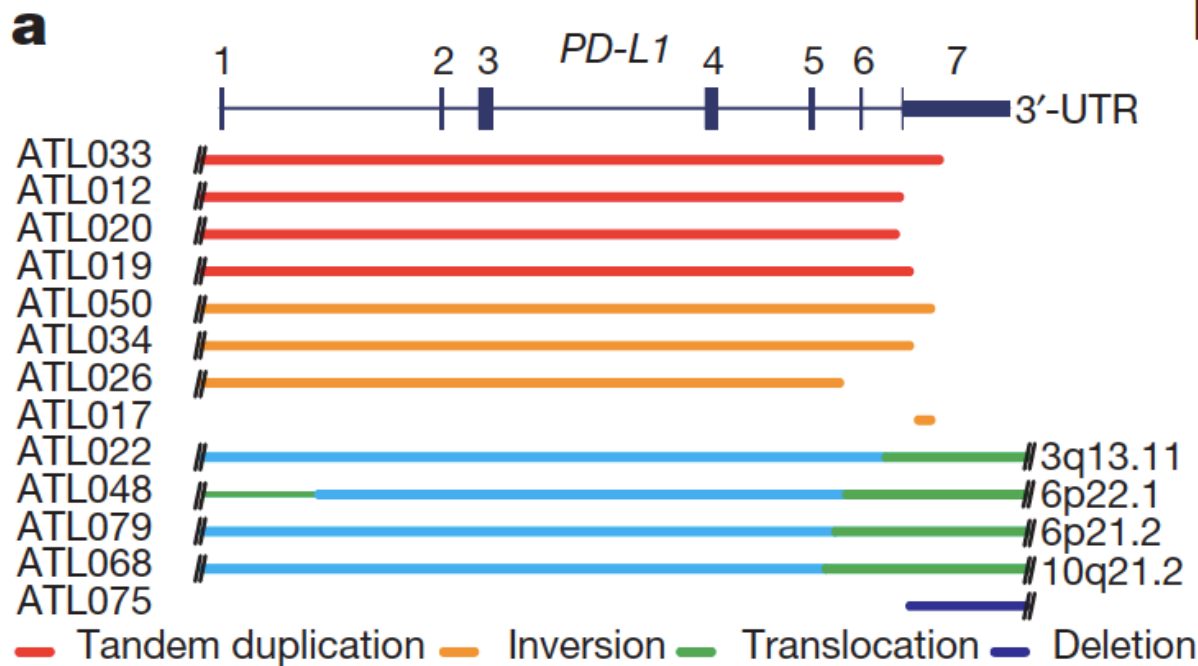
Aberrant *PD-L1* expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers

Keisuke Kataoka^{1*}, Yuichi Shiraishi^{2*}, Yohei Takeda^{3*}, Seiji Sakata⁴, Misako Matsumoto³, Seiji Nagano⁵, Takuya Maeda⁵, Yasunobu Nagata¹, Akira Kitanaka⁶, Seiya Mizuno⁷, Hiroko Tanaka², Kenichi Chiba², Satoshi Ito², Yosaku Watatani¹, Nobuyuki Kakiuchi¹, Hiromichi Suzuki¹, Tetsuichi Yoshizato¹, Kenichi Yoshida¹, Masashi Sanada⁸, Hidehiro Itonaga⁹, Yoshitaka Imaizumi¹⁰, Yasushi Totoki¹¹, Wataru Munakata¹², Hiromi Nakamura¹¹, Natsuko Hama¹¹, Kotaro Shide⁶, Yoko Kubuki⁶, Tomonori Hidaka⁶, Takuro Kameda⁶, Kyoko Masuda⁵, Nagahiro Minato¹³, Koichi Kashiwase¹⁴, Koji Izutsu¹⁵, Akifumi Takaori-Kondo¹⁶, Yasushi Miyazaki¹⁰, Satoru Takahashi⁷, Tatsuhiro Shibata^{11,17}, Hiroshi Kawamoto⁵, Yoshiki Akatsuka^{18,19}, Kazuya Shimoda⁶, Kengo Takeuchi⁴, Tsukasa Seya³, Satoru Miyano² & Seishi Ogawa¹

CRISPR/Cas9法を用いて、ヒト腫瘍で同定された遺伝子異常をマウスで再現し、そのメカニズムを再現した。

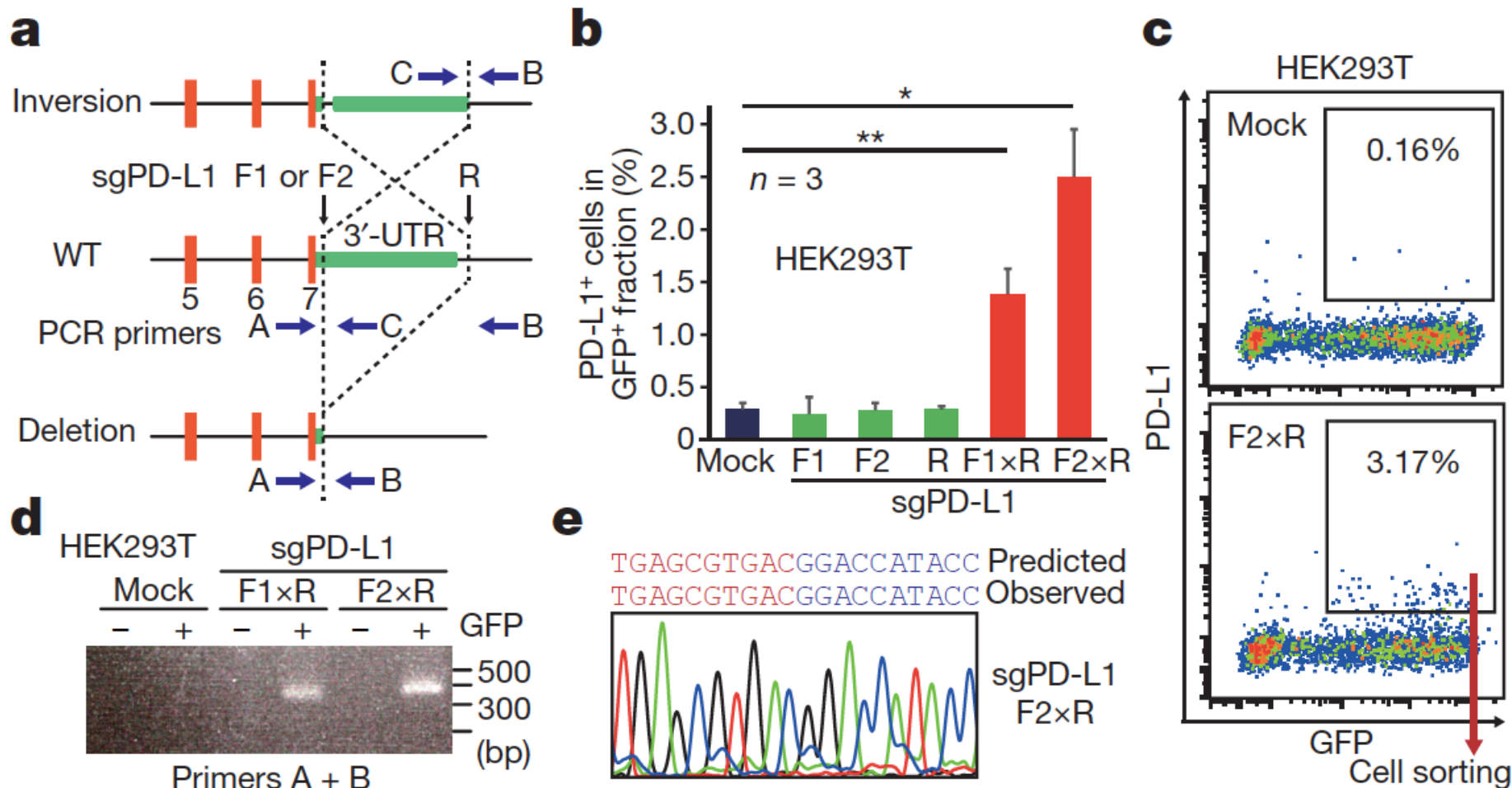
(Kataoka K. et al. Nature. 2016)

CRISPR/Cas9によるヒトがん遺伝子異常の再現



ATL腫瘍細胞ではPD-L1遺伝子の3' UTRに高頻度で様々な遺伝子構造異常が観察された。

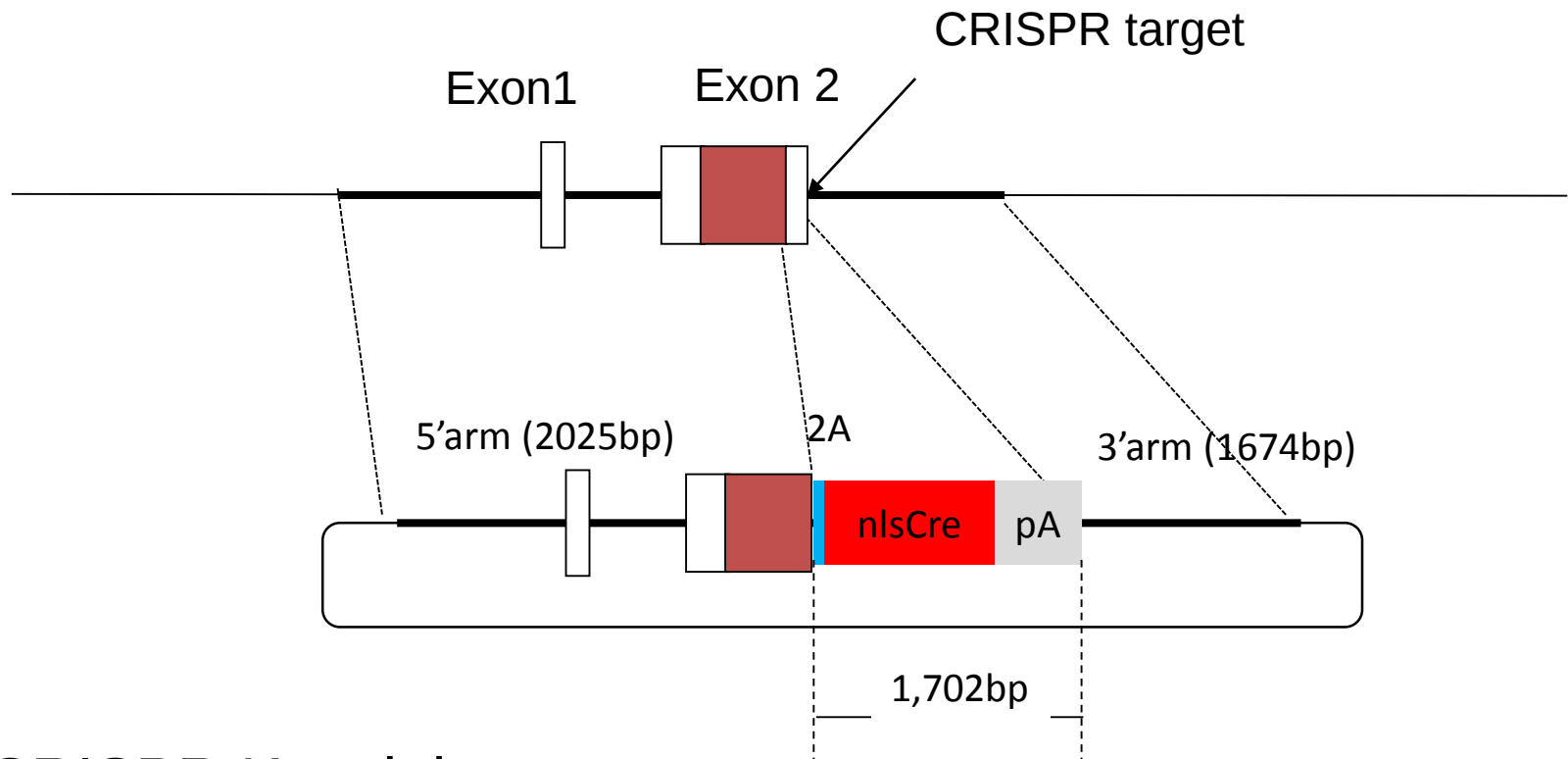
CRISPR/Cas9によるヒトがん遺伝子異常の再現



ヒト腫瘍で同定された3' UTRの欠損をHEK293T細胞に導入したところ、PD-L1の過剰発現が再現された。

CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製

Insulin1 gene (ch19)

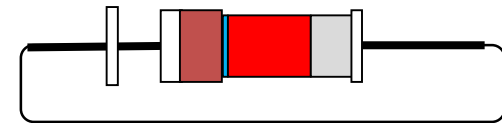
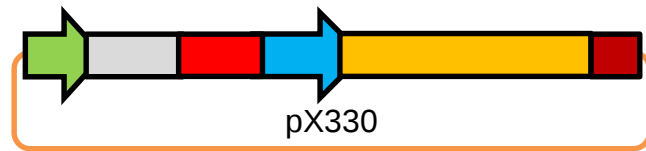


CRISPR Knock in vector

CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製



CRISPR/Cas9 vector for Ins1

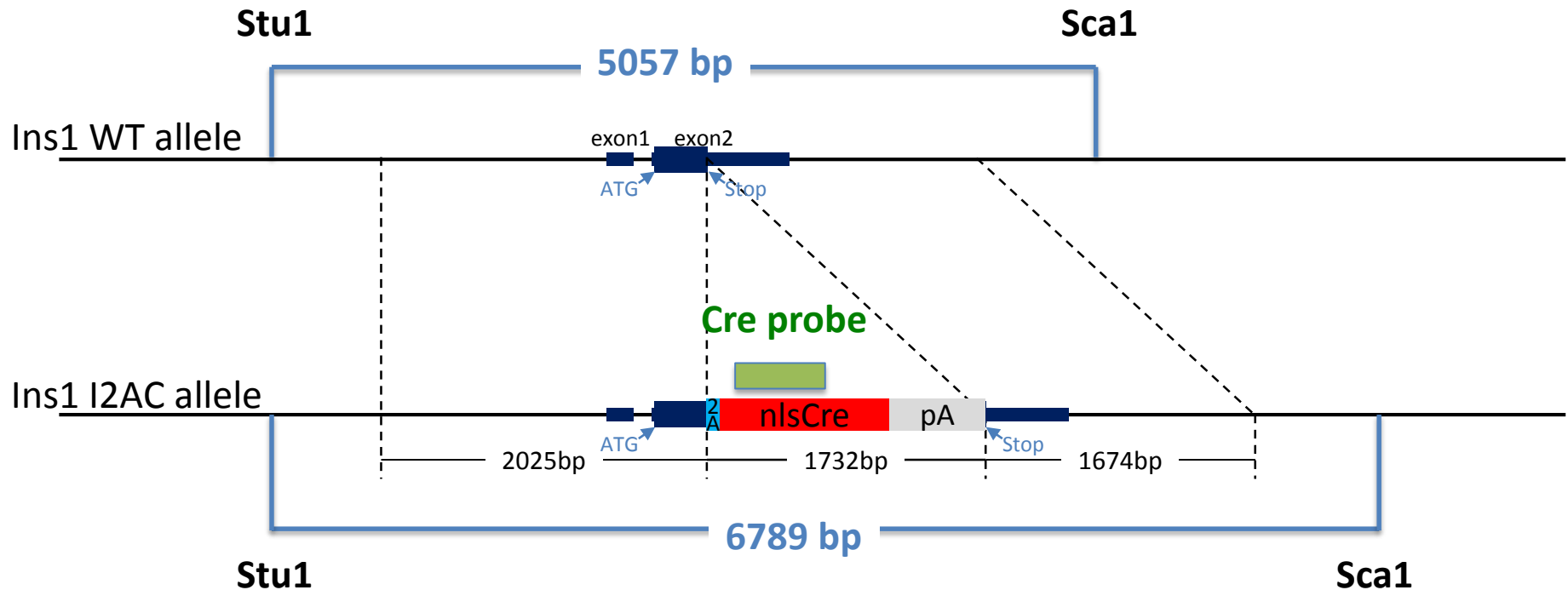


Knock-in donor fragment

受精卵にIns1遺伝子に対する環状のCRISPR vectorとKnock-in vectorをインジェクションする

(Hasegawa Y. et al. Experimental Animals. 2016)

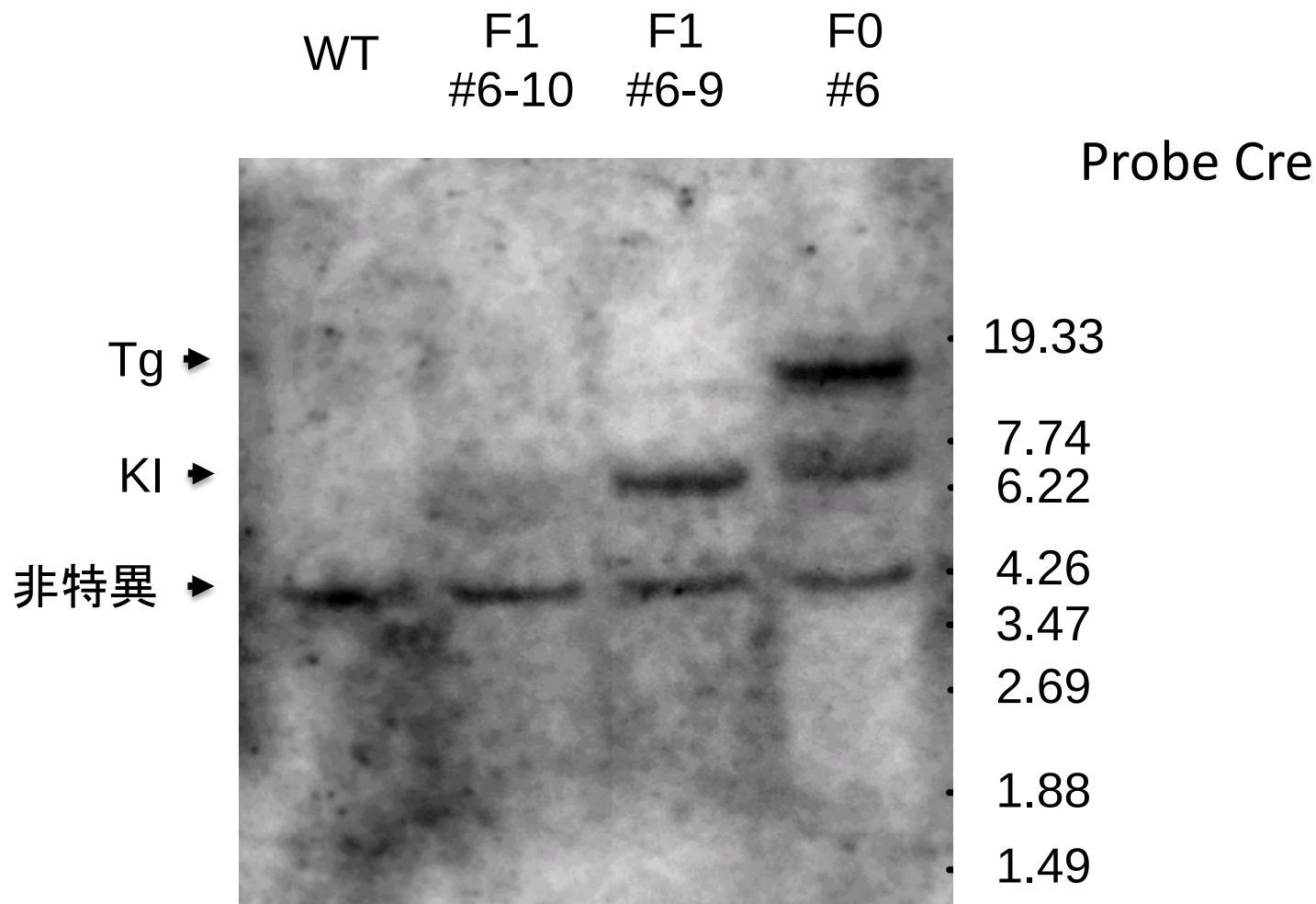
CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製



	Wt	KI
Cre probe	-	6,789 bp

(Hasegawa Y. et al. Experimental Animals. 2016)

CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製

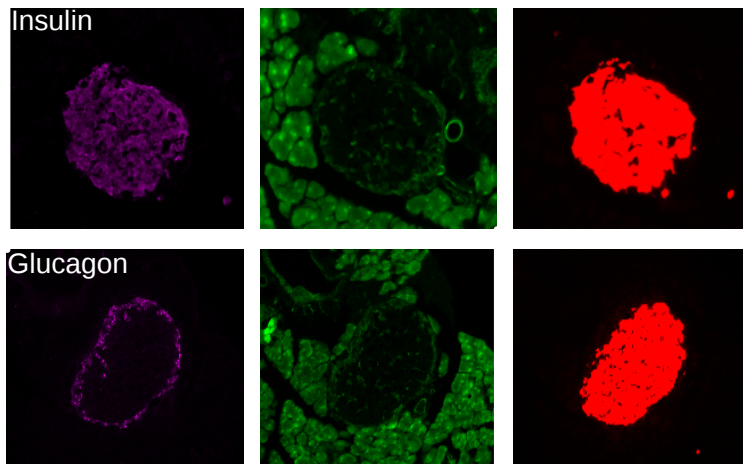
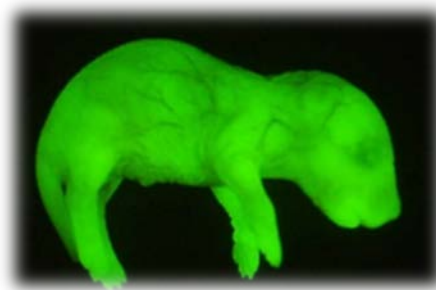
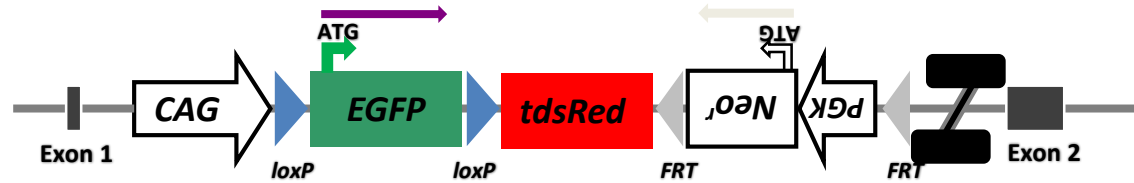


Knock-in + random integration

(Hasegawa Y. et al. Experimental Animals. 2016)

CRISPR/Cas9によるInsulin1-Cre KIマウスの作製

Rosa GRR
reporter mouse



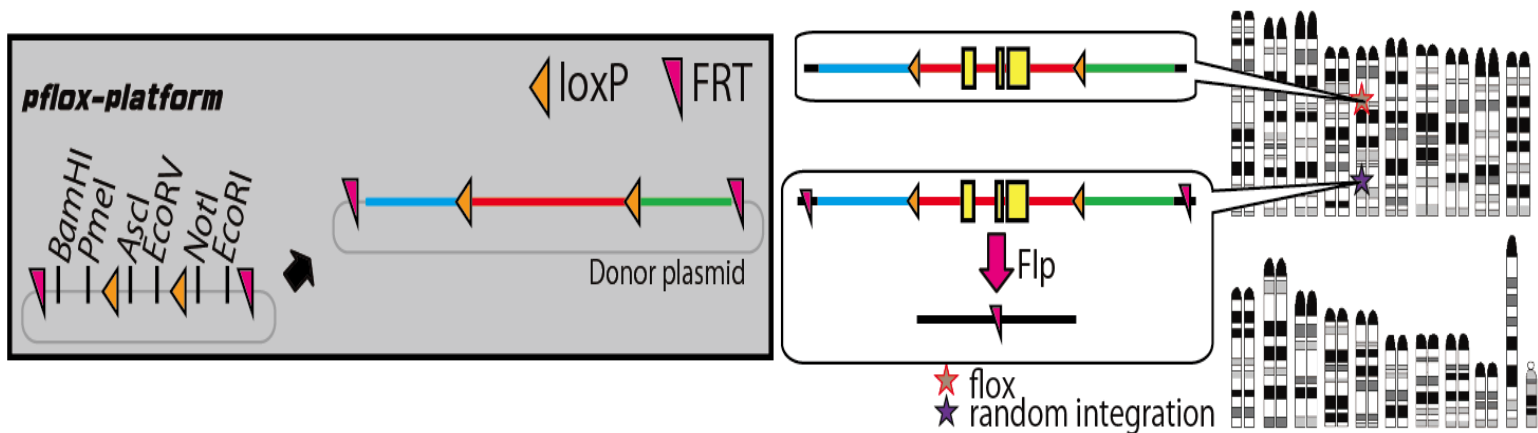
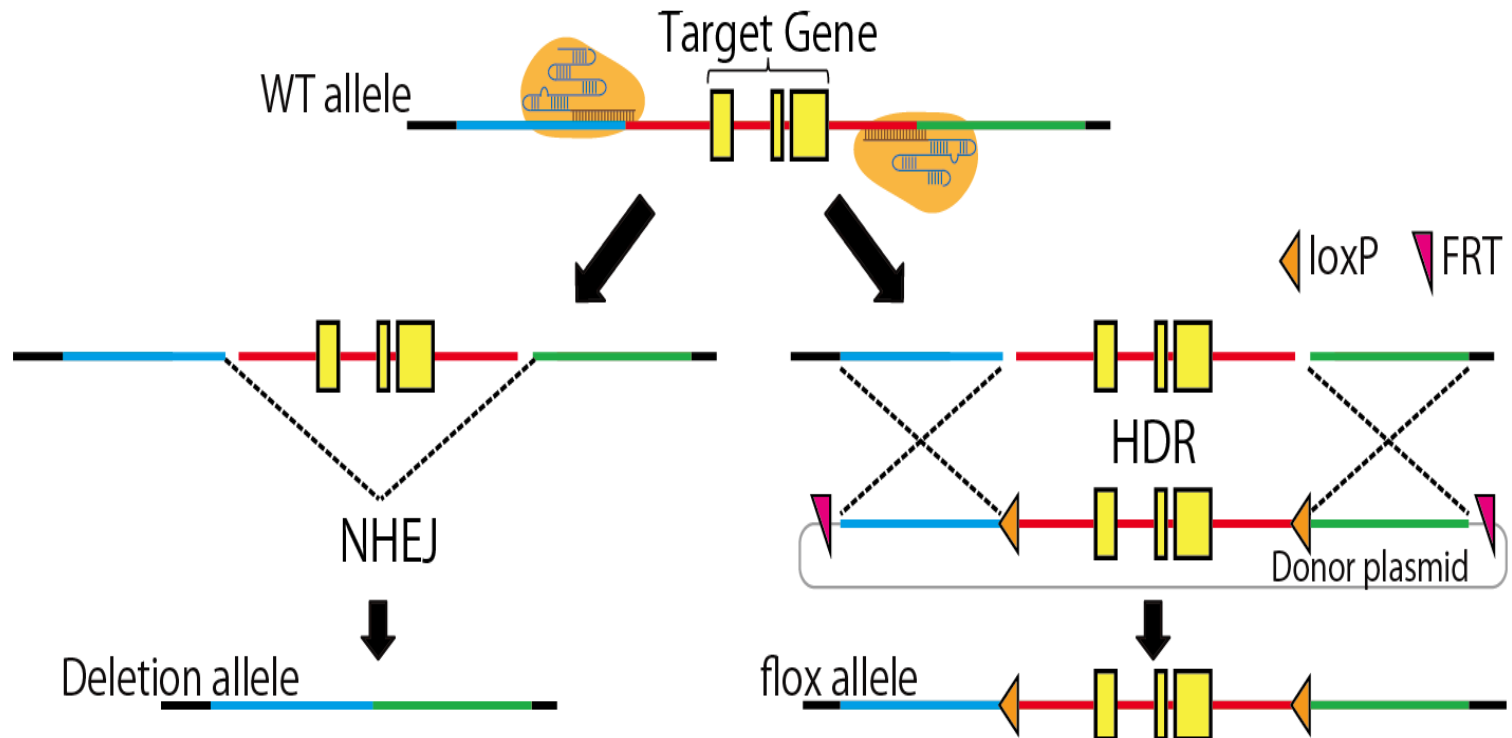
膵臓β細胞特異的な tdsRedの発現

(Hasegawa Y. et al. Experimental Animals. 2016)

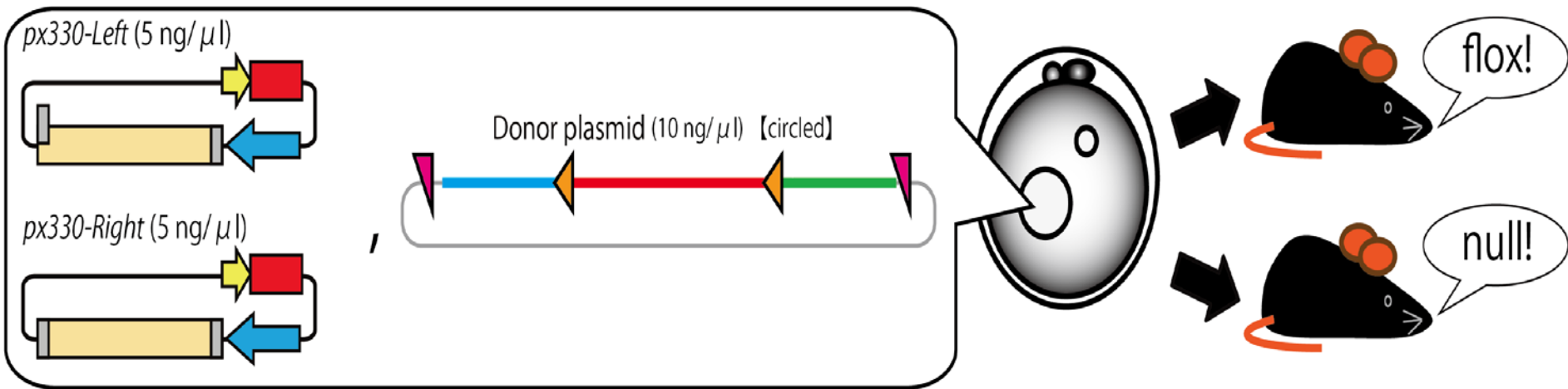
CRISPR/Cas9によるKIマウスの作製効率

gene	Embryo	injection	transfer	born	screening	KI (He+Ho)	KI/screeni ng	inset (KI)	5' arm (kb)	3'arm (kb)	arm total (kb)
Al	B6J	511	410	47	36	1	2.8%	5.5	1.9	1.4	3.3
Al	B6J	481	406	95	90	6	6.7%	5.5	1.9	1.4	3.3
Ca	B6J	435	406	60	60	2	3.3%	2.3	1.1	1.0	2.1
hC	B6J	488	404	94	69	6	8.7%	2.7	1.8	2.0	3.8
ch	B6J	481	409	71	32	7	15.9%	3.5	1.8	1.6	3.4
Or	B6J	497	443	105	54	8	14.8%	2.2	1.9	0.9	2.8
hF	B6J	437	382	82	68	3	4.4%	2.0	0.7	0.9	1.6
In	B6J	373	339	84	84	5	6.0%	1.7	2.0	1.7	3.7
Rv	B6J	404	346	93	93	0	0.0%	2.0	1.0	1.0	2.0
Rv	B6J	268	246	64	64	2	3.1%	2.0	1.0	1.0	2.0
Re	B6J	463	406	96	96	10	10.4%	2.8	1.1	1.0	2.1
Sc	B6J	365	322	85	85	3	3.5%	2.2	1.8	1.7	3.5
Re	B6J	357	300	63	63	1	1.6%	7.0	1.1	4.3	5.4
hC	B6J	455	398	79	64	5	7.8%	2.5	0.9	1.2	2.1
RC	B6J	310	272	50	50	2	4.0%	2.7	1.1	1.0	2.1
GL	B6J	317	280	106	106	2	1.9%	2.5	1.1	1.0	2.1
GL	B6J	357	300	96	96	6	6.3%	2.8	2.0	1.1	3.1
Re	B6J	268	230	68	63	0	0.0%	5.7	1.1	4.3	5.4
Be	B6J	332	292	91	76	9	11.8%	1.4	3.5	1.4	4.9
My	B6J	343	290	131	130	4	3.1%	0.8	2.0	2.0	4.0
Ca	B6J	313	270	81	77	2	2.6%	2.0	1.4	1.4	2.8
II2	B6J	337	284	122	122	3	2.5%	3.6	1.1	1.1	2.2
II1	B6J	312	265	77	77	4	5.2%	3.8	1.1	1.1	2.2

CRISPR/Cas9によるcKOマウスの作製



CRISPR/Cas9によるcKOマウスの作製



Project	Embryo	injection	transfer	born	screening	cKO	deletion	cKO/screening	Del/screening	5' arm (kb)	Central arm (kb)	3'arm (kb)	arm total (kb)
1	B6J	292	238	66	59	2	3	3.4%	5.1%	1.7	3.5	1.6	6.8
2	B6J	332	253	34	31	2	5	6.5%	16.1%	1.8	1.9	1.9	5.6
3	B6J	425	393	141	141	3	14	2.1%	9.9%	1.4	2.7	1.5	5.6
4	B6J	303	292	63	63	3	16	4.8%	25.4%	1.4	3.2	1.1	5.7
5	B6J	239	227	75	74	4	31	5.4%	41.9%	1.3	3.7	1.4	6.4
6	B6J	296	271	137	134	2	48	1.5%	35.8%	1.7	1.3	1.8	4.8
Average		314.5	279.0	86.0	83.7	2.7	19.5	3.9%	22%	1.6	2.7	1.6	5.8

CRISPR/Cas9による遺伝子改変マウスの作製実績

