

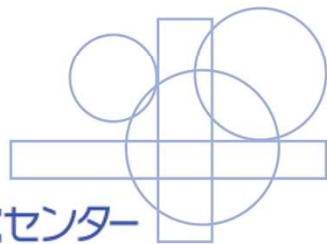
ヒト受精胚等へのゲノム編集技術等を用いる研究に関する合同会議

2019.09.25

新規作成胚とゲノム編集研究






国立研究開発法人
国立成育医療研究センター
National Center for Child Health and Development

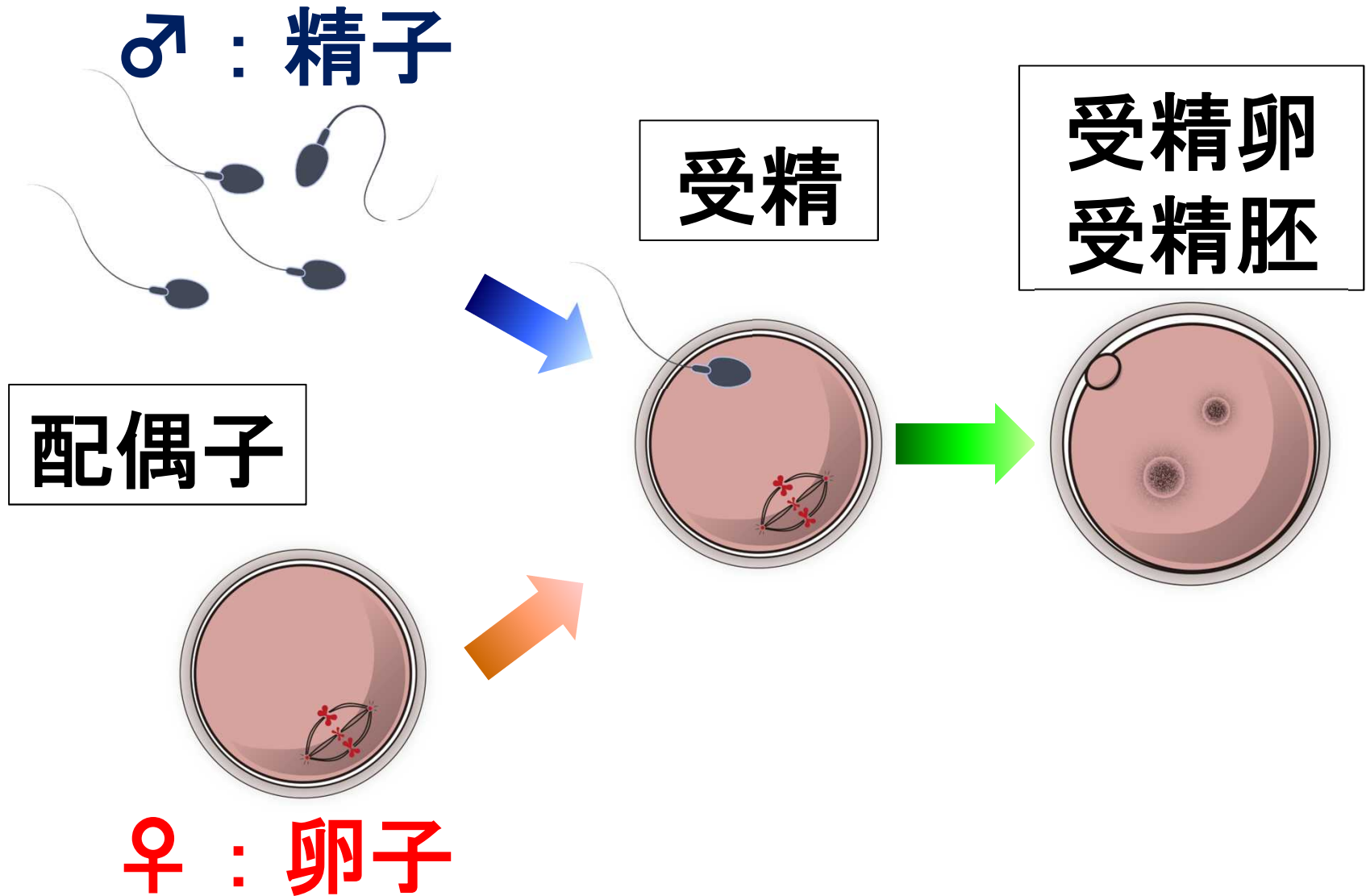


国立成育医療研究センター研究所
阿久津英憲

研究の実施に必要な試料（余剰胚、配偶子）について

研究目的	対象疾患例 ※疾患と遺伝子の関係はあくまで可能性	ゲノム編集の対象となる試料（取扱期間）		
		生殖細胞（受精後14日まで）  精子 卵子	胚（最大14日まで） 	体細胞・多能性幹細胞 
生殖補助医療研究	受精の障害	◎	×	×
	発生初期の胚の発育	○	◎	×
	不育症等、着床後の胎児・胎盤の成長/機能不全	×	○	○
遺伝性・先天性疾患研究	インプリンティング異常症等、発生初期の遺伝子発現異常に起因する疾患	◎	○	×
	生後に発症する遺伝性疾患等、発生初期の遺伝子発現異常に起因しない疾患	×	×	◎
	原因不明な疾患で、発生初期の遺伝子発現異常に起因する疾患	○	○	○

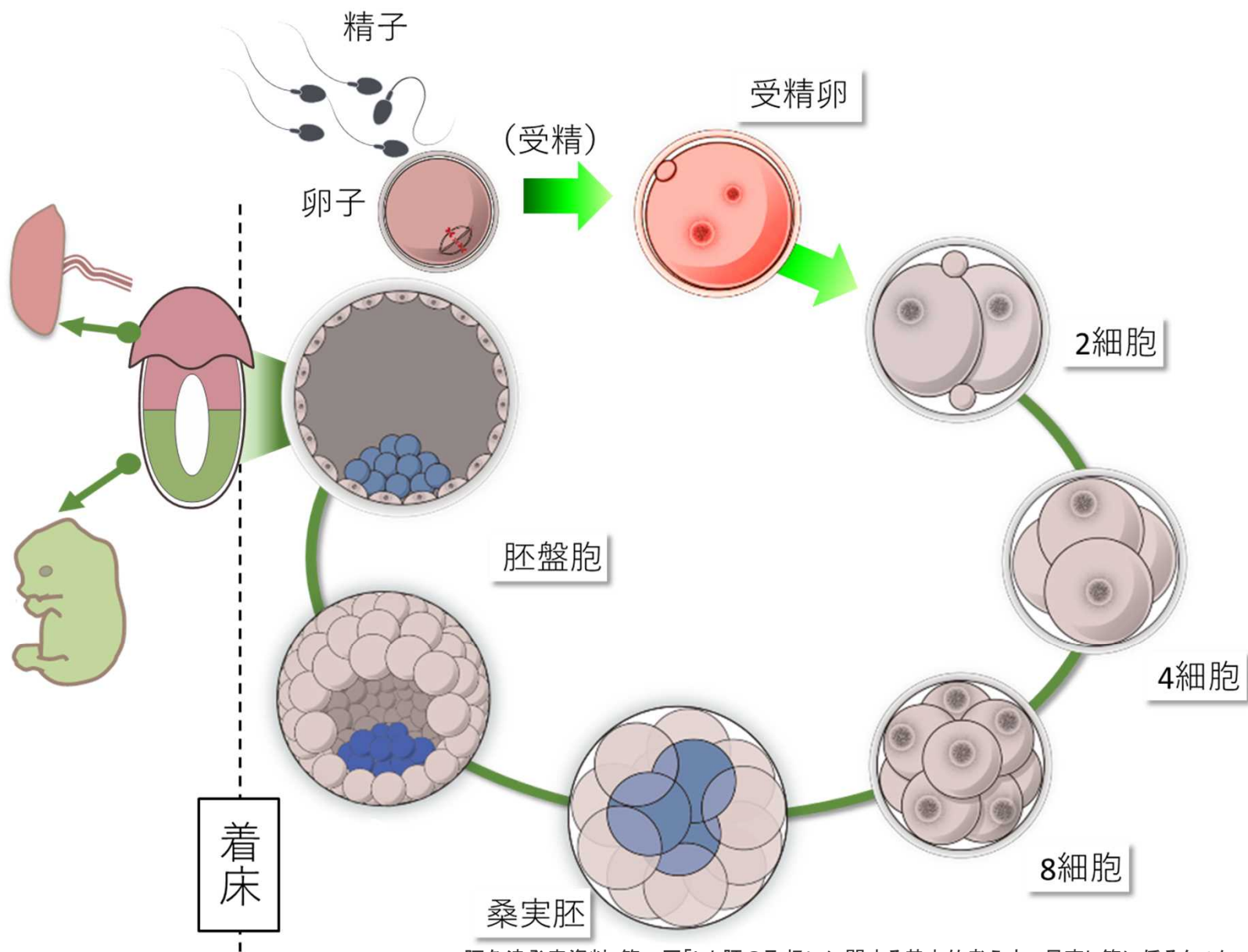
受精



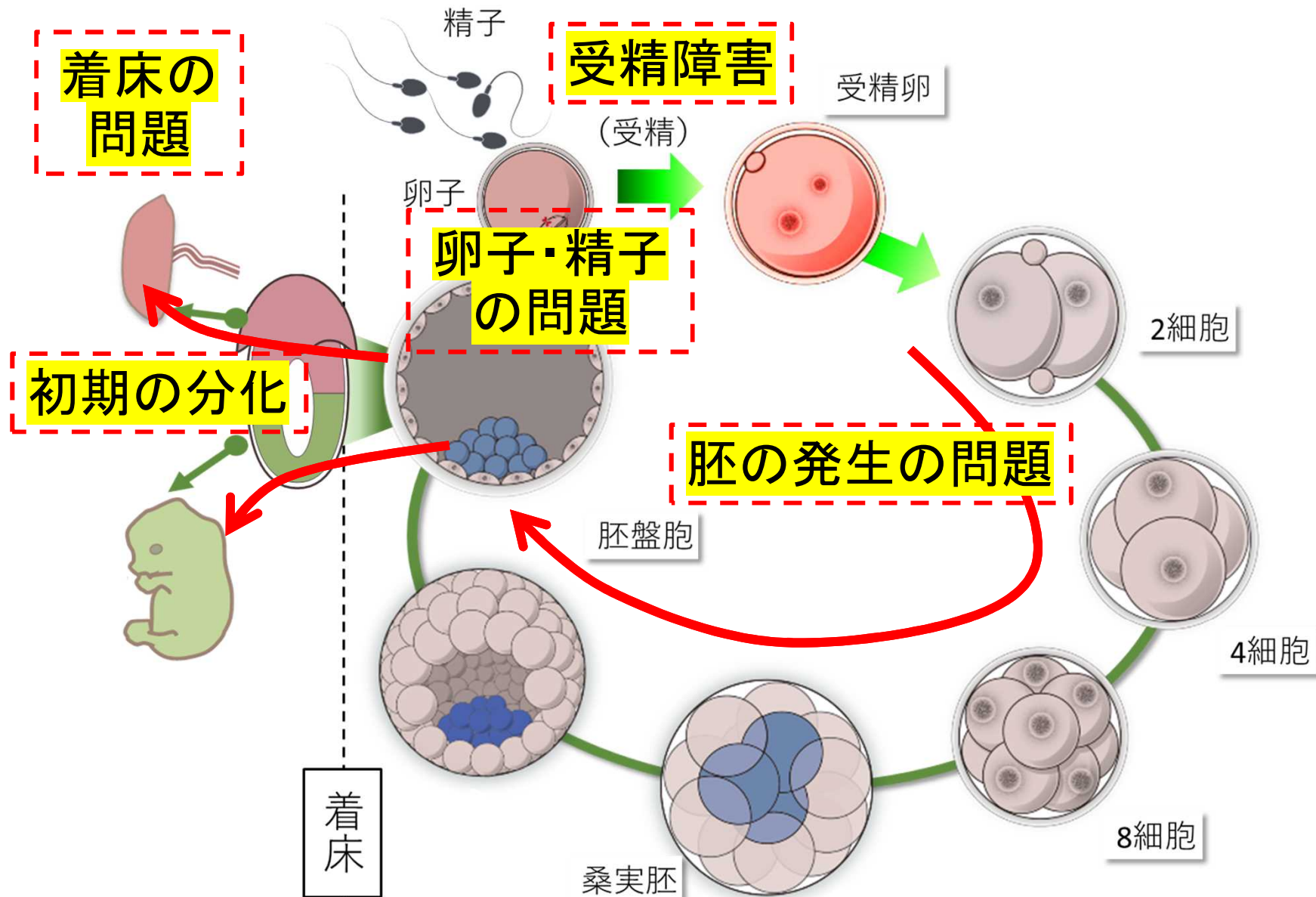
想定されうる新規作成胚の必要性

- ① 受精段階から始まる事象が対象
- ② 技術的観点(ゲノム編集効率や効果)

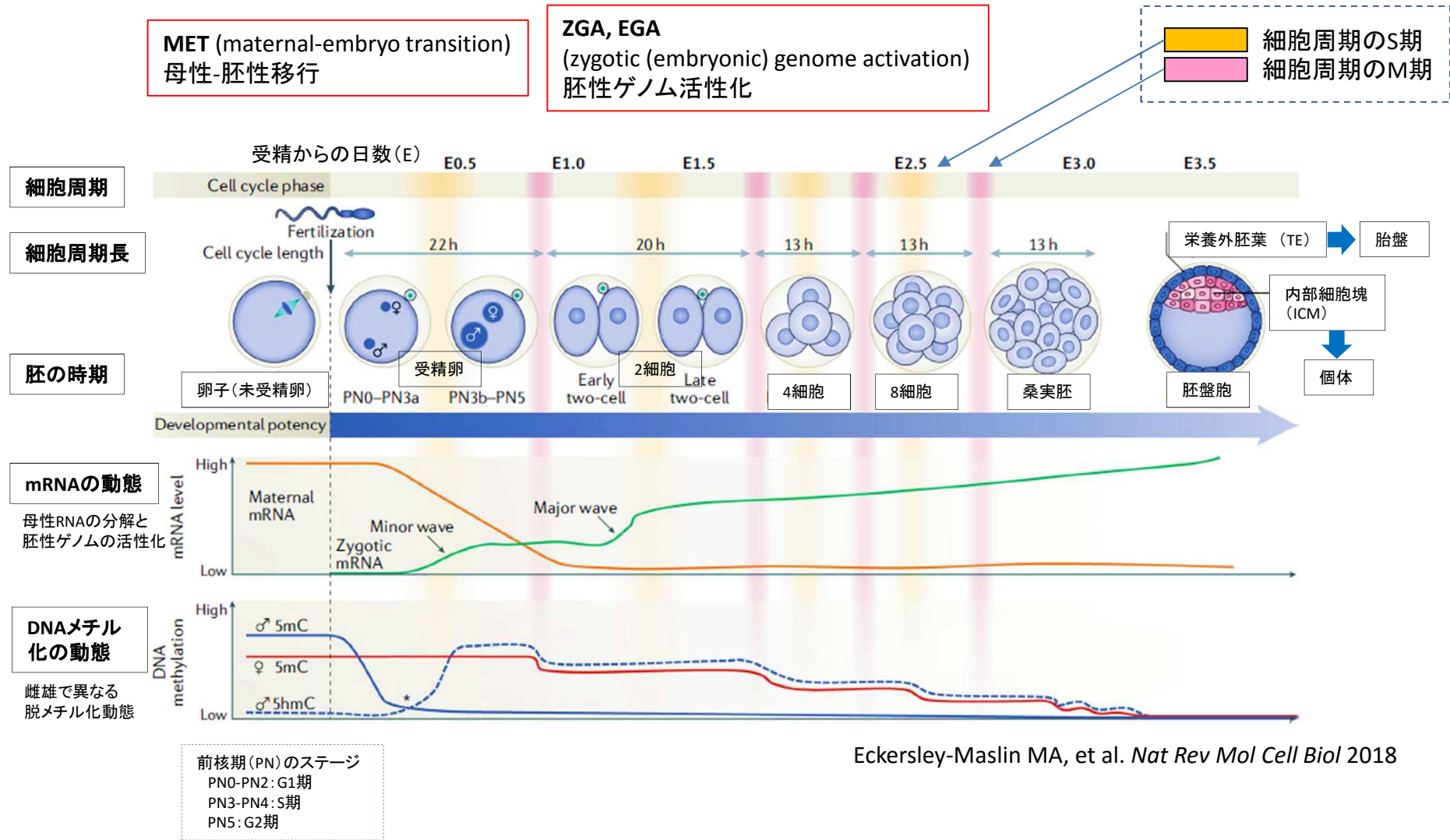
受精から着床前期胚発生を理解



受精から着床前期胚発生を理解



受精から起こる大きな流れ



受精からのダイナミズムの分子による裏付け

母性因子の分解	胚性ゲノム活性化	分解と胚性ゲノム活性化
Degradation of maternal transcripts	ZGA	Degradation of maternal transcripts and ZGA
Transcription factors: ZFP36L2 (REF. ¹³⁷)	Transcription factors: CTCF ¹³⁰ , DUX/DUX4 ^a (REFS ^{83,136,196}), HSF1 (REFS ^{128,138}), LIN28A ¹⁴⁵ , NFYA ⁷³ and SOX2 (REF. ¹³¹)	Transcription factors: POU5F1 (REF. ¹⁴²), SEBOX ^{140,141,145} , DPPA3 (REFS ^{132,133,143,144})
-	Transcription cofactors: TIF1 α ¹²⁹	Transcription cofactors: YAP1 (REF. ¹³⁵)
-	Histone-modifying enzymes: KDM5A (JARID1A) ^{71,75} , KDM5B (JARID1B) ^{71,75} , KMT2B ¹⁴⁹ , KMT2C ¹⁵⁰ , KMT2D ¹⁵⁰ and KMT5C ¹⁵⁶	Histone-modifying enzymes: KDM1A (LSD1) ^{152,153}
-	Chromatin remodellers: BRG1 (REF. ¹⁴⁶), RING1 (REF. ¹⁴⁷) and RNF2 (REF. ¹⁴⁷)	-
-	Histone chaperones: HIRA ¹⁶⁸⁻¹⁷⁰	-
Small RNA biogenesis: AGO2 ¹¹⁹ , DICER1 (REFS ^{120,121})	Non-coding RNAs: miR-125 (REF. ¹⁴⁵)	-
-	Subcortical maternal complex: MATER ¹⁰⁰ and PADI6 (REFS ^{101,102})	-
-	DNA damage-binding protein: DDB1 (REF. ¹¹⁷)	-
-	Pre-mRNA processing factor: BCAS2 (REF. ¹³⁶)	-
Ubiquitin ligase: RNF114 (REF. ¹¹⁴)	Serine protease: GZMG ¹⁰⁷	-
Anti-proliferation factor: BTG4 (REF. ¹²²)	Cell cycle regulators: CCNA2 (REF. ¹¹⁷) and CDK2 (REF. ¹¹⁷)	-

AGO2, protein argonaute 2; BCAS2, pre-mRNA-splicing factor SPF27; CCNA2, cyclin A2; CDK2, cyclin-dependent kinase 2; DDB1, DNA damage-binding protein 1; DICER1, endonuclease Dicer; DPPA3, developmental pluripotency-associated protein 3; DUX, double homeobox; GZMG, granzyme G; HSF1, heat shock factor 1; KDM, lysine-specific demethylase; KMT, histone-lysine N-methyltransferase; LIN28A, protein lin-28 homologue A; MATER, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 5; miR-125, microRNA 125; NFYA, nuclear transcription factor Y subunit- α ; PADI6, protein-arginine deiminase type 6; POU5F1, POU domain, class 5, transcription factor 1 (also known as OCT4); RNF2, E3 ubiquitin-protein ligase RING2; TIF1 α , transcription intermediary factor 1- α ; ZGA, zygote genome activation. ^aOrthologue with a role in the human maternal-to-zygotic transition.

Table 1;Eckersley-Maslin MA, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018

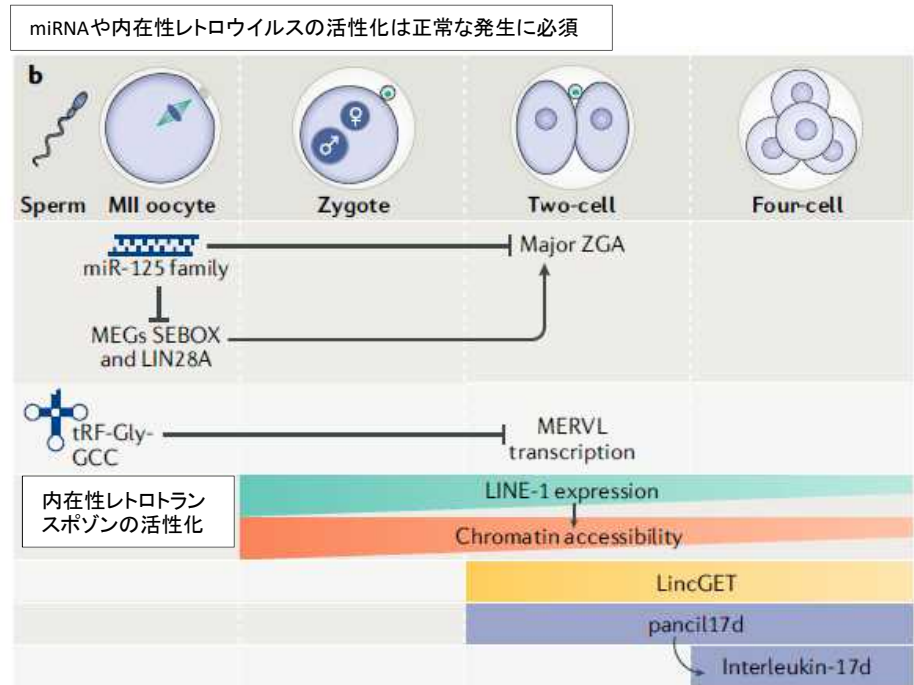
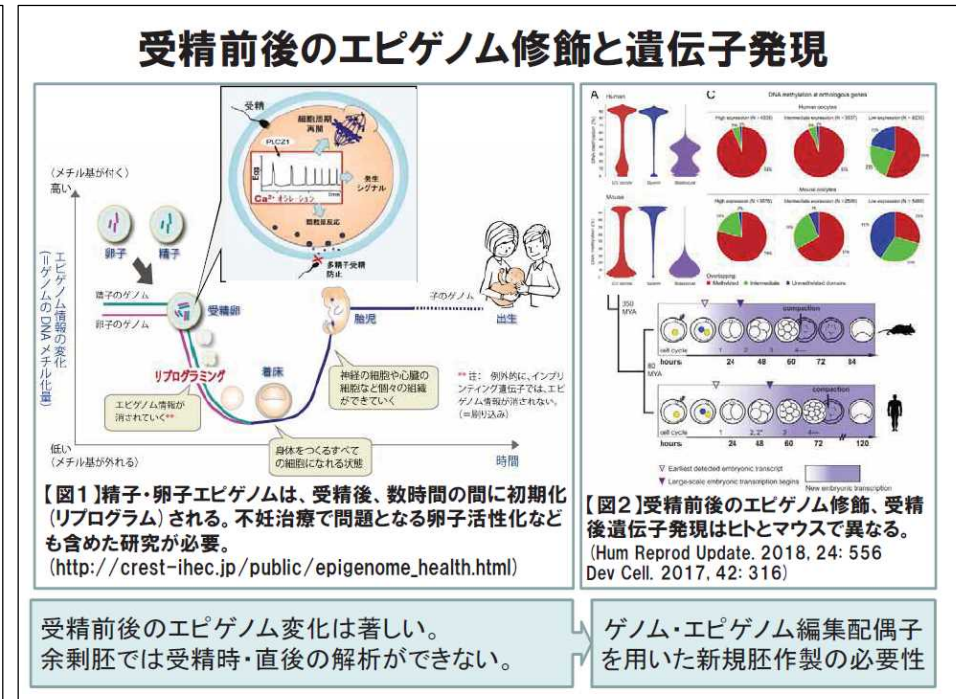
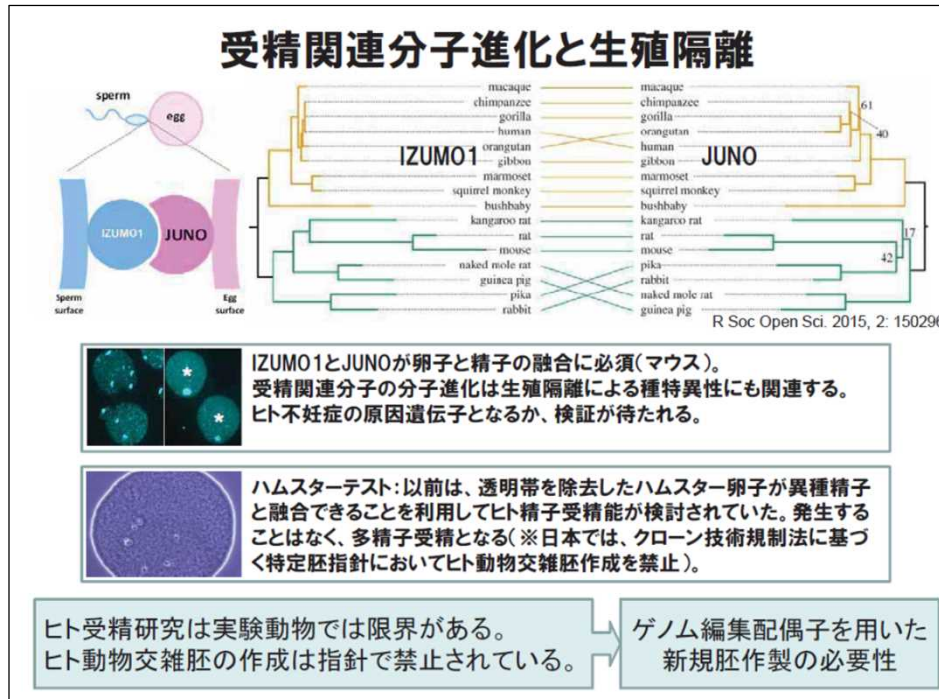


Figure 3;Eckersley-Maslin MA, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018

受精からのダイナミズムの分子による裏付け



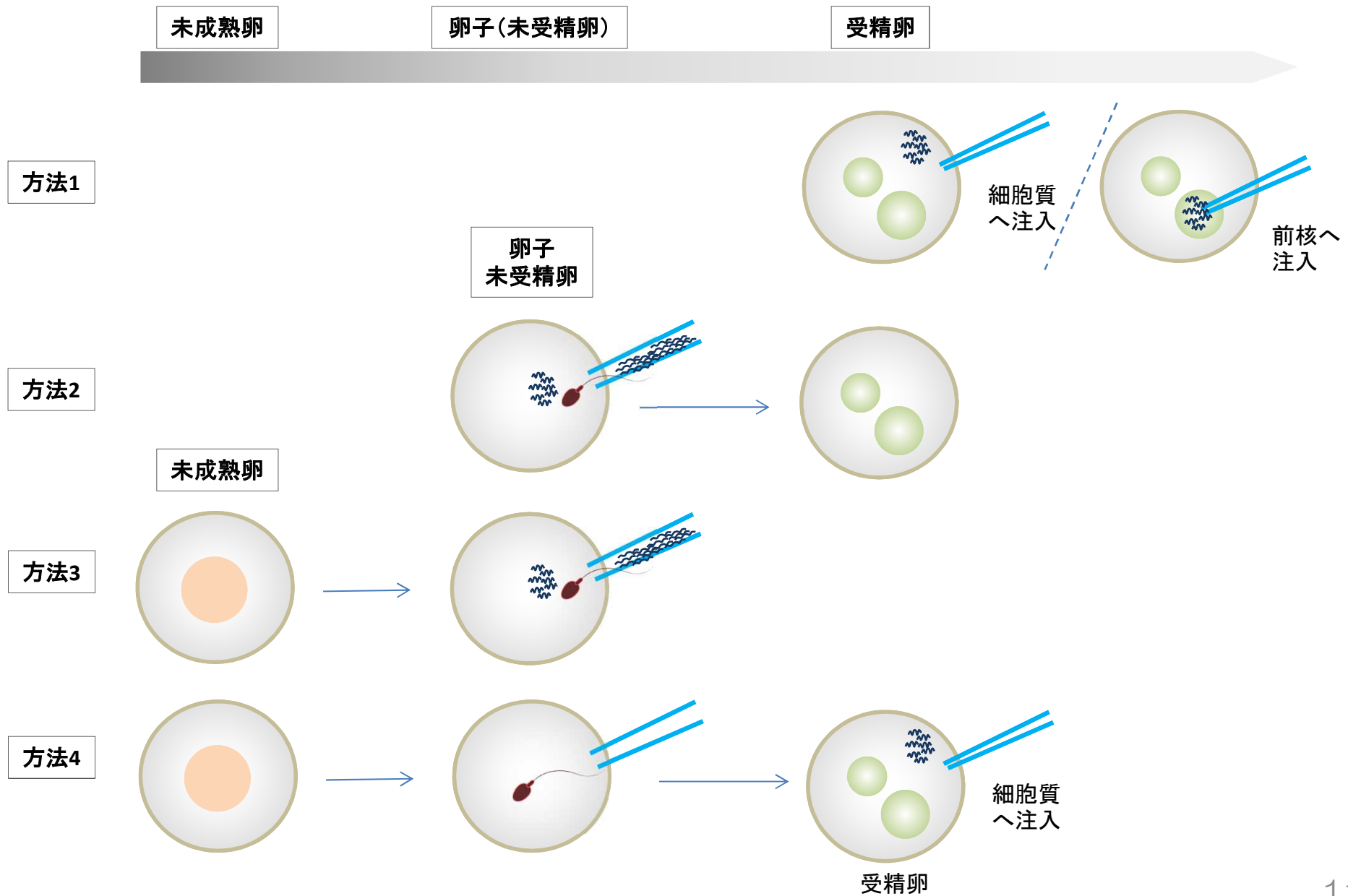
大阪大学 伊川正人先生発表資料:第14回「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」見直し等に係るタスク・フォース

ヒト受精卵ゲノム編集の基礎研究の動向（2019年9月時点）

所属	研究目的	遺伝子	胚の種類,数	研究概要	報告
中国① 中山大学	・ヒト受精胚へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防目的	【HBB】 βサラセミア症原因遺伝子	3PN胚 86個	3前核胚に対しCRISPR/Cas9を用いてβサラセミア原因遺伝子（HBB）を欠損（ランダム変異導入）	2015.4 Protein cell
中国② 広州医科大学	・ヒト受精胚へのゲノム編集効率の確認 ・疾患予防(HIV感染予防)	【CCR5】 HIVの感染受容体遺伝子	3PN胚 213個	3前核胚に対し、CRISPR/Cas9を用いてHIVの感染受容体遺伝子（CCR5）を欠損（ランダム変異導入）	2016.4 J Assist Reprod Genet
中国③ 広州医科大学	・ヒト受精胚へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防	【HBB】 【G6PD】 グル-6リン酸欠損症（溶血性貧血）原因遺伝子	新規作成胚 HBB:10個 G6PD:10個	βサラセミア症又はグルコース6リン酸欠損症患者の配偶子を用いて、受精胚を新たに作成し、CRISPR/Cas9のゲノム編集の修復効率を検証	2017.6 Mol Genet Genomics
中国④ 広州医科大学	・ヒト受精胚への1塩基編集技術（BE3）の検証	【RNF2】 E3 E ³ RING2	3PN胚 25個	3前核胚に1塩基編集技術（BE3）を用いて編集効率を検証	2017.10 Protein cell
中国⑤ 上海交通大学	・ヒト受精胚への1塩基編集技術（BE3等）の確認	【HBB】 , 【FANCF】 , 【DNMT3B】	3PN胚 49個	3前核胚に1塩基編集技術（BE3等）を用いて編集効率を検証	2017.10 Protein Cell
中国⑥ 中山大学	・ヒト受精胚への1塩基編集技術（BE3）の検証 ・遺伝性難病予防	【HBB】	人加へ胚 35個	βサラセミア患者の人クローン胚を作成し、1塩基を置き換えるゲノム編集（塩基編集）技術（BE3）を用いて原因遺伝子（HBB）の変異の修復を検証	2017.11 Protein cell
中国⑦ 上海科技大学	・ヒト受精胚への1塩基編集技術（BE3等）の検証 ・遺伝性難病予防	【FBN1】 マルファン症候群原因遺伝子	新規作成胚 46個	マルファン症候群患者由来精子とICを受けて入手した未成熟卵をin vitroで成熟させたものを顕微授精させ、1塩基編集技術（BE3等）により原因遺伝子（FBN1）の修復を検証	2018.11 Mor Ther
中国⑧ 中国科学院神经科学研究所	・ヒト受精胚へのTild-CRISPR法の確認	【OCT4】 , 【GATA6】	3PN胚	ヒト胚への効率、精密な遺伝子編集法Tild-CRISPR（targeted integration with linearized dsDNA-CRISPR）を開発し改変効率を検証	2018.5 Dev Cell
中国⑨ 合肥医科大学	・ヒト受精胚へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防	【MYBPC3】 肥大型心筋症原因遺伝子	3PN胚	3PN胚を用いて、CRISPR/Cas9による二本鎖DNA切断のメカニズムを検証。	2018.6 Mol Reprod Dev
中国⑩ 中国科学院神经科学研究所	・ヒト受精卵、新規作成胚、2細胞期および4細胞期胚割球への1塩基編集技術（BE3等）の確認	【HBB】 , 【OCT4】 , 【EMX1】 , 【MUT】	3PN胚、新規作成胚、2および4細胞期胚	受精卵、新規作成胚、受精胚の割球に1塩基編集技術（BE3）を用いて編集効率を検証	2019.5 Genome Biol
中国⑪ 広州医科大学	・ヒト受精胚への1塩基編集技術（BE3）の検証	【TTR】 , 【ALDOB】 , 【COL9A2】 , 【PRE65】 , 【KCNJ11】	3PN胚 93個	3前核胚に1塩基編集技術（BE3等）を用いて編集効率を検証	2019.9 Mol Ther Nucleic Acids
米オレゴン健康科学大	・ヒト受精胚へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防	【MYBPC3】	新規作成胚 145個	肥大型心筋症患者の精子と正常な卵子から新たに受精胚を作成。受精胚を作成する際、同時にゲノム編集することによる修復効率化の検証	2017.8 Nature
イギリス フランス・クリック研究所	不妊、初期発生の理解に資する発生学研究	【OCT4】	前核期胚 37個	受精胚や胚性幹細胞で特異的に発現している遺伝子（OCT4）を欠損させて、受精胚の発生における役割を解析	2017.10 Nature

3PN:3前核胚。通常、不妊治療には用いられない。

受精段階でのゲノム編集技術の適応



「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」見直し等に係る報告（第二次）～ヒト受精胚へのゲノム編集技術等の利用等について～（令和元年6月19日 総合科学技術・イノベーション会議）

【タスク・フォース会合における主要知見】

（研究用新規作成胚の作成が必要と考えられる研究例）

- ・体外受精による多くの胚は発生途中で発生停止・流産に至るが、その背景に染色体異常などの遺伝子異常があると考えられている。しかし、ヒト卵子や初期胚における個々の遺伝子の挙動と働きは未解明な部分が多い。近年、ヒト初期胚の網羅的遺伝子発現解析により、初期胚発生においては、卵性遺伝子から胚性遺伝子への遺伝子発現のスイッチや、胚性遺伝子発現が連鎖的に引き起こされることや、発生停止胚の遺伝子発現の網羅的解析により、胚性ゲノムからの転写を誘導する遺伝子群の発現が低下していることが明らかになっている。これらの遺伝子を対象にゲノム編集技術を用いて初期胚発生への影響を検討することにより、初期胚発生に重要な働きを担っている遺伝子及びその機能が明らかになるなど、生殖補助医療の向上に資する知見が得られる可能性がある。
- ・ヒト受精胚には、受精の瞬間から遺伝子、細胞等に短時間で多様な変化が生じる。このため、ヒト受精胚の初期の状態を把握するためには、受精の瞬間から観察することが重要である。
- ・ヒト受精胚の発生初期に生じる染色体異常の頻度は高く、卵割開始後に染色体異常が生じやすい理由、染色体異常が生じた卵割球が失われていく仕組みなど、そのメカニズムの解明については生殖補助医療目的の基礎研究と目的が重複する。
- ・精子先端酵素の異常原因の特定と治療法開発の研究などでは、ゲノム編集を行った精子を実際に受精させることが必要である。