

総 説

マウス胎仔への最近のゲノム編集技術開発の動向

諸星和紀¹, 佐藤正宏², 中村伸吾¹

防医大誌 (2025) 50 (2) : 41 – 49

要旨 : CRISPR/Cas9 システムを代表とするゲノム編集技術により動物や細胞の効率的な遺伝子改変が可能となり, 遺伝子機能の解析や疾患モデルマウスの作製等が実施されている。ゲノム編集を行う場合, 現在まで, 1) 受精卵等の着床前胚に対しゲノム編集を実施する方法, 2) 着床後 (妊娠中期等), 子宮内投与によりゲノム編集試薬を投与し, 続く, エレクトロポレーションによって胎仔内の特定細胞にゲノム編集を実施する方法, 3) 妊娠中期のマウス尾静脈に直接ゲノム編集試薬を投与し, 胎盤を介して胎仔にゲノム編集を実施する方法, 4) 新生仔や成熟マウスを対象に顔面静脈や尾静脈へゲノム編集試薬を直接投与する方法, 等の4つの方法が報告されている。本総説では着床後のマウス胎仔へのゲノム編集法に焦点を当て, 最新の動向を概説する。

索引用語 : ゲノム編集 ／ 胎仔遺伝子操作 ／ 子宮内遺伝子操作 ／
遺伝子治療

1. はじめに

ゲノム編集とはヌクレアーゼを用いて部位特異的に遺伝子を改変させる技術のことであり, 遺伝子機能の解析, 疾患モデルマウスの作製, 遺伝子疾患の治療等, 生物学研究における有用な技術として認知されている。これまで3種類のゲノム編集技術 (ZFN¹⁾, TALEN²⁾, CRISPR/Cas9³⁾) が報告されているが, 利便性, 汎用性の面からCRISPR/Cas9システムが現在主流となっている。ゲノム編集技術, 特にCRISPR/Cas9システムの登場は, これまで治療が困難であった遺伝性疾患に対する新たな遺伝子治療の可能性を飛躍的に高めた。近年, 遺伝子治療の中でも胎児遺伝子治療が大きな注目を集めている。ゲノム編集を利用した子宮内胎児への遺伝子治療は, 出生後の治療と比べ, 効率的な薬剤送達, 免疫寛容機構による外来性物質への拒否反応の低下, 出生直後に発症する恐れのある

遺伝性疾患の発症防止といった点で優位性がある。致死性の遺伝性疾患を患う胎児への遺伝子治療法としても期待され, 動物実験での成功例も報告されている。

しかしながら, 胎児遺伝子治療の実用化には, ゲノム編集の効果, 母体と胎児への安全性評価, 最適な治療時期や送達経路の確立, 倫理的な課題など, 克服すべき課題も多い。本総説では, 胎児遺伝子治療への応用が期待される胎児期のゲノム編集法開発の現状に焦点を当て, マウスを用いた最新の研究動向を紹介する。特に, 胎児でのゲノム編集を効率的かつ安全に行うための遺伝子送達戦略を中心に, その可能性と限界について概説する。

2. ゲノム編集技術

哺乳類においてゲノム編集を行う場合, 主に4つの方法が報告されている。1つ目は, 生殖

¹ 防衛医科大学校防衛医学研究センター医療工学研究部門
Division of Biomedical Engineering, National Defense Medical
College Research Institute, Tokorozawa, Saitama 359-8513,
Japan

² 国立成育医療研究センターゲノム医療研究部
Department of Genome Medicine, National Center for Child
Health and Development, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan

令和6年12月10日受付
令和7年2月13日受理

細胞系列編集 (germline genome editing) と呼ばれる, 生殖細胞系列 (始原生殖細胞, 精子幹細胞, 卵母細胞, 受精卵, 着床前胚など) に対しゲノム編集を実施し, 遺伝子改変動物 (genetically modified animal) を得る方法である^{4, 5)} (図1 a)。2つ目は, 子宮内遺伝子送達 (*in utero* gene delivery) と呼ばれる方法で, 着床後の胎仔へ外科的手法によりゲノム編集試薬を導入する方法である (図1 b)。この場合, 1つ目の手法と異なり, ゲノム編集可能な臓器は, おおよそ心臓, 脳, 肺などに限定され, ゲノム編集された細胞とそうでない細胞とを併せ持つ, いわゆる, モザイク個体となることが多い。3つ目は, ゲノム編集試薬を尾静脈投与により妊娠中期♀個体に直接投与する方法である (図1 c)。この方法はTPGD-GEF (transplacental gene delivery for acquiring genome-edited fetuses) と呼ばれ, 母体血流に投与されたゲノム編集成分が胎盤を介して胎仔に送達され, 結果として, モザイク個体 (胎仔) が作出される^{6, 7)}。4つ目は, ゲノム編集試薬を新生仔の顔面静脈や成熟マウスの尾静脈を介して投与する方法, あるいは, 実体顕微鏡下でガラスピペットや注

射針を用いて成熟マウスの特定の臓器に局所的に投与する方法がある^{8, 9)} (図1 d)。この方法は体細胞ゲノム編集 (somatic genome editing), 生体内体細胞遺伝子編集 (*in vivo* somatic cell genome editing) 等と呼ばれ, 2つ目, 3つ目の方法と同じくモザイク個体が作出される。一方, この方法はある程度の制限はあるものの, 特定の臓器で目的遺伝子を編集できるので, 臓器特異的に起こる遺伝的異常を治癒することも可能である。

CRISPR/Cas9システムは, DNAの標的部位と相補的に結合する一本鎖ガイドRNA (sgRNA) がCas9ヌクレアーゼタンパク質と複合体を形成し, 結果として, Cas9による標的二本鎖DNAの切断 (double-strand break, DSB) が生じる。このDSBは, NHEJ (non-homologous end joining) やHDR (homology-directed repair) と呼ばれるDNA修復機構によって修復される。NHEJは切断されたDNA末端を直接つなぎ合わせる修復であり, 分裂細胞に加え, 非分裂細胞でも生じる。修復の際, 鋳型DNA (ドナー DNA) を必要としないが, その過程でエラーが発生しやすく, 切断部位に塩基対の挿入や欠損 (インデル;

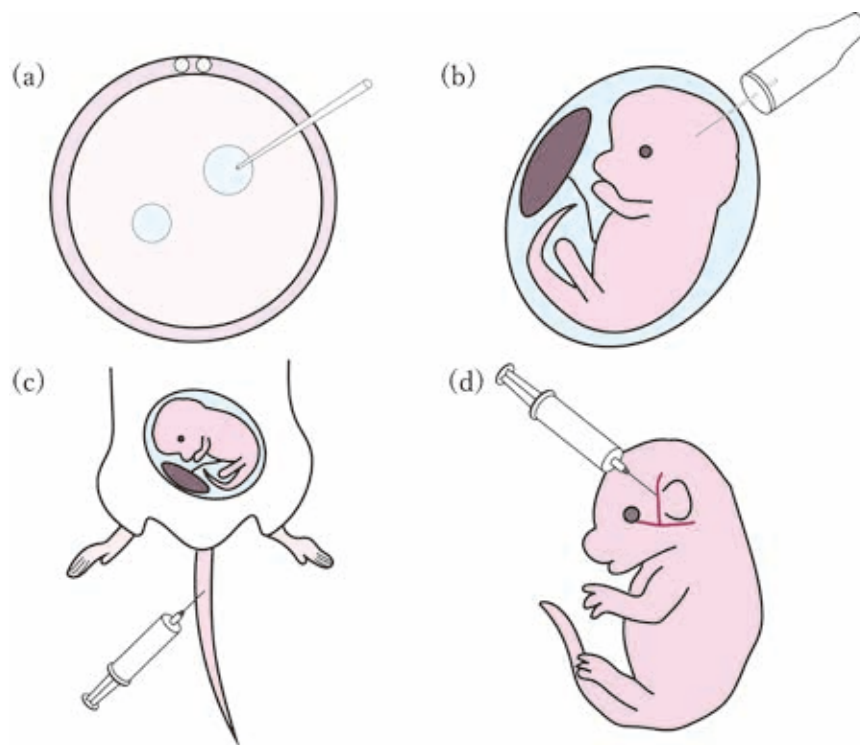


図1. 哺乳類における様々なゲノム編集方法。(a) 生殖細胞系列に対するゲノム編集。(b) 着床後胎仔へのゲノム編集。(c) 妊娠中期♀個体への尾静脈注射を介した着床後胎仔へのゲノム編集。(d) 新生仔マウス顔面静脈を介したゲノム編集。

indels)が生じる。その結果、アミノ酸配列のフレームシフトやタンパク質合成停止の暗号である終始コドンの出現が誘発され、標的遺伝子がノックアウト (KO) される。一方、HDRはドナー DNA存在下で生じる相同組換えにより Cas 9 スクレアーゼ切断部位を修復する方法で、切断部位に挿入したいDNA配列 (ドナー DNA) のノックインを可能にする。しかし、HDRはNHEJよりも発生頻度が低く、分裂細胞でのみ生じる点に注意を要する¹⁰⁾。

CRISPR/Cas9システムは強力なゲノム編集ツールとして広く利用されている一方、DSBの誘発による細胞毒性や、HDR効率の低さ、オフターゲット効果といった課題も指摘されている。近年、これらの課題を克服するため、CRISPR/Cas9システムを基盤とした新たなゲノム編集技術、いわゆる、改良型ゲノム編集技術が開発されている。その代表例が塩基編集 (base editing, BE)¹¹⁾、プライム編集 (prime editing, PE)¹²⁾、HITI (homology-independent targeted integration) 法¹³⁾、SATI (seamless achromatic tagging via long-range genomic integration) 法¹⁴⁾などがある。塩基編集はシチジンデアミナーゼやアデニンデアミナーゼ等の酵素と不活性型 Cas9タンパク質を融合させることで、DSBを誘導することなく、特定の塩基対 (C:G to T:A, A:T to G:C) を標的部位で直接変換する技術である。DSBを介さないため、細胞毒性が低く、より安全なゲノム編集法として注目されている。特に、分裂期の細胞だけでなく、非分裂細胞においても効率的な塩基編集が可能であることから、*in vivo*ゲノム編集や体細胞遺伝子治療への応用が期待されている。プライム編集は、Cas9ニッカーゼと逆転写酵素を融合させ、塩基置換、挿入、欠失など、多様な遺伝子編集をDSBに依存せず、可能とする技術である。HITI法はNHEJ機構を利用したノックイン技術であり、CRISPR/Cas9によってゲノムの標的配列と同一の標的配列を持つように設計されたドナー DNAが同時に切断される。その結果、生じたDNA断片の末端同士が結合することで、ドナー DNAがゲノムへノックインされる方法である。SATI法は、HITI法と同様にNHEJ機構を応用したノックイン技術であり、one-armed

HDRと呼ばれる特殊なHDR経路を利用し、ウイルスベクターを用いることなく、標的遺伝子座に数kb以上の大規模なDNA断片を効率的にノックインする技術である。SATI法は、従来のHDRに依存したノックインに比べ、非分裂細胞や*in vivo*環境下においても高いノックイン効率を示すことが報告されており、遺伝子治療や疾患モデル動物作製への貢献が期待されている。これらの改良型ゲノム編集技術は、従来のCRISPR/Cas9システムの課題を克服し、遺伝子治療、特に胎児遺伝子治療の分野において、新たな可能性を拓くと期待される。

3. 子宮内遺伝子送達

子宮内遺伝子送達は、DNAやゲノム編集試薬を発生中の胎児に直接投与方法である。マウスの場合、卵筒期胚 (E7.5; プラグ確認日をE0とする) や体節期胚 (E8.5) への遺伝子送達に関する研究は、ほとんどが単離した胚を *in vitro* で処置している。これらの胚は短期間培養できるため、実体顕微鏡下で胚組織に遺伝子導入した後の遺伝子産物の挙動をリアルタイムで観察できる。一方、E9.5~E11.5の胚は、その発生が子宮内で進み、且つ、子宮を体外に露出させ、外部から内部の胚の状況を観察出来ないため、例えば、実体顕微鏡下で外部からガラスピペットによる胎仔への試薬注入などの操作は難しい。他方、E12.5~E15.5での妊娠中期胚では、母体側の子宮を露出させた場合、子宮内部の胚 (胎仔) の挙動が実体顕微鏡下で視覚的に観察出来るため、この時期の胚は子宮内遺伝子治療の基礎研究に盛んに利用されている。

上述のように、子宮内遺伝子送達方法として、麻酔下、妊娠♀マウスの腹部側の皮膚を開後、子宮を露出させ、胎仔の特定部位 (皮膚、心臓、脳、肺など) や周辺の付随組織 (胎盤、羊膜、卵黄嚢など) に呼吸制御ガラスキャピラリーを用いてDNAやゲノム編集試薬を注入する方法が一般的に採用されている。使用する遺伝子 (DNA) はウイルスベクターやプラスミド等の非ウイルスベクターがあり、後者のベクターを使用する場合、細胞への試薬の取り込みを加速させるため、試薬注入後、注入部位に対し子宮内エレクトロポレーション (EP) を併

用することが多い。ウイルスベクターの場合、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus, AAV) が多用されており、高度に濃縮したウイルス液を呼気制御ガラスキャピラリーで数 μ L注入する。ゲノム編集試薬の場合、Cas9タンパク質とsgRNAを同時に発現できるall-in-one型プラスミドベクターを注入し、直ちに、子宮内EPを施す方法、あるいは、Cas9タンパク質とsgRNAとの複合体 (ribonucleoprotein, RNP) を注入し、直ちに、子宮内EPを施す方法などがある。あるいは、下記にも示すように、AAVを用いた胎仔への直接的なゲノム編集成分の導入も報告されている。

以下、子宮内遺伝子送達による胎仔組織へのゲノム編集の実際を紹介したい。

1) 子宮内ウイルスベクター投与によるゲノム編集

アンジェルマン症候群 (AS) は発達遅延、てんかん、発話障害、自閉症などの特徴を持つ遺伝性疾患で、母性由来*UBE3A* (ubiquitin protein ligase E3A) 遺伝子に変異や欠損により不活化されることが原因の1つとされる。ASにおける神経細胞では、父性由来*UBE3A*対立遺伝子が*UBE3A-ATS*と呼ばれる非コードRNAでシス (*cis*) に抑制されている。Wolterら¹⁵⁾は、*UBE3A-ATS*の3'領域にクラスター化された核小体RNA *Snord115*を標的としたsgRNAと*Streptococcus pyogenes*由来Cas9遺伝子をコードしたAAV9ベクターを作製し、これをASモデルマウスの胎仔期 (E15)、あるいは、新生仔期の脳内に導入。その後、17か月間、ASの回復の有無を観察した。その結果、*UBE3A-ATS*の抑制に伴う父性*UBE3A*対立遺伝子の活性化が起き、ASモデルマウスの病態は解剖学的、行動学的に正常な表現型へと回復した。以上から、AAV投与によるゲノム編集は、単一遺伝子変異により引き起こされるヒト胎児脳の神経発達障害の根本的治療に有効であることが示唆された。はじめに述べたように、BEは、DSBを誘導せずに塩基対変換を可能とする技術であり、従来のCRISPR/Cas9システムに比べ安全性が高い。Rossidisら¹⁶⁾はBE3技術を実験室でアデノウイルスベクターと子宮内卵黄静脈投与法を組み合わせるこ

とで、遺伝性高チロシン血症I型モデルマウスの治療に成功した。遺伝性高チロシン血症I型 (HT1, hereditary tyrosinemia type I) は代謝性肝疾患で、チロシン代謝経路に関わるフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ (FAH, humarylacetoacetate hydrolase) 遺伝子に変異することで、肝臓内での毒物の蓄積を引き起こし、致死的な肝障害が起こり、生後1か月以内に死に至る疾患である。そのため、乳幼児の肝移植適用が2番目に多い疾患でもある。Rossidisら¹⁶⁾はBE3によるゲノム編集を用い、チロシン代謝の上流にある*Hpd* (hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) 遺伝子内にナンセンス変異を誘導させるため、アデノウイルスにBE3と*Hpd*遺伝子を標的としたsgRNAを搭載し、これをHT1モデルマウス (*Fah*^{-/-})¹⁷⁾のE16胎仔に子宮内投与した。その結果、出産された新生仔はHT1症状を示さず、個体は正常に成長した。

一方、Alpatiら¹⁸⁾は、Cas9遺伝子とsgRNAを搭載したアデノウイルスベクターを妊娠中期マウス胎仔 (E16) の羊水内へ投与した。この時期の胎仔は呼吸をしており、羊水内に投与されたゲノム編集成分を含むアデノウイルスは呼吸によって胎仔肺内に取り込まれ、肺上皮細胞の20%がゲノム編集された。次いで、Alpatiら¹⁸⁾は、致死性肺疾患を患うモデルマウス*Sftpc*^{I37T} (ヒトsurfactant protein C遺伝子の73番目のイソロイシンがスレオニンに置換されているマウス) に*Sftpc*^{I37T}を標的としたsgRNAとCas9遺伝子を搭載したアデノウイルスを羊水内へ投与した。その結果、出生直前の胎仔及び新生仔において、肺形態の正常化、個体の生存性確保が確認された。一方、これらのマウスでは、生殖細胞でのゲノム編集が確認されなかったことから、本手法の安全性が示唆された。これらの研究は、子宮内ゲノム編集がヒトの単一遺伝子異常に起因する疾患 (monogenic diseases) の治療に有効であることを示唆している。

2) 脂質ナノ粒子を用いたゲノム編集

非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、ウイルスベクターに比べ、免疫原性が低く、安全性が高いことが知られている。中でも脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle, LNP) を使用した遺伝子導入法は、旧来のリポソーム系に比

べ、遺伝子導入効率が高い。特に, poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) は生体組織への遺伝子導入助剤としての有用性が最近注目されている。一方, PNAs (peptide nucleic acids) は, DNAと似た挙動を示し, PNA-DNA-PNA複合体を形成する。細胞内でのDNA複製過程に取り込まれ, ドナー DNA断片とゲノムDNAとの間で組換えを起こし, 標的遺伝子に不可逆的な組換えをもたらす。

Ricciardiら¹⁹⁾ は, PNAsと一本鎖DNA(ssDNA)を含むPLGA生分解性ナノ粒子(PLGA nanoparticle, PLGA NP)をヒト β グロブリン遺伝子に変異を持つ, 地中海型貧血として知られる β -thalassemiaモデルマウス胎仔(E15~E16)の卵黄静脈に導入した。その結果, PLGA NPが投与された胎仔肝では部位特異的なゲノム編集が起こり, 出生前での β -thalassemiaの発症は抑えられた。さらに, 血中ヘモグロビン量の増加, 脾腫の喪失, 網状血球数の減少, 生存時間の延長が確認された。

3) 子宮内EPによるゲノム編集

子宮内EPとは, 子宮内の胎仔の脳などの特定部位にプラスミド等のDNAをガラスピペット等で注入後, ピンセット型電極で注入部位を含む子宮全体に矩形波による電気刺激を加えることで, DNA注入部位近傍に存在する細胞の細胞膜透過性を一時的に高め, 細胞の外側に存在するDNAを細胞内に効率的に取り込ませる方法である。2014年, Straubら²⁰⁾はこの方法を用い, マウス胎仔脳内の神経細胞においてCRISPR/Cas9を介した標的遺伝子のKOが可能であることを報告した。この報告では, 子宮内胎仔(E15)脳の左半球へCas9遺伝子とsgRNAを搭載したプラスミド(all-in-one型vector pX330)をガラスピペットで注入し, 直ちに子宮内EPを実施したところ, 生後14~20日目の新生仔脳内の細胞において標的遺伝子のKOが確認されている。この研究から, 子宮内EPという手法が胎仔脳神経回路での特定の神経細胞機能の解明に有効であることが示された。その後, ShinmyoとTanaka²¹⁾もpX330を用いて, 同様の報告をしている。Uemuraら²²⁾は, 標的遺伝子である β -actin遺伝子の開始コドンの直後にEGFP蛍光遺伝子がノックインされるように

設計したDNA配列をCRISPR/Cas9系プラスミドと共に胎仔脳に注入し, 子宮内EPを施した。その結果, 脳神経細胞でEGFP/ β -actin融合タンパクの発現が確認された。この方法は神経やシナプスの機能に影響を与えることなく, 様々なタイプの内在性タンパクの神経細胞での局在を明らかにする手法として期待される。

4. 経胎盤遺伝子送達

経胎盤遺伝子送達(transplacental gene delivery, TPGD)は, 母体の血流に注入されたプラスミド等の核酸が胎盤を経由し, 胎仔側に移送され, 胎仔細胞への遺伝子導入を達成させる技術である。着床後の胚の血液循環系は, 胎盤形成過程で母親由来の血液循環系から徐々に分離し, 胎盤経由で母方からの栄養に依存するようになる。胎盤が完全に形成されると, それは種々の物質輸送を制御する「母体・胎児間バリア」として働く。しかし, ある特定の条件下, 母体循環中に存在するDNA断片, ウイルス, マイクロRNA等の核酸は胎児側へ輸送される^{23, 24)}。Tuzel-Koxら²⁵⁾は妊娠ラット静脈に投与されたリボソームが胎盤に蓄積し, その一部は分解されずに胎仔側へ輸送されることを示した。また, Tsukamotoら²⁶⁾は, リボソーム/プラスミドDNA複合体を妊娠マウス尾静脈へ投与すると, それが母体・胎児間バリアを乗り越え, 胎仔側へ輸送され, 胎仔細胞は一時的であるが, 遺伝子導入を受け, 遺伝子発現を示すことを報告した。Kikuchiら²⁷⁾は, Cre遺伝子が導入された場合のみ目的遺伝子(LacZ; beta-galactosidase 遺伝子をコード)が発現するloxP配列を有するトランスジェニック(Tg)妊娠マウス尾静脈にリボソーム/Cre遺伝子発現プラスミドDNA複合体を投与した。その結果, 胎仔はLacZ遺伝子を発現し, 特に胎仔心臓での発現は顕著に高かった。これは, 妊娠母体に投与された核酸が主に胎仔心臓に集積することを示唆している。以上の結果から, 図1-cに示したように, 妊娠マウス尾静脈経由での胎仔への遺伝子送達も胎仔へのゲノム編集ルートになり得ることが示された。我々はこのような胎盤経由による胎仔への遺伝子送達をTPGDと名付けた⁷⁾。

1) 経胎盤遺伝子送達によるゲノム編集

上述のように、TPGDは母体血中に投与された核酸（プラスミドDNA等）が、胎盤を経由して胎仔側に伝達される現象であるが、胎仔側に到達した核酸は細胞内に一時的に入るにとどまり、細胞染色体に挿入されることはない。しかし、ゲノム編集の場合、目的細胞内でCRISPR/Cas9が一過的に発現されればよく、その成分が染色体に挿入される必要はない。我々はTPGDを用いることで、胎仔でのゲノム編集を誘導できるのではないかと考え、その可能性を検討した⁶⁾。Cas9遺伝子とEGFP cDNAを標的とするsgRNAを搭載したベクターと遺伝子導入介助脂質であるFuGENE6の複合体を作製し、これをEGFP Tg♂マウス (Tg/Tg) とあらかじめ交配させた野生型妊娠♀マウス (E12.5相当) の尾静脈へ投与した。TPGD後、3日目に胎仔 (E15.5; Tg/+) を採取し、緑蛍光を観察した結果、ゲノム編集を行っていない胎仔と比較して、25匹中3匹で蛍光減退が認められた。特に、心臓での減退が顕著であった。しかし、緑蛍光が完全に消光している訳ではないため、これら胎仔はゲノム編集された細胞とそうでない細胞からなる、いわゆる、モザイク状態と見られた。以上から、まだ低率ながら、TPGDでもマウス胎仔でゲノム編集が誘導されることが世界で初めて示された。我々はこの手法をTPGD-GEFと名付けた⁶⁾。

5. 子宮内ゲノム編集とTPGD-GEFの可能性と限界

子宮内遺伝子治療は、胎生致死を誘発する潜在的なリスクはあるが、出生後治療にくらべ、いくつかの明確な利点を有する。例えば、胎児が小さいため、少量の核酸投与で、高効率な遺伝子送達が可能になる。免疫寛容が働いたため、核酸などの外来性物質への拒否反応が低いこと、周産期に現れる遺伝性疾患発症を未然に防ぐこともできる。

子宮内ゲノム編集法やTPGD-GEFを用いた研究から、母体の子宮内にいる胎児は、CRISPR/Cas9等のゲノム編集による標的遺伝子改変を受けやすい状況にあることが判明した。子宮内遺伝子送達に関わる多くの研究は、ガラスピ

ペットを用いた胎仔の特定部位への試薬注入（核酸やウイルス等）、それに続くEP、あるいは、核酸等の静脈への投与といった物理的なアプローチによるものである。特に、前者の場合、顕微鏡下で子宮自体を体外に露出させる、胎仔組織への穿刺等の外科的処置を必要とするため、操作難易度は高く、物理的ダメージによる胎生致死が引き起こされる場合もある。一方、遺伝子送達後のEP処置も胎生致死を引き起こすリスクファクターの1つであり、EP条件の厳密な適正化が必要となる。静脈への投与では、一度に多量の溶液を注入する場合があります。胎仔肝やその他臓器への物理的損傷を引き起こす可能性がある。ゲノム編集にAAVやアデノウイルスのようなウイルスベクターを用いる場合、その安全性が主な懸念点となる。特に、アデノウイルスベクターの場合、繰り返しの感染で潜在的な免疫反応が惹起される可能性がある²⁸⁾。

非ウイルスベクターは、上述の物理的アプローチやウイルスによる感染に比べ、いくつかの利点がある。例えば、PLGAやリポソーム/DNA複合体などは、比較的侵襲性が低く、安全であるため、ゲノム編集に基づく胎児遺伝子治療としては理想的な方法になり得る。しかし、ゲノム編集効率に直結する遺伝子送達率は、ウイルスベクターに比べ若干劣るので、この点は将来的な課題でもある。非ウイルスベクターはこれまで、リン脂質、ポリマー、無機化合物、エキソソーム等、様々なタイプがいくつか開発されてきた²⁹⁻³¹⁾。これらはCRISPR/Cas9系の核酸の分解を防ぎ、直接核内に入り、*in vivo*ゲノム編集が達成されるため、ゲノム編集成分の理想的な*in vivo*送達方法と考えられている³²⁻³⁴⁾。Weiら³⁵⁾は効率的に細胞や組織内にRNPsを導入できる修飾LNPを報告している。この報告では、修飾LNPに複数の標的遺伝子に対応する複数のsgRNAとCas9タンパク質をRNAsとして内包させているため、これを静脈注射によりマウス体内に注入すると、肺や肝臓にその複合体が集積し、肺、肝臓特異的に複数の遺伝子を一度にKOできる。例えば、複数のがん関連遺伝子を一度にKOできれば、肺や肝臓等に器官特異的に癌を誘導することも可能となる（「癌モデル動物」として）。Weiらの研究以外にも、脂

質³⁶⁻³⁹⁾, ポリマー⁴⁰⁻⁴⁶⁾, 無機ナノ物質⁴⁷⁻⁵¹⁾, エキソソーム⁵²⁻⁵⁵⁾を使用した*in vivo*ゲノム編集の成功は数多く報告されているため, 今後, これら試薬が非ウイルスベクターとして胎児遺伝子治療に採用されるものと考えられる。特にナノベクターは, 化学的な修飾やスケールアップが容易で, コスト効率が高く, 大容量のパッケージング能力を持ち, 免疫原性が低いため, 胎児遺伝子治療への応用は大いに期待できる。

6. おわりに

着床直後の胚 (E6~8) は層の厚い脱落膜に阻まれるため, それへの遺伝子導入は困難とされてきた。ところが, Sheehy⁵⁶⁾ らは実体顕微鏡下, ガラスキャピラリーで脱落膜内の胚に直接遺伝子を注入する方法で, 上記胚への遺伝子導入に成功した。現段階では, ゲノム編集の成功例は報告されていないものの, Sheehyらの方法を用いれば, 当該胚へのゲノム編集の可能性は十分に期待できる。着床後中期 (E9~E15) から後期 (E16~E19) での胎仔を標的としたゲノム編集は, 子宮内EP, 羊水内投与, 卵黄静脈内注入, TPGD-GEFなどの事例での成功が報告されている。しかしながら, 子宮内ゲノム編集では侵襲的手術やEP装置が必要であり, また, ウイルスベクターは免疫原性がしばしば問題視される。非ウイルスベクターを用いたTPGD-GEFは, 非侵襲的で, 免疫原性はないが, 変異のモザイク性と低率なゲノム編集という問題がある。最近では, NPを基盤とする核酸送達により高いゲノム編集効率を実現化されている。従って, TPGD-GEFの系にNPを応用させれば, 理想的な胎児遺伝子治療の一手段となる可能性がある。さらに, 近年開発されたSATI法は, ウイルスベクターを用いることなく, 大型遺伝子の標的部位へのノックインを可能とする技術であり, 胎児遺伝子治療における新たな選択肢として期待される。胎児を標的とした様々な手法の開発は胎児遺伝子治療の臨床応用には重要であり, 今後, その技術の継続的な進歩が望まれる。

利益相反

本論文に関して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S.: Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 1156-1160, 1996.
- 2) Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al.: Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 186: 756-761, 2010.
- 3) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al.: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337: 816-821, 2012.
- 4) Sato M, Takabayashi S, Akasaka E, et al.: Recent Advances and Future Perspectives of In Vivo Targeted Delivery of Genome-Editing Reagents to Germ Cells, Embryos, and Fetuses in Mice. *Cells*. 9: 799, 2020.
- 5) Baliou S, Adamaki M, Kyriakopoulos AM, et al.: CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review). *Int J Oncol*. 53: 443-468, 2018.
- 6) Nakamura S, Ishihara M, Ando N, et al.: Transplacental delivery of genome editing components causes mutations in embryonic cardiomyocytes of mid-gestational murine fetuses. *IUBMB Life*. 71: 835-844, 2019.
- 7) Nakamura S, Watanabe S, Ando N, et al.: Transplacental gene delivery (TPGD) as a noninvasive tool for fetal gene manipulation in mice. *Int J Mol Sci*. 20: 2019.
- 8) Liu C, Zhang L, Liu H, et al.: Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release*. 266: 17-26, 2017.
- 9) Fajrial AK, He QQ, Wirusanti NI, et al.: A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Theranostics*. 10: 5532-5549, 2020.
- 10) Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al.: Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 8: 2281-2308, 2013.
- 11) Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al.: Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 551: 464-471, 2017.
- 12) Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al.: Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 576: 149-157, 2019.
- 13) Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al.: In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. 540: 144-149, 2016.
- 14) Suzuki K, Yamamoto M, Hernandez-Benitez R, et al.: Precise in vivo genome editing via single homology arm donor mediated intron-targeting gene integration for genetic disease correction. *Cell Res*. 29: 804-819, 2019.
- 15) Wolter JM, Mao H, Fragola G, et al.: Cas9 gene therapy for Angelman syndrome traps Ube3a-ATS long non-coding RNA. *Nature*. 587: 281-284, 2020.
- 16) Rossidis AC, Stratigis JD, Chadwick AC, et al.: In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of

- metabolic genes. *Nat Med.* 24: 1513-1518, 2018.
- 17) Azuma H, Paulk N, Ranade A, et al.: Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat Biotechnol.* 25: 903-910, 2007.
 - 18) Alapati D, Zacharias WJ, Hartman HA, et al.: In utero gene editing for monogenic lung disease. *Sci Transl Med.* 11: 2019.
 - 19) Ricciardi AS, Bahal R, Farrelly JS, et al.: In utero nanoparticle delivery for site-specific genome editing. *Nat Commun.* 9: 2018.
 - 20) Straub C, Granger AJ, Saulnier JL, et al.: CRISPR/Cas9-mediated gene knock-down in post-mitotic neurons. *PLoS One.* 9: 2014.
 - 21) Shinmyo Y, Tanaka S, Tsunoda S, et al.: CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. *Sci Rep.* 6: 2016.
 - 22) Uemura T, Mori T, Kurihara T, et al.: Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation techniques. *Sci Rep.* 6: 2016.
 - 23) Tetro N, Moushaev S, Rubinchik-Stern M, et al.: The Placental Barrier: the Gate and the Fate in Drug Distribution. *Pharm Res.* 35: 2018.
 - 24) Figueroa-Espada CG, Mitchell MJ, Riley RS, et al.: Exploiting the placenta for nanoparticle-mediated drug delivery during pregnancy. *Adv Drug Deliv Rev.* 160: 244-261, 2020.
 - 25) Tüzel-Kox SN, Patel HM, Kox WJ.: Uptake of drug-carrier liposomes by placenta: Transplacental delivery of drugs and nutrients. *J Pharmacol Exp Ther.* 274: 104-109, 1995.
 - 26) Tsukamoto M, Ochiya T, Yoshida S, et al.: Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nat Genet.* 9: 243-248, 1995.
 - 27) Kikuchi N, Nakamura S, Ohtsuka M, et al.: Possible mechanism of gene transfer into early to mid-gestational mouse fetuses by tail vein injection. *Gene Ther.* 9: 1529-1541, 2002.
 - 28) Lino CA, Harper JC, Carney JP, et al.: Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 25: 1234-1257, 2018.
 - 29) Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al.: Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 15: 541-555, 2014.
 - 30) Wang M, Glass ZA, Xu Q.: Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther.* 24: 144-150, 2017.
 - 31) Dammes N, Peer D.: Paving the Road for RNA Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 41: 755-775, 2020.
 - 32) Duan L, Ouyang K, Xu X, et al.: Nanoparticle Delivery of CRISPR/Cas9 for Genome Editing. *Front Genet.* 12: 2021.
 - 33) Ashok B, Peppas NA, Wechsler ME.: Lipid- and polymer-based nanoparticle systems for the delivery of CRISPR/Cas9. *J Drug Deliv Sci Technol.* 65: 2021.
 - 34) Rouatbi N, McGlynn T, Al-Jamal KT.: Pre-clinical non-viral vectors exploited for in vivo CRISPR/Cas9 gene editing: an overview. *Biomater Sci.* 10: 3410-3432, 2022.
 - 35) Wei T, Cheng Q, Min Y L, et al.: Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nat Commun.* 11: 2020.
 - 36) Zhang X, Li B, Luo X, et al.: Biodegradable Amino-Ester Nanomaterials for Cas9 mRNA Delivery in Vitro and in Vivo. *ACS Appl Mater Interfaces.* 9: 25481-25487, 2017.
 - 37) Miller JB, Zhang S, Kos P, et al.: Non-Viral CRISPR/Cas Gene Editing In Vitro and In Vivo Enabled by Synthetic Nanoparticle Co-Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angew Chem Int Ed Engl.* 56: 1059-1063, 2017.
 - 38) Finn JD, Smith AR, Patel MC, et al.: A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.* 22: 2227-2235, 2018.
 - 39) Shi J, Yang X, Li Y, et al.: MicroRNA-responsive release of Cas9/sgRNA from DNA nanoflower for cytosolic protein delivery and enhanced genome editing. *Biomaterials.* 256: 2020.
 - 40) Yin L, Song Z, Kim KH, et al.: Reconfiguring the architectures of cationic helical polypeptides to control non-viral gene delivery. *Biomaterials.* 34: 2340-2349, 2013.
 - 41) Luo YL, Xu CF, Li HJ, et al.: Macrophage-Specific in Vivo Gene Editing Using Cationic Lipid-Assisted Polymeric Nanoparticles. *ACS Nano.* 12: 994-1005, 2018.
 - 42) Liu BY, He XY, Xu C, et al.: A Dual-Targeting Delivery System for Effective Genome Editing and in Situ Detecting Related Protein Expression in Edited Cells. *Biomacromolecules.* 19: 2957-2968, 2018.
 - 43) Qiao J, Sun W, Lin S, et al.: Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chem Commun.* 55: 4707-4710, 2019.
 - 44) Liu Q, Zhao K, Wang C, et al.: Multistage Delivery Nanoparticle Facilitates Efficient CRISPR/dCas9 Activation and Tumor Growth Suppression In Vivo. *Adv Sci.* 6: 2019.
 - 45) Zhang Z, Wan T, Chen Y, et al.: Cationic Polymer-Mediated CRISPR/Cas9 Plasmid Delivery for Genome Editing. *Macromol Rapid Commun.* 40: 2019.
 - 46) Zhang BC, Wu PY, Zou JJ, et al.: Efficient CRISPR/Cas9 gene-chemo synergistic cancer therapy via a stimuli-responsive chitosan-based nanocomplex elicits anti-tumorigenic pathway effect. *Chemical Engineering Journal.* 393: 2020.
 - 47) Lee K, Conboy M, Park HM, et al.: Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng.* 1: 889-901, 2017.
 - 48) Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, et al.: Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano.* 11: 2452-2458, 2017.
 - 49) Lee B, Lee K, Panda S, et al.: Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. *Nat Biomed Eng.* 2: 497-507, 2018.

- 50) Wang P, Zhang L, Zheng W, et al.: Thermo-triggered Release of CRISPR-Cas9 System by Lipid-Encapsulated Gold Nanoparticles for Tumor Therapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 57: 1491-1496, 2018.
- 51) Tao Y, Yi K, Hu H, et al.: Coassembly of nucleus-targeting gold nanoclusters with CRISPR/Cas9 for simultaneous bioimaging and therapeutic genome editing. *J Mater Chem B.* 9: 94-100, 2021.
- 52) Usman WM, Pham TC, Kwok YY, et al.: Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nat Commun.* 9: 2018.
- 53) Li Z, Zhou X, Wei M, et al.: In Vitro and in Vivo RNA Inhibition by CD9-HuR Functionalized Exosomes Encapsulated with miRNA or CRISPR/dCas9. *Nano Lett.* 19: 19-28, 2019.
- 54) Zhang X, Xu Q, Zi Z, et al.: Programmable Extracellular Vesicles for Macromolecule Delivery and Genome Modifications. *Dev Cell.* 55: 784-801. e789, 2020.
- 55) Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y, et al.: Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas 9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat Commun.* 11: 2020.
- 56) Sheehy NT, Cordes KR, White MP, et al.: The neural crest-enriched microRNA miR-452 regulates epithelial-mesenchymal signaling in the first pharyngeal arch. *Development.* 137: 4307-4316, 2010.

Recent advances in genome editing for post-implanted mouse fetuses

Kazunori MOROHOSHI¹, Masahiro SATO² and Shingo NAKAMURA¹

J. Natl. Def. Med. Coll. (2025) 50 (2) : 41 – 49

Abstract: Genome editing technologies, exemplified by the CRISPR/Cas9 system, have enabled efficient genetic modifications in cells and animals, facilitating of gene function analyses and disease model mice creation. Four main approaches to creating genome-edited animals have been reported: 1) genome editing of preimplanted embryos, including fertilized eggs; 2) genome editing of post-implanted fetuses (i.e., mid-gestational fetuses) via intrauterine delivery of genome editing components, followed by *in utero* electroporation; 3) genome editing of mid-gestational fetuses through transplacental gene delivery by tail vein injection of genome editing components into pregnant females; and 4) somatic genome editing by direct administration of genome editing reagents through the facial vein of neonates or the tail vein of adult mice. This review presents the latest advancements in genome editing techniques that target post-implantation mouse fetuses.

Key words: genome editing / fetal gene manipulation / *in utero* gene manipulation / gene therapy