

ゲノム編集技術を利用した遺伝子改変マウスの簡便な作製法

中村伸吾, 秦 裕樹

防医大誌 (2021) 46 (4) : 147 - 154

要旨: ゲノム編集技術は、ゲノム上の指定した塩基配列の修正を可能にする技術であり、目的遺伝子の操作ツールとして、様々な細胞において広く利用されている。特に、CRISPR/Cas9 システムは、ゲノム編集を行うにあたって必要となるゲノム編集成分の設計が簡単に行えるため、*in vitro* において相同組換えを利用する従来のジーンターゲティング法に代わる手段としての立場を確立している。発生工学の分野においても、CRISPR/Cas9 システムは大きな変革をもたらしている。当初期は、マイクロインジェクション法や電気穿孔法などの古典的な遺伝子導入技術による初期胚操作で CRISPR/Cas9 システムが採用されたが、この方法では受精卵を生体外で取り扱う必要があった。最近では、*in situ* での簡単な胚操作による新たな方法が幾つか報告されている。これらの方法では、ゲノム編集成分を妊娠中の雌マウスの卵管を経由して胚へ導入したり、母体への尾静脈注射によって経胎盤的に胎仔へ導入したりしている。このようなユニークな遺伝子導入技術は、ゲノム改変動物の簡便な作製方法の開発へとつながり、また胎仔の遺伝的疾患の治療に役立つ可能性がある。本総説では、生体内で CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子改変マウスを作製する最近の我々の研究成果を中心に概説する。

索引用語: ゲノム編集 / 遺伝子改変動物 / マウス / *in situ* 遺伝子送達

はじめに

ゲノム編集技術は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (zinc-finger nuclease, ZFN), 転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ (transcription activator-like effector nuclease, TALEN), clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) などを利用してヌクレアーゼによって特定のゲノム配列に改変を加えることのできる技術である¹⁾。中でも、CRISPR/Cas9 システムは、オフターゲット効果が生じる可能性はゼロではないものの、実験系のデザインが容易で使用方法も簡便であることから多くの研究で利用されている。

CRISPR/Cas9 システムの作用機序として重要なポイントは、Cas9 エンドヌクレアーゼ

による DNA の二本鎖切断 (double-stranded break, DSB) の誘発である。このヌクレアーゼによって生じた DSB は、DNA 損傷の修復機構の対象となる。修復の鋳型となる DNA が不在の場合には、DSB は非相同末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) によって修復される。NHEJ は修復エラーによる変異が起りやすく、切断部にインデルと呼ばれるランダムな核酸の挿入、欠失、置換が生じる。この結果、タンパク質翻訳の際のフレームシフト変異がしばしば引き起こされ、本来の終止コドンではない場所に終止コドンが出現することで、完全長のタンパク質が翻訳されない。ナンセンス突然変異と呼ばれるこの状態は、最終的には真核生物に備わっているナンセンス媒介性 mRNA 分解機構によって除去の対象となる²⁾。した

がって、本来発現すべき機能が現れず、いわゆるノックアウト (knock-out, KO) 状態になる。一方、修復の鋳型となる DNA や相同性のある長い遺伝子 (1 kb 以上) あるいは一本鎖配列 (200 bp 以上) を含む DNA が存在した場合、DSB を正確に回復させるために相同組換え修復 (homology directed repair, HDR) が起こる。そして、この HDR を利用することで特異的な塩基配列を DSB の近傍部位へ挿入することが可能になる³⁾。これは、ノックイン (knock-in, KI) と呼ばれ、実際の実験では 20 ~ 30 bp の合成核酸や 200 bp 以上の塩基配列が使用されることが多い。この KI 自体は、NHEJ によるインデルの誘発と比べて成功させることが難しいとされており、さらに、NHEJ は非分裂細胞でも分裂細胞でも起こるが、HDR は分裂細胞で優先的に起こることが知られている⁴⁾。

CRISPR/Cas9 システムを使用してゲノム編集を行うには、一般的には 2 つのゲノム編集成分が必要となる。1 つは主にゲノム上の標的の塩基配列を認識する役割のガイド RNA (guide RNA, gRNA) と呼ばれる成分で、二重の CRISPR RNA (crRNA) / trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) 分子、または crRNA と tracrRNA の融合体であるシングルガイド RNA (sgRNA) から構成され、もう 1 つは、二本鎖 DNA を切断するハサミの役割を担う Cas9 エンドヌクレアーゼである⁵⁻⁷⁾。gRNA は、このヌクレアーゼとともに任意の DNA 配列と結合させることができる。一度結合をすると、このヌクレアーゼはプロトスペーサー隣接モチーフ (protospacer adjacent motif, PAM: 5'-NGG-3' で特徴づけられる) の上流 3 bp の部分で DNA の二本鎖を切断する。その後、先述の NHEJ や HDR などのさまざまな DNA 修復機構によって当該 DSB が DNA 修復されることになり、結果的に KO や KI が誘発される。すなわち、CRISPR/Cas9 システムでは gRNA の配列設計が非常に重要であり、逆に言えばこの点さえしっかり実施されれば良好なゲノム編集効果が得られやすい。CRISPR/Cas9 システムは ZFN システムや TALEN システムなどの他のゲノム編集技術とこの点が異なっており、シンプルで効率的である。それ故に、様々な医学生物学研

究において利用されるようになってきている。そして、CRISPR/Cas9 システムそのものの研究も盛んに進められており、例えば先述の KI 実験においては、Cas9 エンドヌクレアーゼを使用しない CRISPR そのものとトランスポゾンとの併用によって、KI が簡便に幅広い細胞で実施できる可能性が報告されている^{8,9)}。

遺伝子改変マウス作製のためのゲノム編集技術の適用

遺伝子改変個体、例えば遺伝子改変マウス (genetically modified mice, GM マウス) の作製に関する標準的手法は、「受精卵の回収、受精卵への核酸のマイクロインジェクション、胚培養、胚の仮親生殖道への移植」という一連の工程、いわゆる、ex vivo handling を経る。そこには、マイクロインジェクションに必要な高価な装置とその取り扱いスキル、そして、受精卵の採取、胚操作、移植実験等を実施する高度な専門スキルが必須であり、多くの場合専門の人員が雇用されている。加えて、時間と費用も相応に必要となる。また、特定の遺伝子を KO せねばならない場合、ES 細胞の取り扱いやゲノム解析などの遺伝子工学的スキルも必須である。CRISPR/Cas9 システムは、前述の通り、特定のゲノム領域でインデルを誘発することで当該遺伝子の機能を KO できる。また KI 効果についても前述の通りである。したがって、CRISPR/Cas9 システムを発生工学分野へ適用することで、GM マウス作製のための簡便かつ効率的な新規技術が開発できるとの期待が必然的に生まれた。そのためには、CRISPR/Cas9 システムを受精卵へ導入せねばならず、これまでに様々な方法が検討されてきた (表 1)。

GM マウスの作製でこれまでに使用されてきたマイクロインジェクション法での導入は、初期から検討された方法であり、今日でも有用な手段の一つである。マイクロインジェクション技術そのものの利点は、受精卵の種類にかかわらず、既知の量の核酸を導入できることである。ゲノム編集成分を使用したマイクロインジェクション法の詳細なプロトコルは公表されており、広く利用されている¹⁰⁾。

マイクロインジェクション法は熟練したスキ

表1. マウスの胚, 胎仔に対する CRISPR/Cas9 システムの代表的な利用法の一覧

方法	標的	装置等	注意点	代表的な参考文献
マイクロインジェクション (ex vivo)	受精卵 2細胞期胚	マイクロマニピュレーションシステム	採卵, 胚培養, 胚移植の技術が必要	(24), (25)
In vitro 電気穿孔 (ex vivo)	受精卵	電気穿孔装置, マイクロマニピュレーションシステム	顕微授精および採卵, 胚培養, 胚移植の技術が必要	(20), (23)
ウイルスベクター 遺伝子導入 (ex vivo)	受精卵	特に必要とせず	採卵, 胚培養, 胚移植の技術が必要	(13), (14)
GONAD/ <i>i</i> -GONAD/ AAV-based GONAD (in vivo)	受精卵 2細胞期胚	電気穿孔装置	In situ にて実施のため胚操作および移植 マウス等は不要	(15), (26)
子宮内遺伝子導入 (in vivo)	妊娠中期 胎仔	電気穿孔装置 (非ウイルスベクター を使用の場合)	In situ にて実施のため胚操作および移植 マウス等は不要	(27), (28)
TPGD/TPGD-GEF (in vivo)	妊娠中期 胎仔	特に必要とせず	In situ にて実施のため胚操作および移植 マウス等は不要	(19), (29)

ルを必要とするため, これを回避して GM マウスを作製する方法も検討が進められている。具体的には, CRISPR/Cas9 システムのゲノム編集成分を, 受精卵 (1 細胞期胚) あるいは 2 細胞期胚などの着床前胚や着床後胚等へ効率的かつ安全に導入することで, ゲノム編集胎仔を得ようとする試みである。マウスの胚は卵管や子宮内で発生していくため, ゲノム編集成分をこれへ導入する方法は実際のところ限られている。Lino ら¹¹⁾ や Kaneko¹²⁾ は, 妊娠中の雌マウスの卵管から採取した受精卵や体外受精 (in vitro fertilization, IVF) で得られた受精卵に対し, マイクロインジェクション法や in vitro 電気穿孔法 (electroporation, EP) などの既存の技術を適用してゲノム編集成分を導入した。あるいは, このような既存の導入技術に代わるものとして, in vitro の系においてウイルスベクターも使用された。一般的に使用されているウイルスベクターは, レンチウイルス, アデノウイルス, アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus, AAV) である。レンチウイルスやアデノウイルスは透明帯が取り除かれた "脱落" した

着床前胚に感染するが, 透明帯が残っている胚には感染しない¹³⁾。一方で, AAV は血清型に依存するものの, 透明帯を持つ胚に感染することが報告されており^{13,14)}, ゲノム編集成分を持つ組換えアデノ随伴ウイルス (recombinant AAV, rAAV) の着床前胚への感染によって, GM マウスの作製に成功したことが報告されている^{13,14)}。

In vitro の胚培養などの ex vivo handling を回避する「卵管内核酸送達法によるゲノム編集 (genome-editing via oviductal nucleic acids delivery, GONAD)」という新しい生体内アプローチが最近になって報告された¹⁵⁻¹⁷⁾。この技術では, 2 細胞期胚の存在する妊娠雌の卵管にゲノム編集成分を注入し in vivo EP を実施する。この結果, ゲノム編集成分は 2 細胞期胚へ移行し, ゲノム編集胎仔が作り出されたというものである。そしてその後, ゲノム編集成分を持つ rAAV の卵管内投与によるゲノム編集胎仔の作出についても報告がされている¹⁴⁾。これらの研究結果は, 着床前胚の生体内でのゲノム編集が可能であり, その結果として GM マウス

が作り出せることを示している。また、最近になり、さらに2つの *in vivo* ゲノム編集アプローチが報告された。1つは、着床後の胎仔を子宮内でゲノム操作するアプローチであり、ゲノム編集成分を持つ rAAV を羊膜内に注入することで、致死的な変異を持つ胎仔の遺伝子が修正され、救出に成功したとする報告である¹⁸⁾。もう1つは、ゲノム編集成分をコードしたプラスミド DNA を妊娠中期のマウス尾静脈へ注入する方法である。母体マウスの血液中に投与されたゲノム編集成分のプラスミド DNA は胎盤を経由して胎仔へ移行し、その結果、ゲノム編集胎仔が作り出されたと報告されている^{17,19)}。この技術は「ゲノム編集胎仔獲得のための経胎盤的遺伝子送達法 (transplacental gene delivery for acquiring genome-edited fetuses, TPGD-GEF)」と名付けられた。

胚や胎仔以外を対象とした研究も行われている。例えば、精子幹細胞もまた GM マウス作製の有望なターゲットになることが最近になってわかってきた。いくつかの研究グループでは、実際に精子幹細胞のゲノムを改変することで GM マウスの作製に成功したと報告している²⁰⁻²³⁾。しかしながら、これら方法ではいずれも *in vitro* での胚培養操作が必ず必要であり、その取り扱いスキルが不可欠である。

卵管内核酸送達法による GM マウスの作製 (GONAD 法)

これまで我々は、生体組織に対する非ウイルス系 DNA の遺伝子導入に関する研究を進めており、例えば、卵巣や輸卵管における卵子を対象とした遺伝子導入法を報告している^{30,31)}。この手法に対して CRISPR/Cas9 システムの適用を試みたところ GONAD 法の開発に至り、緑色蛍光 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 遺伝子が組み込まれた GM マウスの EGFP 遺伝子に対してインデルが誘発されることが Takahashi らによって報告された^{15,16)}。この報告では、受精卵が存在する卵管内へ Cas9 mRNA と EGFP cDNA を標的とした gRNA とを含む溶液を顕微鏡下で直接注入し (図 1A)、直ちに当該部位に EP を実施することで、これらのゲノム編集成分が受精卵へ導入されたとし

ている。この結果、当該受精卵由来の胎仔の中には EGFP 蛍光の減少が確認できたものが存在し、EGFP 蛍光が完全に失われた胎仔も存在した (35%)。塩基配列解析によれば、蛍光が減少した胎仔はモザイク変異を持っており、蛍光を完全に失った胎仔については両アレルの KO 胎仔であった。モザイク変異が誘発された原因の一つとしては、GONAD 法の実施時期との関係性が予測され、胚盤胞への CRISPR/Cas9 システムの導入による可能性が考えられた。この考えに基づいて、モザイク変異を回避するための GONAD 法の改良が Ohtsuka らによって実施された²⁶⁾。具体的には、Cas9 mRNA の代わりに Cas9 エンドヌクレアーゼのタンパク質を使用し、GONAD 法の実施時期を妊娠 0.7 日目、つまり 1 細胞期胚の後期に相当する段階とした (図 1B, C)。この時期は、1 細胞期胚を強固に取り囲んで EP による胚への外来物質の導入を妨げる原因と考えられた卵丘細胞の剥離が始まる時期にもあたる。目論見は成功し、インデルを持つマウスの取得効率は非常に高くなった (~98%)。さらに、この改良法によって KI 対立遺伝子も作り出せ、その変異した形質は次の世代へと受け継がれた。この様な改良型 GONAD 法は、「improved GONAD (*i*-GONAD)」と名付けられ、その後、ラットにおいても有効であることが報告されている³²⁾。

経胎盤的遺伝子送達法による GM マウスの作製 (TPGD-GEF 法)

1995 年に Tsukamoto らは遺伝子導入試薬と複合化させたプラスミド DNA (pSV40-CAT) を妊娠雌マウスの尾静脈に対し単回投与することで、胎仔に当該遺伝子を導入させることができたことを報告した³³⁾。すなわち、母体マウスの尾静脈に注入された核酸が経胎盤的に発達中の胎仔に送達され、外来性遺伝子が胎仔マウスで発現したとの報告である。その後、我々によって本方法の再現性が確認され、さらに、導入された遺伝子は特に胎仔の心臓と循環系へ優先的に導入されることが報告された³⁴⁾。我々はこれを TPGD と名付け、この技術が、遺伝子が胚の発生に及ぼす影響を調べる研究や胎仔遺伝子治療における研究で役立つものと期待している³⁵⁾。

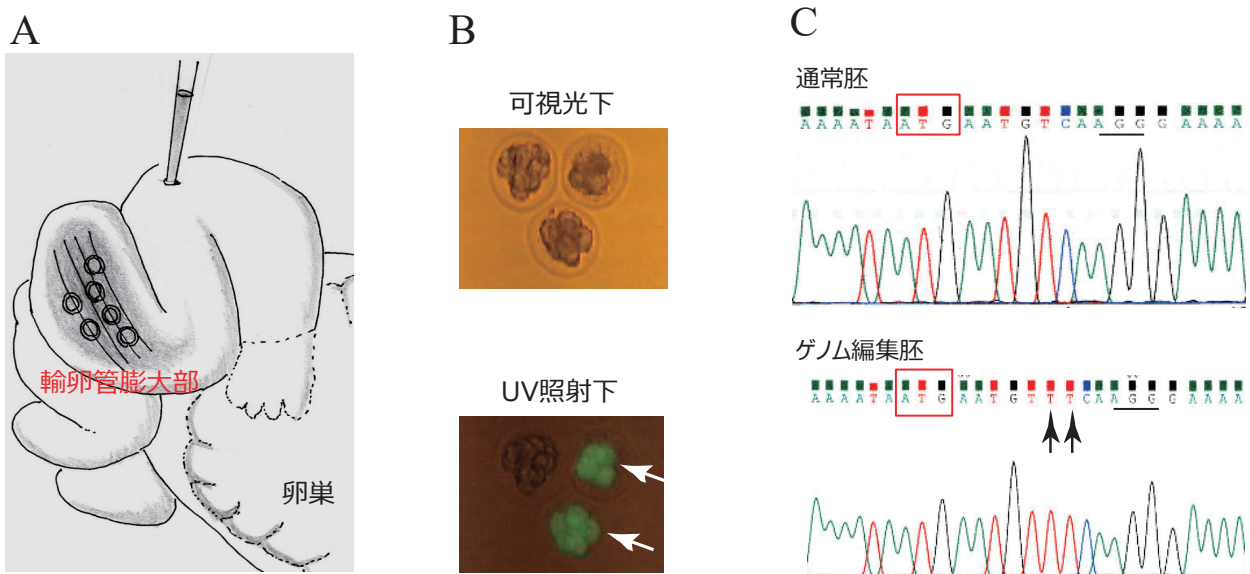


図1. GONADについて(文献(17)より引用, 改変したもの)。

(A) GONADの注入模式図。CRISPR/Cas9システムを輸卵管膨大部へ注入してその後直ちにEP処理することで、受精卵へCRISPR/Cas9システムが導入される。(B) CRISPR/Cas9システムとしてCas9エンドヌクレアーゼのタンパク質/gRNA複合体とフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識デキストラン3kDaを含む溶液を使用し、妊娠0.7日目でGONAD法を実施した。2日後の胚を分離し観察したところ、FITCの蛍光が確認出来た胚(矢印)が存在し、これはCas9タンパク質/gRNA複合体およびFITCがEPによって胚へ導入されたものと考えられた。(C) FITCの発光が確認された胚の塩基配列解析を行ったところ、ゲノム編集胚は通常胚と比べて、PAM配列(AGG)の上流側でヌクレオチドが挿入されていること(矢印)が確認出来た。

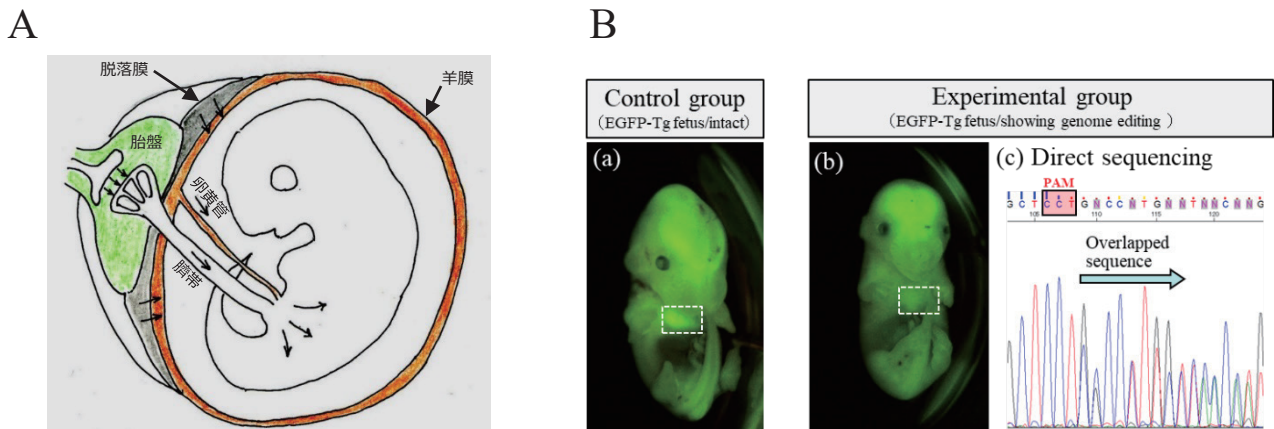


図2. TPGD-GEFについて(文献(17)より引用, 改変したもの)。

(A) 我々の提唱するTPGDの仮説メカニズム^{34,35}。胎盤循環が確立した時期にTPGDが実施された場合、母体静脈血内に投与された外来性プラスミドDNA/遺伝子導入試薬複合体は少なくとも2つのルートで胎仔へ移行する可能性が考えられた。1つは、胎盤から胚へ至るルートであり、もう1つは脱落膜から卵黄囊へ至るルートである。(B) TPGD-GEFが実施された胎仔の中には無処置のコントロール群(a)と比べてEGFP蛍光の発現が減少しているものが観られ(b)、心臓では特に顕著であった(点線四角)。蛍光が減少した胎仔のEGFP配列(5'領域)の塩基配列解析では、PAM配列の上流でオーバーラップした塩基配列(c: 矢印)が観察できたものがあり、これはモザイク変異であることを示していた。

TPGD による胎仔組織への遺伝子導入のメカニズムについては、その可能性を図 2A に示している。

最近、TPGD への CRISPR/Cas9 システムの適用が試みられ、その結果、胎仔の心筋細胞にインデルが誘発されることが初めて報告された¹⁹⁾。この実験では、Cas9 エンドヌクレアーゼと標的配列に対する gRNA の両方を同時に発現させることができるオールインワンタイプのプラスミド DNA を非リポソームタイプの遺伝子導入試薬と複合化させ、妊娠中期の野生型雌マウスの尾静脈内へ静脈注射している。この野生型雌マウスは、ホモ接合 (Tg/Tg) 状態の EGFP 遺伝子を持つ Tg 雄マウスと交配されているため全ての胎仔はヘテロ接合 (Tg/+) となり、すなわち、EGFP を必ず発現していると考えられた。そして、導入されたオールインワンタイプのプラスミド DNA は EGFP を標的とした CRISPR/Cas9 システムであったため、これが上手く胎仔へ導入されてその機能が発現すれば、染色体上の EGFP 遺伝子はゲノム編集されて EGFP の蛍光レベルが低下することが予想された。実際に、TPGD の 2 日後に分離した 24 匹の胎仔のうち、3 匹の胎仔の心臓で明らかな蛍光の減少が確認された。塩基配列解析の結果、この胎仔の心臓の標的遺伝子座にはインデルが存在しており、正常な細胞と変異した細胞とで構成されていることがわかった (図 2B)。これらの結果から、TPGD による CRISPR/Cas9 システムのゲノム編集は、モザイク変異による胚の心臓欠損を引き起こすのに十分実用的であり、先天性心疾患を背景とした心血管疾患モデルの作製や胎仔の遺伝子治療に利用できる可能性のあることが示唆された。その後、TPGD-GEF によって、マウス内在性遺伝子のゲノム編集も実施できたことが報告されている²⁹⁾。

おわりに

本総説では、CRISPR/Cas9 システムの発生活工学分野への適用による簡便な GM マウスの作製法について、我々の研究成果を中心に概説した。CRISPR/Cas9 システムは、有望なゲノム編集技術の一つであるものの、オフターゲット

効果の可能性が示されている点にこの技術の現状の限界がある。そのために、CRISPR/Cas9 システムをヒトの遺伝子治療研究に用いた場合の安全性については、従前の遺伝子治療に対する懸念とは別の課題があるとされている。この課題を解決するための最近の研究例として、黄色ブドウ球菌の Cas9 ヌクレアーゼ (SaCas9) に由来する「SaCas9-HF」と呼ばれる新しいヌクレアーゼの利用があり、オフターゲット活性の約 90% 低減などが報告されている³⁶⁾。このようなオフターゲット効果の低減に関する CRISPR/Cas9 システムそのものの改良は、GM マウスの生産にも有益であろうことは疑いない。本総説で概説した GONAD 法、*i*-GONAD 法、TPGD-GEF 法以外にも、その一部に言及した精子幹細胞を含む生殖細胞系列 (germline) のゲノム編集による新たな遺伝子改変動物の作製に関する研究は現在も進められている。これらの技術に共通する発想としては、*in vivo* (*in situ*) 遺伝子導入である。このような方法の多くは、手技そのものが簡便になるだけでなく、犠牲死させる動物个体数の減少にもつながる。本研究分野の発展は、医学生物学研究で重要な位置を占めている遺伝子改変動物の簡便な作製技術の開発へとつながり、医学生物学研究そのものの進展に貢献していくものと期待される。

利益相反

本論文に関して、開示すべき COI 関係にある企業などはない。

文 献

- 1) Khan SH.: Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Mol. Ther. Nucleic. Acids.* 16: 326-334, 2019.
- 2) He F, Jacobson A.: Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu. Rev. Genet.* 49: 339-366, 2015.
- 3) Beumer KJ, Trautman JK, Mukherjee K, et al.: Donor DNA Utilization During Gene Targeting with Zinc-Finger Nucleases. *G3 (Bethesda)*. 3: 657-664, 2013.
- 4) Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, et al.: Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair*. 5: 1021-1029, 2006.
- 5) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al.: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive

- bacterial immunity. *Science*. **337**: 816-821, 2012.
- 6) Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends. Biotechnol.* **31**: 397-405, 2013.
 - 7) Doudna JA, Charpentier E.: Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. **346**: 1258096, 2014.
 - 8) Strecker J, Ladha A, Gardner Z, et al.: RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science*. **365**: 48-53, 2019.
 - 9) Klompe SE, Vo PLH, Halpin-Healy TS, et al.: Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature*. **571**: 219-225, 2019.
 - 10) Jacobi AM, Rettig GR, Turk R, et al.: Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes. *Methods*. **121-122**: 16-28, 2017.
 - 11) Lino CA, Harper JC, Carney JP, et al.: Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* **25**: 1234-1257, 2018.
 - 12) Kaneko T.: Reproductive technologies for the generation and maintenance of valuable animal strains. *J. Reprod. Dev.* **64**: 209-215, 2018.
 - 13) Mizuno N, Mizutani E, Sato H, et al.: Intra-embryo Gene Cassette Knockin by CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing with Adeno-Associated Viral Vector. *iScience*. **9**: 286-297, 2018.
 - 14) Yoon Y, Wang D, Tai PWL, et al.: Streamlined ex vivo and in vivo genome editing in mouse embryos using recombinant adeno-associated viruses. *Nat. Commun.* **9**: 412, 2018.
 - 15) Takahashi G, Gurumurthy CB, Wada K, et al.: GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci. Rep.* **5**: 11406, 2015.
 - 16) Sato M, Ohtsuka M, Nakamura S.: Intraoviductal instillation of a solution as an effective route for manipulating preimplantation mammalian embryos in vivo. *New Insights into Theriogenology*, InTechOpen, London, 2018, pp 135-150.
 - 17) 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.
 - 18) Alapati D, Zacharias WJ, Hartman HA, et al.: In utero gene editing for monogenic lung disease. *Sci. Transl. Med.* **11**: eaav8375, 2019.
 - 19) 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.
 - 20) Sato T, Sakuma T, Yokonishi T, et al.: Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports*. **5**: 75-82, 2015.
 - 21) Wu Y, Zhou H, Fan X, et al.: Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*. **25**: 67-79, 2015.
 - 22) Wang Y, Ding Y, Li J.: CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Methods. Mol. Biol.* **1622**: 293-305, 2017.
 - 23) Li X, Sun T, Wang X, et al.: Restore natural fertility of Kit(w)/Kit(wv) mouse with nonobstructive azoospermia through gene editing on SSCs mediated by CRISPR-Cas9. *Stem Cell. Res. Ther.* **10**: 271, 2019.
 - 24) Li D, Qiu Z, Shao Y, et al.: Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* **31**: 681-683, 2013.
 - 25) Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al.: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. **153**: 910-918, 2013.
 - 26) Ohtsuka M, Sato M, Miura H, et al.: i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* **19**: 25, 2018.
 - 27) Tsunekawa Y, Terhune RK, Fujita I, et al.: Developing a de novo targeted knock-in method based on in utero electroporation into the mammalian brain. *Development*. **143**: 3216-3222, 2016.
 - 28) 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**: 35861, 2016.
 - 29) Nakamura S, Ando N, Watanabe S, et al.: Hydrodynamics-Based Transplacental Delivery as a Useful Noninvasive Tool for Manipulating Fetal Genome. *Cells*. **9**: 1744, 2020.
 - 30) Sato M, Tanigawa M, Kikuchi N, et al.: Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation. *Genesis*. **35**: 169-174, 2003.
 - 31) Sato M.: Intraoviductal introduction of plasmid DNA and subsequent electroporation for efficient in vivo gene transfer to murine oviductal epithelium. *Mol. Reprod. Dev.* **71**: 321-330, 2005.
 - 32) Takabayashi S, Aoshima T, Kabashima K, et al.: i-GONAD (improved genome-editing via oviductal nucleic acids delivery) , a convenient in vivo tool to produce genome-edited rats. *Sci. Rep.* **8**: 12059, 2018.
 - 33) 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.
 - 34) 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.
 - 35) 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**: 5926, 2019.
 - 36) Tan Y, Chu AHY, Bao S, et al.: Rationally engineered *Staphylococcus aureus* Cas9 nucleases with high genome-wide specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **116**: 20969-20976, 2019.

Novel and simple methods for generating genetically modified mice using genome editing techniques

Shingo NAKAMURA, Yuuki HATA

J. Natl. Def. Med. Coll. (2021) 46 (4) : 147 – 154

Abstract : Genome-editing techniques make it possible to induce modifications in a predefined region of the genome and are now widely used as promising tools to manipulate a gene of interest in various cells. Particularly, the CRISPR/Cas9 system is extensively used as a powerful alternative to traditional gene targeting methods using homologous recombination *in vitro*, because of its simplicity in designing the elements. In the field of developmental engineering, the use of the CRISPR/Cas9 system, has brought about significant changes. This system was initially employed in early embryos, utilizing classical gene delivery methods such as microinjection or electroporation, which required *ex vivo* handling of zygotes. Recently, novel methods which facilitate easy embryo manipulation *in situ*, have been reported. Studies utilizing these techniques employed pregnant female mice to directly introduce the genome-editing components into the oviduct or were dependent on delivery via tail-vein injection. This unique gene delivery technique may be a useful tool for manipulating embryonic cell functions *in vivo*, with simpler procedures for generating genome modified animals, and has potential in the treatment of fetal genetic diseases. In this review, we describe our recent achievements in generating genetically modified mice using the CRISPR/Cas9 system *in vivo*.

Key words : Genome editing / genetically modified animal / mouse
/ *in situ* gene delivery