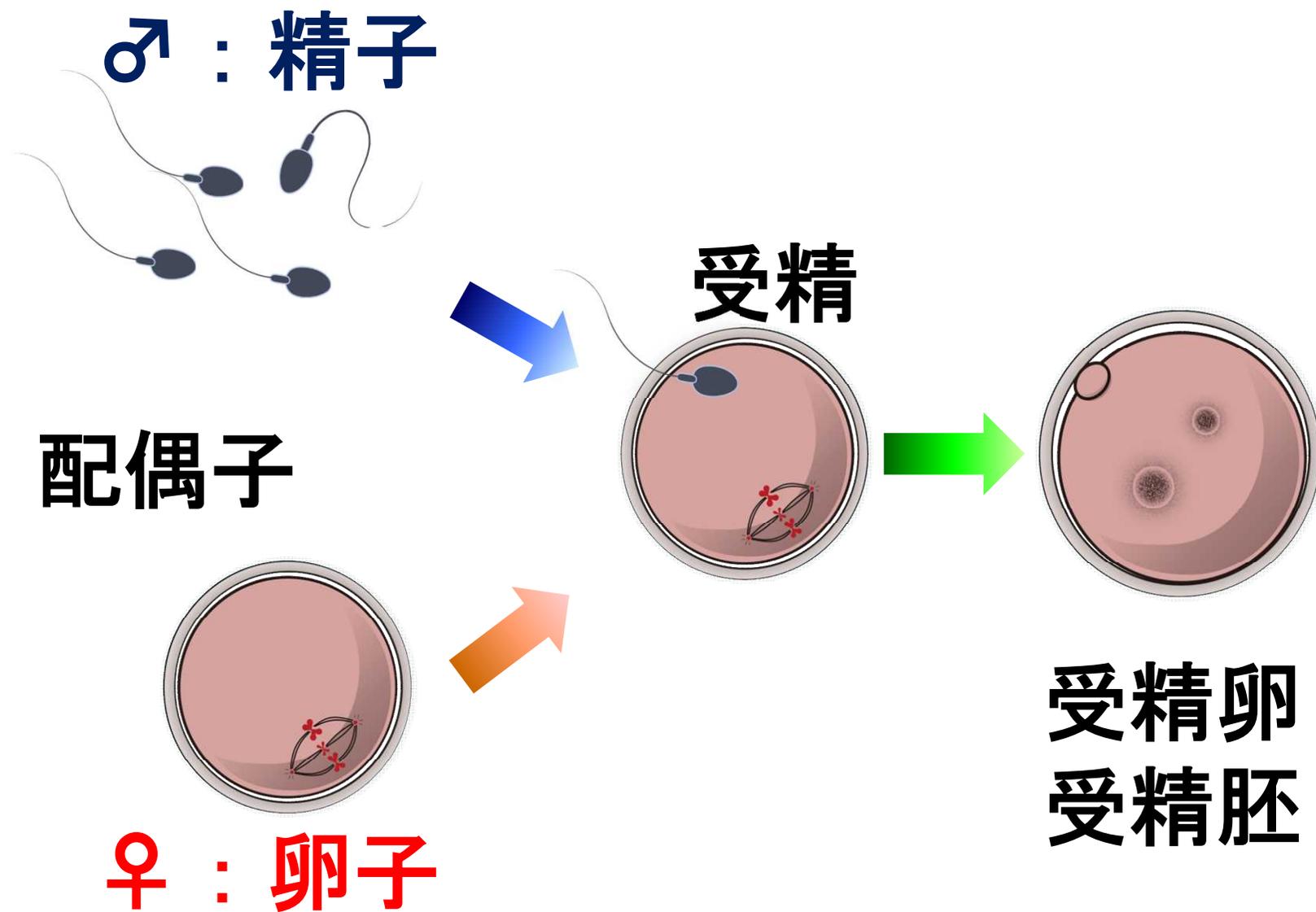


ヒト受精胚へのゲノム編集技術等を用いる研究に関する合同会議(第1回)

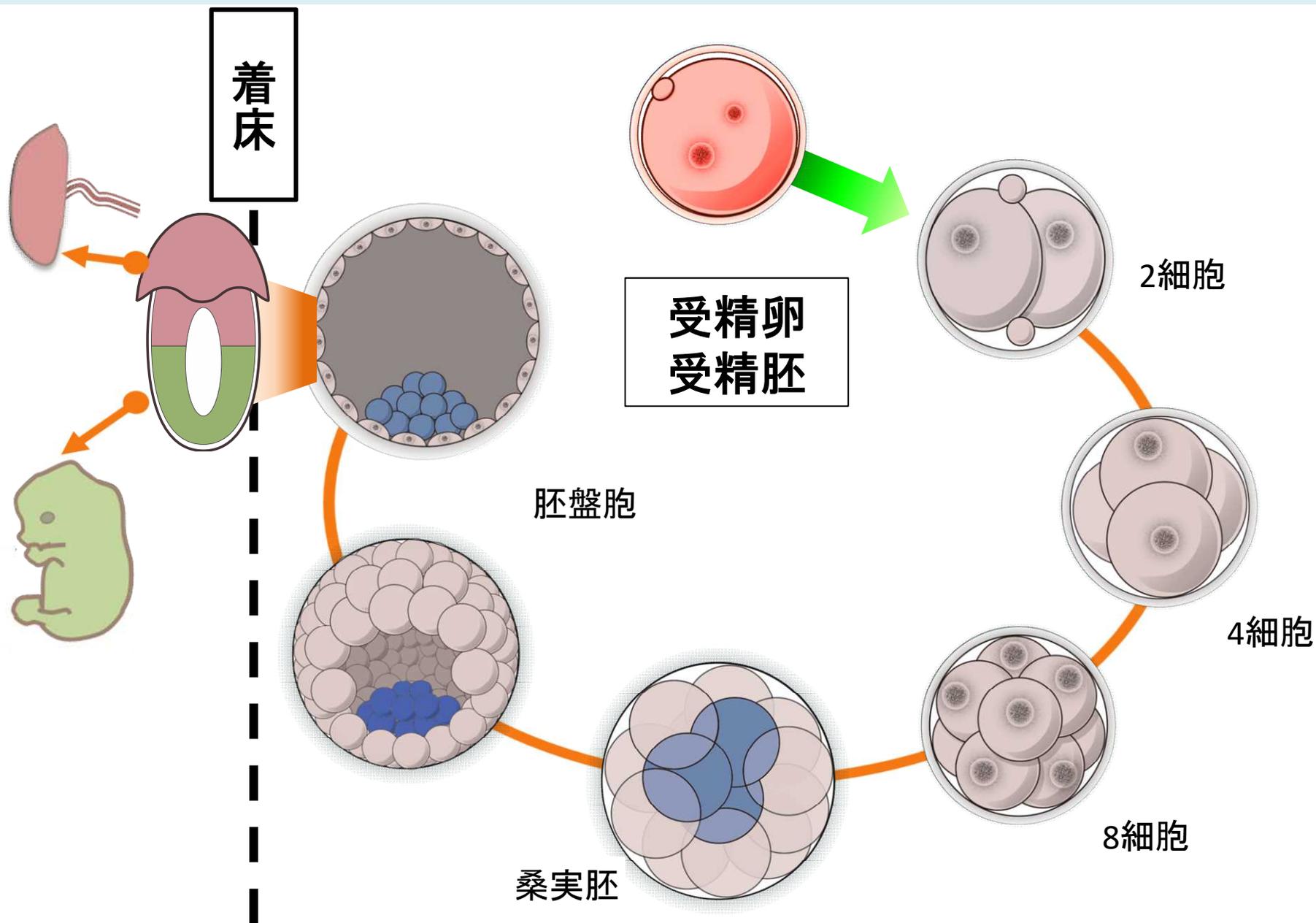
ヒト受精胚を用いたゲノム編集利用研究について

国立成育医療研究センター研究所
生殖医療研究部 阿久津 英憲

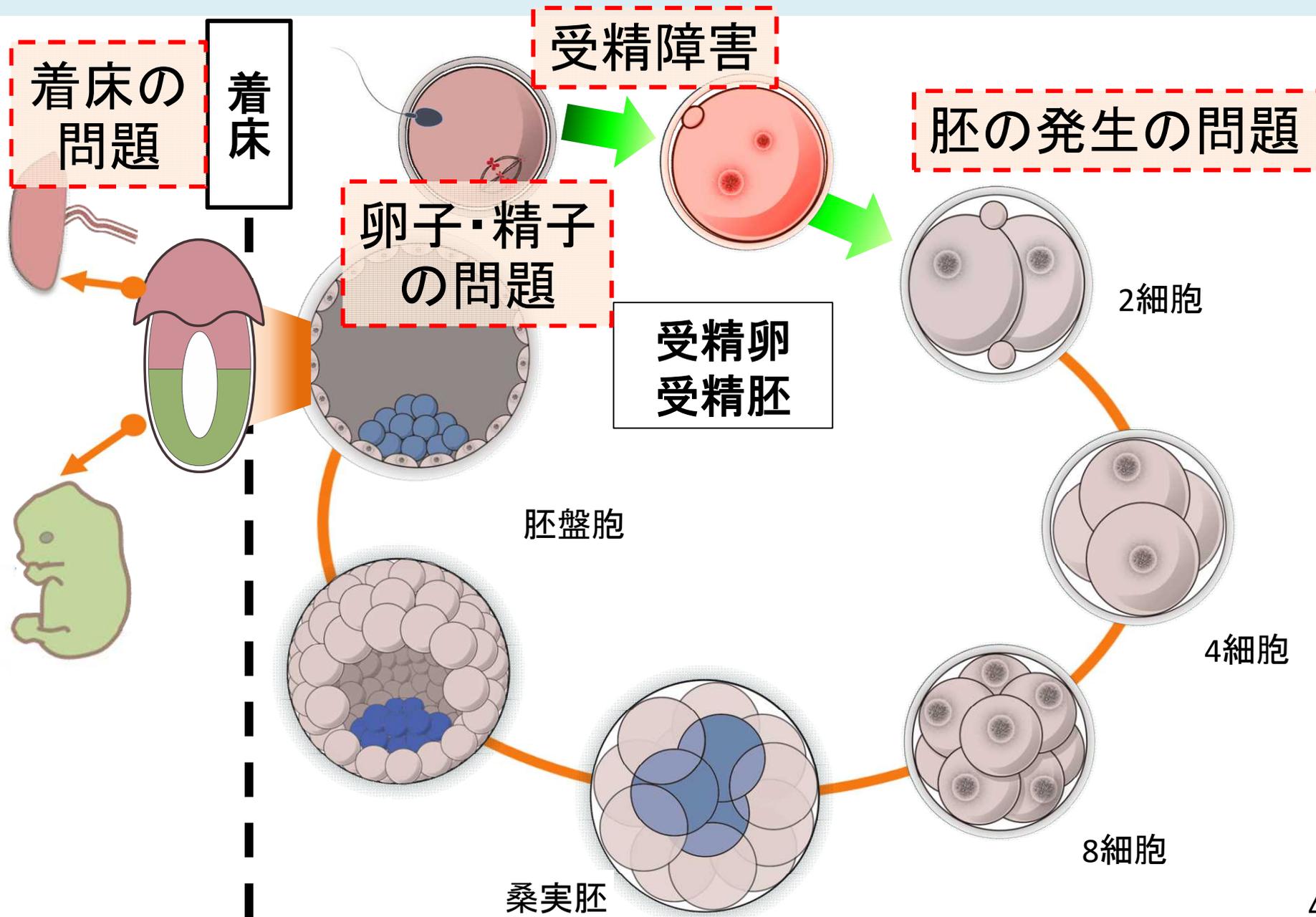
受精から着床前期胚発生を理解



受精から着床前期胚発生を理解



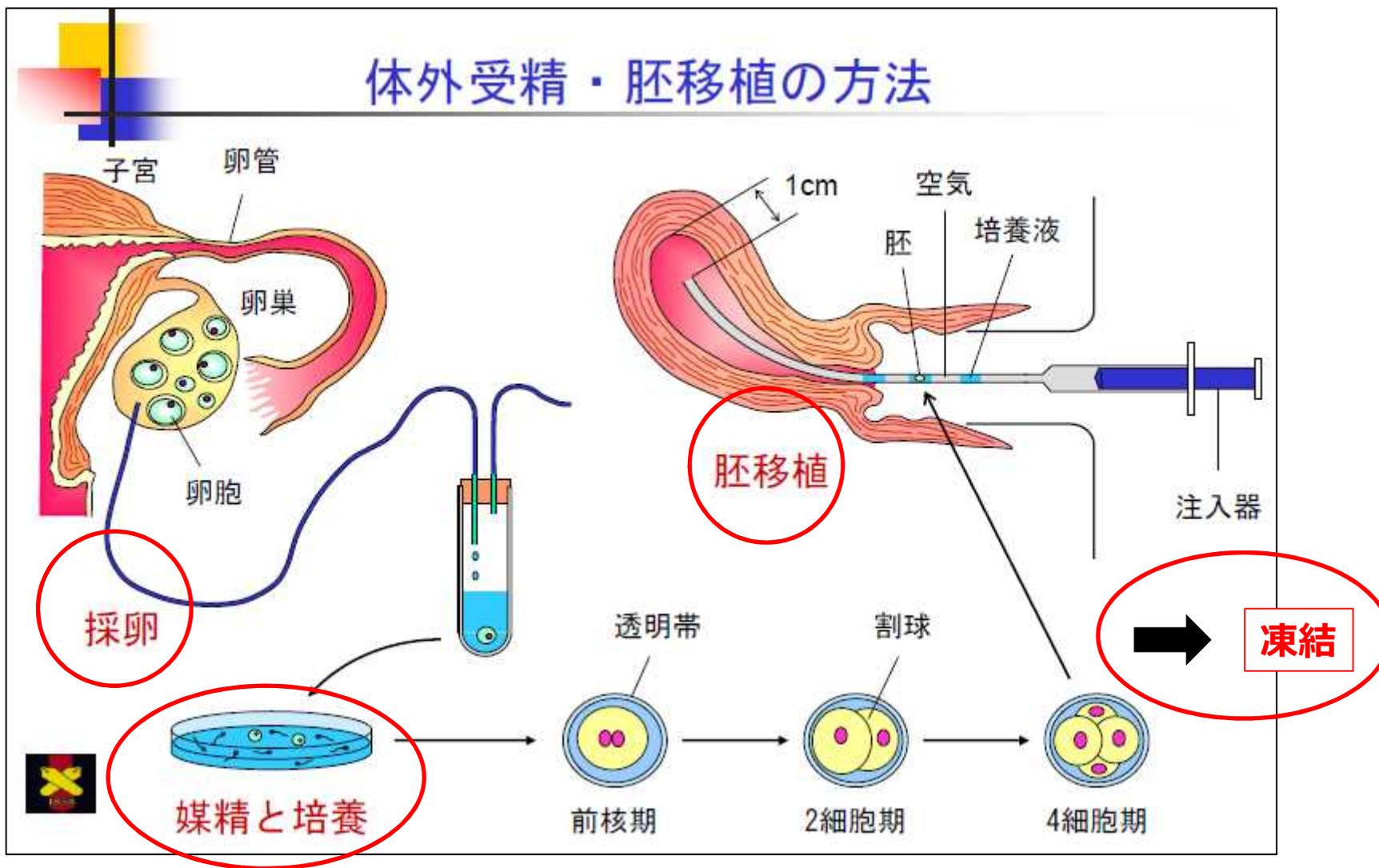
受精から着床までと不妊症



生殖補助医療

生殖補助医療の概要

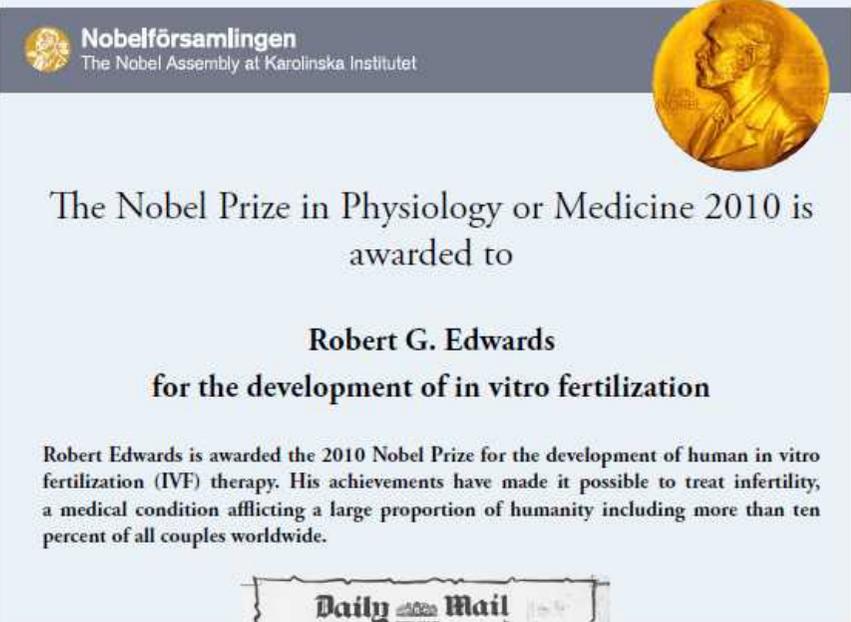
生殖補助医療で補助できること: 受精～着床前までの発生



引用(一部改変): 第1回ART委員会 資料1-5「ヒト胚の研究体制に関する研究」(吉村 泰典 委員提出資料)

生殖補助医療

Edwards博士 ノーベル賞受賞 (2010年)



Nobelförsamlingen
The Nobel Assembly at Karolinska Institutet

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2010 is awarded to

Robert G. Edwards
for the development of *in vitro* fertilization

Robert Edwards is awarded the 2010 Nobel Prize for the development of human *in vitro* fertilization (IVF) therapy. His achievements have made it possible to treat infertility, a medical condition afflicting a large proportion of humanity including more than ten percent of all couples worldwide.

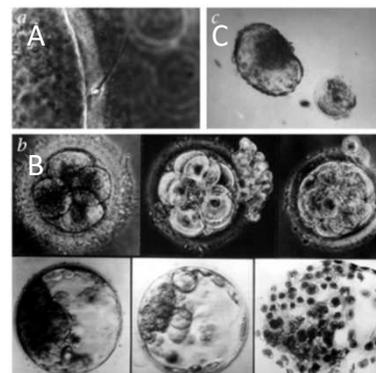


Nobelprize.org; Information for the Public

- 1962 Systematic collection of mature oocytes from patients' ovaries
- 1962 Rabbit embryo stem cells grown and differentiated *in vitro* from inner cell mass
- 1963 Rabbit stem-cell lines established
- 1965 Human oocytes matured *in vitro* to metaphase 2 and first polar body
- 1967 Cells injected into mouse blastocysts produce mosaic chimaeras
- 1968 Rabbit blastocysts sexed successfully
- 1969 Fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*
- 1970 Mature oocytes aspirated from human follicles after gentle priming of patients with gonadotrophins
- 1971 Human fertilization and embryo growth *in vitro* to expanding blastocysts
- 1972 Human embryo transfers begin
- 1977 Human embryos grown to day 9, with huge embryonic discs trumpeting news of stem cells
- 1978 Birth of first IVF baby
- 1984 First attempt at producing human stem cells

'IVF and the history of stem cell' commentary article. Nature 413, 2001

体外での受精、胚の発生などの研究が1960年代からなされ、1978年のIVF成功につながった。一方で、不妊症の原因を直接的に突き止めるものではなかった。

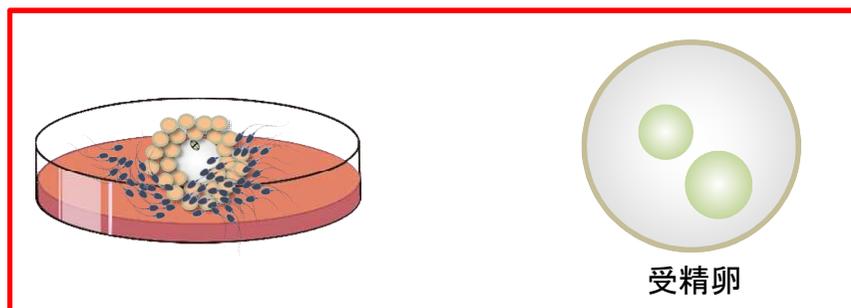


ヒト体外受精研究の初期の成果
A: ヒト卵子と精子の融合
B: 受精卵の体外培養下での発生
C: 胚盤胞のハッチング

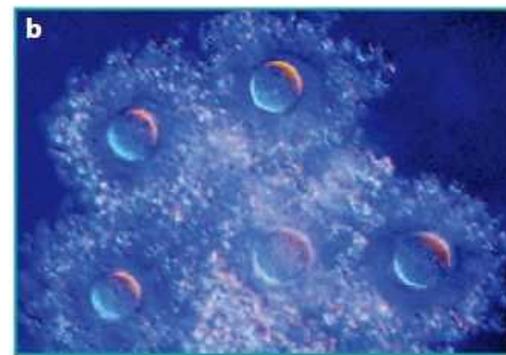
Fig 1; Edwards RG. 'The bumpy road to human *in vitro* fertilization'. Nature Medicine 7, 2001

配偶子、受精胚に対する胚操作技術

1. 体外受精: IVF (in vitro fertilization)



Steptoe PC and Edwards RG. "Birth after the reimplantation of a human embryo." *Lancet* 2:366 (1978)

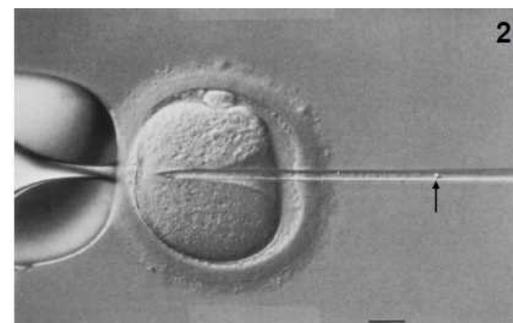


Martin M. Matzuk and Kathleen H. Burns. *Annu. Rev. Physiol.* 2012. 74:503–28

2. 顕微授精: ICSI (intracytoplasmic sperm injection)



Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." *Lancet* 340: 17-18 (1992)

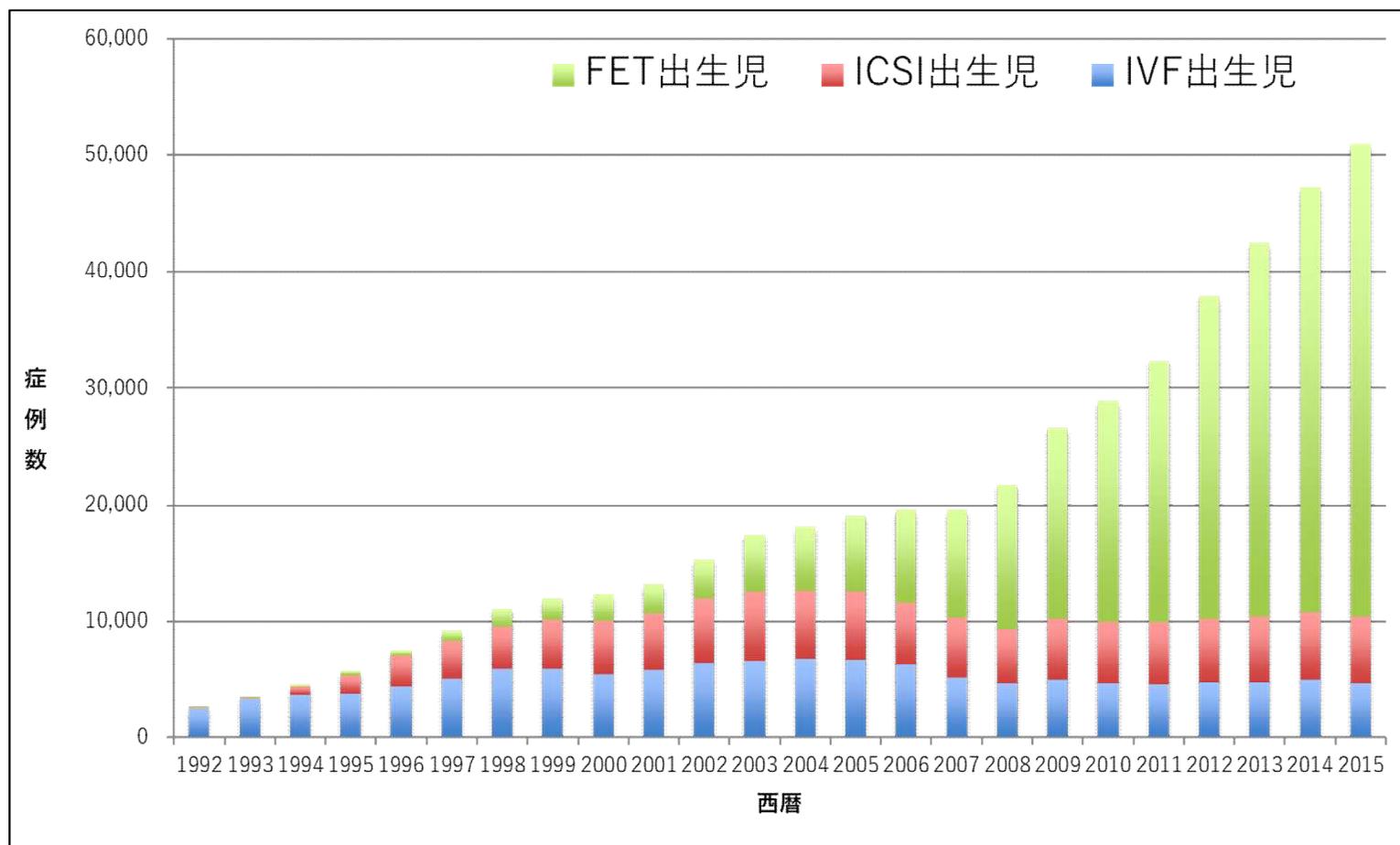


引用(一部改変): 第1回ART委員会 資料1-5
「ヒト胚の研究体制に関する研究」(吉村 泰典
委員提出資料)

配偶子、受精胚に対する胚操作技術の臨床応用

3. 凍結胚移植：FET (frozen-thawed embryo transfer)

生殖補助医療：年別 出生児数



日本産科婦人科学会 生殖補助医療の成績(2015)

生殖補助医療の課題

卵割期胚の形態評価法 (Veeck分類)



(図 E-4-4)-2) 初期分割胚(採卵後2日目の4細胞期胚あるいは4日目の8細胞期胚)のVeeck分類

日産婦誌60(12)2008

卵割期胚の形態評価→より良好な胚を移植へ
選択

(ヒトでは割球が不均一, フラグメンテーション*
が比較的多い)

ヒト胚の発育

- 30-50%が胚盤胞へ発生 (IVF後)

Alper, et al. Hum Reprod 2001

マウスでは約80%が胚盤胞へ発生

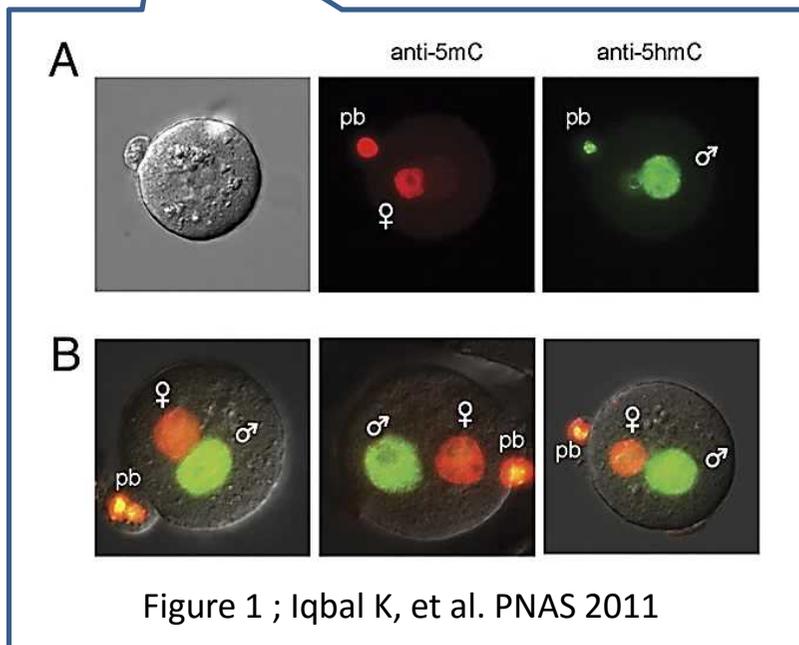
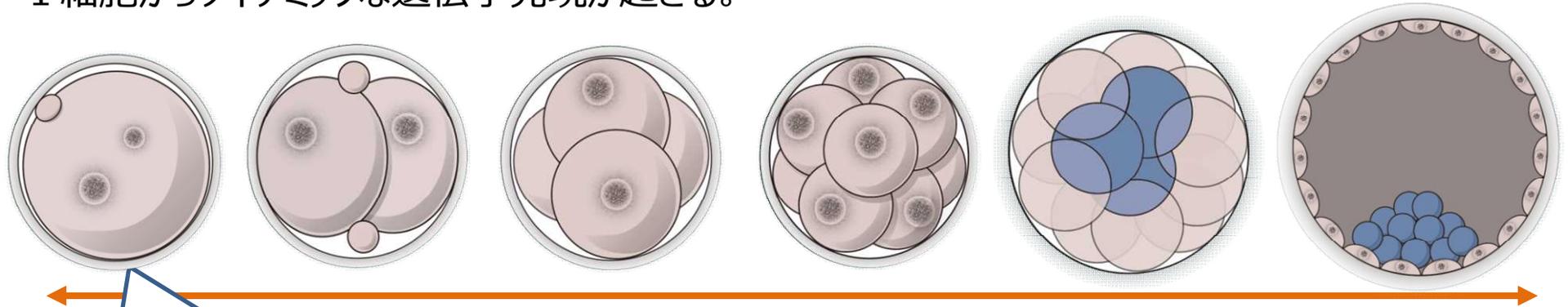
- ヒト卵割期胚の50-80%で割球に異数性
の染色体異常を認める Vanneste, et al. Nat Med 2009

一方、マウスは約1% Lightfoot, et al. Dev Biol 2006

*フラグメンテーション (fragmentation): 割球以外の細胞の断片化したもの。細胞質だけであったり、染色体の断片が含まれたりしている。

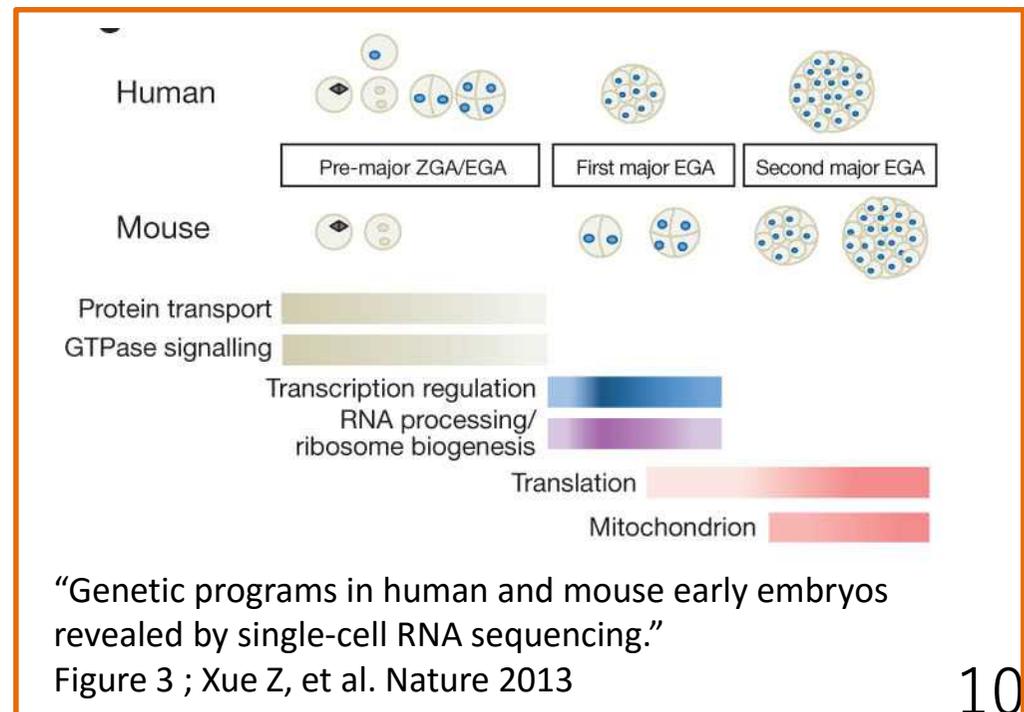
ヒト初期胚発生の遺伝子発現に関する知見

1 細胞からダイナミックな遺伝子発現が起きる。



受精直後から同じ細胞内の精子由来、卵子由来の核はDNAの化学的修飾が全く異なる。

胚発育動態解明のため、網羅的遺伝子発現解析をした結果、何千もの遺伝子発現が異なる時期に起きることが明らかに。



ヒト初期胚発生の遺伝子発現に関する知見

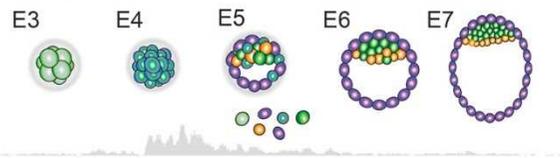
Cell

Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos

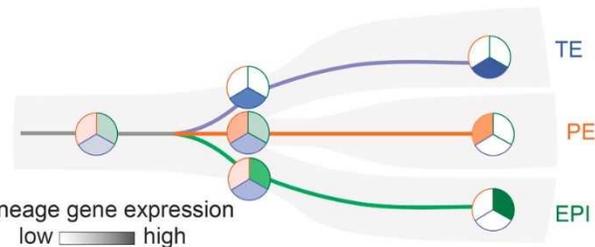
Embryos Sophie Petropoulos,^{1,2,6} Daniel Edsgård,^{2,3,6} Björn Reinius,^{2,3,6} Qiaolin Deng,^{2,3} Sarita Paulina Panula,¹ Simone Codeluppi,^{4,5} Alvaro Plaza Reyes,¹ Sten Linnarsson,⁶ Rickard Sandberg,^{2,3,7,*} and Fredrik Lanner^{1,7,*}

ヒト胚発生の遺伝子発現動態を明らかにするため、受精胚の割球を1つずつ分けて遺伝子発現の変化を解析したところ、着床以降の発生運命決定に関しマウスとは異なる遺伝子発現動態であることやX染色体不活化制御もヒトではユニークな機構が存在するという知見が得られた。

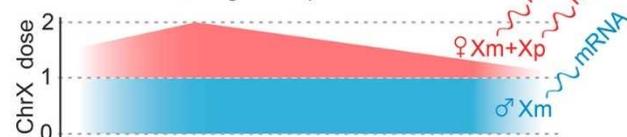
1529 single-cell RNA-seq libraries from 88 human embryos



Initial co-expression and concurrent lineage formation



X-chromosome dosage compensation



Graphical Abstract

Petropoulos S, et al. Cell 2016

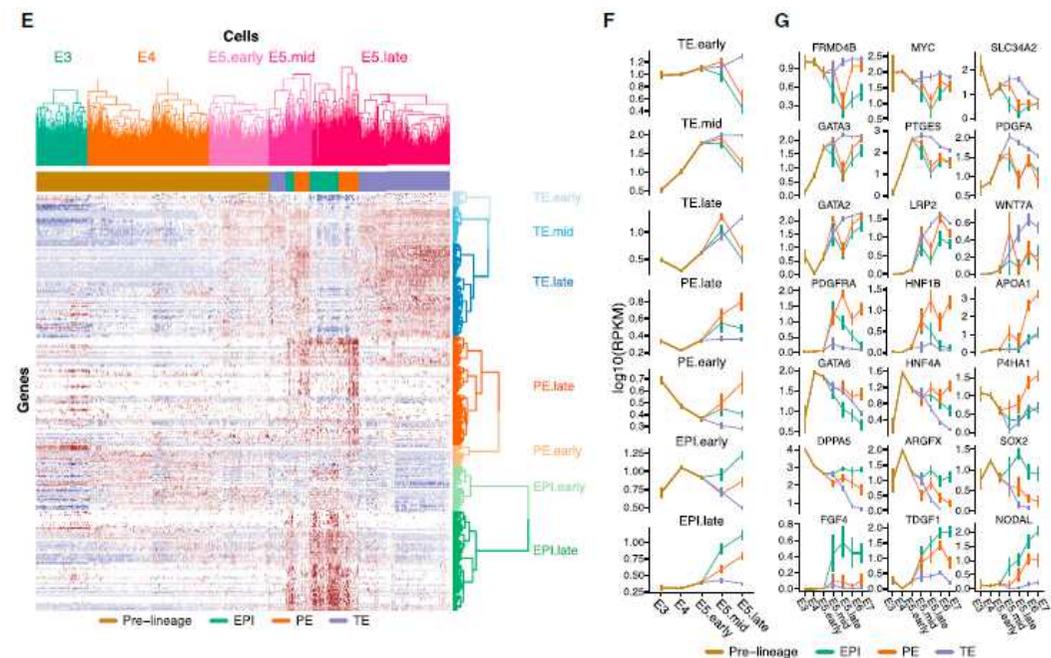
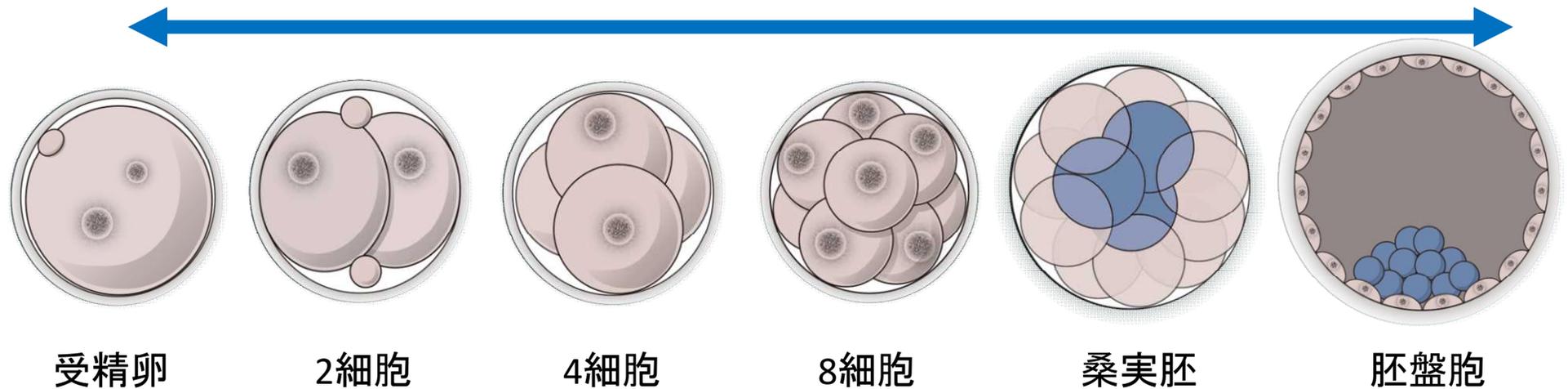


Figure 4 ; Petropoulos S, et al. Cell 2016

ヒト初期胚発生の遺伝子発現に関する知見



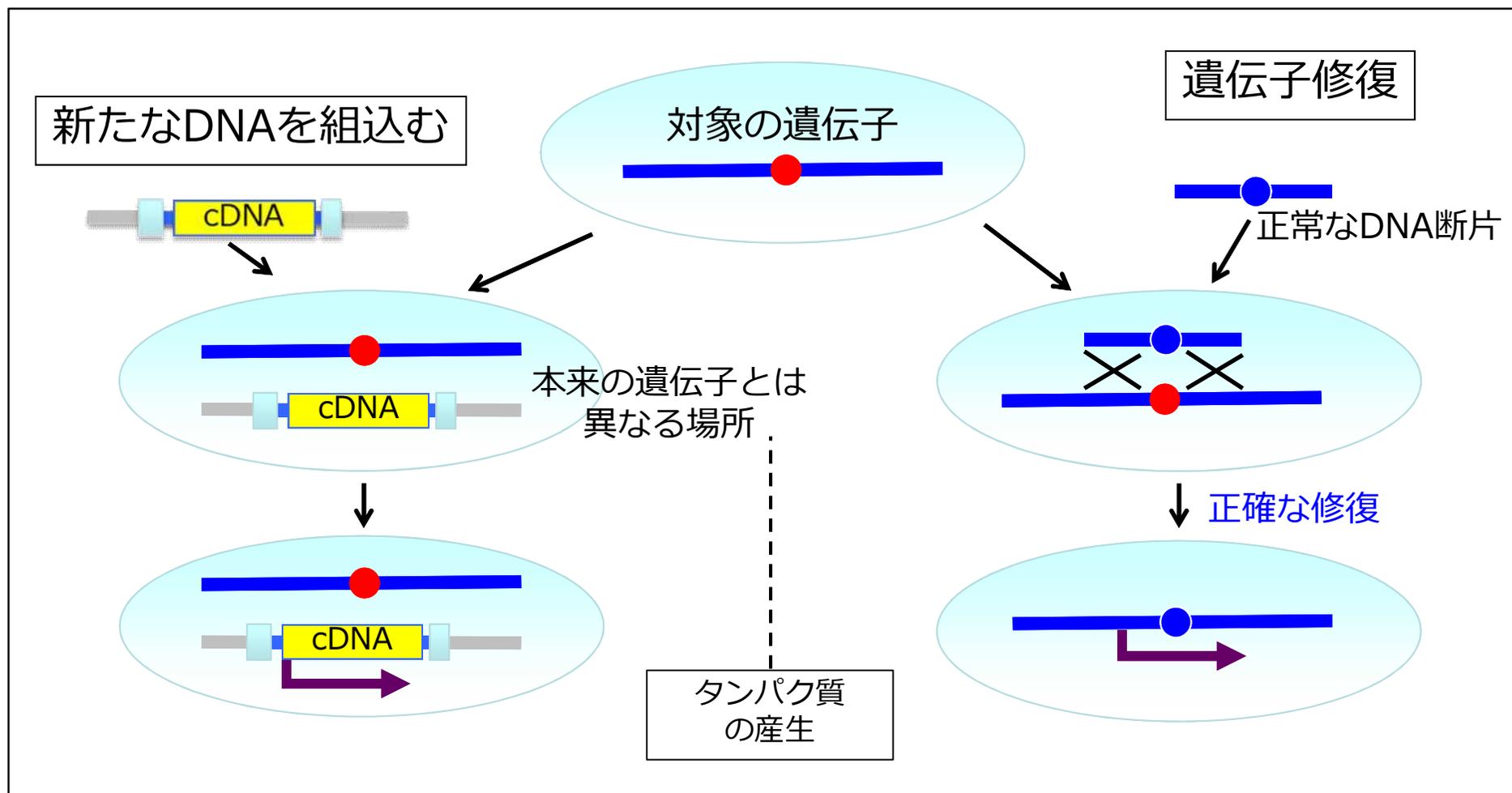
ヒトの初期発生でわからないことは多い

- 個体が育つための重要な遺伝子の発現が始まる.
- この時期特異的に起こるゲノム、エピゲノム現象があり、その後の発育に重要.
- ヒトと実験動物の相違.
- ヒト初期胚も含むゲノム情報知見の蓄積

受精から着床前までの発生には様々な遺伝子が働いていて、遺伝子の働きに不具合があると発生が進まない。

→初期胚における遺伝子の働きを研究することで胚の発生障害の原因解明につながる可能性。

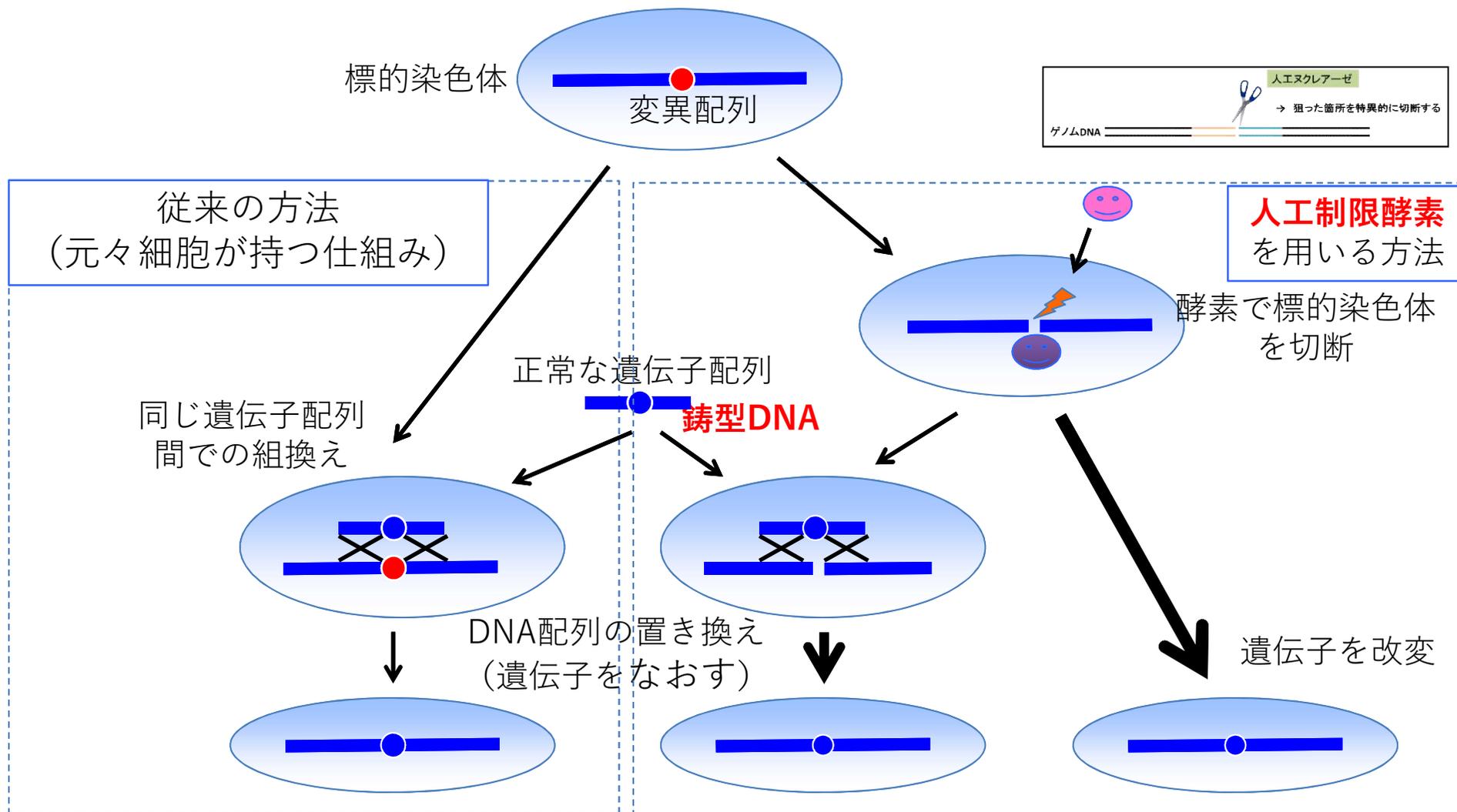
遺伝子の働きを知るための手法について



第59回日本卵子学会学術集会教育講演1

スライド資料一部改変(三谷幸之介教授:埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝治療部門)

遺伝子の働きを知るための手法について



- 人工制限酵素の開発により
- 桁違いに効率が上昇
 - 遺伝子の改変が容易に

第59回日本卵子学会学術集会教育講演1
スライド資料(三谷幸之介教授:埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝治療部門)

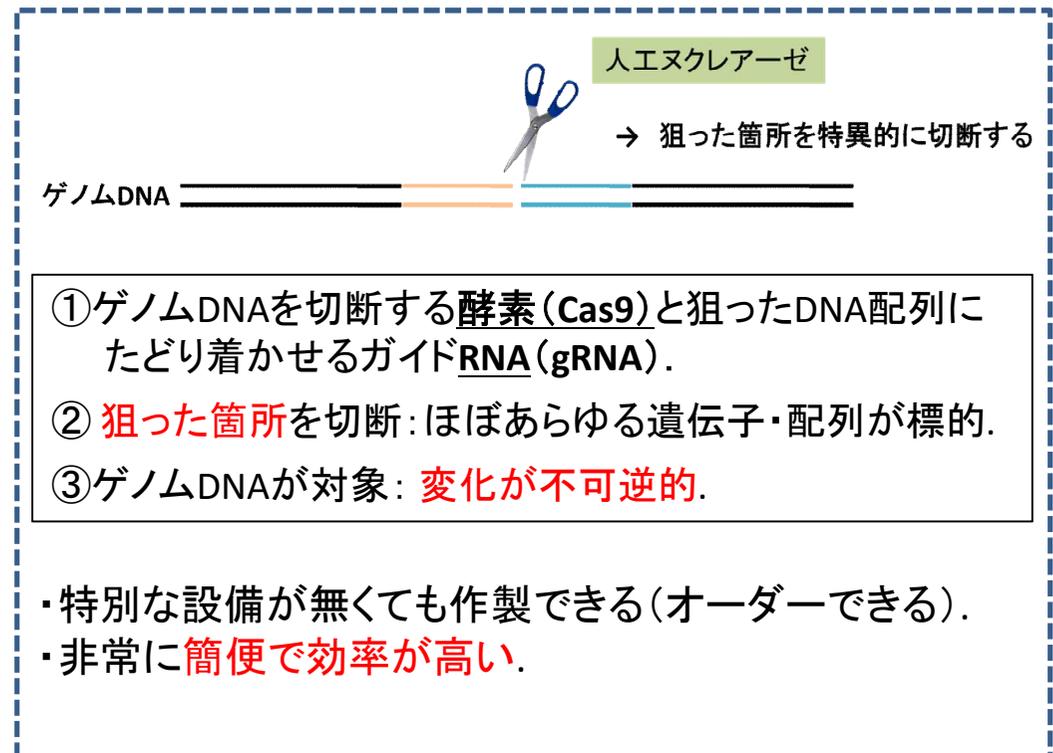
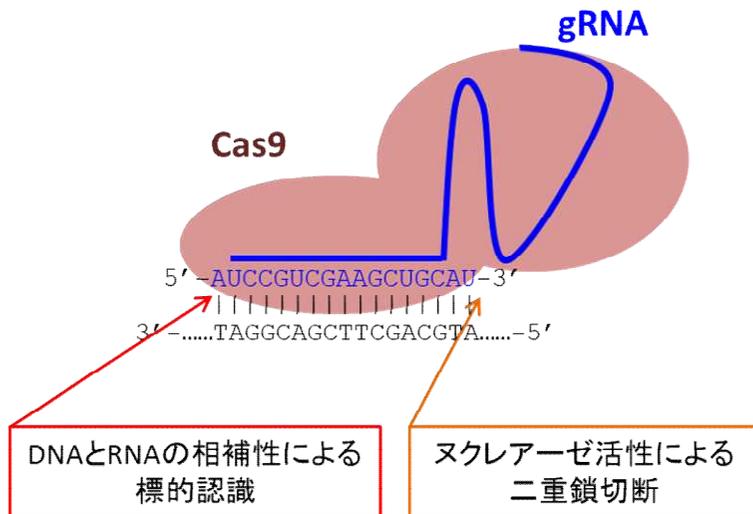
遺伝子の働きを知るための手法の一つ：ゲノム編集技術とは

「**ゲノム編集技術**」とは、生物のゲノムの**狙ったDNA配列**を認識する部分と、そこを**特異的に切断する人工の核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)**からなるものを用い、細胞の持つDNA修復機構を利用し、切断による遺伝子の不活性化又は、切断箇所への人工のDNA断片の挿入により、**遺伝子の改変を行う技術**である。従来の遺伝子組換えと異なり、ゲノムに編集の痕跡を残さず、改変される。

ヒト受精卵へのゲノム編集技術を用いる研究について(中間まとめ) 第97回生命倫理専門調査会

CRISPR/Cas9:

gRNAが約20塩基を認識、Cas9がゲノムDNA切断



ゲノム編集技術とヒト受精胚

受精胚 ヒト生命の萌芽

「基本的考え方」(抜粋)
第2. ヒト受精胚
2. ヒト受精胚の位置付け
(2) ヒト受精胚の位置付けに関する生命倫理専門調査会としての考え方
(前 略)

すなわち、ヒト受精胚は、「人」そのものではないとしても、「人の尊厳」という社会の基本的価値の維持のために特に尊重されるべき存在であり、かかる意味で「人の生命の萌芽」として位置付けられるべきものと考えられる。

(3) ヒト受精胚の取扱いの基本原則

ア 「人の尊厳」を踏まえたヒト受精胚尊重の原則

既に述べたとおり、「人」へと成長し得る「人の生命の萌芽」であるヒト受精胚は、「人の尊厳」という社会の基本的価値を維持するために、特に尊重しなければならない。

したがって、ヒト胚研究小委員会の報告に示されたとおり、「研究材料として使用するために新たに受精によりヒト胚を作成しないこと」を原則とするとともに、その目的如何にかかわらず、ヒト受精胚を損なう取扱いが認められないことを原則とする。

イ ヒト受精胚尊重の原則の例外

しかし、人の健康と福祉に関する幸福追求の要請も、基本的人権に基づくものである。このため、人の健康と福祉に関する幸福追求の要請に応えるためのヒト受精胚の取扱いについては、一定の条件を満たす場合には、たとえ、ヒト受精胚を損なう取扱いであるとしても、例外的に認めざるを得ないと考えられる。

ウ ヒト受精胚尊重の原則の例外が許容される条件

イに述べた例外が認められるには、そのようなヒト受精胚の取扱いによらなければ得られない生命科学や医学の恩恵及びこれへの期待が十分な科学的合理性に基づいたものであること、人に直接関わる場合には、人への安全性に十分な配慮がなされること、及びそのような恩恵及びこれへの期待が社会的に妥当なものであること、という3つの条件を全て満たす必要があると考えられる。

また、これらの条件を満たすヒト受精胚の取扱いであっても、人間の道具化・手段化の懸念をもたらさないよう、適切な歯止めを設けることが必要である。

第4. 制度的枠組み

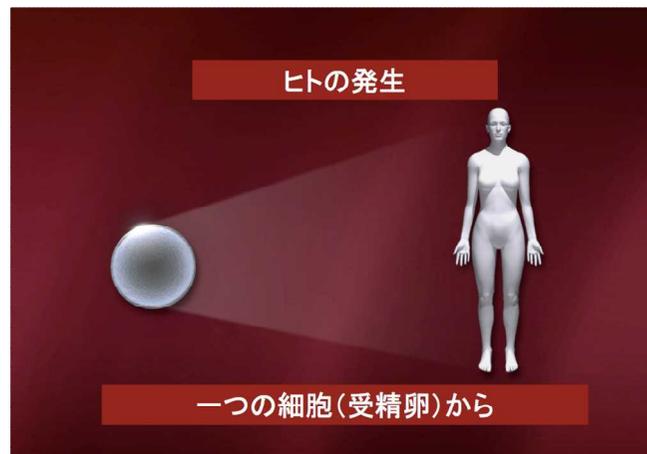
1. 基本的考え方

(前 略)

また、ヒト胚は胎内に戻さず、取扱いは原始線形成前に限ることとしている。

(後 略)

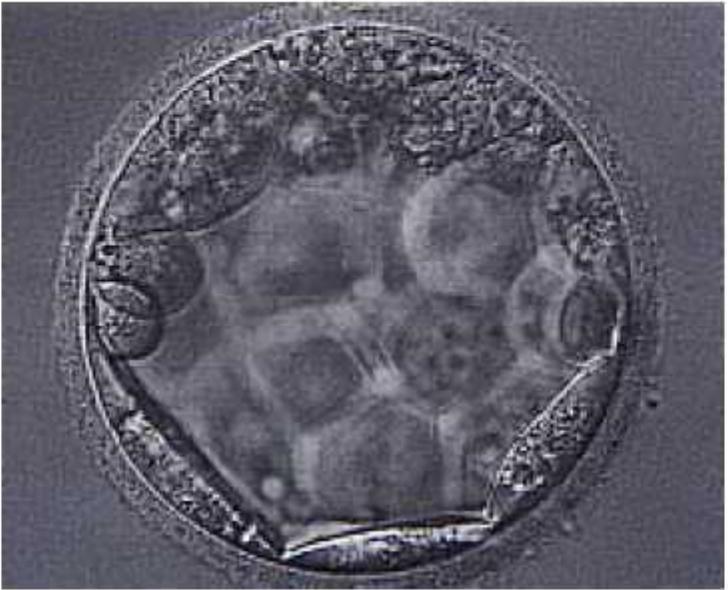
生命科学の観点からも
重要な認識なのではないか



ヒト受精胚の位置づけ

二つの受精卵

- 母体に戻されてヒトになる予定の受精卵
- 母体に戻されないことが決定された受精卵

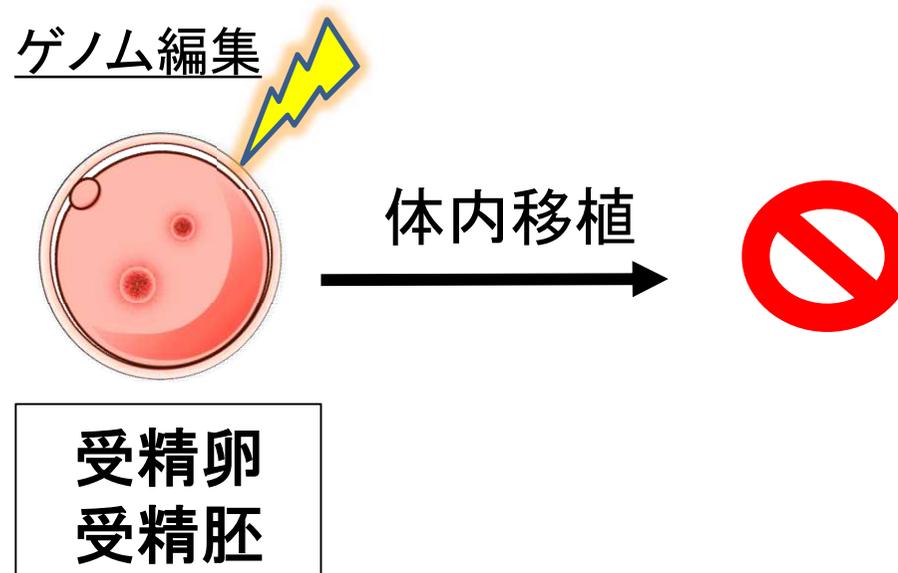


引用:第1回ART委員会 資料1-5「ヒト胚の研究体制に関する研究」(吉村 泰典 委員提出資料)

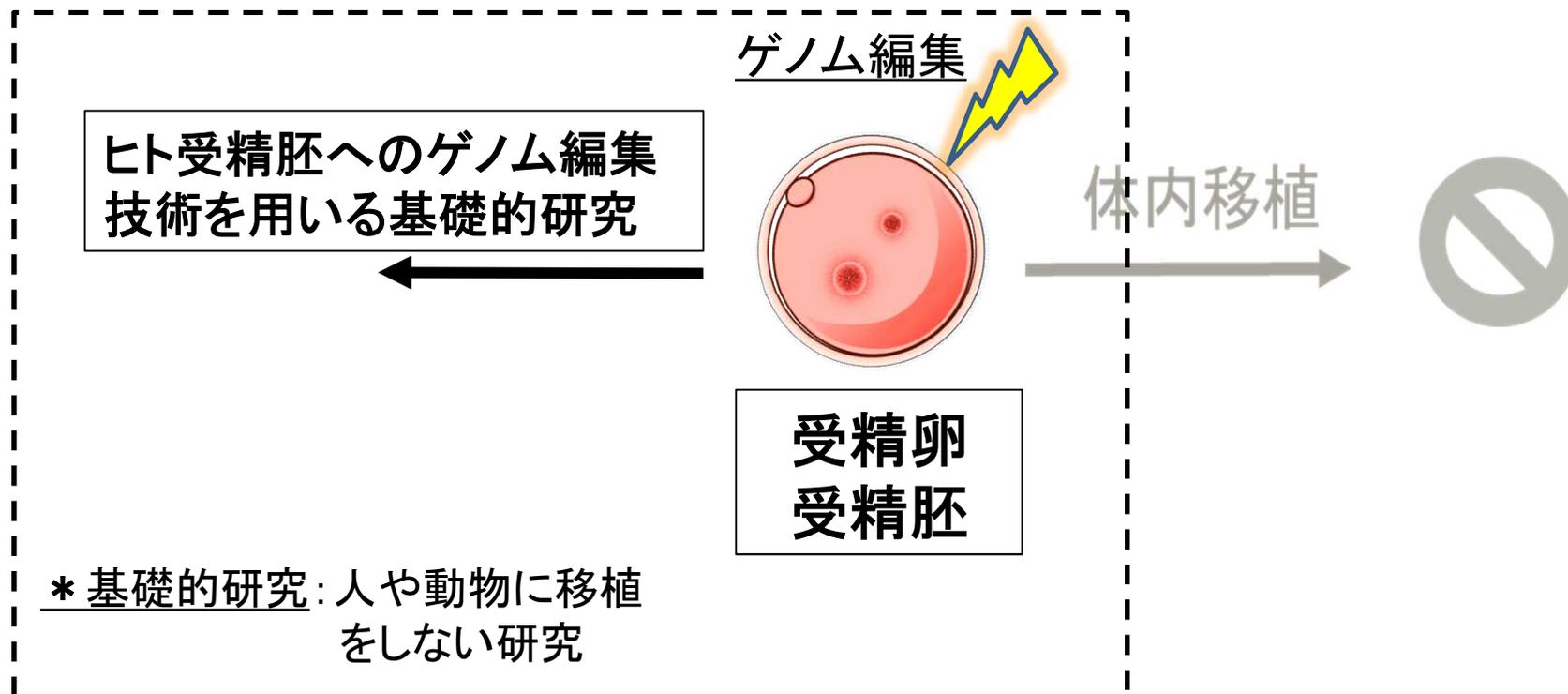
ゲノム編集技術とヒト受精胚

「ゲノム編集技術を用いたヒト受精胚を、ヒトの胎内へ移植することは容認できない。」

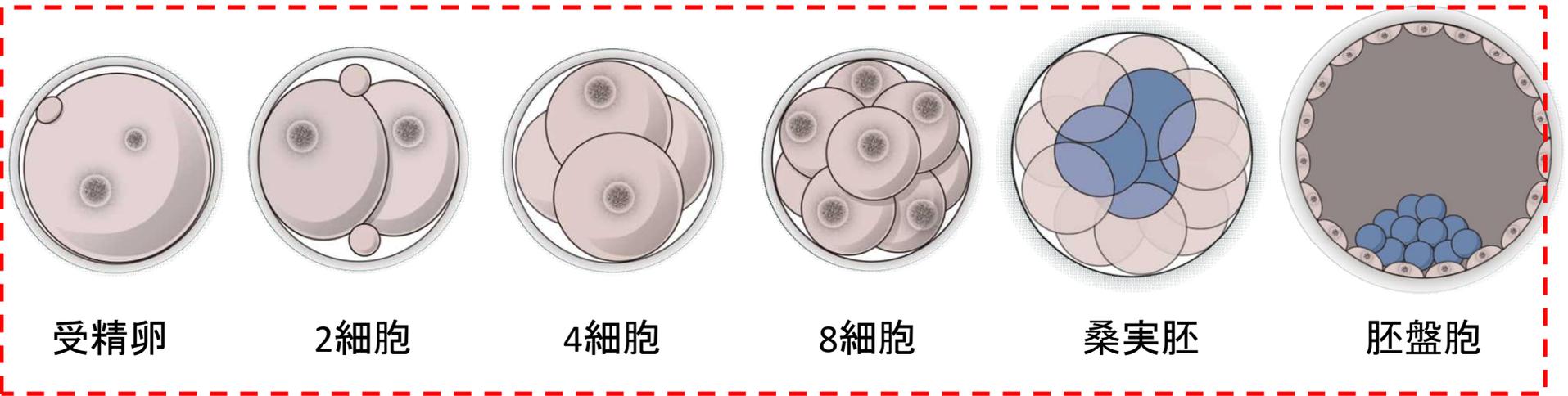
「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」見直し等に係る報告(第一次)(30府政科技第228号 平成30年3月29日)
「提言 我が国の医学・医療領域におけるゲノム編集技術のあり方」日本学術会議(平成29年9月27日)



ヒト受精胚へのゲノム編集技術を用いる基礎的研究



研究の対象となる受精胚は



受精卵

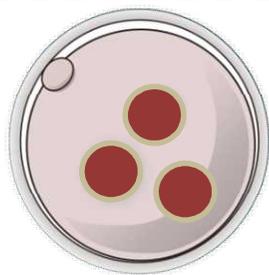
2細胞

4細胞

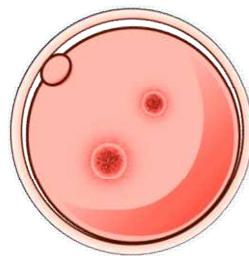
8細胞

桑実胚

胚盤胞



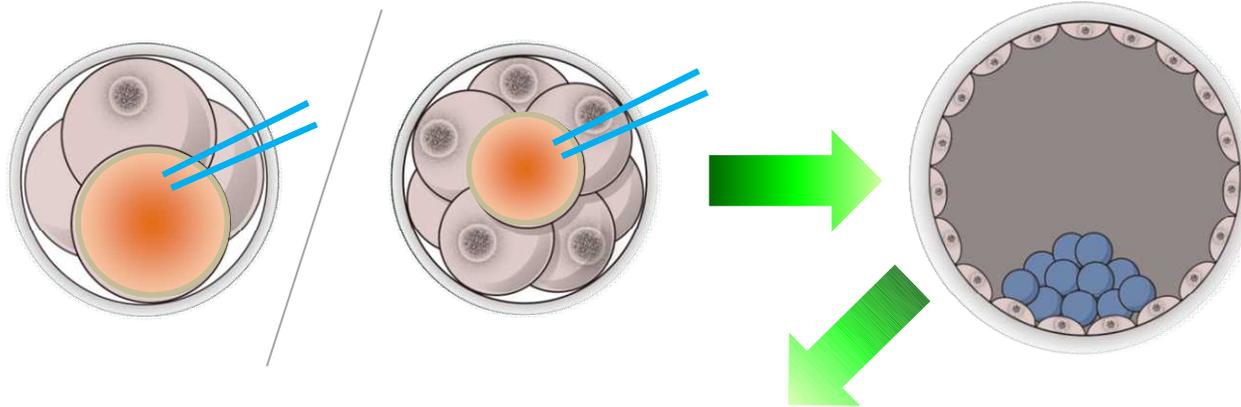
3前核胚



●核ゲノムのみならずミトコンドリアゲノムも対象となりうる

内閣府生命倫理専門
調査会で検討中

研究の一例 体外培養系で可能なこと



- ゲノム編集を行った割球の発生運命を追う (可視化も可能)
- 発生停止?、細胞死?
- 胎盤系? 個体発生系 (内部細胞塊)?
- 分子発現動態解析等

14日ルールを守った上で解析すればより効果的な場合もある

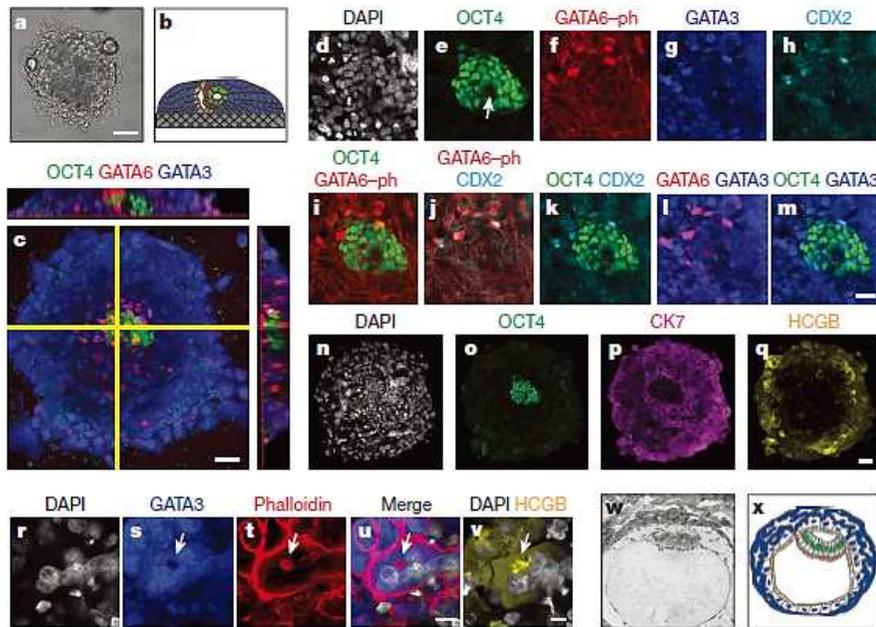


Fig 4. Deglincerti, et al. Nature 2016

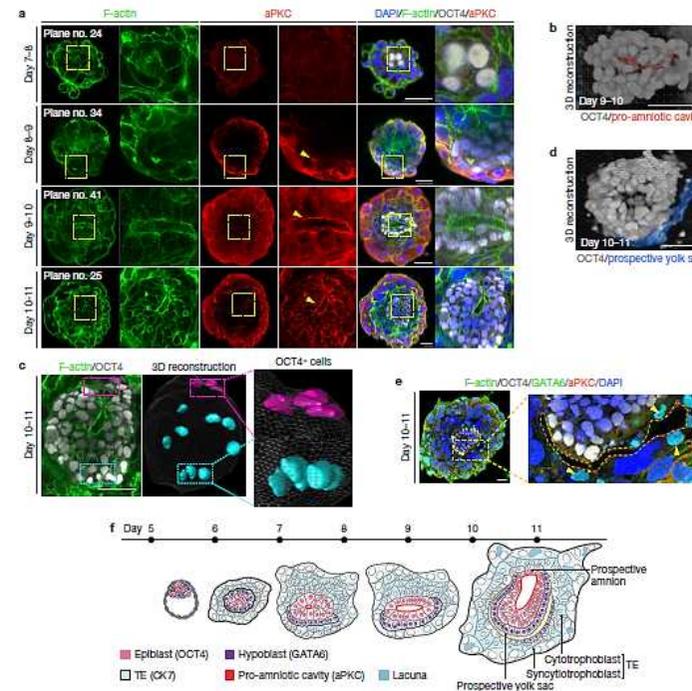


Fig 4. Shahbazi et al. Nat Cell Biol 2016

ヒト受精卵ゲノム編集の基礎研究の動向

	研究目的	遺伝子	胚の種類・数	研究概要	公表日・公表雑誌
中国 1	<ul style="list-style-type: none"> ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 遺伝性難病予防目的 	<i>HBB</i> : βグロビン=ヘモグロビン成分。βサラセミア症(溶血性貧血)原因遺伝子。	3前核胚 86個	3前核胚に対しβサラセミア原因遺伝子(<i>HBB</i>)を欠損(ランダム変異導入)させた。成功率5%	2015年4月 Protein & cell
中国 2	<ul style="list-style-type: none"> ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 疾患予防(HIV感染予防) 	<i>CCR5</i> : HIVの感染受容体遺伝子	3前核胚 213個	3前核胚を用いて、HIVの感染受容体遺伝子(<i>CCR5</i>)を欠損(ランダム変異導入)させた。	2016年4月 J Assist Reprod Genet.
中国 3	<ul style="list-style-type: none"> ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 遺伝性難病予防 	<ul style="list-style-type: none"> <i>HBB</i> : βグロビン=ヘモグロビン成分。βサラセミア症(溶血性貧血)原因遺伝子。 <i>G6PD</i> : グルコース6リン酸欠損症(溶血性貧血)原因遺伝子。 	新規作成胚 <i>HBB</i> : 10個 <i>G6PD</i> : 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、受精卵を新たに作成し、ゲノム編集の修復効率を確認。 <i>HBB</i> は2個中1個で成功。 <i>G6PD</i> は2個中2個で成功。	2017年3月 Molecular Genetics and Genomics
中国 4	<ul style="list-style-type: none"> ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 遺伝性難病予防 	<i>HBB</i> : βグロビン=ヘモグロビン成分。βサラセミア症(溶血性貧血)原因遺伝子。	人クローン胚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技術を用いて原因遺伝子(<i>HBB</i>)の変異を修復した。23%以上修復。	2017年10月 Protein & cell
アメリカ	<ul style="list-style-type: none"> ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 遺伝性難病予防 	<i>MYBPC3</i> : ミオシン結合蛋白 C=筋原線維成分。肥大型心筋症原因遺伝子。	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卵を作成。受精卵を作成する際、同時にゲノム編集することで、修復効率が向上。コントロールに比べ25%(47%から72%)に)変異が改善	2017年8月 Nature
イギリス	不妊の理解につながる発生学的研究(生殖補助医療研究)	<i>OCT4</i> : 受精卵や胚性幹細胞で特異的に発現している遺伝子	前核期胚 37個	受精卵や胚性幹細胞で特異的に発現している遺伝子(<i>OCT4</i>)を欠損させて、受精卵の発生における役割を調べた。 <i>OCT4</i> が欠損したヒト受精卵は胚盤胞まで発生できなかった。	2016年2月 HFEA許可、 2017年9月 Nature
スウェーデン	不妊の理解につながる発生学的研究(生殖補助医療研究)	(不明)	2日齡胚	胚の発生に関する遺伝子を欠損させて、発生への影響を確認する	2016年9月 米公共ラジオ局報道 (論文未発表)

ヒト受精卵ゲノム編集の基礎研究の動向

イギリス	不妊の理解につながる発生学的研究 (生殖補助医療研究)	OCT4: 受精胚や胚性幹細胞で特異的に発現している遺伝子	1細胞期 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調べた。OCT4が欠損したヒト受精胚は胚盤胞まで発生できなかったことを発見。	2016年2月 HFEA許可、 2017年9月論文 Nature (IF:40)	計画書: 1細胞期、初期胚、胚盤胞期胚 論文: 1細胞期
------	--------------------------------	-------------------------------	-------------	---	---	---------------------------------



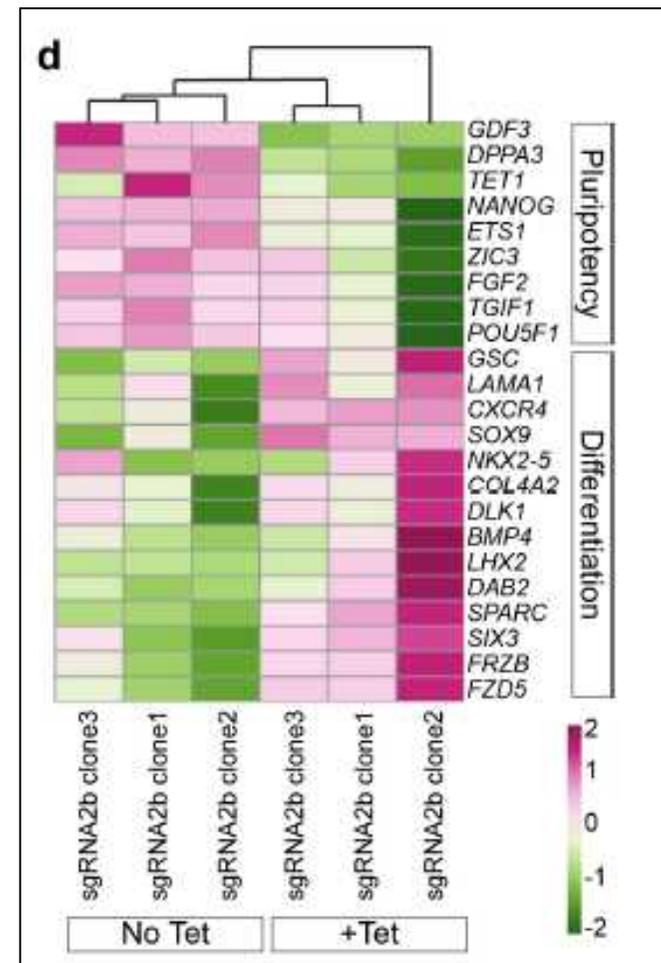
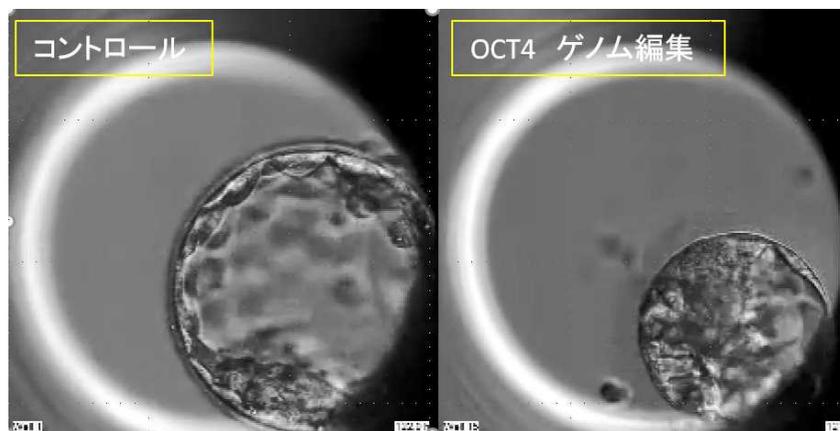
ARTICLE

doi:10.1038/nature24033

Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis

Norah M. E. Fogarty¹, Afshan McCarthy¹, Kirsten E. Snijders², Benjamin E. Powell³, Nada Kubikova⁴, Paul Blakeley¹, Rebecca Lea¹, Kay Elder⁵, Sissy E. Wamaitha¹, Daesik Kim⁶, Valdone MacIulyte¹, Jens Kleinjung⁷, Jin-Soo Kim^{6,8}, Dagan Wells⁴, Ludovic Vallier^{2,9,10}, Alessandro Bertero^{10†}, James M. A. Turner³ & Kathy K. Niakan¹

Fogarty NME, et al. Nature 551, 2017



The Francis Crick Institute

POU5F1 targeting and comparison of sgRNAs (Extended Data Figure 1)

Kathy Niakan

Human Embryo and Stem Cell Laboratory

The allocation of cells to a specific lineage is regulated by the activities of key signalling pathways and developmentally regulated transcription factors. The focus of our research is to understand the influence of signalling and transcription factors on differentiation during early human development.

During preimplantation development, totipotent human zygotes undergo subsequent rounds of mitotic cell divisions leading to the divergence of pluripotent embryonic cells, which form the foetus, and extra-embryonic cells, which contribute to the placenta and yolk sac.

The central question we are addressing is what are the molecular mechanisms that regulate embryonic stem cell pluripotency and how is it disengaged during cellular differentiation? We seek to define the genetic hierarchy acting during differentiation, the influence of extracellular signalling and the extent to which these mechanisms are conserved between humans and mice. The molecular basis of these early cell lineage decisions are of fundamental biological importance and have significant clinical implications for infertility, miscarriages, developmental disorders and therapeutic application of stem cells.

For more information about the research group's HFEA licence to use the genome editing technique 'CRISPR-Cas9' in human embryos, [please click here](#).

Selected publications

Niakan, KK and Eggan, K (2013) Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse *Developmental Biology* 375, 54-64

Cho, LTY; Wamaitha, SE; Tsai, IJ; Artus, J; Sherwood, RI; Pedersen, RA; Hadjantonakis, A-K and Niakan, KK (2012) Conversion from mouse embryonic to extra-embryonic endoderm stem cells reveals distinct differentiation capacities of pluripotent stem cell states *Development* 139, 2866-2877



Kathy Niakan
kathy.niakan@crick.ac.uk
+44 (0)20 379 61539

Qualifications and History

2005 PhD, University of California, Los Angeles, USA

2005 Postdoctoral Fellow, Harvard University, Cambridge, USA

2009 Centre for Trophoblast Research Next Generation Fellow, University of Cambridge, UK

2013 Group Leader, Medical Research Council National Institute for Medical Research, London, UK

2015 Group Leader, the Francis Crick Institute, London, UK

LINKS

[Internal](#)

[Biography](#)
[Publications](#)
[HFEA licence](#)

英国フランス・クリック研究所



3億5,000万ポンドの公的投資を受けて新設された、世界の医学研究の最先端施設の一つ。1,250名の研究者が、ガン、脳卒中、運動ニューロン疾患などの疾患向けの薬剤や治療法の開発につながる生物学的プロセスの研究・解明に従事する。アンダー・ワン・ルーフの生物医学研究機関としては欧州最大で、英国が医学の発見と研究で引き続き世界をリードしていくことに資する機関である。本研究所のオープンは、英国の研究予算を実質ベースで堅持するという2015年のスペンディング・レビューの公約、および、(EUのHorizon2020等における研究ファンディングに対する国の保証を約束した) 2016年8月の財務大臣の声明を受けた、英国の研究者に対する政府支援の最新の動きである。

JST 研究開発戦略センター (CRDS) より

<http://crds.jst.go.jp/dw/20161111/2016111110022/>

Use of CRISPR-Cas9 genome editing technique in human embryos

Patient information and consent forms

In any research using donated embryos from IVF treatment, it is imperative that those considering donating their embryos can give fully informed consent. This process is carefully regulated. Patient information and consent documents, and any updates to them, are always subject to approval by the relevant ethics committee (in this case, the Cambridge Central Research Ethics Committee). There is also a requirement for the patient information and consent documents to comply with HFEA licence conditions.

Below are the current versions of the patient information and consent documents relating to this project.

- [Patient information sheet and consent form 1](#)
- [Patient information sheet and consent form 2](#)
- [Patient information sheet and consent form 3](#)

<https://www.crick.ac.uk/research/a-z-researchers/researchers-k-o/kathy-niakan/>

生殖補助医療との関連



ARTICLE

Received 21 Feb 2012 | Accepted 1 Nov 2012 | Published 4 Dec 2012

DOI: 10.1038/ncom1249

Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage

Shawn L. Chavez^{1,2}, Kevin E. Loewke³, Jinnuo Han^{1,2}, Farshid Moussavi³, Pere Colls⁴, Santiago Munne⁴, Barry Behr² & Renee A. Reijo Pera^{1,2}

ヒト卵割期胚の染色体異数性の研究が進んでいる

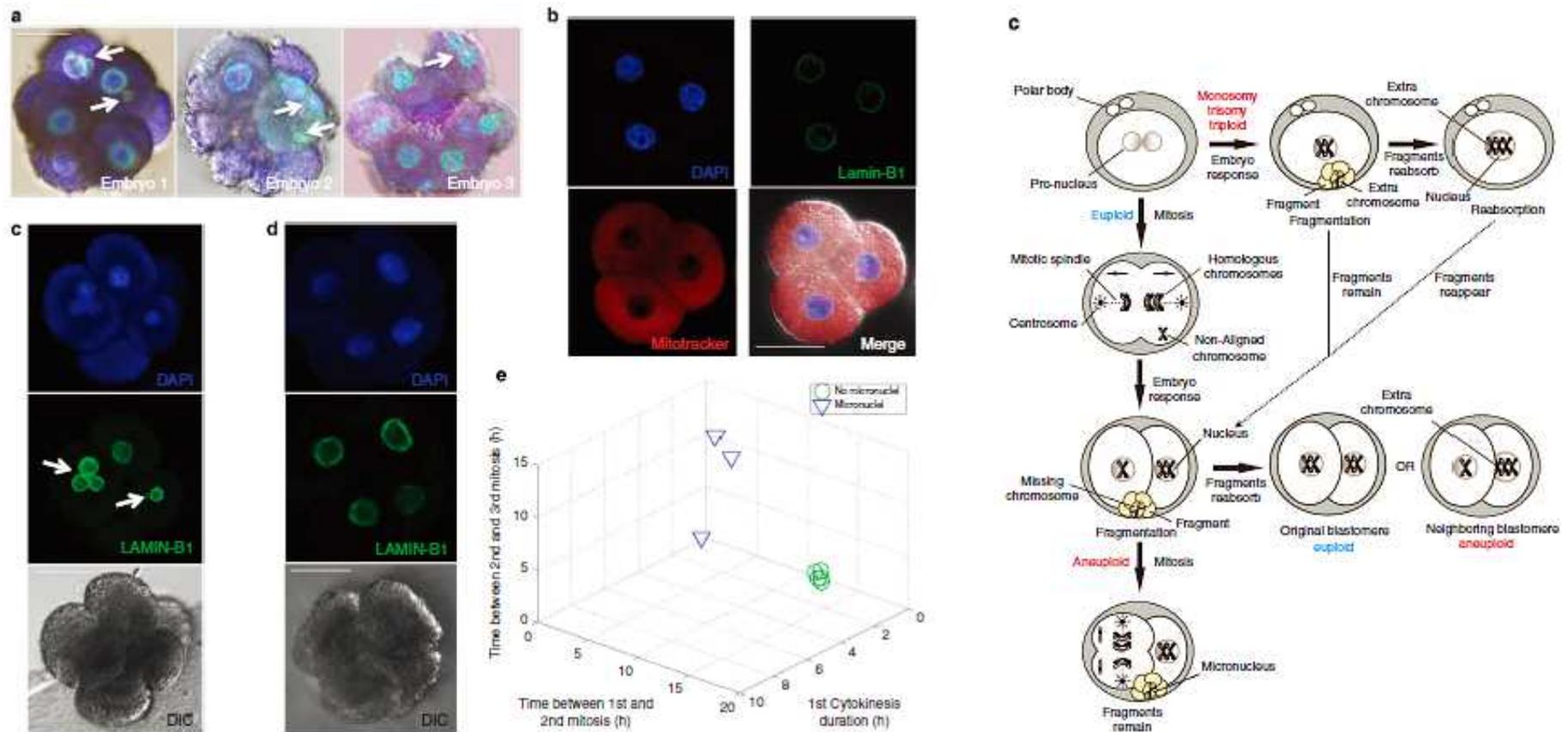
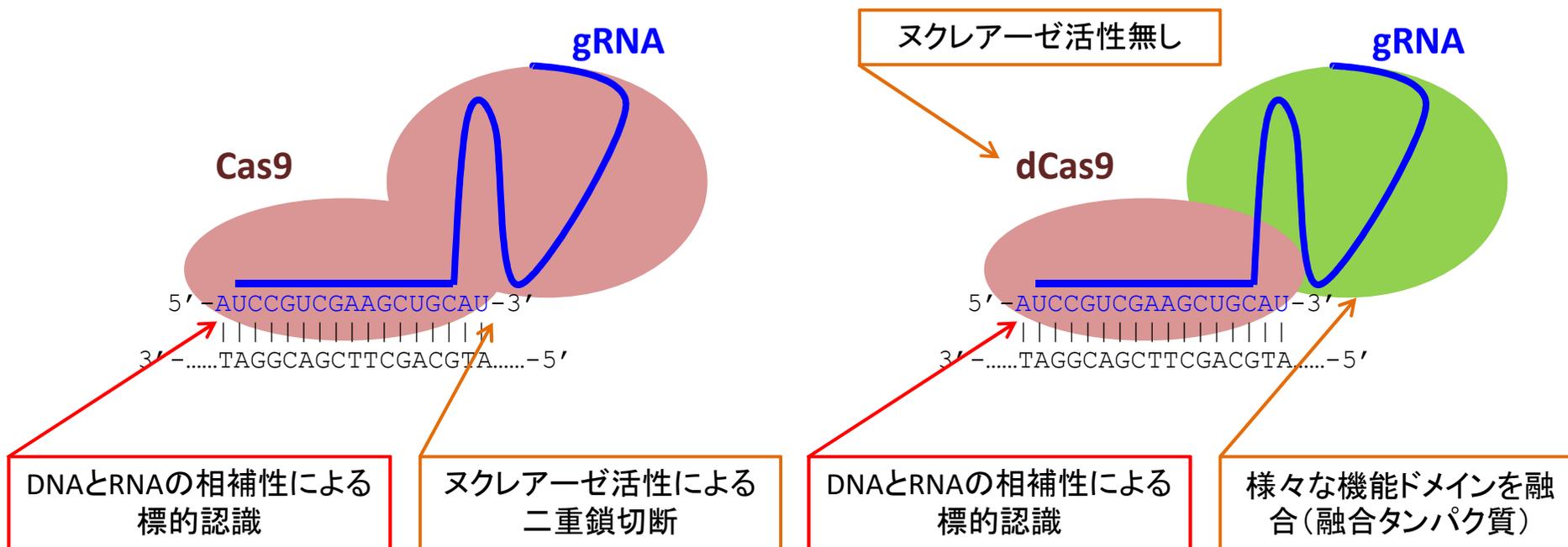


Fig 4, 5. Wong, et al. Nat Commun 2012

ゲノムかきかえを伴わない「ゲノム編集技術」応用

ゲノムかきかえ無し



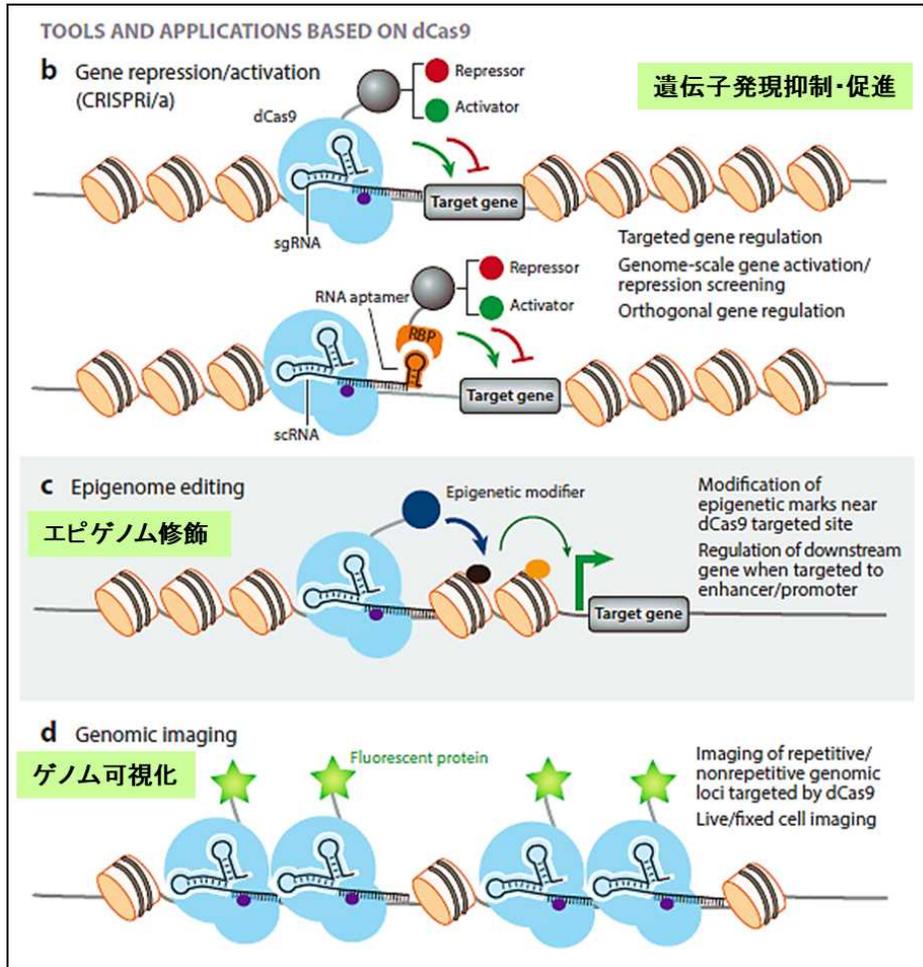
標的配列:
→切断



標的配列:
→転写、抑制、可視化、
DNAメチル化

ゲノムかきかえを伴わない「ゲノム編集技術」まとめ

ゲノム編集 CRISPR/dCas9



ゲノムかきかえを伴わない「ゲノム編集技術」応用

◆ ゲノム特定領域を可視化させゲノム動態を観察

- Anton T, et al. "Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system." Nucleus 2014.
- Ma H, et al. "Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells". PNAS 2015.
- Ma H, et al. "Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow". Nat Biotechnol 2016.

◆ 一過性遺伝子発現制御 (DNAメチル化制御を含む)

- Konermann S, et al. "Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex." Nature 2015.
- Liu XS, et al. "Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome". Cell 2016.
- Morita S, et al. "Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions." Nat Biotechnol 2016

類似論文多数

ヒト受精胚に対するゲノム編集技術の応用

ヒト初期胚に対するゲノム編集技術応用の適応例

- ◆ 初期胚発生特異的遺伝子(機能性RNA含む)の機能評価、発現動態解析
 - ・胚性ゲノム活性化(全能性・多能性の獲得)の分子機序
 - ・胎盤と内部細胞塊(個体発生の元)の分化分子機序
 - ・受精胚内性差非対称性エピジェネティック制御機構
 - ・初期胚特異的X染色体不活化制御機序
 - ・受精卵後の卵割期でおこる染色体分配にかかる分子機序
 - ・ミトコンドリア複製に関わる分子機序(ミトコンドリア及び核ゲノム)

など

謝辞

三谷幸之介教授

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
遺伝治療部門



「御清聴ありがとうございました。」