

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05581

研究課題名(和文)細胞内作用場の制御による遺伝子変異修復技術開発

研究課題名(英文)Precise genomic correction by intercellular regulation of genome editing enzyme

研究代表者

堀田 秋津(Hotta, Akitsu)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師

研究者番号：50578002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの疾患原因となる遺伝子変異の約半数は一塩基変異である。近年のCRISPR-Cas9を始めとするゲノム編集技術を用いることで、NHEJ(非相同末端結合)を介した欠失は比較的簡単に誘導可能であるが、HDR(相同組換え)を利用したノックインの効率は1%以下と極めて効率が悪かった。そこで我々は、細胞の中にあらかじめCRISPR-Cas9とガイドRNAをpiggyBacトランスポゾンベクターで組み込んでおき、二種類の薬剤でCas9の活性を誘導可能なCRONUSシステムを開発した。これにより、これまでの効率(<1%)を大幅に上回る、20%から30%もの効率で狙った一塩基変化が誘導可能となった。

研究成果の概要(英文)：About half of the genetic mutation causing human disease is a single nucleotide mutation. Deletion via NHEJ (nonhomologous end joining) can be relatively easily induced by using recent genomic editing techniques including CRISPR-Cas9, but knock-in using HDR (homologous recombination) efficiency was less than 1%, which was extremely inefficient. Therefore, we developed the CRONUS system in which CRISPR-Cas9 and guide-RNA were incorporated in the cells with a piggyBac transposon vector in advance, and Cas9 activity can be induced with two kinds of drugs. This made it possible to induce a desired single base modification at efficiencies as high as 20% to 30%, far exceeding the efficiency (<1%) so far.

研究分野：幹細胞遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集 iPS細胞 CRISPR 相同組換え 一塩基修復 一塩基変異

## 1. 研究開始当初の背景

### ・CRISPR を用いた効率的なゲノム編集

近年、任意の DNA 配列に結合して切断する TALEN や CRISPR-Cas9 といった人工ヌクレアーゼの開発が急速に進んでいる。我々は世界に先駆けて、Duchenne 型筋ジストロフィー患者由来のフレームシフト変異の精密な遺伝子変異修復に成功した。

### ・現状の相同組換え技術の限界

CRISPR を用いると、NHEJ(非相同末端結合)を介した欠失は比較的簡便に誘導可能であるが、HDR(相同組換え)を利用したノックインの効率は低いため、薬剤選択カセットを持ったドナーDNA を鋳型にしてノックインを行い、次に不要な選択カセットを除去するという煩雑な手順を踏む必要があった。また、人工ヌクレアーゼと 100~200 塩基の一本鎖 DNA(ssODN) を鋳型に用いた相同組換えも報告されているが[Chen F et al., Nat Methods, 2011]、iPS 細胞においては 1%以下と極めて効率が悪かった[Soldner et al., Cell, 2011]。その一方で、マウス受精卵に CRISPR と ssODN を注入した場合には、9-19%という高い効率での相同組換えが報告されている[Yang H et al., Cell, 2013]。受精卵の場合、顕微注入によって直接細胞質や前核に注入できる一方で、培養細胞への核酸導入は電気穿孔法やリポフェクション法に依存しており、外来核酸(ssODN)が核まで届く割合はごく僅かである[Brandén et al., Nat Biotech, 1999]。培養細胞において効率的に相同組換えを誘導するためには、鋳型となるドナーDNA を的確に核内まで送り届ける必要がある。

## 2. 研究の目的

培養細胞でゲノム編集効率が低い理由の一つに、CRISPR-Cas9 とガイド RNA、そして

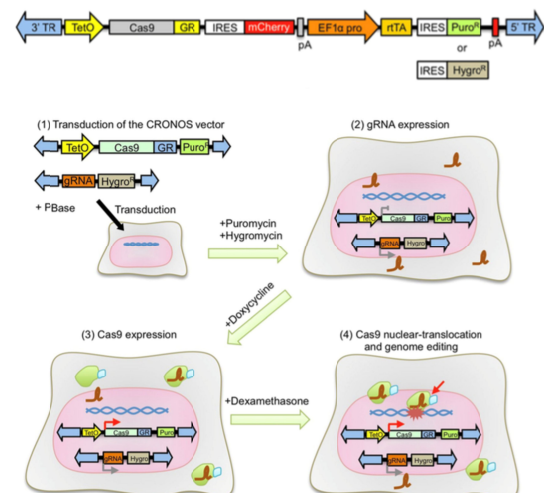
一本鎖 DNA の鋳型が、細胞内に取り込まれる確率が低い点が挙げられる。そこで我々は細胞の中にあらかじめ CRISPR-Cas9 とガイド RNA を組み込んでおき、ゲノム編集を行いたい時だけ、鋳型となる一本鎖 DNA を導入する方法を試すこととした。これにより、一本鎖 DNA を用いた相同組換え効率を上昇させ、ヒト iPS 細胞における自在な遺伝子配列の組換え手法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

iPS 細胞をはじめとするヒト培養細胞へ効率的に Cas9 とガイド RNA を導入できるよう、比較的大きな遺伝子でも搭載可能な piggyBac ベクターを導入に利用した。

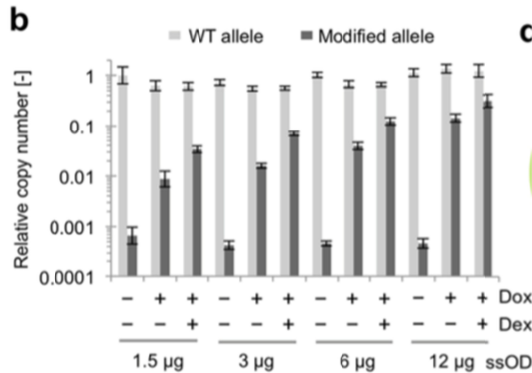
Cas9 とガイド RNA が常に働き続けると、鋳型 DNA を導入する前に細胞内のゲノムの切断と欠失が起こってしまい、目的の一塩基変化が誘導できない。

そこで、Cas9 の DNA 切断活性を自在に制御するために、薬剤(Doxycycline)に応答して遺伝子のオン・オフを切り替えられるプロモーター(Dox 誘導型プロモーター)と、Cas9 が核内に入ってゲノムにアクセスするための核移行を別の薬剤(Dexamethasone)で制御可能なシステムの二種類を組み合わせ、CRONUS(CRISPR-Cas9 regulated by transcription and nuclear shuttling)システムを開発した。

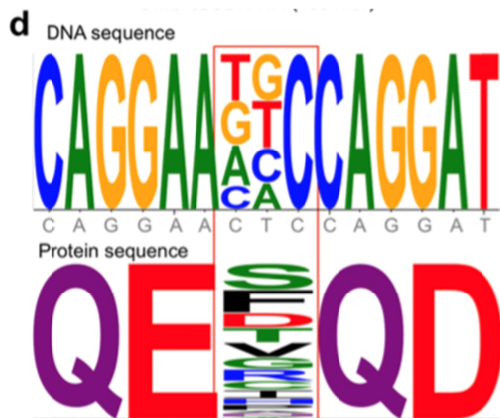


#### 4. 研究成果

CRONUS システムを搭載した *piggyBac* ベクターにより、iPS 細胞の中の Cas9 の活性を二種類の薬剤で自在に制御することが可能となった。また Cas9 とガイド RNA を毎回細胞内へ導入する必要もないため、ゲノム編集効率が大きく向上することを確認できた。さらに、一塩基を置換するための一本鎖 DNA を導入すると、これまでの効率 (<1%) を大幅に上回る、20%から 30%もの効率で狙った一塩基改変が誘導可能であった。

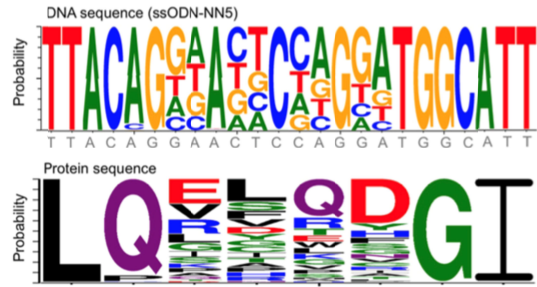


これまでのゲノム編集実験では、元の一塩基から別の一塩基へと一つ一つ改変する方法が主流で非効率的だった。CRONUS システムを利用することにより、異なる塩基配列をもった複数の細胞株を一度に作製可能であることも示した。例えば、とあるコドンの前二箇所の塩基を改変することにより、 $4^2 = 16$  種類のコドン配列 (アミノ酸配列) を持った細胞を作製できたほか、



八箇所の塩基を改変すれば、 $4^8 = 65,536$  通り

りのランダムな配列組合せを一度に作製可能であることを Ampli-con-seq により確認した [申請者文献 ]。



本研究成果は、二重制御 Cas9 CRONUS を *piggyBac* ベクターでヒト細胞にあらかじめ導入することによって、これまでにない高効率での一塩基改変が可能であることを示した。狙った箇所の塩基配列に様々な塩基への変換をランダムに誘導することも可能になったため、疾患変異配列と正常配列をそれぞれ持った細胞を同時に作製して比較解析したり、遺伝子の配列を様々に変化させてより機能性の優れたタンパク質を作り出したりすることが可能となる。これにより、遺伝子変異が原因で引き起こされる疾患を細胞レベルで再現するための非常に強力なツールとなることが期待される。

また、特定の細胞種内で Cas9 の活性を制御する方法として、Cas9 をコードする mRNA に細胞種特異的 miRNA 結合サイトを導入した miRNA スイッチ技術を導入し、Cas9 の活性を細胞種依存的に制御出来る事を報告した [申請者文献 ]。

その他、CRONUS システム開発過程で蓄積された効率的なゲノム編集手法を用いて、Blau 症候群の原因遺伝子 NOD2 遺伝子の変異修復を行い、病態解明の一端に寄与した [申請者文献 ]。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

Ishida K, Xu H, Sasakawa N, Lung MSY, Kudryashev JA, Gee P, Hotta A.

Site-specific randomization of the endogenous genome by a regulatable CRISPR-Cas9 *piggyBac* system in human cells.

*Scientific Reports*, 2018 Jan 10;8:310. doi:10.1038/s41598-017-18568-4.

Hirosawa M, Fujita Y, Parr CJC, Hayashi K, Kashida S, Hotta A, Woltjen K, Saito H.

Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch.

*Nucleic Acids Res*, 2017 May 19. doi: 10.1093/nar/gkx309.

Takada S, Kambe N, Kawasaki Y, Niwa A, Honda-Ozaki F, Kobayashi K, Osawa M, Nagahashi A, Semi K, Hotta A, Asaka I, Yamada Y, Nishikomori R, Heike T, Matsue H, Nakahata T, Saito MK.

Pluripotent stem cell models of Blau syndrome reveal an IFN- $\gamma$ -dependent inflammatory response in macrophages. *J Allergy Clin Immunol.*, 2017; pii: S0091-6749(17)30685-1.

doi:10.1016/j.jaci.2017.04.013.

Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S, Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito MK.

Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors.

*Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Mar 4;497(2):719-725. doi:

10.1016/j.bbrc.2018.02.139.

Ikeda T, Hikichi T, Miura H, Shibata H, Mitsunaga K, Yamada Y, Woltjen K, Miyamoto K, Hiratani I, Yamada Y, Hotta A, Yamamoto T, Okita K, Masui S. Srf destabilizes cellular identity by suppressing cell-type-specific gene expression programs.

*Nature Communications.*, 2018 Apr 11;9(1):1387. doi:

10.1038/s41467-018-03748-1.

岩淵久美子, 堀田秋津

ゲノム編集技術とその応用の現状

血液フロンティア, 2017; Vol.36 (07): p194-202 (p1250-1258).

堀田秋津

iPS 細胞の遺伝子変異をゲノム編集で修復する -疾患研究と遺伝子治療の最先端

生物の科学 遺伝, 2017; Vol.71 (05): p415-424.

井福正隆, 堀田秋津

iPS 細胞とゲノム編集の融合による新展開

日本臨床, 2017; Vol.75 (05): p788-794.

石田賢太郎, 徐 淮耕, 堀田秋津

第 2 章-8. ヒトでのゲノム編集 -遺伝子治療応用へと動き出した現状  
実験医学増刊号 "All About ゲノム編集"

2016 年 Vol.34 No.20 p133-140. 真下知士, 山本 卓 編

徐 淮耕, 堀田秋津

Duchenne 型筋ジストロフィーに対するゲノム編集戦略

医学のあゆみ, 2016; Vol.259 (1): p73-79.

〔学会発表〕(計 9 件)

2015 年 7 月

NGS 現場の会第四回研究会

2015 年 7 月

第 21 回日本遺伝子治療学会総会

2015 年 9 月

CSHL Meeting: Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution

2016 年 7 月

The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society

2016 年 9 月

第 68 回日本生物工学会大会

2016 年 10 月

Skoltech セミナー

2016 年 11 月

パシフィコ横浜 MBSJ2016

2017 年 7 月

ゲノム創薬・医療フォーラム 第 8 回談話会

2017 年 10 月

International Conference of the Genetics Society of Korea (ICGSK)

2017(招待講演, 国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：部位特異的塩基置換法  
発明者：堀田秋津、石田賢太郎  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2017-139268  
出願年月日：2017年7月18日  
国内外の別：国内

名称：低抗原性細胞の製造方法  
発明者：堀田秋津、徐淮耕、金子新、王博  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2018-26421  
出願年月日：2018年2月16日  
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
堀田 秋津 (HOTTA Akitsu)  
京都大学 iPS 細胞研究所・特定拠点講師  
研究者番号：50578002

研究者番号：

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )