

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07263

研究課題名(和文) CRISPR-Cas9 nickaseによるDNA二重鎖切断を伴わないゲノム編集

研究課題名(英文) Genome editing without DNA double-strand breaks mediated by CRISPR-Cas9 nickases

研究代表者

小西 裕之 (Konishi, Hiroyuki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20344335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集によるノックインは広汎な生命科学分野への応用が見込まれる有望な遺伝子工学技術であるが、正確性、特異性、安全性などに課題が残されている。本研究では、Cas9 nickaseを通常と違う使い方で用いる tandem paired nicking法(TPN法)によるノックインの研究を行った。さまざまな検討の結果、TPN法は従来法に匹敵するノックイン効率を維持しつつ編集局所のランダムな望まぬ挿入・欠失を飛躍的に減少させることがわかった。また、同法によるノックインが「ゲノムの守護神」たるp53シグナル経路を攪乱せず、p53活性によるノックイン効率への干渉も受けないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、TPN法の利用によってノックインに伴う標的ゲノム部位の予期せぬランダム変異を抑えうることがわかった。また、TPN法では標的外部位(オフターゲット部位)のランダム変異が少ないことも示唆されており、ゲノム編集細胞のがん化などの危険性を抑制しうるものと期待される。さらに、DNA損傷反応を制御するp53シグナル経路がTPN法によって攪乱されないことは、同法の安全性を裏付けるものと考えられる。従来法に比肩するノックイン効率が保持されていることも鑑み、TPN法は今後の技術的な洗練を経たのち、将来的には臨床医学、畜産学、植物科学などに応用可能な有用なノックイン法になりうるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Targeted knock-in assisted by genome editing is a promising technology for genome engineering which will be applicable to a broad range of research fields in life science. However, the precision, specificity, and safety of this technology need to be improved to expedite its practical applications. In the present study, we characterized a methodology for targeted knock-in, namely tandem paired nicking (TPN), which leverages Cas9 nickases in a manner distinct from their regular use. By empirically addressing the properties of TPN, we found that TPN achieves the efficiency of targeted knock-in largely equivalent to those achieved by the conventional Cas9 nuclease-based approach, while drastically decreasing the incidence of random undesired insertions and deletions occurring at the targeted genomic loci. Moreover, TPN-based targeted knock-in neither activated the p53 signaling pathway as known as “the guardian of the genome,” nor was restricted by the function of wild-type p53.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR Cas9 nickase ゲノム編集 ノックイン tandem paired nicking

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム編集は、特定の狙ったゲノム部位の塩基配列を変更する画期的な遺伝子工学技術である。畜産学、植物科学を含む生命科学の広い研究分野に大いなる発展をもたらしつつあり、近い将来には臨床医学などの分野への応用も期待されている。ゲノム編集技術は、配列改変様式によっていくつかのサブカテゴリーに分類される。「ノックアウト」と「ノックイン」はその中で特によく研究され、すでに様々な研究分野で活用されている主要なサブカテゴリーの技術である。

(2) ゲノム編集によるノックアウトでは、Cas9 nuclease(または2個の対になる Cas9 nickase)を用いてゲノム中の狙った部位に DNA 二重鎖切断を導入し、細胞が持つ DNA 修復機構のひとつ「非相同末端結合」による DNA 修復を誘発する。この方法で修復される DNA 二重鎖切断の局所には、大小のランダムな挿入・欠失が導入される。挿入・欠失が遺伝子のコード配列中に起きた場合、フレームシフトが発生し、機能的な遺伝子破壊(つまりノックアウト)が遂行される。

(3) 一方、ノックインは、ランダムな挿入・欠失ではなく、設計通りの配列改変をゲノム中の狙った部位へ導入する手法である。通常、ノックインは、標的ゲノム部位に二重鎖切断を導入する Cas9 nuclease を同領域と相同性を持つドナーDNA とともに細胞へ共導入することによって遂行される。ゲノム DNA に二重鎖切断が導入されると、細胞が持つ DNA 修復機構のひとつ「相同組換え」が起動され、ドナーDNA と切断ゲノム部位の組換えが誘発される。その結果、ドナーDNA 中にあらかじめ組み込まれていた目的配列がゲノム中に導入される。配列変更の内容をあらかじめ設計可能なことから、ノックインはノックアウトに比べて計画的で安全な遺伝子改変を可能にするものと考えられ、将来的にはノックアウトより広汎な用途への応用が期待される。

(4) しかし、哺乳類細胞では DNA ドナーの存在下であっても DNA 二重鎖切断が相同組換えではなく非相同末端結合によって修復されることの方が多く、その結果、DNA 修復局所に大小のランダムな DNA 挿入・欠失が発生する。また、Cas9 nuclease は必ずしも標的ゲノム部位だけを切断するわけではなく、ある程度の相同性を持つゲノム内の他の部位(オフターゲット部位)も切断しうる。そのオフターゲット部位の切断が非相同末端結合で修復される際にもランダムな挿入・欠失が発生する。そして標的ゲノム部位やオフターゲット部位に起きた挿入・欠失はゲノム機能の異常を引き起こし、細胞がん化などのリスクを高める。さらに、DNA 二重鎖切断は「ゲノムの守護神」たる p53 シグナル経路を活性化し、細胞周期の G1 期停止を引き起こす。その結果、相同組換えが抑制されてノックイン効率が低下するというジレンマが発生する<sup>1,2)</sup>。以上のような課題を克服しない限り、現行のノックイン技術の広汎な実用化を推進することは難しいと考えられている。

### 2. 研究の目的

(1) 以上のことから、ノックイン技術の実用化と医療・産業への応用を加速するためには、今後、ノックインに伴う標的ゲノム部位や他の部位へのランダムな挿入・欠失を抑制する必要があると考えられる。また、ノックイン操作による「ゲノムの守護神」p53 シグナル経路の攪乱を抑え、両者間の相互干渉を断ち切ることも重要と考えられる。

(2) そこで研究代表者らは、これまで、ノックイン法の正確性と特異性の向上を目標として研究を行ってきた。特に、Cas9 nuclease の変異体である Cas9 nickase が DNA 二重鎖のうち一本を切断する(つまりニックを導入する)だけで二重鎖切断は導入しないことに注目し、その有効利用の道を探ってきた。その結果、Cas9 nickase を従来と違う用法で使うことによって一定の効率でノックインを起こしうることを見出した。この方法では、ドナーDNA と標的ゲノム領域へ同所性のニックを 2ヶ所ずつ導入するように Cas9 nickase を設計し、ドナーDNA とともに細胞へ導入する。すると相同性に基づく DNA 組換えが起き、両ニックの間に挟まれるドナーDNA 上の配列がゲノムへ導入される(図1)。なお、この方法は、ニックの導入様式になぞらえて Tandem paired nicking 法(TPN 法)などと呼ばれ、他の研究者らによっても

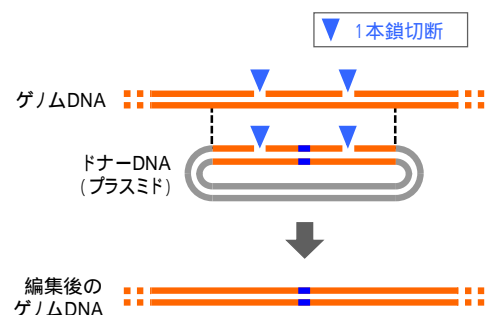


図1 TPN 法の模式図。ゲノム DNA とドナーDNA に2ヶ所ずつニックを導入し、ノックインを誘導する。

論文報告されている<sup>3,4)</sup>。

(3) 本研究では、TPN 法によって誘導されるノックインの効率を複数の細胞株、複数のアッセイ系で定量し、Cas9 nuclease を用いた従来法と比較する。また、ノックインに伴って発生する編集局所のランダムな挿入・欠失の頻度を、TPN 法と Cas9 nuclease を用いた従来法との間で比較する。さらに、TPN 法によって p53 活性の上昇が誘起されるか否か、野生型 p53 の存在が TPN 法によるノックインを阻害するか否かを検討する。

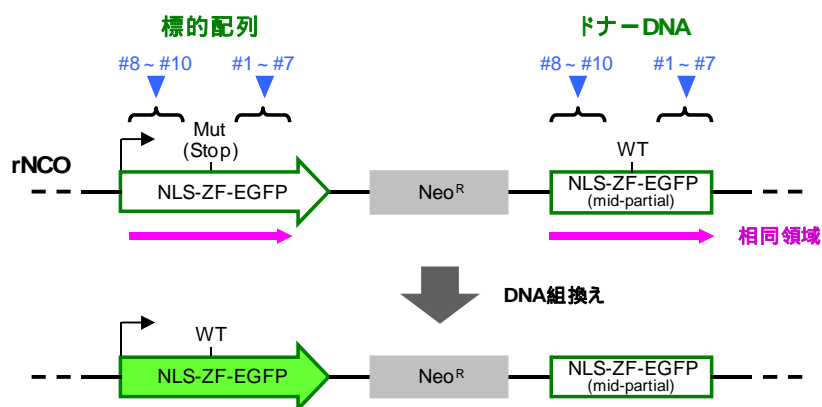
### 3. 研究の方法

(1) ノックイン効率の測定には、*PIGA* 遺伝子および *CD55* 遺伝子に対する変異ノックインまたは変異修正のアッセイ系を用いた。

変異ノックインのアッセイを行うにあたっては、まずそれぞれの遺伝子のコード領域の一部に対して相同性を持つ 2 個の相同腕を作製し、それらの腕がネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを挟むようにドナーDNA (プラスミド) 内に配置した。また、相同腕の一方に標的遺伝子に対する不活化変異を組み込んだ。このドナーDNA を Cas9 nuclease または Cas9 nickase を発現するプラスミドとともに細胞株に導入することによってノックインを誘発した後、細胞を G418 で選択し、G418 耐性の細胞集団からゲノム DNA を回収した。得られたゲノム DNA を鋳型にしてノックイン標的遺伝子座の PCR 増幅を行い、制限酵素断片長解析によってノックイン効率を定量した。このアッセイの対象細胞株には、ヒト大腸がん細胞株 HCT116、DLD-1 や、ヒト不死化非がん上皮細胞株 MCF10A、BEAS2B、さらにヒト多能性幹細胞 (iPSC) などを使用した。

一方、変異修正のアッセイ系には *PIGA* 遺伝子を利用した。*PIGA* は GPI アンカーの生合成に必須の分子であり、*PIGA* 遺伝子が不活化変異を獲得すると、細胞膜表面から GPI アンカーが失われる。逆に *PIGA* 遺伝子変異を修正すると、失われていた GPI アンカーが細胞膜表面に出現する<sup>5,6)</sup>。このような *PIGA* 遺伝子の特性を利用し、本アッセイの準備段階として、まず HCT116 細胞株に *PIGA* 遺伝子の不活化変異を(薬剤耐性遺伝子を使用せずに)ノックインし、細胞クローンを単離した。次に、同クローン (HCT116-mut*PIGA*) に野生型 *PIGA* 配列を相同領域としたドナーDNA (プラスミド; 薬剤耐性遺伝子を持たない) と Cas9 nuclease または Cas9 nickase を発現するプラスミドを導入し、ノックインによる *PIGA* 遺伝子修正を誘発した。続いて、細胞を約 2 週間維持培養した後、GPI アンカーに特異的に結合する蛍光試薬 (FLAER) で染色した。最後に、フローサイトメトリーによって FLAER 陽性細胞の割合を決定し、その数値からノックインによる変異修正の効率を決定した。

(2) ノックイン実施時の編集局所におけるランダムな挿入・欠失の発生率の検討は、HCT116 細胞株および DLD-1 細胞株に *PIGA* 遺伝子の変異をノックインした後、同遺伝子座を次世代シーケンスで解析することによって行った。具体的には、まず変異 *PIGA* 遺伝子を相同領域とするドナーDNA (プラスミド) を作製し、Cas9 nuclease または Cas9 nickase を発現するプラスミドとともに細胞に導入し、ノックインを誘発した。続いて、当該細胞からゲノム DNA を抽出し、*PIGA* 遺伝子座を PCR で増幅し、MiSeq シーケンサーを用いて、PCR 産物のペアエンド・シーケンスによるディープシーケンス解析を行った。得られたデータをオンラインソフトウェア (CRISPResso)<sup>7)</sup> を用いて解析し、ランダムな挿入・欠失の発生頻度および大きさ・範囲を決定した。



**図 2** TPN 法のノックインを蛍光シグナルによって検出するレポーターコンストラクト rNCO。ノックインが起きると標的配列中の EGFP 不活化変異が修正され、細胞は GFP 陽性となる。  
標的配列： 不活化変異を有する EGFP 遺伝子  
ドナーDNA： EGFP 遺伝子 (野生型) の部分断片

(3) ノックイン操作による p53 シグナル経路活性化の解析は、*p21* 遺伝子発現量のリアルタイム RT-PCR 解析と p21 タンパク質の免疫染色によって行った。まず野生型 *p53* 遺伝子を持つ非がん乳腺上皮細胞株 MCF10A に *PIGA* 遺伝子に対するドナーDNA とともに Cas9 nuclease または Cas9 nickase を発現するプラスミドを導入した後、一部の細胞から RNA を抽出し、*p21* 遺伝子および *GAPDH* 遺伝子(対照)の発現量に関するリアルタイム RT-PCR 解析を行った。また、残った細胞に対して抗 p21 抗体による蛍光免疫染色を行い、Cas9(GFP によって標識)が導入された細胞の中で p21 陽性の細胞(Alexa Fluor 594 で標識)が占める割合を算出した。以上の実験によって、mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの p21 発現量の評価、すなわち p53 シグナル経路の活性の評価を行った。

(4) 図 2 に示すプラスミド rNCO は、その内部でノックイン(相同性に基づく DNA 組換え)が起きると、野生型 EGFP 遺伝子が再構成され、細胞が GFP 陽性となるレポーター・コンストラクトである。ゲノム内に rNCO を安定導入した細胞集団に対してノックイン操作を施した後、GFP シグナル陽性率をフローサイトメトリーで決定することによって、コンストラクト内部でのノックインの発生頻度を定量できる。

野生型 p53 活性によるノックイン阻害の評価は、rNCO を安定導入した MCF10A 由来の細胞クローン(MCF10A-rNCO)を用いて行った。具体的には、MCF10A-rNCO に Cas9 nuclease または Cas9 nickase を発現するプラスミドを導入してノックインを誘導した後、フローサイトメトリーで GFP 陽性細胞の割合を測定するアッセイ系において、Cas9 プラスミドと同時に *p53* 遺伝子に対する shRNA 発現プラスミド(*p53* 遺伝子の発現を RNA 干渉法によって抑制するプラスミド)を導入し、*p53* 遺伝子抑制がノックイン効率に及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) TPN 法によるノックインは、Cas9 nuclease を用いる従来のノックイン法と概ね同等、もしくは実験条件によってはやや上回るレベルのノックイン効率を達成した。この結果は *PIGA* 遺伝子、*CD55* 遺伝子の別を問わず、ドナーDNA 中におけるネオマイシン耐性遺伝子使用の有無を問わず、またノックイン対象細胞株ががん細胞由来か非がん上皮細胞由来かを問わず共通していた。

(2) 次世代シーケンサーを用いたディープシーケンス解析の結果、ノックイン局所における望まぬランダムなゲノム変異(挿入・欠失)は、TPN 法の適用によって Cas9 nuclease を用いた従来法の 6%未満に抑制されることがわかった。TPN 法の利用がノックインの正確性を飛躍的に向上させることを示す結果となった。

(3) p53 シグナル経路の下流分子 p21 を対象としたリアルタイム RT-PCR および免疫細胞染色の結果、従来法と異なり、TPN 法によるノックインは *p21* 遺伝子発現量や p21 タンパク質陽性細胞の増加を誘導しなかった。この結果は、TPN 法が p53 下流の DNA 損傷反応を誘発しないことを示しており、同法が DNA 二重鎖切断を介さずにノックインを誘導することに合致すると考えられた。

(4) MCF10A-rNCO コンストラクト内部でのノックイン効率を GFP シグナルによって定量するアッセイの結果、RNA 干渉法による *p53* 遺伝子の抑制は TPN 法によるノックイン効率の有意な上昇を誘導しなかった。このことから、Cas9 nuclease を用いる従来法とは対照的に、TPN 法では野生型 p53 活性によるノックインの阻害が起きないことがわかった。上記の(3)と合わせ、TPN 法はノックインの際に「ゲノムの守護神」たる p53 シグナル経路を攪乱しないものと考えられ、TPN 法によって安全性の高いノックインが行われることを裏付ける結果となった。

(5) 以上より、TPN 法によるノックインは Cas9 nuclease を用いた従来法と概ね同程度のノックイン効率を達成し、しかも従来法よりも遙かに高い正確性と安全性を両立することが分かった。また、他グループからの報告により、Cas9 nickase を利用したゲノム編集ではゲノム上の標的外部位(オフターゲット部位)におけるランダムなゲノム変異が顕著に抑制されることが分かっている。TPN 法は Cas9 nickase を利用してノックインを遂行することから、同法によってオフターゲット変異が抑制された特異性の高いノックインが実現されるものと期待される。このような技術的特性から、TPN 法によるノックインは、将来臨床医学や農学分野などへの応用を期待しうる有望な方法であると考えられた。以上の研究成果を論文にまとめ、学術雑誌で発表した<sup>8)</sup>。

#### <引用文献>

- 1) Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B & Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med* **24**, 927-930 (2018).
- 2) Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, Frias E, Ho D, *et al.* p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med* **24**, 939-946 (2018).
- 3) Chen X, Janssen JM, Liu J, Maggio I, t Jong AEJ, *et al.* In trans paired nicking

triggers seamless genome editing without double-stranded DNA cutting. *Nat Commun* **8**, 657 (2017).

- 4) Nakajima K, Zhou Y, Tomita A, Hirade Y, Gurumurthy CB, *et al.* Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick via noncanonical homology-directed repair. *Genome Res* **28**, 223-230 (2018).
- 5) Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, *et al.* The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* **259**, 1318-1320 (1993).
- 6) Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, *et al.* Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* **73**, 703-711 (1993).
- 7) Pinello L, Canver MC, Hoban MD, Orkin SH, Kohn DB, *et al.* Analyzing CRISPR genome-editing experiments with CRISPResso. *Nat Biotechnol* **34**, 695-697 (2016).
- 8) Hyodo T, Rahman ML, Karnan S, Ito T, Toyoda A, *et al.* Tandem Paired Nicking Promotes Precise Genome Editing with Scarce Interference by p53. *Cell Rep* **30**, 1195-1207.e1197 (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 1. Karnan S, Hanamura I, Ota A, Takasugi S, Nakamura A, Takahashi M, Uchino K, Murakami S, Wahiduzzaman M, Vu LQ, Rahman ML, Hasan MN, Hyodo T, Konishi H, Tsuzuki S, Yoshikawa K, Suzuki S, Ueda R, Ejiri M, Hosokawa Y, and Takami A	4. 巻 -
2. 論文標題 CD52 is a novel target for the treatment of FLT3-ITD-mutated myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Murakami Hideki, Rahman Md Lutfur, Hasan Muhammad Nazmul, Wahiduzzaman Md, Hanamura Ichiro, Quang Vu Lam, Inoko Akihito, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of CD24 as a potential diagnostic and therapeutic target for malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-020-00364-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ota Akinobu, Hanamura Ichiro, Karnan Sivasundaram, Inaguma Shingo, Takei Norio, Lam Vu Quang, Mizuno Shohei, Kanasugi Jo, Wahiduzzaman Md, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Ikeda Hiroshi, Takami Akiyoshi, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel Interleukin-6 Inducible Gene PDZ-Binding Kinase Promotes Tumor Growth of Multiple Myeloma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Interferon & Cytokine Research	6. 最初と最後の頁 389 ~ 405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/jir.2020.0111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuzuki S, Yasuda T, Kojima S, Kawazu M, Akahane K, Inukai T, Imaizumi M, Morishita T, Miyamura K, Ueno T, Karnan S, Ota A, Hyodo T, Konishi H, Sanada M, Nagai H, Horibe K, Tomita A, Suzuki K, Muramatsu H, Takahashi Y, Miyazaki Y, Matsumura I, Kiyoi H, Hosokawa Y, Mano H, Hayakawa F	4. 巻 1
2. 論文標題 Targeting MEF2D-fusion Oncogenic Transcriptional Circuitries in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 82 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.BCD-19-0080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hyodo Toshinori, Rahman Md. Lutfur, Karnan Sivasundaram, Ito Takuji, Toyoda Atsushi, Ota Akinobu, Wahiduzzaman Md, Tsuzuki Shinobu, Okada Yohei, Hosokawa Yoshitaka, Konishi Hiroyuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Tandem Paired Nicking Promotes Precise Genome Editing with Scarce Interference by p53	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1195 ~ 1207.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Sayuri, Ota Akinobu, Ono Takayuki, Karnan Sivasundaram, Wahiduzzaman Md, Hyodo Toshinori, Lutfur Rahman Md, Ito Kunihiro, Furuhashi Akifumi, Hayashi Tomio, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka, Kazaoka Yoshiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Discovery of novel molecular characteristics and cellular biological properties in ameloblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2904-2917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanasugi Jo, Hanamura Ichiro, Ota Akinobu, Karnan Sivasundaram, Vu Lam Quang, Mizuno Shohei, Wahiduzzaman Md, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka, Takami Akiyoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Bi allelic loss of FAM46C triggers tumor growth with concomitant activation of Akt signaling in multiple myeloma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wahiduzzaman Md, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Hanamura Ichiro, Murakami Hideki, Inoko Akihito, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 110
2. 論文標題 Establishment and characterization of CRISPR/Cas9 mediated NF2-/- human mesothelial cell line: Molecular insight into fibroblast growth factor receptor 2 in malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 180-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wahiduzzaman Md, Ota Akinobu, Karnan Sivasundaram, Hanamura Ichiro, Mizuno Shohei, Kanasugi Jo, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Takami Akiyoshi, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 433
2. 論文標題 Novel combined Ato-C treatment synergistically suppresses proliferation of Bcr-Abl-positive leukemic cells in vitro and in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 117~130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.06.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamoto Kazumasa, Miura Yuji, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Konishi Hiroyuki, Hosokawa Yoshitaka, Sato Keiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Inhibition of NADPH oxidase 2 induces apoptosis in osteosarcoma: The role of reactive oxygen species in cell proliferation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 7955-7962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaji M, Ota A, Wahiduzzaman M, Karnan S, Hyodo T, Konishi H, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Hanyuda M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Novel ATP-competitive Akt inhibitor afuresertib suppresses the proliferation of malignant pleural mesothelioma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 2646-2659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Ota A, Nakao H, Sawada Y, Karnan S, Wahiduzzaman M, Inoue T, Kobayashi Y, Yamamoto T, Ishii N, Ohashi T, Nakade Y, Sato K, Itoh K, Konishi H, Hosokawa Y, Yoneda M.	4. 巻 130
2. 論文標題 Delta40p53 suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Sci	6. 最初と最後の頁 614-625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.190736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 兵頭寿典, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたNF2及びCDKN2Aノックアウトヒト中皮腫細胞株の樹立と分子生物学的解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 花村一朗, 村上秀樹, 兵頭寿典, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝
2. 発表標題 p16/NF2遺伝子の欠損により発現の誘導される悪性中皮腫特異的分子の同定
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshinori Hyodo, Md Lutfur Rahman, Atsushi Toyoda, Sivasundaram Karnan, Akinobu Ota, Shinobu Tuzuki, Yoshitaka Hosokawa, ○ Hiroyuki Konishi
2. 発表標題 Tandem paired nicking using Cas9 nickases permits targeted knock-in without significant inhibition by p53
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	兵頭寿典, Md Lutfur Rahman, 豊田敦, Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 都築忍, 細川好孝, ○小西裕之
2. 発表標題	DNA二重鎖切断を介さない変異ノックイン法
3. 学会等名	第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	兵頭寿典, Md Lutfur Rahman, 豊田敦, Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 都築忍, 細川好孝, 小西裕之
2. 発表標題	CRISPR/Cas9 nickaseによるサイレント変異不要のノックイン
3. 学会等名	日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	兵頭寿典, Md Lutfur Rahman, Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 都築忍, 細川好孝, 小西裕之
2. 発表標題	CRISPR/Cas9 nickaseによるノックインはp53を活性化しない
3. 学会等名	日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Md Lutfur Rahman, 兵頭寿典, Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 都築忍, 細川好孝, 小西裕之
2. 発表標題	Experimental conditions permitting efficient targeted knock-in using CRISPR/Cas9 nickases
3. 学会等名	日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 花村一朗, 村上秀樹, Md Wahiduzzaman, 兵頭寿典, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝
2. 発表標題 p16/NF2遺伝子の欠損により発現の誘導される悪性中皮腫特異的分子の同定
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田明伸, 花村一朗, Sivasundaram Karnan, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝
2. 発表標題 多発性骨髄腫の腫瘍増殖におけるPDZ binding kinaseの関与
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田明伸, 山地雅之, Md Wahiduzzaman, Sivasundaram Karnan, 兵頭寿典, 小西裕之, 都築忍, 羽生田正行, 細川好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞の増殖を特異的に抑制するAkt阻害剤の探索と同定
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Md Wahiduzzaman, Akinobu Ota, Sivasundaram Karnan, Toshinori Hyodo, Hiroyuki Konishi, Shinobu Tsuzuki, Yoshitaka Hosokawa.
2. 発表標題 Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment synergistically suppresses proliferation of Bcr-Abl-positive leukemic cells.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 兵頭寿典, 稲見恵理, 太田明伸, Sivasundaram Karnan, 小西裕之, 細川好孝.
2. 発表標題 Protein phosphatase 2Aの調節サブユニットPPP2R5Eは微小管架橋因子MTCL1の発現量を制御する.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 花村一郎, 村上秀樹, 兵頭寿典, Md Wahiduzzaman, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝.
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫の早期診断腫瘍マーカーの検討.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田明伸, 花村一郎, Sivasundaram Karnan, Md Wahiduzzaman, 兵頭寿典, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝.
2. 発表標題 新規Interleukin-6誘導因子PDZ binding kinaseは骨髄腫細胞の増殖と進展に関与する.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 花村一郎, Sivasundaram Karnan, 太田明伸, Wahiduzzaman Md, 後藤峰明, 高橋美裕希, 水野昌平, 内野かおり, 鈴木進, 都築忍, 小西裕之, 上田龍三, 細川好孝, 高見昭良
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたFLT3-ITD導入ヒト白血病クローンの樹立と分子生物学的解析
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田明伸, Md Wahiduzzaman, Sivasundaram Karnan, 兵頭寿典, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝.
2. 発表標題 亜ヒ酸とシスプラチンによる併用療法はBcr-Abl陽性白血病細胞に対して相乗的な増殖抑制効果を示す
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sivasundaram Karnan, 太田明伸, 花村一朗, 村上秀樹, 兵頭寿典, Md Wahiduzzaman, 小西裕之, 都築忍, 細川好孝.
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたNF2ノックアウトヒト中皮腫細胞株の樹立と分子生物学的解析
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ichiro Hanamura, Akinobu Ota, Sivasundaram Karnan, Md Wahiduzzaman, Shohei Mizuno, Kaori Uchino, Jo Kanasugi, Tomohiro Horio, Satsuki Murakami, Susumu Suzuki, Ryuzo Ueda, Shinobu Tsuzuki, Hiroyuki Konishi, Yoshitaka Hosokawa, Akiyoshi Takami.
2. 発表標題 SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THE PBK GENE IS CLOSELY ASSOCIATED WITH MYELOMA CELL PROLIFERATION.
3. 学会等名 The 22nd Congress of the European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 花村一朗, 太田明伸, Sivasundaram Karnan, Wshiduzzaman Md, 水野昌平, 内野かおり, 金杉 丈, 堀尾知弘, 村上五月, 鈴木 進, 都築忍, 小西裕之, 上田龍三, 細川好孝, 高見昭良
2. 発表標題 PBK遺伝子多型rs3779620のゲノムタイプは骨髄腫細胞の増殖と密接に関連する
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:96名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	兵頭 寿典  (Hyodo Toshinori)  (40710645)	愛知医科大学・医学部・講師   (33920)	
研究 分担者	シバサンダラン カルナン  (Sivasndaram Karnan)  (30557096)	愛知医科大学・医学部・講師   (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------