

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16025

研究課題名(和文) 日本発ゲノム編集ツールによる in vivoゲノム改変研究

研究課題名(英文) In vivo genomic engineering with a novel genome editing tools

研究代表者

吉見 一人 (Yoshimi, Kazuto)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：50709813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにType I-E CRISPR-Cas3システムがヒト培養細胞の遺伝子を破壊できることを発見した。本研究課題では、ヒト細胞に加えてマウス・ラットの受精卵および生体組織で変異導入効率を検討し、生体内ゲノム編集ツールとしての有用性を証明することを目指した。CRISPR-Cas3のタンパク質複合体を得ることに成功し、プラスミドに比べて高いゲノム編集効率を示すことを見出した。またCRISPR-Cas3を用いたノックアウトマウスの作製にも成功し、生体におけるゲノム編集ツールとしての有用性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vivoにおける自由自在なゲノム改変技術は、ライフサイエンス研究に欠かすことのできない技術になりつつある一方、オフターゲットの影響、モザイク個体、配列特異性といった技術的問題に加えて、アメリカ主導で開発されたことによる知的財産の問題点が挙げられる。本研究で日本発ゲノム編集ツールの in vivoにおける有用性を示すことができ、新規疾患モデル動物の開発のみならず、ヒト疾患への応用に向けたゲノム編集治療戦略に大きく貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that the Type I-E CRISPR-Cas3 system can induce a large deletion in human genome. In this research project, we examined the knockout efficiency in fertilized eggs of mice and rats as well as human cells and also investigated several modification of this system to improve its usefulness as an in vivo genome editing tool.

We succeeded in the production of Cas3 and Cascade protein complex and found that it showed higher genome editing efficiency than plasmids. We also succeeded in generating knockout mice using CRISPR-Cas3 and demonstrated its usefulness as a genome editing tool in vivo.

研究分野：実験動物学

キーワード：CRISPR-Cas3 ゲノム編集 受精卵 マウス

1. 研究開始当初の背景

In vivo における自由自在なゲノム改変技術は、未知ゲノム領域の生体内での機能を理解し、有用物質生産や医療技術へ応用するための有用なモデルを開発する上で欠かすことのできない技術である。CRISPR-Cas9 の発展により遺伝子改変動物が簡単に作製できるようになり、世界中の研究者が利用するようになった。特に、ES 細胞が利用できなかったマウス以外の実験動物(ラット、ウサギ、ブタ、サルなど)でも遺伝子改変が可能となり、多様なヒト疾患モデルの作製が加速している。例えば宿主の配列をヒト型配列へ置き換えたゲノムヒト化動物は、ヒトの体内環境を模倣した動物モデルになり、疾患メカニズムの解明や治療法の開発などに大きく貢献している。

ゲノム編集技術が広がりを見せる一方、CRISPR-Cas9 にはオフターゲットの影響、モザイク個体の作出、PAM 配列の配列特異性といった技術的問題に加えて、アメリカ主導で開発されたことによる知的財産の問題点が挙げられる。こうした状況から、CRISPR-Cas9 とは異なる特徴を持った新しいゲノム編集ツール、特に日本発の新規ゲノム編集ツールの開発が強く求められていた。

我々は、当時ゲノム編集として利用されていなかった、Class 1 に属する大腸菌由来 Type I-E CRISPR-Cas3 に着目し、ヒト培養細胞の標的配列に変異を導入できることを見出した。この新規ゲノム編集ツール Type I-E CRISPR-Cas3 システムは Cas9 と大きく異なり、1 つの標的部位に対して数 kb 以上の削り込みを起こして大規模欠失を誘導する。本技術は日本発の新しい性質を持つゲノム編集ツールとして期待される一方、ヒト細胞における DNA 切断メカニズムは未解明であり、また受精卵や生体内組織といった in vivo でも同じように機能するかどうかは未知である。

2. 研究の目的

本研究課題では、CRISPR-Cas3 が機能するために必要な因子の改良および特性解析を行い、受精卵および生体組織で変異導入効率を検討することで、in vivo における Type I-E CRISPR/Cas3 のゲノム編集の効率的手法を開発することを目指した。具体的には、1) 細胞周期依存的発現 CRISPR-Cas3 のゲノム編集効率検討、2) CRISPR-Cas3 タンパク質の機能解析、3) マウス受精卵を用いたゲノム編集の検討、4) AAV ベクターを用いた生体内ゲノム編集の検討を実施した。

3. 研究の方法

1) 細胞周期依存的発現 CRISPR-Cas3 のゲノム編集効率検討

Type I-E CRISPR-Cas3 が働くためには6因子(Cas3, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas11)が必要であり、全てを同時に高発現させる必要がある。2細胞期胚でのゲノム編集が高効率ノックインを起こすことが報告されるなど(*Nat Biotechnol*, 36, 632-637, 2018)細胞周期依存的な発現が重要視されている。そこで細胞周期依存的シグナル(Cdt1, Geminin)をCRISPR-Cas3の各因子に付加することで、全ての因子をS/G2/M期あるいはG1期で発現させるシステムを構築した。C末端およびN末端に各因子をそれぞれ結合したプラスミドを作製後、GFP発現ヒトHEK293T細胞に導入し、発現パターンおよび変異導入効率を検討した。

2) CRISPR-Cas3 タンパク質の機能解析

これまでに、理化学研究所の竹下研究員らとの共同研究で、Type I-E CRISPR-Cas3 タンパク質複合体の合成および精製に成功した(*iScience* 25, 103830, 2022)。生体への適用可能性を検討するため、ヒト HEK293T 細胞およびルシフェラーゼレポータープラスミドを用いた切断活性測定(SSAアッセイ)を行い、切断効率を検討した。

3) マウス受精卵を用いたゲノム編集の検討

マウス受精卵に、毛色遺伝子 Tyr を標的とした CRISPR-Cas3 発現プラスミド、mRNA もしくはタンパク質複合体をエレクトロポレーションもしくはマイクロインジェクションにより導入した。得られた産子の表現型およびゲノムのシーケンス解析により、変異導入効率、変異パターンを検討した。

4) AAV ベクターを用いた生体内ゲノム編集の検討

さらにマウス生体内でのゲノム編集効率を検討するため、CRISPR-Cas3 を発現するためにアデノ随伴ウイルス(AAV)用に導入した。セロタイプは、全身臓器を標的とする血清型 AAV9 とした。本 AAV を GFP 発現マウスの尾静脈から投与し、全身臓器の病理解析、ゲノムシーケンス解析を行い、変異導入効率を検討した。

4. 研究成果

1) 細胞周期依存的発現 CRISPR-Cas3 のゲノム編集効率検討

S/G2 期に発現する Geminin, M/G1 期に発現が見られる Cdt1 を C 末端もしくは N 末端側にリンカー配列でつないだ CRISPR-Cas3 の各因子 6 種類の発現プラスミドを作成した。それぞれの組み合わせについて検討した結果、最も反応が阻害されない付加位置は図 1 の通りとなった。それらについて細胞内 GFP の KO 効率を測定した結果、Cdt1 付加 CRISPR-Cas3 は野生型 ($24.6 \pm 0.4\%$) とほぼ同じ値 ($24.8 \pm 2.1\%$) を示した一方、Geminin 付加型は若干の減少が見られた ($20.6 \pm 0.4\%$) (Figure 1)。このことから、細胞周期依存シグナルは KO 効率に大きな影響を示さないことが明らかになった。一本鎖オリゴ DNA を用いた KI についても検討したが、大きな向上は見られなかった。

| HEK reporter | Cas8 | Cas11 | Cas3 | Cas5 | Cas6 | Cas7 |
|------------------------|------|-------|------|------|------|------|
| Cdt1-Cascade & Cas3 | N | N | C | N | N | C |
| Geminin-Cascade & Cas3 | N | N | C | N | N | C |

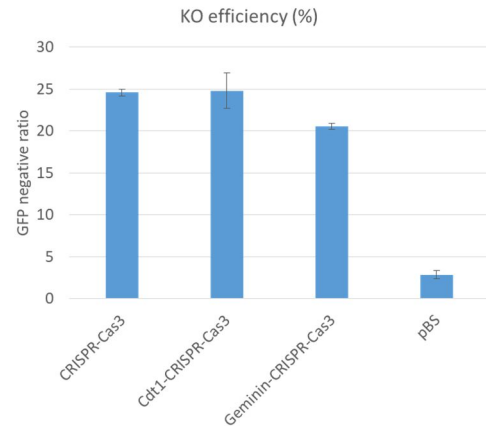
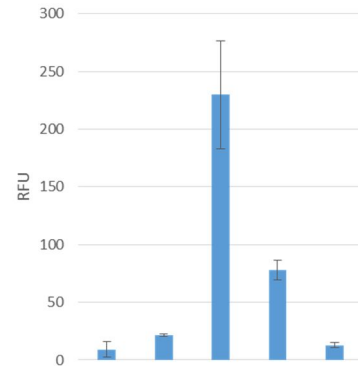


Figure1, 細胞周期依存シグナルの付加位置と KO 効率

2) CRISPR-Cas3 タンパク質の機能解析

合成に成功した Cas3 タンパク質および Cascade タンパク質複合体について、エレクトロポレーションにより標的配列を有するレポーターベクターとともに HEK293T 細胞に導入し、レポータープラスミドの切断によるルシフェラーゼ遺伝子の発現上昇を検討した。その結果、プラスミドに比べてタンパク質は高い切断効率を示すことが明らかになった (Figure 2)。このことから、タンパク質複合体を用いることで生体内でもゲノム編集効率を上昇させることができることが期待された。



| | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|
| Cas3 protein | + | - | + | - | - |
| Cascade Protein | - | + | + | - | - |
| CRISPR-Cas3 Plasmid | - | - | - | + | - |
| pBlueScript | - | - | - | - | + |

Figure2, HEK細胞を用いたSSAアッセイ

3) マウス受精卵を用いたゲノム編集の検討

C57BL/6 マウス受精卵に対し、毛色遺伝子 Tyr を標的とした CRISPR-Cas3 発現プラスミド、mRNA もしくはタンパク質複合体をエレクトロポレーションもしくはマイクロインジェクションにより導入した。プラスミドを使用した場合、また、エレクトロポレーションでは KO 個体が得られなかった。一方、mRNA を使用した結果、複数個体で KO が得られた。電気泳動の結果、数百から数 kb の欠失が認められたため、シーケンス解析を行った結果、1476 塩基欠失、192 塩基欠失などが観察され、これらの結果はヒト細胞で得られた結果と類似していた (Figure 3)。効率は Cas9 に比べて低いが、CRISPR-Cas3 を用いた KO マウスの作製に成功した。

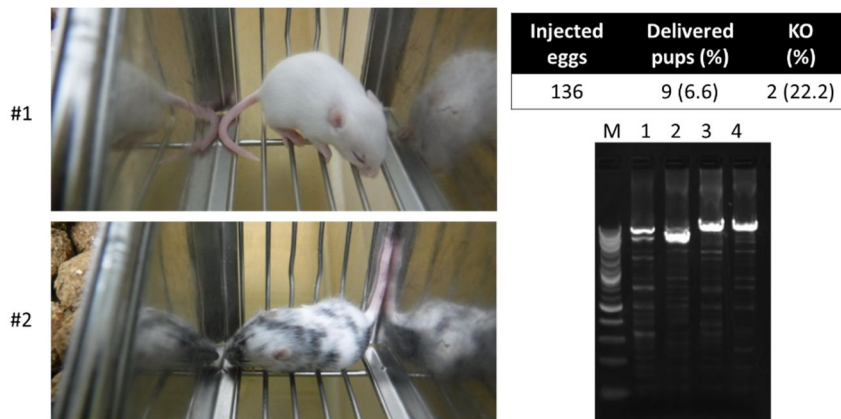
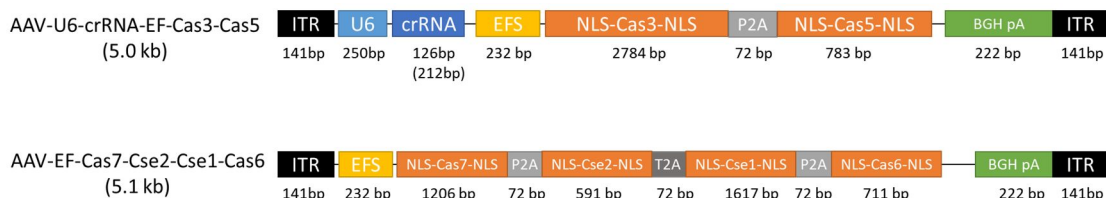


Figure3, CRISPR-Cas3によるTyrノックアウトマウスの作製

4) AAV ベクターを用いた生体内ゲノム編集の検討

CRISPR-Cas3 はすべての因子を2つに分けて導入することで AAV をパッケージングすることに成功した(下図)。



これらを尾静脈投与により GFP 発現 C57BL/6 マウスに導入し、2週間後に肝臓を採取してゲノム編集効率を FACS で測定したが、GFP 陽性率変化は得られなかった。そこで、マウス MEF 細胞を用いて本 AAV を感染させた後、RT-PCR により発現解析を行った結果、AAV-EF-Cas7-Cse2-Cse1-Cas6 の発現が極めて低いことが観察された。原因として、EFS プロモーターがうまく機能しなかったことが考えられた。

以上をまとめると、改良型 CRISPR-Cas3 の開発部分については、細胞周期依存的シグナルをつけることでは改良することができなかった。一方、活性を有するタンパク質複合体を合成することに成功したことで、DNA 切断メカニズムを複数明らかにすることができた()。今後こうしたメカニズムをさらに考慮することでゲノム編集効率を向上した改良型を得ることが期待された。生体内ゲノム編集については CRISPR-Cas3 の配列長が大きな制限となり、AAV の構築が現時点では困難であることが明らかになった。今後、プロモーターを変更して十分な発現を確認できれば生体内ゲノム編集へ利用できると考えられた。また CRISPR-Cas3 mRNA を利用することで KO マウスの作出に成功した。またその変異パターンは細胞で見られた大規模欠失と類似していた。今後、オフターゲット解析等、詳細な解析は必要であるが、CRISPR-Cas3 が生体内ゲノム編集として利用できることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Iwamoto Rina, Takahashi Takumi, Yoshimi Kazuto, Imai Yuji, Koide Tsuyoshi, Hara Miroku, Ninomiya Tadashi, Nakamura Hiroaki, Sayama Kazutoshi, Yukita Akira | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Chemokine ligand 28 (CCL28) negatively regulates trabecular bone mass by suppressing osteoblast and osteoclast activities | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism | 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) 10.1007/s00774-021-01210-9 | 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 Yoshimi Kazuto, Yamauchi Yuko, Tanaka Takao, Shimada Toshio, Sato Moritoshi, Mashimo Tomoji | 4. 巻 101 |
| 2. 論文標題 Photoactivatable Cre knock-in mice for spatiotemporal control of genetic engineering in vivo | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Laboratory Investigation | 6. 最初と最後の頁 125 ~ 135 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00482-5 | 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 Yoshimi Kazuto, Oka Yuichiro, Miyasaka Yoshiki, Kotani Yuko, Yasumura Misato, Uno Yoshihiro, Hattori Kosuke, Tanigawa Arisa, Sato Makoto, Oya Manami, Nakamura Kazuhiro, Matsushita Natsuki, Kobayashi Kazuto, Mashimo Tomoji | 4. 巻 140 |
| 2. 論文標題 Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Human Genetics | 6. 最初と最後の頁 277 ~ 287 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02198-4 | 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 藤井智明、吉見一人、真下知士 | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 ゲノム編集技術CRISPR-Cas3とそのCAR-T細胞療法への応用 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 バイオエクス・プレス 2021 冬 | 6. 最初と最後の頁 28-32 |
| 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 無 |
| 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 藤井 智明, 吉見 一人, 真下 知士 | 4. 巻 38(17) |
| 2. 論文標題 ゲノム編集技術CRISPR-Cas3とその遺伝子治療および診断への応用 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 実験医学(増刊)新規の創薬モダリティ | 6. 最初と最後の頁 2841 - 2846 |
| 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 無 |
| 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 吉見 一人 | 4. 巻 10(4) |
| 2. 論文標題 国産ゲノム編集技術CRISPR-Cas3の開発 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 遺伝子医学 | 6. 最初と最後の頁 16 - 21 |
| 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 無 |
| 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 吉見 一人, 真下 知士 | 4. 巻 3(6) |
| 2. 論文標題 新規ゲノム編集ツールCRISPR-Cas3 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Precision Medicine | 6. 最初と最後の頁 512 - 515 |
| 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 無 |
| 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 吉見 一人, 真下 知士 | 4. 巻 273(9) |
| 2. 論文標題 CRISPR-Cas3を用いた新しいゲノム編集 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 医学のあゆみ | 6. 最初と最後の頁 751 - 755 |
| 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 無 |
| 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 Morisaka Hiroyuki, Yoshimi Kazuto, Okuzaki Yuya, Gee Peter, Kunihiro Yayoi, Sonpho Ekasit, Xu Huaigeng, Sasakawa Noriko, Naito Yuki, Nakada Shinichiro, Yamamoto Takashi, Sano Shigetoshi, Hotta Akitsu, Takeda Junji, Mashimo Tomoji | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 5302 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13226-x | 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 Gurumurthy Channabasavaiah B. et al. | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Reproducibility of CRISPR-Cas9 methods for generation of conditional mouse alleles: a multi-center evaluation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Genome Biology | 6. 最初と最後の頁 171 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-019-1776-2 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉見一人 |
| 2. 発表標題 Development and applications of CRISPR-Cas3 technology for studying human diseases |
| 3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 吉見一人 |
| 2. 発表標題 国産ゲノム編集技術CRISPR-Cas3の開発と応用 |
| 3. 学会等名 第14回ラットリソースリサーチ研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉見一人 |
| 2. 発表標題 国産ゲノム編集技術の開発と新型コロナウイルス診断への応用 |
| 3. 学会等名 令和2年度第2回応用動物科学セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 服部 晃佑、山内祐子、星 美穂、Jinxi Wang、吉見一人、真下知士 |
| 2. 発表標題 NBRP-免疫不全ラットと支援プラットフォームの概要 |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤井智明、吉見一人、玉田耕治、真下知士 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集技術CRISPR-Cas3とそのCAR-T細胞療法への応用 |
| 3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉見 一人 |
| 2. 発表標題 Combi-CRISPR ~ マウス・ラットの高効率プラスミドノックイン法 ~ |
| 3. 学会等名 基礎生物学研究所ゲノム編集テクニカルセミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 吉見 一人 |
| 2. 発表標題 マウス・ラット受精卵を用いたゲノム改変技術の現状 |
| 3. 学会等名 第53回日本実験動物技術者協会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉見一人, 宮坂佳樹, 小谷祐子, 服部晃佑, 谷川亜里紗, 山内祐子, 外野善弘, 真下知士 |
| 2. 発表標題 Combi-CRISPR : 新しい高効率ノックイン動物作成法の開発 |
| 3. 学会等名 第4回日本ゲノム編集学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 吉見 一人 |
| 2. 発表標題 マウス・ラットにおける効率的ゲノム編集法の開発研究 |
| 3. 学会等名 第59回北陸実験動物研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuto Yoshimi, Hiroyuki Morisaka, Yuki Naito, Yayoi Kunihiro, Satomi Shibumura, Junji Takeda, Tomoji Mashimo |
| 2. 発表標題 Characterization of CRISPR-Cas3-mediated genome editing in mammalian cells |
| 3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 山本 卓, 佐久間哲史 / 編 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 386 |
| 3. 書名 実験医学別冊 完全版 ゲノム編集実験スタンダード | |

〔出願〕 計4件

| | | |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 C a s 3 タンパク質を製造する方法 | 発明者 真下知士、吉見一人、竹下浩平、山本雅貴、渋村里美 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-031907 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 試料中の特定のDNAを検出する方法 | 発明者 真下知士、吉見一人、渋村里美 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/002372 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 外国 |

| | | |
|---------------------------------|----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 ノックイン細胞の作製方法 | 発明者 真下知士、吉見一人、他5名 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-072782 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|---------------------------------|-----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 試料中の特定のDNAを検出する方法 | 発明者 真下知士、吉見一人、渋村里美 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-010216 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 真下 知士 (Mashimo Tomoji) | | |
| 研究協力者 | 竹下 浩平 (Takeshita Kohei) | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|