

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18478

研究課題名(和文)階層的ゲノム・エピゲノム編集法を用いた疾患発症モデリング技術の開発

研究課題名(英文)Development of disease-modeling technology using hierarchical genome/epigenome editing

研究代表者

佐久間 哲史(SAKUMA, TETSUSHI)

広島大学・理学研究科・特任講師

研究者番号：90711143

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、単一細胞内で多発的に生じるゲノム・エピゲノム異常による疾患のモデル化を可能にするゲノム・エピゲノム編集技術の開発を実施した。ゲノム編集については、基盤整備としてMMEJ依存性遺伝子ノックイン(PITCh)の効率化とPITChの自動設計ツールを開発するとともに、効率化した技術を用いてPITChによる複数遺伝子座への同時ノックインを実現した。また、エピゲノム編集については、従来のシステムによる編集効果を上回るエフェクター超集積型システム(TREE)を構築した。これらの成果により、ゲノム編集・エピゲノム編集の両面から、多因子性の複雑な疾患の発症をモデリング可能な技術が確立された。

研究成果の概要(英文): In this research, we developed the genome/epigenome editing technologies enabling disease modeling caused by genomic and/or epigenomic abnormality that multiplexly occurs in a single cell. Regarding genome editing, we achieved the improvement of MMEJ-dependent gene knock-in (PITCh) and the development of automated design tool of PITCh knock-in. In addition, we realized simultaneous gene knock-in into multiple gene loci using the improved PITCh system. Regarding epigenome editing, we constructed the TREE system for hyper accumulation of effector molecules, showing superior editing effect compared to the conventional systems. Collectively, the technology capable of modeling complex multifactorial pathogenesis was established in terms of both genome and epigenome editing.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：がん ゲノム編集 エピゲノム編集 マイクロホモロジー媒介性末端結合 MMEJ ゲノム生物学 CRI  
SPR-Cas9 TALEN

### 1. 研究開始当初の背景

単一細胞内で多発的に生じるゲノム・エピゲノム異常による疾患のモデル化を可能にするには、複数遺伝子座のゲノム編集（特に遺伝子ノックイン）およびエピゲノム編集（または転写調節）を同一細胞内で実行可能な技術が必要不可欠であり、そのための技術開発が急務となっていた。

### 2. 研究の目的

ゲノム編集においては、複数遺伝子座への遺伝子ノックインを可能にするために、まず遺伝子ノックインそのものの効率を高める必要があった。また、システムティックな遺伝子ノックインのためには、設計過程を自動化する必要があった。これらの基礎基盤を確立した上で、複数遺伝子座への効率的な遺伝子ノックインの技術を確立することを目的とした。エピゲノム編集/転写調節技術についても、従来のシステムでは全ての遺伝子座で必ずしも十分な効果が得られないことが明らかとなっており、システム自体の改良を施す必要があった。更に、複数遺伝子座を効率的に標的化するためには、導入するベクターをオールインワン化する必要があった。これらの開発を通じて、多因子性疾患の発症をモデル化可能な技術を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム編集：PITCh 法の効率化・自動設計化と複数同時ノックイン法の確立

本研究開始前までに我々は、マイクロホモロジー媒介末端結合（MMEJ）に依存した簡便・正確・高効率な遺伝子ノックイン法である PITCh 法を開発していた。本研究ではまず、PITCh 法の更なる効率化と設計のオートメーション化を進めた。具体的には、MMEJ に関与する因子を過剰発現することで、DNA 二本鎖切断の修復経路を MMEJ に偏らせる方策で効率化を図った。設計のオートメーション化については、当該機能を有するウェブツールの開発を試みた。その後、より高いノックイン効率を実現するシステムの開発も実施し、それを用いて 3 遺伝子座への同時ノックインを試みた。

#### (2) エピゲノム編集/転写調節：エフェクター超集積型システムの確立と効果判定

エピゲノム編集/転写調節のためのシステムとして、本研究開始前までに、ヌクレアーゼ活性を不活化させた dCas9 に直接エフェクターを融合したシステムが開発され、更にタグを介してエフェクターを集積させることで編集・調節効果を上昇させた報告もなされていた。本研究では、この効果を更に強いものとするため、複数種類のタグを階層化したエフェクター超集積型システムを考案し、この開発と機能性検証を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) ゲノム編集：PITCh 法の効率化・自動設計化と複数同時ノックイン法の確立

MMEJ 因子のスクリーニングの結果、エキソヌクレアーゼの一種である Exo1 を過剰発現した際に、PITCh 法によるノックインの効率が上昇することを見出した（雑誌論文 2）。また、PITCh 法の自動設計ウェブツールとして、「PITCh designer」（下図；<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/sm/g/PITChdesigner/index.html>）を開発した（雑誌論文 12）。

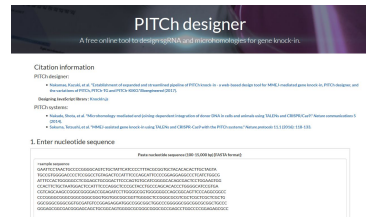


図 ウェブツール「PITCh designer」

その後、MMEJ 因子を単純に過剰発現するのではなく、DNA 二本鎖切断が起こる場所に集積させることで、PITCh エンハンサーとしての機能が格段に高まることを見出した（LoAD 法）。更に、LoAD 法を適用した PITCh ノックイン技術によって、ヒト細胞内で、3 箇所の独立した遺伝子座にそれぞれ異なる遺伝子カセットを同時にノックインできることを確認した（論文投稿中）。

#### (2) エピゲノム編集/転写調節：エフェクター超集積型システムの確立と効果判定

エフェクター超集積型システムとして、sgRNA に MS2 ループを付加しつつ、MS2 コートタンパク質に GCN4 タグを融合し、更に GCN4 タグに結合する scFv に目的の転写調節因子を融合させるという多段階の集積システムを構築した（TREE システム；特願 2018-041322）。TREE システムを用いることにより、従来システムでは顕著な発現の活性化がみられなかった遺伝子の発現をも強く誘導できることが明らかとなった。更に、TREE システムの優位性が細胞種や遺伝子座に依存しないことを証明し、普遍的に高い効果を示すエフェクター集積システムとして利用可能であることを示した（論文投稿中）。また、TREE を適用する上で、複数の sgRNA+MS2 と dCas9-effector 分子を同時に発現するオールインワンベクターを使用し、この有用性も確認した。

以上の成果により、ゲノム編集・エピゲノム編集の両面から、多因子性の複雑な疾患の発症をモデリング可能な技術が確立された。

### 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 32 件)

1. Sasakura Y, Ogura Y, Treen N, Yokomori R, Park SJ, Nakai K, Saiga H, Sakuma T, Yamamoto T, Fujiwara S, Yoshida K. Transcriptional regulation of a horizontally transferred gene from bacterium to chordate. *Proc Biol Sci*. 査読有 283: 20161712 (2016). doi: 10.1098/rspb.2016.1712
2. Aida T, Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, Aizawa H, Yamamoto T, Tanaka K. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics*. 査読有 17: 979-979 (2016). doi: 10.1186/s12864-016-3331-9
3. Toyonaga K, Torigoe S, Motomura Y, Kamichi T, Hayashi JM, Morita YS, Noguchi N, Chuma Y, Kiyohara H, Matsuo K, Tanaka H, Nakagawa Y, Sakuma T, Ohmuraya M, Yamamoto T, Uemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Yano I, Miyamoto T, Yamasaki S. C-Type Lectin Receptor DCAR Recognizes Mycobacterial Phosphatidyl-Inositol Mannosides to Promote a Th1 Response during Infection. *Immunity*. 査読有 45: 1245-1257 (2016). doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.012
4. Tochio N, Umehara K, Uewaki JI, Flechsig H, Kondo M, Dewa T, Sakuma T, Yamamoto T, Saitoh T, Togashi Y, Tate SI. Non-RVD mutations that enhance the dynamics of the TAL repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy. *Sci Rep*. 査読有 6: 37887 (2016). doi: 10.1038/srep37887
5. Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*. 査読有 21: 1253-1262 (2016). doi: 10.1111/gtc.12437
6. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. *Biol Open*. 査読有 5: 1142-1148 (2016). doi: 10.1242/bio.019349
7. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*. 査読有 19: 127-138 (2016). doi: 10.1016/j.stem.2016.06.003
8. Sasaki T, Hanisch FG, Deutzmann R, Sakai LY, Sakuma T, Miyamoto T, Yamamoto T, Hannappel E, Chu ML, Lanig H, von der Mark K. Functional consequence of fibulin-4 missense mutations associated with vascular and skeletal abnormalities and cutis laxa. *Matrix Biol*. 査読有 56: 132-149 (2016). doi: 10.1016/j.matbio.2016.06.003
9. Nii T, Kohara H, Marumoto T, Sakuma T, Yamamoto T, Tani K. Single-Cell-State Culture of Human Pluripotent Stem Cells Increases Transfection Efficiency. *Biores Open Access*. 査読有 5: 127-136 (2016). doi: 10.1089/biores.2016.0009
10. Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. *Cell Rep*. 査読有 15: 1228-1241 (2016). doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.031
11. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice. *Biol Open*. 査読有 6: 706-713 (2017). doi: 10.1242/bio.025122
12. Nakamae K, Nishimura Y, Takenaga M, Nakade S, Sakamoto N, Ide H, Sakuma T, Yamamoto T. Establishment of expanded and streamlined pipeline of PITCH knock-in - a web-based design tool for MMEJ-mediated gene knock-in, PITCH designer, and the variations of PITCH, PITCH-TG and PITCH-KIKO. *Bioengineered*. 査読有 8: 302-308 (2017). doi: 10.1080/21655979.2017.1313645
13. Takayama K, Igai K, Hagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T,

- Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T, Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucleic Acids Res.* 査読有 45: 5198-5207 (2017). doi: 10.1093/nar/gkx130
14. Yoshida K, Nakahata A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Hox-mediated endodermal identity patterns the pharyngeal muscle formation in the chordate pharynx. *Development.* 査読有 144: 1629-1634 (2017). doi: 10.1242/dev.144436
  15. Yoshida K, Hozumi A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Shirae-Kurabayashi M, Sasakura Y. Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis* reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. *Dev Biol.* 査読有 423: 111-125 (2017). doi: 10.1016/j.ydbio.2017.01.022
  16. Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3-What's next? *Bioengineered.* 査読有 8: 265-273 (2017). doi: 10.1080/21655979.2017.1282018
  17. Mizutani O, Arazoe T, Toshida K, Hayashi R, Ohsato S, Sakuma T, Yamamoto T, Kuwata S, Yamada O. Detailed analysis of targeted gene mutations caused by the Platinum-Fungal TALENs in *Aspergillus oryzae* R1B40 strain and a ligD disruptant. *J Biosci Bioeng.* 査読有 123: 287-293 (2017). doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.09.014
  18. Kaku Y, Taguchi A, Tanigawa S, Haque F, Sakuma T, Yamamoto T, Nishinakamura R. PAX2 is dispensable for in vitro nephron formation from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 査読有 7: 4554 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-04813-3
  19. Sakuma T, Yamamoto T. Magic wands of CRISPR-lots of choices for gene knock-in. *Cell Biol Toxicol.* 査読有 33: 501-505 (2017). doi: 10.1007/s10565-017-9409-6
  20. Nakamura M, Kumrungsee T, Sakuma T, Yamamoto T, Yanaka N. TALEN-mediated targeted editing of the GDE5 gene suppresses fibroblastic cell proliferation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 査読有 81: 2164-2167 (2017). doi: 10.1080/09168451.2017.1373593
  21. Matsuzaki Y, Sakuma T, Yamamoto T, Saya H. Establishment of pten knockout medaka with transcription activator-like effector nucleases (TALENs) as a model of PTEN deficiency disease. *PLoS One.* 査読有 12: e0186878 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0186878
  22. Abe S, Kobayashi K, Oji A, Sakuma T, Kazuki K, Takehara S, Nakamura K, Okada A, Tsukazaki Y, Senda N, Honma K, Yamamoto T, Ikawa M, Chiba K, Oshimura M, Kazuki Y. Modification of single-nucleotide polymorphism in a fully humanized CYP3A mouse by genome editing technology. *Sci Rep.* 査読有 7: 15189 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-15033-0
  23. Tsuda M, Cho K, Ooka M, Shimizu N, Watanabe R, Yasui A, Nakazawa Y, Ogi T, Harada H, Agama K, Nakamura J, Asada R, Fujiike H, Sakuma T, Yamamoto T, Murai J, Hiraoka M, Koike K, Pommier Y, Takeda S, Hirota K. ALC1/CHD1L, a chromatin-remodeling enzyme, is required for efficient base excision repair. *PLoS One.* 査読有 12: e0188320 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0188320
  24. Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T. Cancer induction and suppression with transcriptional control and epigenome editing technologies. *J Hum Genet.* 査読有 63: 187-194 (2018). doi: 10.1038/s10038-017-0377-8
  25. Kawabe Y, Komatsu S, Komatsu S, Murakami M, Ito A, Sakuma T, Nakamura T, Yamamoto T, Kamihira M. Targeted knock-in of an scFv-Fc antibody gene into the hprt locus of Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 and CRIS-PITCh systems. *J Biosci Bioeng.* 査読有 125: 599-605 (2018). doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.003
  26. Sakuma T, Yamamoto T. Genome editing for dissecting and curing human genetic diseases. *J Hum Genet.* 査読有 63: 105 (2018). doi: 10.1038/s10038-017-0380-0
  27. Sato'o Y, Hisatsune J, Yu L, Sakuma T, Yamamoto T, Sugai M. Tailor-made gene silencing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates by CRISPR interference. *PLoS One.* 査読有 13: e0185987 (2018). doi: 10.1371/journal.pone.0185987
  28. Sakuma T, Mochida K, Nakade S, Ezure T, Minagawa S, Yamamoto T. Unexpected heterogeneity derived from Cas9 ribonucleoprotein-introduced clonal cells at the HPRT1 locus. *Genes Cells.* 査読有 23: 255-263 (2018). doi:

- 10.1111/gtc.12569
29. Tanaka Y, Sone T, Higurashi N, Sakuma T, Suzuki S, Ishikawa M, Yamamoto T, Mitsui J, Tsuji H, Okano H, Hirose S. Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the SCN1A gene. *Stem Cell Res.* 査読有 28: 100-104 (2018). doi: 10.1016/j.scr.2018.01.036
  30. Shukunami C, Takimoto A, Nishizaki Y, Yoshimoto Y, Tanaka S, Miura S, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, Kondoh G, Hiraki Y. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Sci Rep.* 査読有 8: 3155 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-21194-3
  31. Kim SI, Matsumoto T, Kagawa H, Nakamura M, Hirohata R, Ueno A, Ohishi M, Sakuma T, Soga T, Yamamoto T, Woltjen K. Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nat Commun.* 査読有 9: 939 (2018). doi: 10.1038/s41467-018-03044-y
  32. Kuriyama S, Tsuji T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka M. PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetero-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer. *Cell Death Discov.* 査読有 4: 11 (2018). doi: 10.1038/s41420-017-0006-5

〔学会発表〕(計 20 件)

1. Tetsushi Sakuma, Current advances and future prospects of genome editing technology, 10th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016), 2016年11月24日, つくば(産業技術総合研究所)
2. Tetsushi Sakuma, Recent Development and Application of Genome Editing Tools and Methods, The 20th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, CRISPR/Cas9 Gene Editing In Vivo, 2017年3月9日, Silver Spring, MD, USA
3. 佐久間哲史, CRISPR-Cas9 によるゲノム編集とヒト疾患解析・治療への応用, 第57回日本呼吸器学会学術講演会, 2017年4月22日, 東京(東京国際フォーラム)
4. 佐久間哲史, ゲノム編集の技術開発と培養細胞での利用, 日本ゲノム編集学会第2回大会, 2017年6月28日, 大阪(千里ライフサイエンスセンター)
5. Tetsushi Sakuma, Recent advances in genome editing technology, The 23rd

Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (JSGCT2017), 2017年7月21日, 岡山(岡山コンベンションセンター)

6. Tetsushi Sakuma, Updated summary of genome editing technology, 11th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2017), 2017年12月14日, 仙台(東北大学)
7. 佐久間哲史, がん抑制およびがんモデリングのための人工転写調節技術の開発, 第2回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会セミナー, 2017年12月15日, 東京(東京慈恵会医科大学)

他 13 件

〔図書〕(計 3 件)

1. Sakuma T, Sakamoto T, Yamamoto T, In Vitro Mutagenesis - Methods in Molecular Biology, Springer, 41-56, 2017.
2. Takata N, Sakakura E, Sakuma T, Yamamoto T, RNAi and Small Regulatory RNAs in Stem Cells - Methods in Molecular Biology, Springer, 269-292, 2017.
3. Sakuma T, Yamamoto T, Genome Editing in Animals - Methods in Molecular Biology, Springer, 25-36, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 標的遺伝子にエフェクタータンパク質を集積するための組成物、およびその利用  
 発明者: 山本卓、佐久間哲史、國井厚志  
 権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-041322

出願年月日: 2018年3月7日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

広島大学 分子遺伝学研究室

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/sm/g/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐久間 哲史 (SAKUMA TETSUSHI)

広島大学・大学院理学研究科・特任講師

研究者番号: 9 0 7 1 1 1 4 3