

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04993

研究課題名（和文）遺伝子修復治療を可能にする正確なゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Genome editing technology that enables gene correction therapies

研究代表者

宮岡 佑一郎 (MIYAOKA, Yuichiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20549521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,200,000円

研究成果の概要（和文）：CRISPR/Cas9によるゲノム編集は、標的配列特異的なgRNAがヌクレアーゼであるCas9を誘導し、標的DNAが切断されることで達成される。切断されたDNAの修復反応には、HDRとNHEJがある。このうち、組換えを介して鋳型DNAの配列通りに編集が起きるHDRは、正確なゲノム編集に特に有益であるが、その頻度はNHEJに比べて低い場合が多い。

本研究で我々は、Cas9やgRNAの改変によって、Cas9-gRNA複合体がDNAに結合する様式を変化させることで、HDR誘導活性が亢進することを明らかにした。この傾向は、HEK293T細胞、HeLa細胞、ヒトiPS細胞の全てで観察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の持つ遺伝情報を書き換えるゲノム編集技術は、医療や農業への応用が期待されるが、その実現には、正確に遺伝情報の編集を行う必要がある。CRISPR/Cas9と呼ばれるゲノム編集に用いられるツールは、本来細菌や古細菌の免疫機構であり、必ずしも哺乳類細胞のゲノム編集のために最適化されていない。本研究では、CRISPR/Cas9の標的DNAへの結合の仕方を調整することで、編集の正確さを高められることを見出した。今後のゲノム編集技術の応用につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：CRISPR/Cas9-mediated genome editing is accomplished by cleavage of target DNA sequences by Cas9 guided by sequence-specific gRNA molecules. The two repair pathways, HDR and NHEJ, are activated by Cas9 at the target sites. NHEJ often induces random insertions or deletions at the target sites. In contrast, the DNA sequences are precisely repaired based on the sequences of template DNA that is homologous to the cleaved DNA in HDR. Therefore, HDR is particularly useful for precise genome editing, because the target DNA sequences are replaced by those of donor DNA molecules that we can introduce into the cell via DNA recombination. However, in general, HDR is much more infrequent than NHEJ.

In this study, we revealed that modification of the interaction between the Cas9-gRNA complex and DNA can enhance HDR. This trend was observed in all three cell types we tested, that is, in HEK293T cells, HeLa cells, and human iPS cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 HDR NHEJ iPS細胞 再生医療 遺伝子修復

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスなどの外来 DNA を切断・駆逐するための細菌/古細菌の免疫機構である CRISPR/Cas9 は、ゲノム編集技術として爆発的な発展を遂げている。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集では、配列特異的な guide RNA (gRNA) が標的ゲノム領域にヌクレアーゼである Cas9 を誘導し、DNA を切断する (図 1)。この DNA 切断により惹起される細胞内在性 DNA 修復機構である homology-directed repair (HDR) と non-homologous end joining (NHEJ) により、実際にゲノムが編集される。HDR は鋳型 DNA との組換えにより正確な編集をもたらすが、NHEJ は頻りにランダムな塩基の挿入や欠失を伴いながら切断された DNA の両端を結合し、正確性と予測性を欠く (図 1)。

一般に CRISPR/Cas9 は、HDR よりも NHEJ をはるかに強く誘導し、ランダムな塩基の挿入や欠失による遺伝子破壊技術としては確立されたが、HDR を介した正確な編集の効率の低さが医療応用への大きな障壁となっていた。正確な HDR を誘導できれば、疾患原因遺伝子の修復など、ゲノム編集技術の医療応用の可能性ははるかに広汎なものになる。しかしながら、NHEJ を伴わずに HDR だけを高効率に誘導できる技術は存在しなかった。

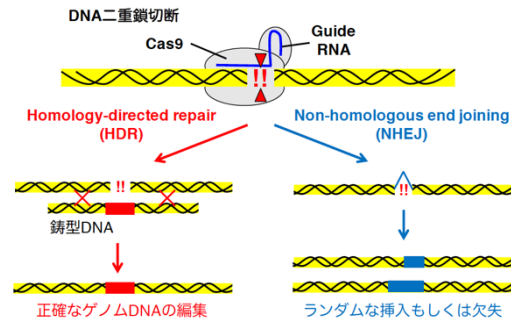


図 1. HDR と NHEJ によるゲノム編集

2. 研究の目的

本研究では、Cas9 と RAD51 をはじめとする HDR 因子の融合、および Cas9 と DNA の結合様式の改変という 2 つの異なるアプローチを発展・複合させ、HDR を特異的に誘導する CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術の確立を目指した。確立した技術により、ヒト iPS 細胞における HDR によるゲノム編集効率を向上させ、医療応用への可能性の開拓も目指した。

3. 研究の方法

(1) HDR 因子との融合や、DNA への結合様式の改変による CRISPR/Cas9 システムの改良

これまでに得た知見をもとに以下①~⑦のアプローチで Cas9 の HDR 誘導活性亢進と NHEJ 誘導活性抑制を試みた。HEK293T 細胞において、疾患に関わる 3 種類の点変異 (RBM20 R636S, GRN R493X, ATP7B R778L) の導入効率と、約 4.2 kbp の EGFP と Puromycin 耐性遺伝子の発現カセットのノックイン効率の定量によって、HDR と NHEJ の誘導活性を評価した。

①RAD51 と Cas9 の融合

HDR における DNA 組換え因子である RAD51 と Cas9 を融合させ、HDR 誘導活性亢進を試みた。また、RAD51 は実際にはオリゴマーとして機能するため、複数の RAD51 をタンデムに Cas9 に融合する実験も行った。

②RAD51 以外の HDR 因子と Cas9 の融合

HDR を制御する RAD51 以外の HDR 因子 (MRE11 や i53 など) を Cas9 に融合させた。

③gRNA の 5' 末端への過剰なヌクレオチドの付加

グアニンを gRNA の 5' 末端に付加し、Cas9-gRNA 複合体と DNA との結合を変化させた。また、アデニン/ウラシル/シトシンの付加も実施し、グアニン付加の効果と比較した。

④Cas9 への変異導入による DNA 結合様式の改変

DNA との相互作用を担うアミノ酸に変異が導入された、Cas9 改変体である eSpCas9 や Cas9-HF1、HypaCas9 の HDR 誘導活性と NHEJ 誘導活性を詳細に比較した。さらにこれらの改変体に Y450A、K810A などの変異を追加して、ゲノム編集活性を検討した。

⑤eSpCas9 や Cas9-HF1 と RAD51 の融合

eSpCas9 や Cas9-HF1 などの Cas9 改変体に RAD51 を融合した。

⑥eSpCas9 や Cas9-HF1 とヌクレオチドを付加した gRNA の組合せ

eSpCas9 や Cas9-HF1 などの Cas9 改変体とグアニンを付加した gRNA を組み合わせて、ゲノム編集活性を検討した。

⑦Cas9 nickase への応用

Cas9 の持つ 2 箇所の DNA 切断部位の一方を不活化した Cas9 nickase は、DNA 二重鎖の片方だけを切断し、この nickase が野生型の Cas9 よりも HDR 誘導に有効な可能性があった。したがって、①~⑥までのアプローチを Cas9 nickase でも検討した。

(2) 改良した CRISPR/Cas9 システムの HeLa 細胞およびヒト iPS 細胞を用いた評価

HEK293T 細胞を用いて改良した CRISPR/Cas9 システムの細胞種に対する一般性を、HeLa 細胞

とヒト iPS 細胞において評価した。HeLa 細胞では、HEK293T 細胞でも検討した疾患に関わる 3 種類の点変異の導入効率、ヒト iPS 細胞では約 4.2 kbp の EGFP と Puromycin 耐性遺伝子の発現カセットのノックイン効率をそれぞれ定量した。

4. 研究成果

(1) Cas9-gRNA 複合体と DNA の結合様式の変更が HDR 誘導活性を亢進する

①RAD51 と Cas9 の融合による HDR 誘導活性の亢進は限定的

RAD51 と Cas9 を N 末端で融合させ、3 種類の点変異の導入効率をデジタル PCR で検討したところ、RBM20 R636S 点変異導入には若干の HDR 誘導効率の上昇が認められたが、GRN R493X および ATP7B R778L 点変異導入効率は変化しなかった。また、RAD51 と Cas9 nickase の融合も行い、同様に 3 種類の点変異の導入効率を検討したところ、ATP7B R778L 点変異導入では顕著な HDR 誘導効率の亢進が認められたが、その他 2 種類の点変異導入では効果が認められなかった。全く同じ考え方で、RAD51 と Cas9 および Cas9 nickase との融合が HDR 誘導活性に有効であるという論文が、本研究の遂行中に他のグループから発表されたが (Rees, Nature Commun 10:2212 2019)、本研究結果からはその主張を全面的には支持できなかった。一部の標的のみで RAD51 融合の効果が認められ、またそれが Cas9 と Cas9 nickase で異なったことから、その効果は標的 DNA の配列などに依存すると予想される。RAD51 融合 Cas9 および Cas9 nickase の効果が認められる標的とそうでない標的とで、どのような差があるのかを解明することが今後の課題である。

また、タンデムな 2、3 分子の RAD51 の融合、さらには SunTag システムを用いた RAD51 のオリゴマー化も試みたが、いずれも HDR 誘導活性の亢進は全く認められなかった。eSpCas9 と Cas9-HF1 にも RAD51 の融合を行ったが、顕著な効果は認められなかった。

②RAD51 以外の HDR 因子と Cas9 の融合は効果的ではなかった

MRE11 と i53 を Cas9 に融合し、3 種類の点変異の導入効率を検討したが、残念ながら HDR 誘導活性の亢進は認められなかった。その他の HDR 因子の融合も計画したが、分子量が大きいのが多く、分子全体の融合は困難であった。今後は、HDR 因子の活性に重要な部分を同定し、その部分だけを融合して、ゲノム編集活性への効果を検討していく。

③gRNA の 5' 末端への過剰なヌクレオチドの付加は、HDR 誘導活性亢進に効果を示した

3 種類の点変異導入において、過剰なヌクレオチドの gRNA への 5' 末端への付加は効果的な場合が多く認められた。グアニンを 1 から 3 個追加した場合に、その効果の段階的な変化も見られた。標的 DNA の配列によって、過剰なヌクレオチドが Cas9-gRNA 複合体の DNA への結合様式に与える影響が異なるためと考えられる。グアニンだけでなく、アデニン、ウラシル、シトシンの付加も行ったが、グアニンを付加した場合と大きな差異は認められなかった。プラスミドからの転写を促す場合、5' 末端のグアニンは U6 プロモーターからの転写を促進することが知られているため、グアニンの付加が最も実用的であると結論づけた。

さらに本研究では、gRNA の 5' 末端のヌクレオチドを 1 から 3 個取り除き、通常よりも短くした gRNA の活性も検討した。興味深いことに、ヌクレオチドを追加した場合と同様に、除去した場合でも HDR 誘導活性が向上し、NHEJ 誘導活性が抑制される例が多く観察された。また、短くするにつれて、やはり段階的な活性の変化が認められた。これらの結果から、通常に使用されている gRNA が HDR 誘導のために必ずしも最適ということではなく、gRNA の長さを変化させることによって活性を高めることができる、ということが明らかとなった。

④Cas9 改変体は HDR 誘導活性の亢進に有効であった

まず、eSpCas9、Cas9-HF1 という 2 種類の Cas9 改変体の持つ HDR 誘導活性を、3 種類の変異導入効率によって評価したところ、多くの gRNA との組み合わせで HDR 頻度が上昇し、NHEJ 頻度が低下した。本研究を遂行している間に、新しい Cas9 改変体として HypaCas9 が報告されたため、HypaCas9 についても HDR 誘導活性を評価し、同様に HDR 頻度の上昇と NHEJ 頻度の低下が観察できた (図 2)。これらの結果から、DNA との結合様式を変化させた Cas9 改変体が HDR 誘導活性の亢進に有効

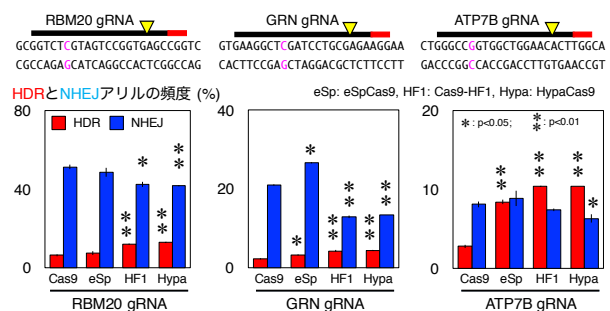


図 2. Cas9 改変体の点変異導入活性

であることが明らかになった。そこで、DNA との結合様式を変化させるその他の変異をこれらの Cas9 改変体に追加し、その活性も評価した。その結果、DNA との結合様式の変化に伴って段階的に HDR 誘導活性向上が認められたが、変化させすぎると全てのゲノム編集活性が失われた。これは、DNA と相互作用するアミノ酸の変異を蓄積しすぎたために、Cas9 が DNA と結合できなくなったためと推測される。つまり、HDR 誘導活性を亢進させるための Cas9-gRNA 複合体と DNA との結合には至適な状態があり、適切な変異を導入した Cas9 改変体によるゲノム編集が理想であることが明らかとなった。しかし、標的遺伝子や gRNA 配列によってもその至適な改変体が異なって

いたため、標的配列がもたらすゲノム編集結果への影響の解明が今後の課題である。一方、これら Cas9 改変体と同一の変異を持つ Cas9 nickase の活性も検討したが、顕著な HDR 誘導活性の亢進は認められなかった。

また、約 4.2 kbp の EGFP と Puromycin 耐性遺伝子の発現カセットのノックイン効率の定量も行ったところ、点変異導入の場合と同様に Cas9 改変体で高い HDR 誘導活性が認められた。長い DNA 断片のノックインにおいても、Cas9 改変体が有効であることが示された (図 3)。

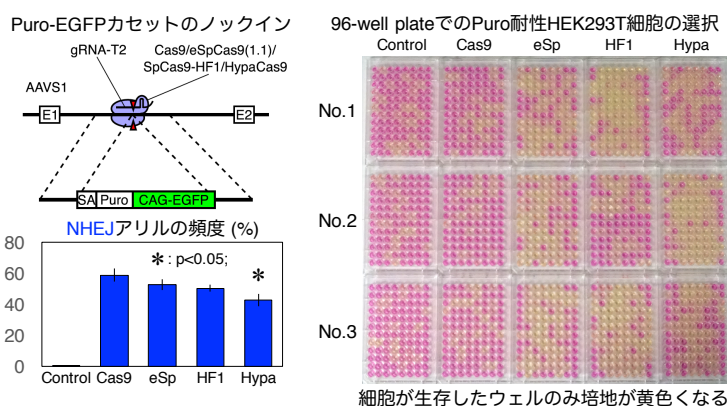


図 3. Cas9 改変体のノックイン誘導活性

⑤ Cas9 改変体と過剰なヌクレオチドを付加した gRNA を組み合わせると活性が失われる

eSpCas9 および Cas9-HF1 と、過剰なヌクレオチドを付加した gRNA を組み合わせ、3 種類の点変異導入を試みたところ、ゲノム編集活性がほぼ失われることが明らかとなった。これは、Cas9 と gRNA の双方から DNA 結合様式を改変することによって、その加算された影響が大きすぎ、Cas9-gRNA 複合体が DNA に結合できなくなったためと推測された。これは、④で得られた HDR 誘導活性亢進のために、Cas9-gRNA 複合体と DNA に至適な結合様式が存在するという結論と合致する。

(2) HeLa 細胞およびヒト iPS 細胞でも Cas9 改変体が高い HDR 誘導活性を示した

① HeLa 細胞における 3 種類の点変異導入でも Cas9 改変体が高い HDR 誘導活性を示した

HeLa 細胞において Cas9 は、HEK293T 細胞と比較して圧倒的に低い HDR 誘導活性を示した。しかしそれでも、HeLa 細胞における点変異導入において Cas9 改変体が、通常の Cas9 よりも高い HDR 誘導活性を示した。この結果から、Cas9 改変体による HDR 誘導活性の向上は細胞種にかかわらず、一般的なものであることが示唆された。

② ヒト iPS 細胞における DNA 断片のノックインでも Cas9 改変体が高い HDR 誘導活性を示した

HEK293T 細胞の場合と同様に、ヒト iPS 細胞でも約 4.2 kbp の EGFP と Puromycin 耐性遺伝子の発現カセットのノックイン効率の定量を行った。HEK293T 細胞で最も高い効率を示した HypaCas9 と通常の Cas9 を比較したところ、ヒト iPS 細胞でも HypaCas9 を用いた場合の方が、HDR によるノックイン効率が高かった。

(3) Cas9-gRNA 複合体と DNA の結合様式の改変が HDR 誘導を亢進する

本研究から、DNA との相互作用に関与するアミノ酸に変異を加えた Cas9 改変体や、長さを調節した gRNA を用いることによって、一塩基置換の導入や長い DNA 断片をノックインする際の HDR 誘導活性を、通常の Cas9-gRNA 複合体よりも高めることが可能であることが示された。さらに、その改変には至適な強度があり、過剰な改変はむしろゲノム編集活性そのものを失ってしまうことも示された。

近年、DNA を切断せずに塩基のみを置換してゲノムを編集する塩基置換技術なども発展しているが、これらの新たな技術においても DNA と Cas9-gRNA 複合体の結合様式が重要な役割を果たしている可能性がある。本研究の成果を、NHEJ によるランダムな欠失や挿入を伴わずに、HDR による組換えだけを誘導できる技術の開発につなげていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 宮岡 佑一郎 | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 一塩基置換による疾患モデル細胞作製 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 月刊「細胞」 | 6. 最初と最後の頁 17-20 |
| 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 Kato-Inui Tomoko, Takahashi Gou, Hsu Szuyin, Miyaoka Yuichiro | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 4677 ~ 4688 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky264 | 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 Miyaoka Yuichiro, Mayerl Steven J., Chan Amanda H., Conklin Bruce R. | 4. 巻 1768 |
| 2. 論文標題 Detection and Quantification of HDR and NHEJ Induced by Genome Editing at Endogenous Gene Loci Using Droplet Digital PCR | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 349 ~ 362 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7778-9_20 | 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 該当する |
| 1. 著者名 宮岡 佑一郎 | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 一塩基置換をもつヒトiPS細胞の単離 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 実験医学 2017年6月号 | 6. 最初と最後の頁 1487-1493 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuichiro Miyaoka |
| 2. 発表標題 Genome Editing in Human iPS Cells to Cure and Study Disease |
| 3. 学会等名 The 4th TransMed-VN Conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Gou Takahashi, Hideto Mori, Soh Ishiguro, Nozomu Yachie, Yuichiro Miyaoka |
| 2. 発表標題 Precise Deletion Mutagenesis by Dual Cas12a DNA Cleavage |
| 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 Yuichiro Miyaoka, Kenneth Tan, Elena Matsa, Steven Mayerl, Amanda Chan, Vanessa Herrera, Aishwarya Kulkarni, Meenakshi Venkatasubramanian, Kashish Chetal, Han Sun, Francesca Briganti, Wu Wei, Saji Oommen, Daniel Carlson, Timothy Nelson, Lars Steinmetz, Jay Schneider, Bruce Conklin, Nathan Salomonis |
| 2. 発表標題 Genome-Edited iPSC and Pig Cardiomyopathy Models Reveal Mutant RBM20 Forms Mislocalized Granules to Dominantly Disrupt Global Splicing |
| 3. 学会等名 ISSCR 2019 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮岡 佑一郎, Kenneth Tan, Elena Matsa, Steven Mayerl, Amanda Chan, Vanessa Herrera, Aishwarya Kulkarni, Meenakshi Venkatasubramanian, Kashish Chetal, Han Sun, Francesca Briganti Francesca, Wu Wei, Saji Oommen, Daniel Carlson, Timothy Nelson, Lars Steinmetz, Jay Schneider, Bruce Conklin, Nathan Salomonis |
| 2. 発表標題 ゲノム編集iPS細胞およびブタを用いたスプライシング因子RBM20の変異による心筋症発症機序の解析 |
| 3. 学会等名 第4回 日本ゲノム編集学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤-乾 朋子、高橋 剛、許 絲茵、宮岡 佑一郎 |
| 2. 発表標題 CRISPR/Cas9による相同組換え修復（HDR）を介した正確なゲノム編集を促進する条件の探索 |
| 3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoko Kato, Gou Takahashi, Szuyin Hsu, Yuichiro Miyaoka |
| 2. 発表標題 Modified interactions between Cas9/Cas9 D10A nickase and genomic DNA enhances HDR |
| 3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory, Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution Meeting 2018（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤-乾 朋子、高橋 剛、許 絲茵、宮岡 佑一郎 |
| 2. 発表標題 Cas9-DNA相互作用の改変によるゲノム編集の正確性向上は同時にHDR誘導活性も高める |
| 3. 学会等名 第3回 日本ゲノム編集学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤-乾 朋子、高橋 剛、許 絲茵、宮岡 佑一郎 |
| 2. 発表標題 Cas9とDNAの結合力が HDRとNHEJの活性を規定する |
| 3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第2回大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮岡 佑一郎 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集 -基礎から応用まで- |
| 3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会 合同年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tomoko Kato, Gou Takahashi, Szuyin Hsu, Yuichiro Miyaoka |
| 2. 発表標題 Binding Affinity of Cas9 to DNA Determines Its HDR and NHEJ Activities |
| 3. 学会等名 CSHL Meeting Genome Engineering: The CRISPR-Cas Revolution (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 宮岡 佑一郎 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 日刊工業新聞社 | 5. 総ページ数 160 |
| 3. 書名 今日からモノ知りシリーズ トコトンやさしいゲノム編集の本 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>公益財団法人 東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト 宮岡研究室 https://www.igakuken-regmed.com/ 未来を話そう！プロジェクト研究の紹介 再生医療プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/to-pro22.html</p> |
|--|

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