

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15054

研究課題名（和文）遺伝子治療を可能とするCRISPR/Cpf1による正確な欠失変異導入法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a precise deletion mutagenesis method using CRISPR/Cpf1 to enable gene therapy

研究代表者

高橋 剛 (TAKAHASHI, Gou)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・研究員

研究者番号：70802817

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）：本研究は、CRISPR-Cas12a (Cpf1) を用いて同一染色体上の2ヶ所を切断することにより、高精度かつ高正確性をもつ欠失変異導入法を確立することを目的とした。代表者は、Cas12aでのダブルカットをアンプリコンシーケンスによって解析することで、2つのガイドRNAが欠失するフラグメントの内側に結合する配置の場合において、正確な欠失が生じる割合が高まる傾向があることを見出した。さらに、より簡便かつ定量的に欠失導入を検出するため、デジタルPCRによる解析系を樹立し、hHPRT1やジストロフィン遺伝子において導入された欠失を定量的に検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、ゲノム編集ツールの一つであるCas12aを利用して、ヒトゲノムに正確な欠失を導入することが可能であることが示唆された。高精度なゲノムへの欠失導入は、正確な遺伝子機能を解析できるほか、筋ジストロフィー症の遺伝子治療法であるエキソスキッピングにも応用が期待される。一方で、遺伝子治療へCas12の欠失導入を応用するには、さらなる精度向上や実験動物を利用した検証が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to establish a precise deletion mutagenesis method by using CRISPR-Cas12a (Cpf1) to cleave two locations on a same chromosome. By amplicon sequencing to double cuts with Cas12a, I found that the percentage of precise deletions tended to be higher when the two guide RNAs were arranged to join inside a fragment to be deleted. Furthermore, in order to more easily and quantitatively detect the deletions, I established a digital PCR-based analysis system and succeeded in quantitatively detecting the deletions in hHPRT1 and dystrophin genes.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：CRISPR/Cpf1 CRISPR-Cas12a 欠失変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

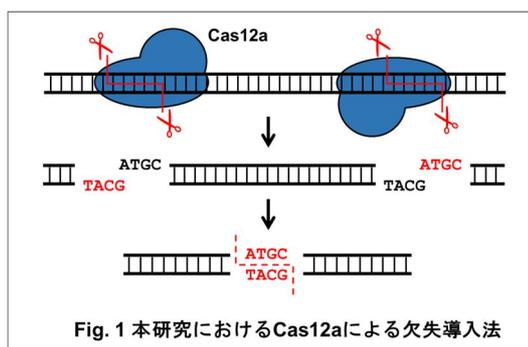
### 1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cpf1 (CRISPR-Cas12a\*) は、CRISPR/Cas9 系と同じく配列特異的な guide RNA (gRNA) とヌクレアーゼ活性のある Cas12 タンパクによって標的 DNA における二本鎖切断 (Double strand break; DSB) を生じさせ、細胞内在性 DNA 修復機構である HDR または NHEJ を誘導することでゲノムを編集する (Zetsche, Cell 2015)。HDR はドナー DNA との組換え (遺伝子ノックイン) によって低頻度に正確な編集を可能とする。一方で NHEJ による修復機構は、HDR より圧倒的に強い活性をもつが、頻繁にランダムな塩基の挿入/欠失 (indel) を伴いながら切断された DNA の両端を結合するため、予測困難な編集となる。先行研究から、Cas12a は Cas9 系よりも標的 DNA に対する特異性が高いことに加え、切断部に平滑末端を作り出す Cas9 系とは異なり、標的 DNA に 5' 突出末端を形成できることが判明しており、これらの特徴を利用した高精度なゲノム編集法の開発が期待されている。現在、キロベース以上の長さの欠失導入には、Cas9 系を始めとしたゲノム編集ツールによって、同一染色体上の 2ヶ所切断し結合させる方法がある。しかしながら、抜け落ちたフラグメントの逆位挿入や転座・重複、欠失距離が大きい場合の導入効率の大幅な低下という問題がある。さらに、結合部に indel 変異が挿入されると一塩基単位での欠失変異導入の再現は極めて困難となる。また、ドナー DNA を利用した HDR を介する欠失変異の導入も原理的には可能であるが、HDR が NHEJ に比べて極めて低頻度な機構であるため、容易には目的とする変異は得られず、さらにドナー DNA が染色体上にランダムに挿入される可能性もある。したがって現在、効率良く安定的な一塩基レベルの再現性を持つ欠失導入の技術は確立されておらず、特に医療などへの応用に向けて大きな障壁となっている。

\*2022 年現在、Cpf1 は Cas12a という名称が主流化した為、本報告書においても Cas12a という表記で統一する。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、Cas12a の持つ突出末端の形成能に着目して、切断後の突出末端が相補的になる 2つの標的を選ぶことで、末端同士が結合する一塩基単位の正確性を持つ欠失変異の導入法を考案した (Fig.1)。この Cas12a ダブルカットは、低頻度にはかき生じない HDR を介さず、強い活性をもつ NHEJ による DNA 修復によって欠失後の末端を高頻度に正確に結合させることで、正確な欠失を導入できると期待される。本研究の欠失変異導入法は、遺伝子機能、発現調節配列、遺伝子クラスター、lncRNA などの解析に利用でき、さらに遺伝子治療としてエクソン・スキップ治療などへの応用が期待できる。



### 3. 研究の方法

#### (1) HEK293T 細胞の Cas12a ダブルカットによる欠失導入実験

本研究ではまず、Cas12a ダブルカットによって実際に欠失導入が可能であることをテストするため、HEK293T 細胞での欠失導入実験を行った。ヒト *HPRT1* 遺伝子およびジストロフィン遺伝子 (*DMD*) にそれぞれ、4-kb と 288-kb の欠失を導入するようにガイド RNA を設計し、Cas12a とガイド RNA を共発現するプラスミド DNA を細胞へと導入し、その後ゲノム DNA の解析を実施した。

#### (2) デジタル PCR による解析系の構築

欠失変異の導入効率と末端結合の正確性を高精度かつ迅速に定量可能な droplet digital PCR (ddPCR) による解析系を構築する。ddPCR 技術は、各アリルの増幅反応を、ゲノム DNA を数コピーしか含まない極小の油滴の中に分割するため、低頻度の欠失変異でも高精度な定量解析が可能である。そこで本研究では、正確な欠失と不正確な欠失を同時に検出可能なプローブセットをデザインし、欠失導入後のゲノム DNA の解析を実施した。

#### (3) アンプリコンシーケンスによる欠失導入後の配列解析

Cas12a を利用したダブルカットによる欠失導入法を特徴づけるため、アンプリコンシーケンスによる詳細な解析を進めた。まず、*DMD* 遺伝子ならびにタイチン (*TTN*) 遺伝子上に複数のダブルカット用ガイド RNA をデザインした。このガイド RNA ペアは、それぞれが近い距離 (100-200bp 以内) に設置されており、欠失が導入されなかった場合でも、アンプリコンシーケンスによる解析が可能となっており、欠失導入率についても解析できる。さらに、Cas12a ダブルカットに使用するガイド RNA ペアが DNA に結合する配向の影響を検討するため、3種の配向となるようガイド RNA ペアをデザインし、欠失導入を実施した。

(4) ランダム化配列ライブラリによる再現性かつ正確性のある突出末端の組み合わせの検証

(3)の結果より、Cas12a ダブルカットによる欠失導入においては、配向が正確性に影響することが明らかとされた。代表者は、この解析を通じて突出配列のパターンも結合部の配列決定に寄与している可能性を見出した。したがって、すべての突出配列同士の結合の組み合わせを解析すれば、結合部の配列を予測できると考えた。ダブルカットによって形成される突出配列がランダムとなる人工標的配列をもつレンチウイルスライブラリを作製し、このライブラリ上で実際にダブルカットを生じさせ、欠失導入後のどのような配列となったかを検証した。まず、ドキシサイクリン誘導的に Cas12a を発現する HEK293 細胞を樹立し、この細胞へとライブラリを含むウイルス粒子を感染させた。最終的に、ドキシサイクリン添加・非添加の区に細胞を分けて解析を行うことで、編集の前後の配列を検出し、配列変化を追跡できるようにした。この解析によって、欠失導入前と後の配列を比較することで、再現性のある突出末端の決定を試みた。

4. 研究成果

(1) Cas12a ダブルカットによって、ヒトゲノムへの欠失導入が可能である

Cas12 ダブルカットによって期待される正確な欠失導入が可能であるかをテストするため、*HPRT1* 遺伝子にガイド RNA を設計し、HEK293T 細胞で欠失導入を実施した。その結果、期待された正確な末端結合を伴った約 4-kb の欠失を検出することができた (Fig. 2A)。同様に、ヒト筋ジストロフィー症の原因遺伝子として知られる *DMD* 遺伝子に対して、さらに大きな欠失 288-kb の欠失導入実験を実施した。この欠失導入は、*DMD* のエクソン 44 と 45 を削除するようにデザインされており、ヒト筋ジストロフィー症におけるエクソンスキッピングを模している。この実験においても、正確な欠失配列が検出された (Fig. 2B)。以上の結果から、Cas12a ダブルカットによって期待通りの正確な欠失導入が可能であることが明らかとなった。さらに、*DMD* 遺伝子における欠失導入の結果から、エクソンスキッピングへの応用の可能性についても示唆された。

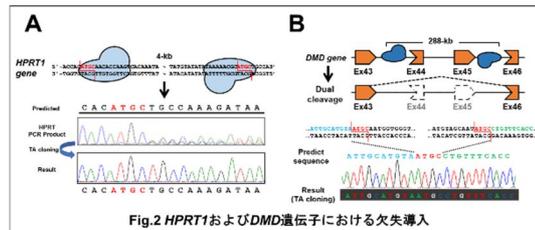


Fig. 2 *HPRT1* および *DMD* 遺伝子における欠失導入

(2) Cas12a ダブルカットによる欠失導入を ddPCR は高感度に検出できる

Cas12a ダブルカットによる *HPRT1* および *DMD* 遺伝子での欠失導入によって、正確な欠失導入が可能であることが判明した一方で、結合部に期待とは異なる不正確な配列が導入されることも明らかとなった。そこで、ddPCR によって欠失導入率と正確性を測定するためのプローブセットを設計し、*DMD* 遺伝子における欠失導入を測定した (Fig. 3A)。その結果、設計されたプローブセットで、正確な欠失と不正確な欠失を検出することに成功した。*DMD* 遺伝子における欠失の導入率は約 1.5% であり、そのうち 38.1% が正確で 61.9% は不正確な欠失導入であることが明らかとなった。さらに、本解析方法は、Cas12a のみならず既存の Cas9 系などにも応用でき、成果の一部は共同研究として論文として報告された (HL Watry, Sci Rep, 2020)。

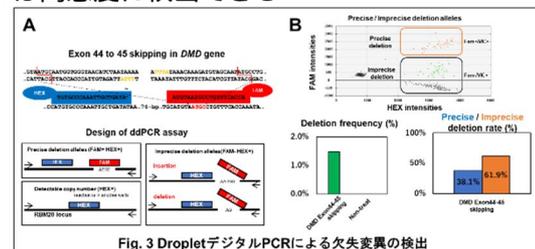


Fig. 3 Droplet デジタル PCR による欠失変異の検出

(3) Cas12a ダブルカットの正確性は、ガイド RNA ペアの配向が重要である

Cas12a ダブルカットによる欠失導入を特徴づけるため、3 種の配向をもつガイド RNA ペアでの欠失導入実験を実施した (Fig. 4A)。それぞれの配向ごとに、正確および不正確な欠失導入割合をカウントしたところ、正確な欠失導入はガイド RNA が欠失するフラグメントの内側にあるときのみ高頻度に生じることが明らかとなった (Fig. 4B)。この配向以外では、ほとんど正確な欠失は生じていなかったが、欠失導入率については 3 種の配向で有意な差は認められなかった。そこで、ガイド RNA が同一方向ならびに欠失するフラグメントの外側に配置されているケースについて詳細に解析を行ったところ、これらの配向のダブルカットにおいては、欠失導入後にガイド RNA の標的配列が残存することで、Cas12a による再切断が生じていることが示唆された。この再切断は、ガイド RNA が標的配列を認識できなくなるまで繰り返されると考えられ、再切断に伴う DNA 修復によって欠失や挿入が蓄積していくことで、不正確な欠失導入となることが推測された。以上の結果から、Cas12a ダブルカットによる欠失導入にはガイド RNA の配向が重要であると結論づけた。

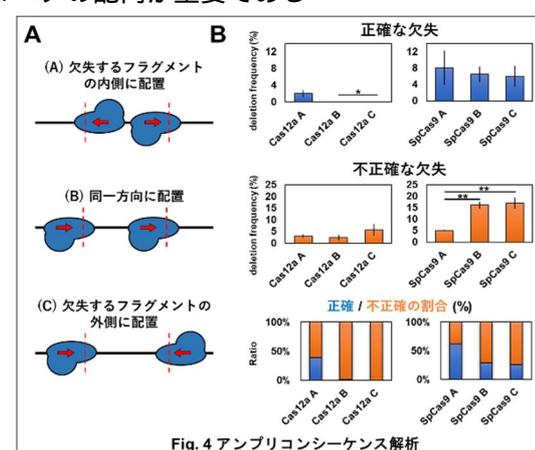


Fig. 4 アンプリコンシーケンス解析

#### (4) ランダム化配列ライブラリにより正確性の検証

Cas12a ダブルカットを効率良く生じさせるため、ドキシサイクリン (DOX) 誘導的に Cas12a を発現する HEK293T 細胞を樹立した (iCas12a 細胞) (Fig. 5A)。次に、突出末端配列がランダムとなるよう設計された人工標的配列を合成し、これらの DNA ライブラリからレンチウイルスライブラリを作製した。このウイルスライブラリを iCas12a 細胞へと感染させることで、DOX 存在下で Cas12a を発現して、人工標的配列上で欠失を生じさせる (Fig. 5B)。欠失導入後の配列は、DNA バーコードによって追跡できるよう設計されており、誘導させる前と後で配列変化を確認できるようデザインされている。

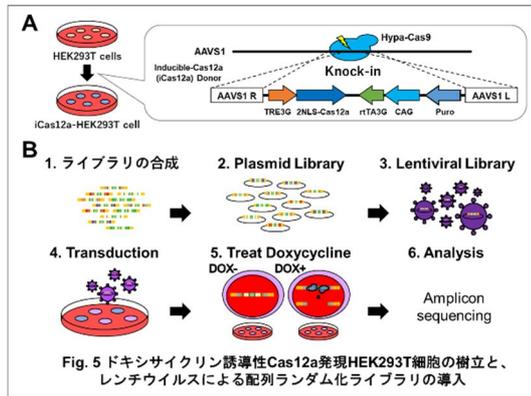


Fig. 5 ドキシサイクリン誘導性Cas12a発現HEK293T細胞の樹立と、レンチウイルスによる配列ランダム化ライブラリの導入

はじめに、パイロット実験として、4塩基突出末端が相補的 (Complementary) なライブラリと非相補的 (Non-Complementary) なライブラリを使用して実験を実施した。その結果、4塩基突出が相補的なライブラリを導入した細胞において、DOX 添加区ではライブラリの約 90% で編集が生じ、不正確な欠失は約 85% であり、正確な欠失は約 5% に生じていた (Fig. 6A)。さらに、欠失導入の結合部に生じた塩基数をカウントしたところ、4塩基で結合した配列のうち、89% は相補末端が1塩基の誤りもなく結合していることが明らかとなった (Fig. 6B)。一方で、結合部の配列長がどのように分布しているのかを解析したところ、4塩基突出末端が相補のライブラリにおいては、欠失導入の結合部には 4-bp の結合が高頻度に観察されたが、非相補のライブラリでは 5 から 9-bp の結合が分布していた (Fig. 6C)。以上のことから、突出末端の相補性は結合部の正確性に強力に作用していることが示唆された。

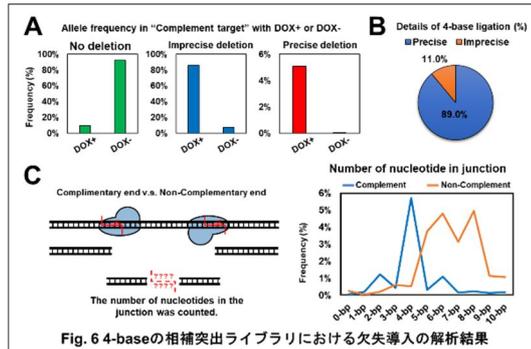


Fig. 6 4-baseの相補突出ライブラリにおける欠失導入の解析結果

最後に、ランダム化配列ライブラリにおける欠失導入をテストした。その結果、4塩基の突出末端2つをランダム化した組み合わせである 65,536 パターンが検出され、期待されていた欠失導入も DOX 誘導的に生じさせることに成功した。しかし一方で、DNA バーコードのエラーによって、編集前後の変化を追跡することが困難な例が散見された。研究期間内に、最終的な解析までは至らなかったものの、ランダム化ライブラリを利用した実験と解析について、多くの知見が得られた。

#### (5) まとめ

本研究によって、Cas12a ダブルカットで標的ゲノム配列に狙い通りの正確な欠失を導入できることが示された。さらに、この欠失導入をデジタル PCR で高感度に検出する系を樹立した。また、ガイド RNA ペアの配向が、Cas12a ダブルカットにおける欠失導入の正確性に強く影響することを明らかとした。一方で、ランダム化配列ライブラリにおける解析が不十分であるため、今後さらに研究を進め、不正確な欠失導入をコントロールできる条件について明らかとしたい。

#### <引用文献>

1. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-71.
2. Rapid, precise quantification of large DNA excisions and inversions by ddPCR. Watry HL, Feliciano CM, Gjoni K, Takahashi Gou, Miyaoka Y, Conklin BR, Judge LM. Sci Rep. 2020 Sep 10;10(1):14896.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Watry Hannah L., Feliciano Carissa M., Gjoni Ketrin, Takahashi Gou, Miyaoka Yuichiro, Conklin Bruce R., Judge Luke M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid, precise quantification of large DNA excisions and inversions by ddPCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71742-z	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋剛
2. 発表標題 CRISPR-Cas12aによる欠失変異導入のプロファイリング
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋剛
2. 発表標題 CRISPR-Cas12aによる正確な欠失変異導入
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所  
<http://www.igakuken.or.jp/>

研究室ホームページ  
<https://www.igakuken-regmed.com/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------