

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21409

研究課題名(和文)医療応用を目指すゲノム編集結果の1細胞解析

研究課題名(英文)Single-cell level analysis of genome editing outcomes for medical applications

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・疾患制御研究分野・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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Casによるゲノム編集は、科学、医学、農業などの分野に革命をもたらした。しかし、ゲノム編集結果は細胞集団でしか解析されておらず、1細胞中での解析が正確なゲノム編集の影響の評価に重要である。そのため、我々はヒト細胞のクローンを効率的に単離する手法を開発し、合計で2,600個以上のクローンに起きたゲノム編集結果を解析した。その結果、各細胞においてゲノム編集は全く起こらないか、もしくは全ての標的配列に起きるかの二者択一性を持つことが明らかとなった。挿入・欠失の誘導だけでなく、組換えによるゲノム編集でも同様の二者択一性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あらゆる細胞の遺伝情報の改変を可能にするゲノム編集は、様々な分野に革命をもたらしている。しかし、これまでのゲノム編集結果解析手法は、細胞を集団として扱うことしかできず、細胞1つ1つに何が起きたかを知ることは難しかった。そこで我々は、細胞1つ1つを単離し、そこから増えてきた細胞を解析し、各細胞に起きたゲノム編集結果を明らかにした。その結果、全くゲノム編集が起こらない細胞が多く観察された。一方で、編集が起きた細胞では編集される遺伝子が全て編集されている場合が多かった。このように、ゲノム編集が全く起こらないか、起きるのであれば全ての標的遺伝子が編集される、という二者択一性を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genome editing by CRISPR-Cas has already revolutionized science, medicine, agriculture, and other fields. However, genome editing outcomes have only been analyzed in cell populations but not in single cells. An understanding of editing outcomes in single cells would lead to precise estimation of the effects of genome editing, and enhance its applications. For this purpose, we developed an efficient method to isolate genome edited cultured human cell clones using a specialized device for single cell dispensation. This allowed us to analyze more than 2,600 clones. We found strong binarity in the induction of genome editing (i.e., individual cells tend to undergo either full editing in all target alleles, or no editing at all even when the CRISPR components were expressed). Moreover, the induction of homologous recombination also tends to be binary to produce cells fully edited by recombination.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 HDR NHEJ Cas9 HypaCas9 1細胞 SPiS

1. 研究開始当初の背景

CRISPR-Cas9 は、ゲノム中の編集したい DNA 配列を切断し、細胞の DNA 修復反応を起こす。この反応には、切断部位に配列相同性のある鋳型 DNA との相同組換え (HDR) と、DNA 末端同士を結合させる非相同末端結合 (NHEJ) がある (図 1)。HDR では鋳型 DNA の配列通りの正確な編集が起きるが、NHEJ ではランダムな挿入・欠失が導入される。ゲノム編集を誘導すると、例え HDR を意図したものであっても、様々な形の NHEJ を伴い、ゲノム編集結果は均一なものにはならない。1 細胞で起きる HDR と NHEJ の組合せと頻度の正確な把握は、ゲノム編集の医療応用に向け克服すべき課題である。しかし、従来の解析手法は細胞集団を扱ってきており、各細胞で起こるゲノム編集結果を明らかにすることができない。

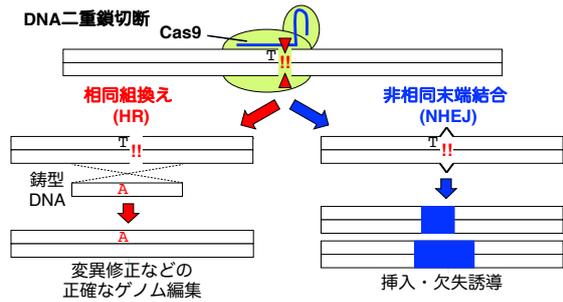


図 1. HDR と NHEJ によるゲノム編集

これは 1 細胞ゲノミクスが、1 細胞トランスクリプトミクスに比較して、立ち遅れていることが一因である。標準的な哺乳類細胞 1 個あたり、mRNA は 10^5 - 10^7 分子存在するが、ゲノム DNA はわずか 2 分子しか存在せず、その配列解析は技術的に困難なためである。我々は、2011 年より iPS 細胞のゲノム編集を進めてきたが、目的の HDR が起きて、もう片方のアリルが NHEJ で破壊されてしまうことが非常に多く (図 2)、1 細胞ゲノム編集結果解析の必要性を常に感じてきた。

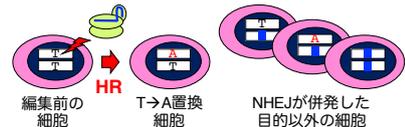


図 2. HDR に併発する NHEJ

2. 研究の目的

本研究は、ゲノム編集結果を 1 細胞レベルで明らかにすることを目的とした。そのために、ゲノムを編集した個々の細胞をクローン化して、HDR と NHEJ が各細胞に起きる頻度と組み合わせを解明した。

3. 研究の方法

[概要]

細胞をクローン化する手法として、限界希釈法は多数のクローンを得るためには非効率であり、フローサイトメトリーによる単離では、生存率が低い。そこで本研究では、Single Particle isolation System (SPiS, オンチップバイオテクノロジー) を活用した。SPiS は、自動で細胞懸濁液をマイクロチップで分取し、その内容物をカメラで 2 回撮影して画像解析を行い、1 細胞の存在の確認後に培養プレートに播種する。SPiS によって得られたクローンからゲノム DNA を抽出し、ゲノム編集の標的領域を PCR により増幅し、amplicon sequencing を行って編集結果を解析した。PCR に各クローンを識別するためのバーコード配列を持つプライマーを用いることで、クローンごとのゲノム編集結果を同定した (図 3)。

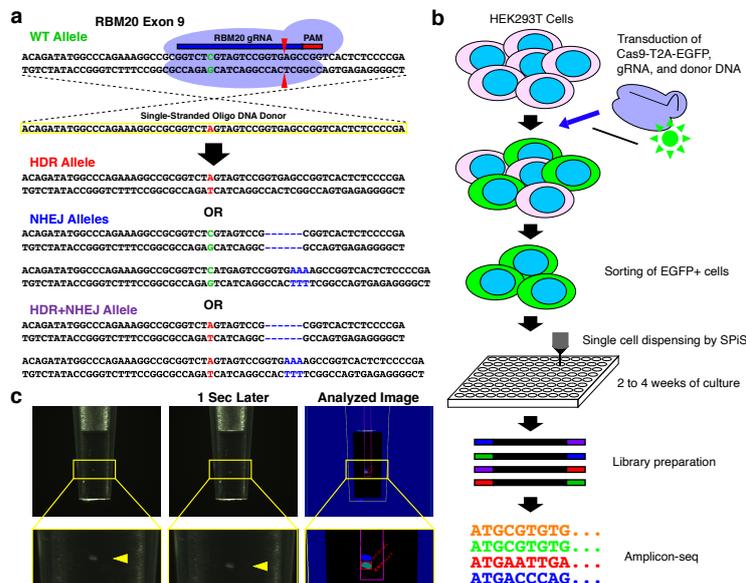


図 3. 実験のデザイン

a. RBM20 R636S 変異導入の設計。b. 実験の流れ。細胞にドナー DNA と T2A ペプチドで EGFP と連結した Cas9 を導入し、EGFP 陽性細胞を単離、SPiS でクローンを樹立した。得られたクローンから amplicon sequencing を行った。c. SPiS による 1 細胞播種のための画像解析。SPiS はマイクロチップに細胞を吸引し、1 秒の間隔を置いて画像解析を行い、細胞特有の沈降速度と 1 細胞のみの存在を確認した後に播種する。

(1) SPiS を用いたゲノム編集細胞の1細胞単離と培養の最適化

RBM20 R636S 点変異を、CRISPR-Cas9 により HEK293T 細胞に導入し、2日後に SPiS を用いて細胞を1個ずつ 96-well plate もしくは 384-well plate に播種したところ、96-well plate の方が高い生存率を得たため、以降は 96-well plate を使用した。また、Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (GFR) Phenol Red-Free (BD Bioscience) でプレートをコーティングすることにより、生存率が向上した。さらに、SPiS による細胞播種から1週間後に、一度ウェル中の細胞を剥離し、ウェル中で懸濁して再培養することによって細胞の増殖を促し、ゲノム DNA 抽出の効率が高まることも見出した。以降はこの条件で実験を行った。

(2) Cas9 と HypaCas9 の比較

(1) で確立したクローン単離条件を用いて、HEK293T 細胞において Cas9 もしくは HypaCas9 を用いて RBM20 R636S 変異を導入した。我々は、改変体である HypaCas9 が Cas9 よりも高い HDR 活性を持つことを見出しており (Kato-Inui, Nucleic Acids Res 46:4677 2018)、本研究でも HypaCas9 が各クローンにおいて、より HDR を誘導することを確認した。HDR が1細胞で起きる頻度を解析するために、本研究では以降の実験では全て HypaCas9 を用いた。

(3) HEK293T 細胞、HeLa 細胞、PC9 細胞における1細胞ゲノム編集結果の解析

ヒト細胞における一般性を検討するために、HEK293T 細胞に加えて、HeLa 細胞、PC9 細胞において、RBM20 R636S、ATP7B R778L、GRN R493X の3種類の点変異を、HypaCas9 を用いて導入した。(1) で確立した条件で合計 2,600 個以上のクローンを単離し、標的配列の amplicon sequencing によってゲノム編集結果を明らかにした。全体における、編集されずに残った野生型、HDR、NHEJ の各アリの頻度を計算し、全ての細胞にゲノム編集が完全にランダムに起きたと仮定する数理モデルを導出した。この数理モデルを実際に観察された結果と比較し、ヒト1細胞において HypaCas9 によって起きるゲノム編集結果の傾向を明らかにした。

4. 研究成果

(1) HEK293T 細胞において、HDR および NHEJ は同時多発的に起こる

HEK293T 細胞において、HypaCas9 を用いて RBM20 R636S 変異を導入する実験を3回繰り返した。各クローンにおいて、NHEJ、HDR、HDR と NHEJ の併発 (HDR+NHEJ) アリが生じた割合を amplicon sequencing により明らかにした (図4a)。また、HEK293T 細胞において、RBM20 のコピー数が約 3.5 個であったことから、RBM20 のコピー数が3個であった場合と4個であった場合の、それぞれの数理モデルを構築した (図4b)。モデルと実際の結果を比較したところ、Cas9 や gRNA が発現したにも関わらず一切ゲノム編集が起こらなかったクローンと、全てのアリで NHEJ が起きたクローンが、実際に観察された結果において優位に多いことが明らかとなった (図4c)。また、全てのアリに HDR あるいは HDR+NHEJ が起きたクローンも観察され、ゲノム編集は同時多発的に起きるか、全く起きないかの二者択一性を持つことが示された。

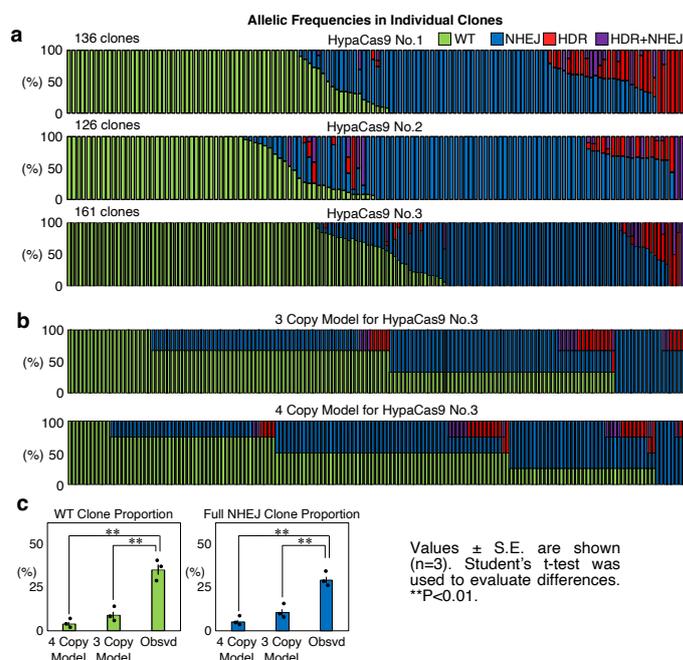


図4. HEK293T 細胞における RBM20 R636S 変異導入の1細胞解析結果

a. HypaCas9 を用いて変異導入を行った結果。列が1クローンを表し、各クローンが有する野生型 (緑)、NHEJ (青)、HDR (赤)、HDR+NHEJ (紫) アリの頻度を各色で示す。b. 全体に生じたゲノム編集が、各クローンにランダムに生じたと仮定した場合の、想定されるゲノム編集の1細胞解析結果。161クローンが得られた、No.3の場合を示す。c. 実際に観察された結果とモデルにおいて、ゲノム編集が起きずに野生型のまま残ったクローンと、全てのアリに NHEJ が起きたクローンの割合。

(2) ゲノム編集の同時多発性は他の遺伝子でも観察される

ゲノム編集の同時多発性の一般性を検討するために、RBM20 R636S 変異に加えて、ATP7B R778L、GRN R493X 変異を、HEK293T 細胞において HypaCas9 を用いて導入した。その結果、RBM20 での観察と同様に、ゲノム編集が起こらずに野生型のまま残る細胞と、全ての標的配列にゲノム編集が起きる細胞の割合が高いことが明らかとなった (図5a-d)。

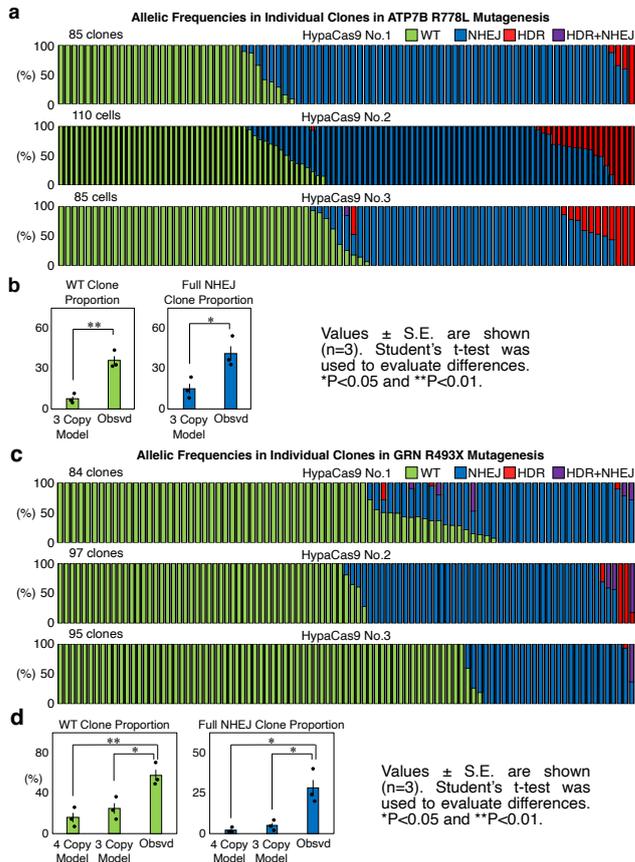


図5. HEK293T細胞におけるATP7B R778LおよびGRN R493X変異導入の1細胞解析結果
 a. HypaCas9を用いてATP7B R778L変異導入を行った結果。b. 実際に観察された結果とモデルにおいて、ゲノム編集が起きずに野生型のまま残ったクローンと、全てのアリルにNHEJが起きたクローンの割合。c. HypaCas9を用いてGRN R493X変異導入を行った結果。b. 実際に観察された結果とモデルにおいて、ゲノム編集が起きずに野生型のまま残ったクローンと、全てのアリルにNHEJが起きたクローンの割合。

(3) ゲノム編集の同時多発性は程度の違いはあるが他の細胞種でも観察される
 ゲノム編集の同時多発性の一般性を検討するため、HeLa細胞、PC9細胞においても、同様にHyPaCas9を用いて変異の導入を行った。その結果、PC9ではややその傾向は弱いものの、HDR、NHEJともに同時多発的に誘導されることが明らかとなった(図6 a-c)。これらの結果をbioRxivにて公開し (<https://doi.org/10.1101/2022.03.04.482947>)、現在論文が査読中である。

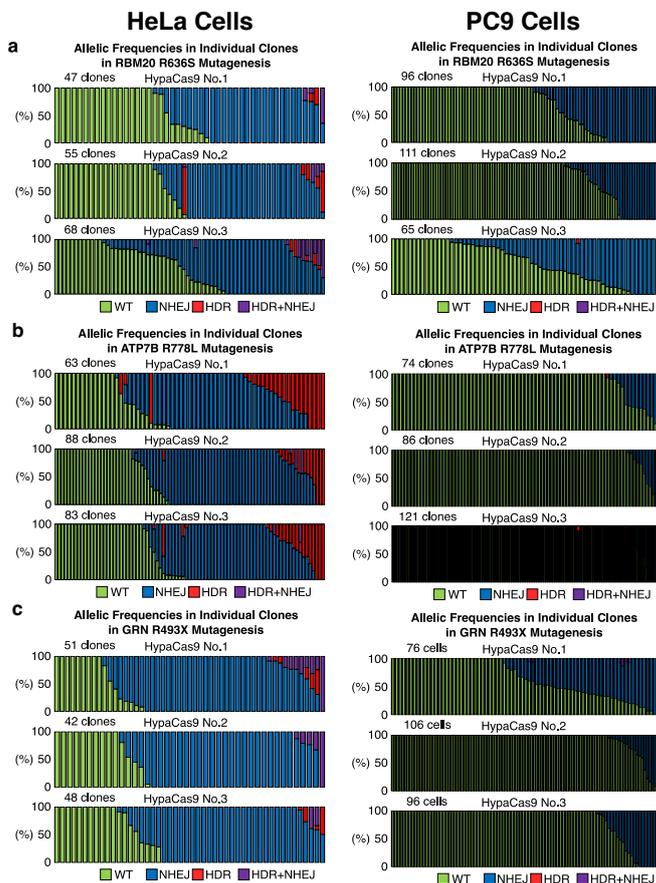


図6. HeLa細胞およびPC9細胞における変異導入の1細胞解析結果
 a. HyPaCas9を用いてRBM20 R636S変異導入を行った結果。b. HyPaCas9を用いてATP7B R778L変異導入を行った結果。c. HyPaCas9を用いてGRN R493X変異導入を行った結果。全て左がHeLa細胞、右がPC9細胞の結果である。PC9細胞では、やや傾向が弱かったものの、いずれの細胞においても野生型のまま残る細胞と、全てのアリルが編集される細胞が多く生じ、ゲノム編集の同時多発性が確認された。

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Gou, Kondo Daiki, Maeda Minato, Morishita Yuji, Miyaoka Yuichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome Editing Is Induced in a Binary Manner in Single Human Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2022.03.04.482947	査読の有無 無
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 Fenix AM, Miyaoka Y, Bertero A, Blue SM, Spindler MJ, Tan KKB, Perez-Bermejo JA, Chan AH, Mayerl SJ, Nguyen TD, Russell CR, Lizarraga PP, Truong A, So PL, Kulkarni A, Chetal K, Sathe S, Sniadecki NJ, Yeo GW, Murry CE, Conklin BR, Salomonis N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Gain-of-function cardiomyopathic mutations in RBM20 rewire splicing regulation and re-distribute ribonucleoprotein granules within processing bodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26623-y	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
1. 著者名 中島 一徹、宮岡 佑一郎	4. 巻 76
2. 論文標題 CRISPR-Cas9とその医療応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 437-442
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 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11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮岡 佑一郎
2. 発表標題 iPS細胞でのゲノム編集技術応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dan Song, Gou Takahashi, Yun-Wen Zheng, Mami Matsuo-Takasaki, Jingyue Li, Miho Takami, Yuri An, Yasuko Hemmi, Natsumi Miharada, Tsuyoshi Fujioka, Michiya Noguchi, Takashi Nakajima, Megumu K Saito, Yukio Nakamura, Tatsuya Oda, Yuichiro Miyaoka, Yohei Hayashi
2. 発表標題 Retinoids rescue ceruloplasmin secretion and alleviate oxidative stress in steatosis models of Wilson's disease-specific hepatocytes.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor-Asia, Liver Development, Metabolism, Disease & Cancer Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 大輝、高橋 剛、森下 祐至、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 On-chip SPiSによる1細胞レベルゲノム編集結果解析
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 近藤 大輝、高橋 剛、森下 祐至、前田 湊、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 CRISPR-Cas9によるゲノム編集結果の1細胞レベル解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 朋子、高橋 剛、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 CRISPR-Cas9システムを基盤とした相同組換えによる修復(HDR)亢進因子の新規探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 一徹、月村 考宏、兎川 忠靖、櫻庭 均、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 Immunodeficient Mouse Model of Fabry Disease for Development of New Cell Therapy
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、森 秀人、石黒 宗、谷内江 望、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 Profiling of deletion mutagenesis by CRISPR-Cas12a dual cleavage
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 近藤 大輝、高橋 剛、森下 祐至、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 一細胞内で生じるCRISPR-Cas9によるゲノム編集結果の解析
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 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47回 日本小児栄養消化器肝臓学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤 大輝、高橋 剛、森下 祐至、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 Genome editing outcomes induced by CRISPR/Cas9 in single cells
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 中島 一徹、宮岡 佑一郎
2. 発表標題 Immunodeficient Mouse Model of Fabry Disease for Development of New Cell Therapy
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:96名（分担執筆者：宮岡 佑一郎）、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〕

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 ウェブサイト
<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
---------	---------