

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310149

研究課題名(和文) 高効率ヒトゲノム改変技術の開発と医療創薬応用に向けての安全性検証

研究課題名(英文) Development and applications of high-efficiency gene targeting in human cells

研究代表者

足立 典隆 (ADACHI, NORITAKA)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・教授

研究者番号：30264675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム上の遺伝子を自由自在に改変できるようになれば、生物学全般のみならず、医療や創薬、農畜産等の分野において大きな発展が期待できる。本研究では、遺伝子ターゲティングの効率やベクターの安定性に影響を及ぼす因子の解析を中心に、ヒト細胞において効率的にゲノム改変を行うための汎用的な手法の開発に取り組んだ。特に、遺伝子ターゲティングの障害となるランダム挿入反応を抑制するための方策を多方面から検討した。本研究により、超高効率遺伝子ターゲティング法の開発に直結する貴重な成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We have been developing systems that enable rapid production of human cell lines with the use of plasmid-based DNA vectors. In this research project, we have conducted basic studies aimed at developing ultrahigh-efficiency gene-targeting systems, particularly in terms of controlling random integration, a mechanism that acts to reduce the efficiency of gene targeting.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム改変 ジーンターゲティング ランダム挿入

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上の遺伝子を自由自在に改変できるようになれば、生物学全般のみならず、医療や創薬、農畜産等の分野において大きな発展が期待できる。本研究代表者は長年にわたり動物細胞のゲノム改変、特にヒト細胞のジーンターゲティング(標的遺伝子破壊)の効率化に関する研究を幅広く行ってきた。その代表的な成果の一つに、ヒト pre-B 細胞株 Na1m-6 を使った独自の遺伝子ノックアウトシステムの確立がある。この系により最短期間2ヶ月という短時間でヒト遺伝子変異株を作製することが可能になった。さらに最近、エクソントラップ型のターゲティングベクター(プラスミドを直鎖化した遺伝子改変用ベクター)を用いることにより、Na1m-6 細胞におけるターゲティング効率を最大 100%にまで上昇させることに成功した。これは従来よりも一桁以上高い効率である。しかし、こうしたジーンターゲティング技術を医療創薬の分野に応用していくためには、幹細胞や初代細胞等のヒト正常細胞において Na1m-6 と同レベルの高いターゲティング効率を達成する必要がある。また、効率面だけでなく安全面についても考慮しながら基礎研究を進めていく必要がある。

2. 研究の目的

ヒト細胞において、人工ヌクレアーゼやウイルスベクターを用いずに効率的に遺伝子改変を行うための手法の開発に取り組んだ。特に、上述の目標に向け、ヒト細胞においてランダム挿入体の出現頻度を著しく低下させるための普遍的な手法を見いだすべく、(1)最適なターゲティングベクターの構造、および(2)DNA 修復機構(特に alt-NHEJ)とランダム挿入機構との関連、の2点を明らかにすることに重点を置いた。

3. 研究の方法

さまざまなヒト遺伝子(主に *HPRT* 遺伝子)を標的とするターゲティングベクターをエレクトロポレーション法により Na1m-6 細胞株に導入し、組換え頻度(すなわちランダム挿入頻度と相同組換え挿入頻度)およびターゲティング効率についての定量的なアッセイを行った。ターゲティング効率は、「相同組換え挿入頻度 ÷ (ランダム挿入頻度 + 相同組換え挿入頻度)」により算出した(これらの挿入頻度は細胞の生存率で補正した値を用いた)。siRNA の導入はターゲティングベクターとのコトランスフェクションにより行った。本研究では Na1m-6 細胞の野生株や NHEJ 欠損株、相同組換え変異株を主に使用した。ベクター構造の検討においては、Na1m-6 細胞に加え、ヒト iPS 細胞や HT1080 細胞、マウス ES 細胞等を使用した。ランダム挿入部位のジャンクション解析では逆 PCR 法により DNA 断片を抽出しシーケンズ解析を行った。

4. 研究成果

上述の通り、ターゲティング効率は、「相同組換え挿入頻度 ÷ (ランダム挿入頻度 + 相同組換え挿入頻度)」によって求められる。通常この効率は高くても 0.1~1%であり、これがヒト細胞での遺伝子ターゲティングが困難な最大の要因である(Na1m-6 細胞は例外中の例外)。したがって、ターゲティング効率を上昇させるための有効な戦略の一つは「ランダム挿入頻度を低下させる」ことである。さらに正確に言うなら「ランダム挿入体(である薬剤耐性コロニー)の出現頻度を低下させる」ことができれば結果的に高いターゲティング効率を達成することができる。

我々の以前の研究から、DNA 二本鎖切断修復の主要機構である非同相末端連結(NHEJ)経路を欠損させるとランダム挿入頻度が約半分に低下するが、相同領域の比較的長い(合計 8.9 kb)ターゲティングベクターを用いるとランダム挿入頻度はほとんど低下しない(むしろ上昇する)ことが明らかになっている。このことから、ランダム挿入に関する研究はターゲティングベクターを使って実験を行わなければ全く価値がないことがわかる。また、メカニズムの面からは、ランダム挿入反応を抑制するためには alternative NHEJ (alt-NHEJ) の抑制が鍵を握っていることが強く示唆される。alt-NHEJ は DNA 二本鎖切断修復の第3の機構であり、通常2つの主要機構(相同組換えと NHEJ)によって抑制されていると考えられているが詳細は不明である。

先述したように、エクソントラップ型のターゲティングベクターを用いると、Na1m-6 細胞におけるターゲティング効率は最大 100%にまで上昇する。すなわち、ランダム挿入体(である薬剤耐性コロニー)の出現頻度は通常よりも極めて低い。そこで、この現象を利用して、ターゲティング効率やランダム挿入頻度に影響を与えるシス因子(ベクターの構造や塩基配列)についての解析を行った。その結果、ターゲティングベクター(中の相同領域)が長ければ長いほどターゲティング効率が高くなるが、同時にランダム挿入頻度も高くなってしまふこと、また、5' 相同領域中にエクソンが存在するとランダム挿入頻度が高くなる傾向があることが明らかとなった。次に、トランス因子を探るべく、各種ヒト変異株細胞を用いて DNA 二本鎖切断修復機構との関連を調べたところ、NHEJ を欠損させるとターゲティング効率がさらに上昇すること、一方、意外なことに、相同組換えの主要タンパク質である Rad54 を欠損させても十分に高いターゲティング効率が得られることがわかった。さらに、ランダム挿入部位を網羅的に調べたところ、ヒトゲノム中にくつかのホットスポットが存在することが判明した(特に5番染色体長腕)。すなわち、ランダム挿入というよりはむしろセミランダム挿入と呼ぶべき現象が起こっているこ

とがわかった。さらに驚いたことに、こうしたホットスポットは Rad54 欠損細胞で顕著化していたが、NHEJ 欠損株では全く見られなかった。また、挿入箇所（ジャンクション）におけるベクターの構造を調べたところ、ホットスポットでは挿入反応に伴うベクター末端の削れ（terminal deletion）の程度が小さい傾向があることがわかった。以上の結果から、NHEJ を介したランダム挿入にはホットスポットが存在し、ベクターの terminal deletion が小さめであるのに対し、alt-NHEJ によるランダム挿入では terminal deletion が大きいこと、また、ベクター中の相同領域が長いほど挿入反応が起こりやすくなることが強く示唆された。

ヒト細胞の核には3種類の DNA リガーゼが発現しており、このうちリガーゼ IV は NHEJ に特異的に機能し、必須の役割を果たす。そこで、他の DNA リガーゼ（I および III）の発現抑制により alt-NHEJ を介したランダム挿入が抑制されるかを調べたところ、NHEJ 欠損株だけでなく野生株においても siRNA によるノックダウンの効果が見られた。この結果と我々の先行研究の結果を考え併せると、alt-NHEJ を介したランダム挿入は NHEJ の有無に関わらず自発的に起こっている可能性が高い。したがって、NHEJ と alt-NHEJ を同時に抑制することが今後の研究において重要となるだろう。本研究におけるジャンクション解析の結果から、alt-NHEJ を介したランダム挿入に特定の DNA ポリメラーゼが関与している可能性も示唆されており、近い将来、ランダム挿入頻度を激減させるための手法を開発できるのではないかと期待している。

遺伝子ターゲティングの障害となるランダム挿入の頻度を低下させるためのもう一つのアプローチとして、本研究では、新規負選択マーカーとしての条件的致死遺伝子の効果の検討を行った。この条件的致死遺伝子は（プロモーターをもたない）ジフテリア毒素 A 遺伝子の 5' 上流にスプライスアクセプター部位と IRES 配列を付加したユニットのことであり、このユニットをターゲティングベクター（ただしエクソントラップ型ベクターに限る）の 5' 相同領域の上流に付加しておけばランダム挿入頻度の低下が期待できると考えた。実際、ヒト iPS 細胞や HeLa 細胞において、ランダム挿入頻度が 5~20 倍低下することが確認できた。また、マウス ES 細胞においては、約 50% という高い効率で遺伝子ターゲティングを行うことができた。ヒト HT1080 細胞においてもターゲティング効率が 5 倍以上上昇することがわかった。このように、本研究で開発した新規負選択マーカーがエクソントラップ型ターゲティングベクターの有効性をさらに高めるための汎用的な手法となることが明らかとなった。

以上述べてきたように、本研究により、任意のヒト細胞に適用可能な超高効率遺伝子ターゲティング法の開発に直結する貴重な

成果を数多く得ることができた。近年、TALEN や CRISPR をはじめとする人工ヌクレアーゼが大変な脚光を浴びており、効率面では大きな進展が見られたが、ゲノム改変技術を医療創薬に応用していくための大前提は安全性の確保、すなわちオフターゲット変異を引き起こさないことであることを忘れてはならない。今後、この点に十分留意しながら研究を進めていく必要があるだろう。

5. 主な発表論文等 (下線は研究代表者)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Saito S, Ura K, Kodama M, Adachi N. Construction and applications of exon-trapping gene-targeting vectors with a novel strategy for negative selection. BMC Research Notes, in press.
2. Kanemaru Y, Suzuki T, Niimi N, Gruz P, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Nohmi T. Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase kappa in protection of human cells against genotoxic stresses. Environ Mol Mutagen, in press.
doi: 10.1002/em.21961.
3. Moscariello M, Wieloch R, Kurosawa A, Li F, Adachi N, Mladenov E, Iliakis G. Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining. DNA Repair (Amst). 2015 Jul;31:29-40.
doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.004.
4. Ishii T, Hayakawa H, Sekiguchi T, Adachi N, Sekiguchi M. Role of Auf1 in elimination of oxidatively damaged messenger RNA in human cells. Free Radic Biol Med. 2015 Feb;79:109-16.
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.018.
5. Ishii A, Kurosawa A, Saito S, Adachi N. Analysis of the role of homology arms in gene-targeting vectors in human cells. PLoS One. 2014 Sep 24;9(9):e108236.
doi: 10.1371/journal.pone.0108236.
6. Sassa A, Suzuki T, Kanemaru Y, Niimi N, Fujimoto H, Katafuchi A, Gruz P, Yasui M, Gupta RC, Johnson F, Ohta T, Honma M, Adachi N, Nohmi T. In vivo evidence that phenylalanine 171 acts as a molecular brake for translesion

- DNA synthesis across benzo[a]pyrene DNA adducts by human DNA polymerase kappa. *DNA Repair (Amst)*. 2014 Mar;15:21-8.
doi: 10.1016/j.dnarep.2013.12.008.
7. Adachi N, Saito S, Kurosawa A. Repair of accidental DNA double-strand breaks in the human genome and its relevance to vector DNA integration. *Gene Technology* 2013; 3:e107.
doi: 10.4172/2329-6682.1000e107
 8. Liu S, Liu X, Kamdar RP, Wanotayan R, Sharma MK, Adachi N, Matsumoto Y. C-terminal region of DNA ligase IV drives XRCC4/DNA ligase IV complex to chromatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Sep 20;439(2):173-8.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.068.
 9. Kamekawa H, Kurosawa A, Umehara M, Toyoda E, Adachi N. Endogenous factors causative of spontaneous DNA damage that leads to random integration in human cells. *Gene Technology* 2013; 2:105.
doi: 10.4172/2329-6682.1000105
 10. Adachi N. Generation and use of genetically modified human cell lines: a promising approach for in vitro toxicology studies. *J Clin Toxicol*. 2013;3(5):45.
doi: 10.4172/2161-0495.S1.009
 11. Kurosawa A, Saito S, So S, Hashimoto M, Iwabuchi K, Watabe H, Adachi N. DNA ligase IV and Artemis act cooperatively to suppress homologous recombination in human cells: Implications for DNA double-strand break repair. *PLoS One*. 2013 Aug 14;8(8):e72253.
doi: 10.1371/journal.pone.0072253.
 12. Suzuki T, Ukai A, Honma M, Adachi N, Nohmi T. Restoration of mismatch repair functions in human cell line Nalm-6, which has high efficiency for gene targeting. *PLoS One*. 2013 Apr 15;8(4):e61189.
doi: 10.1371/journal.pone.0061189.
 13. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, Hirota K. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. *PLoS One*. 2013;8(4):e60043.
doi: 10.1371/journal.pone.0060043.
 14. Cui X, Lu Z, Kurosawa A, Klemm L, Bagshaw A, Tsai A, Gemmell N, Muschen M, Adachi N, Hsieh CL, Lieber MR. Both CpG methylation and AID are required for the fragility of the human Bcl-2 major breakpoint region: Implications for the timing of the breaks in the t(14;18). *Mol Cell Biol*. 2013 Mar;33(5):947-57.
doi: 10.1128/MCB.01436-12.
 15. Cowell IG, Sondka Z, Smith K, Lee KC, Manville CM, Sidorczuk-Lesthurige M, Rance HA, Padgett K, Jackson GH, Adachi N, Austin CA. Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase IIbeta mediated DNA strand breaks and gene proximity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 5;109(23):8989-94.
doi: 10.1073/pnas.1204406109.
 16. Malu S, De Ioannes P, Kozlov M, Greene M, Francis D, Hanna M, Pena J, Escalante CR, Kurosawa A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Adachi N, Vezzoni P, Villa A, Aggarwal AK, Cortes P. Artemis C-terminal region facilitates efficient V(D)J recombination through its interaction with both DNA Ligase IV and DNA-PKcs. *J Exp Med*. 2012 May 7;209(5):955-63.
doi: 10.1084/jem.20111437.
 17. Kohzaki M, Chiourea M, Versini G, Adachi N, Takeda S, Gagos S, Halazonetis TD. The helicase domain and C-terminus of human RecQL4 facilitate replication elongation on DNA templates damaged by ionizing radiation. *Carcinogenesis*. 2012 Jun;33(6):1203-10.
doi: 10.1093/carcin/bgs149.
- [産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)
- 名称 : 遺伝子ターゲティングベクター、
その作製方法及び利用方法
発明者 : 足立 典隆
権利者 : 公立大学法人横浜市立大学
種類 : 特許出願
番号 : 2013-518006
出願年月日 : 平成 24 年 5 月 24 日
国内外の別 : 国内

名称：遺伝子ターゲティングベクター
及びその利用方法
発明者：足立 典隆
権利者：公立大学法人横浜市立大学
種類：特許出願
番号：PCT/JP2012/082160
出願年月日：平成 24 年 12 月 12 日
国内外の別：国外

[その他]

ホームページ

<http://dnar.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 典隆 (ADACHI, Noritaka)

横浜市立大学・

生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：30264675

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし