

ゲノム編集技術の現状

第2回 ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用のあり方に関する専門委員会

資料3

令和元年8月21日

武田洋幸

東京大学理学系研究科研究科長(生物学専攻・教授)

日本学術会議会員(第二部幹事)
ゲノム編集技術に関する分科会委員長

発表資料作成協力者:

国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター 生殖医療研究部
部長 阿久津英憲 (ゲノム編集分科会幹事)

同・分子内分泌研究部

福井由宇子 (ゲノム編集分科会・上席学術調査員)

第2回ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用のあり方に関する専門委員会

ゲノム編集技術の現状

- ・ゲノム編集技術とOff-targetの問題（変化は不可逆的）
特異性は高いが、間違いは“ゼロ”ではない
--- ターゲット配列の類似性、生物現象のStochasticity

Off-targetが少ないゲノム編集手法の開発

DNA鎖を切断 ----> 修復過程で目的外のDNA断片の挿入などが高頻度で起こる
→ DNA鎖を切断しない編集(塩基置換など)へ移行する(?)

Off-target評価を迅速・正確に行う手法の開発

Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq. Wienert et al., Science 2019

- ・エピゲノム編集の現状

ゲノムDNAを変化させることなしに狙った遺伝子の発現を長期的に制御する

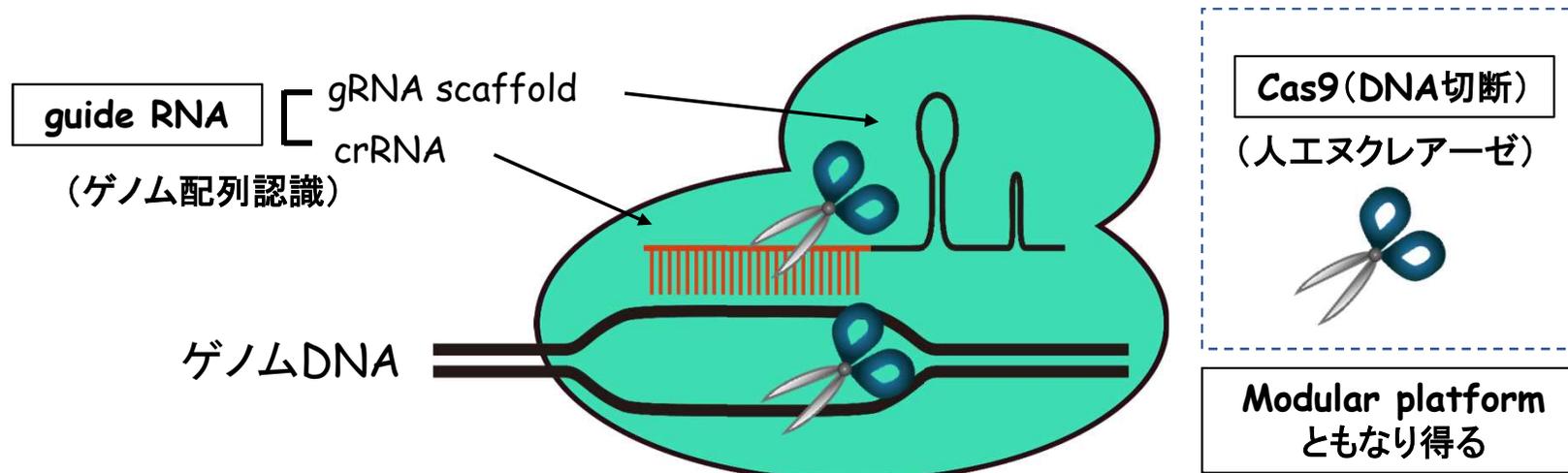
技術的には可能であるが評価はこれから。

Off-target効果の検証はこれから

長期間の影響、次世代への影響が未確定

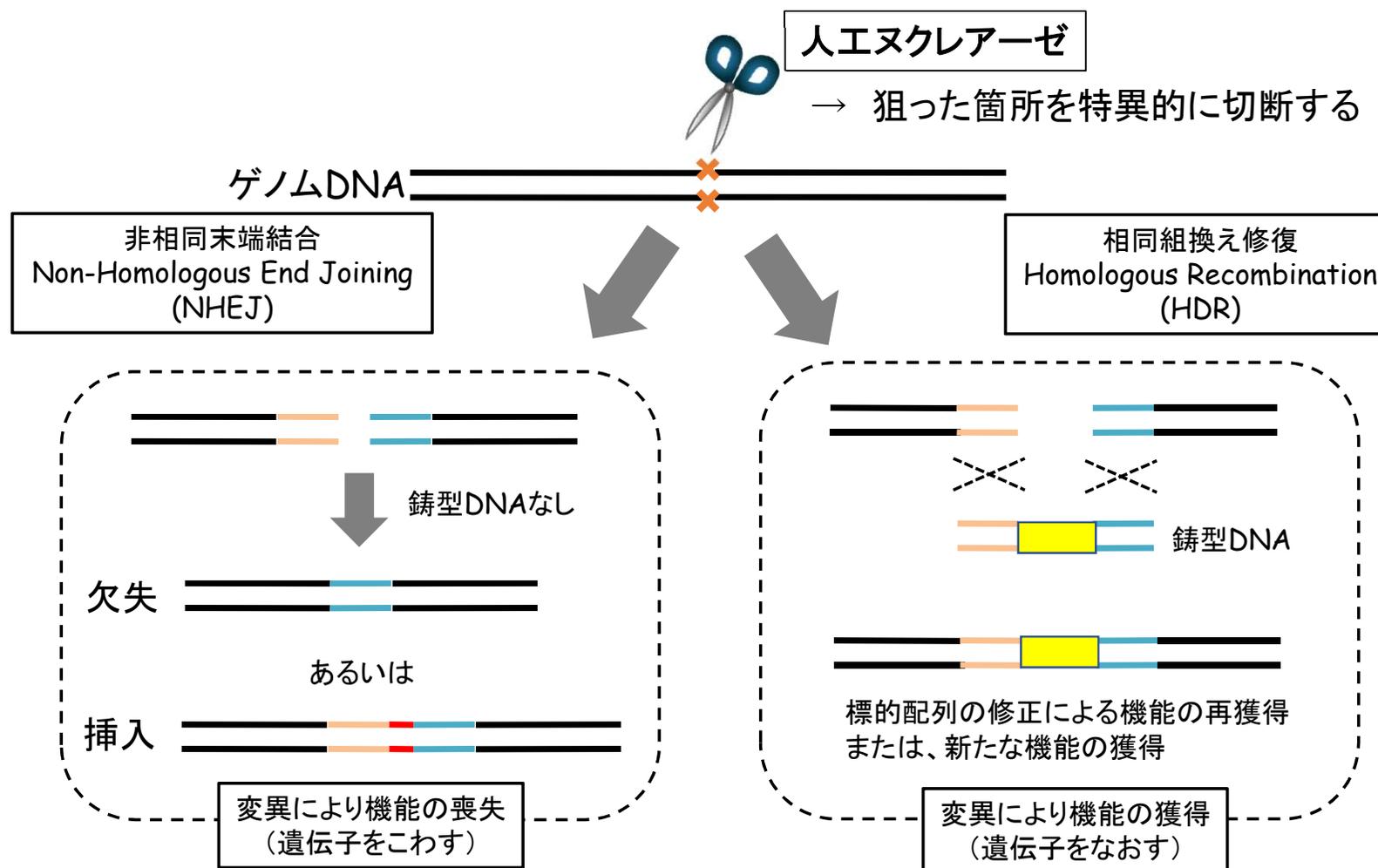
ゲノムDNAが変化していないので、操作が実際に行われたかどうかの検証が難しい

ゲノム編集技術 ; CRISPR/Cas9

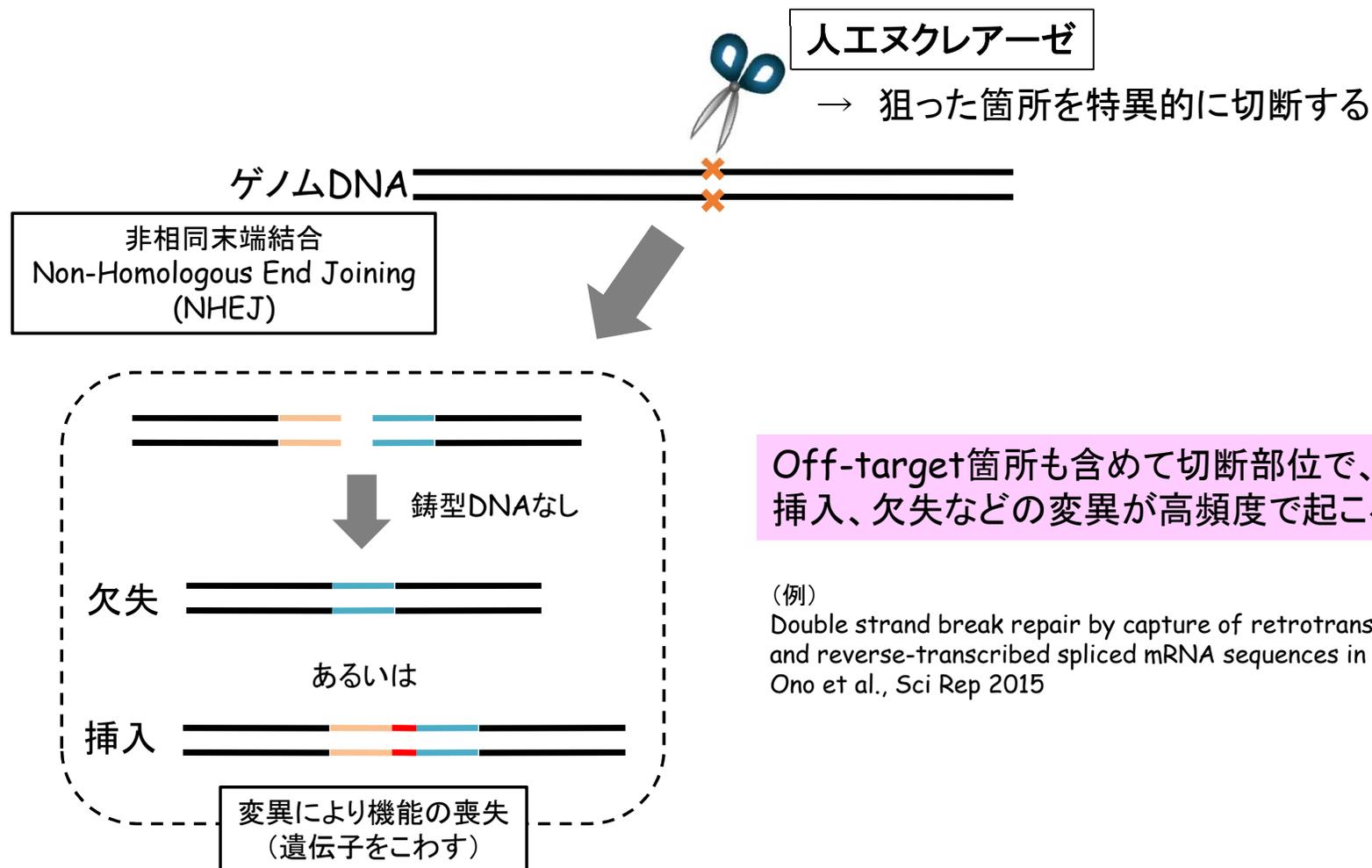


- ①ゲノムDNAを切断する人工ヌクレアーゼ(Cas9)と狙ったDNA配列にたどり着かせるガイドRNA(gRNA).
- ② 狙った箇所を切断: ほぼあらゆる遺伝子・配列が標的.
- ③ゲノムDNAが対象: 変化が不可逆的.

ゲノム編集技術; CRISPR/Cas9



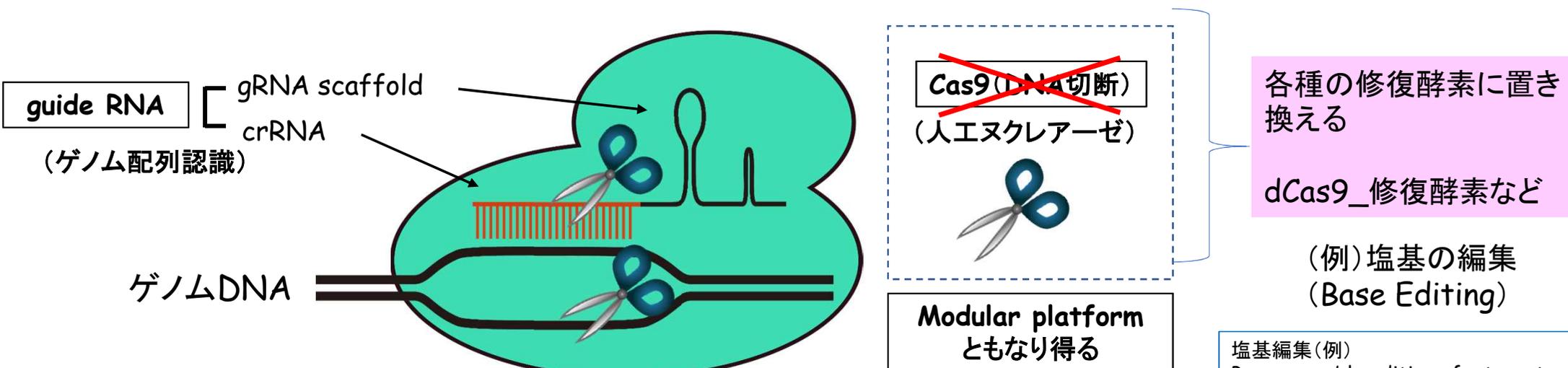
ゲノム編集技術; CRISPR/Cas9



阿久津 を改変

第2回ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用のあり方に関する専門委員会

ゲノム編集技術; CRISPR/Cas9



- ① ~~ゲノムDNAを切断する人工ヌクレアーゼ(Cas9)と狙ったDNA配列にたどり着かせるガイドRNA(gRNA).~~
- ② 狙った箇所を切断: ほぼあらゆる遺伝子・配列が標的.
- ③ ゲノムDNAが対象: 変化が不可逆的.

塩基編集(例)
Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Komor et al., Nature 2016

Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Gaudelli et al., Nature 2017

Off-targetについて
Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. Zuo et al., Science 2019



阿久津 を改変

第2回ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用のあり方に関する専門委員会

ゲノム編集技術の現状

- ・ゲノム編集技術とOff-targetの問題（変化は不可逆的）
特異性は高いが、間違いは“ゼロ”ではない
--- ターゲット配列の類似性、生物現象のStochasticity

Off-targetが少ないゲノム編集手法の開発

DNA鎖を切断 ----> 修復過程で目的外のDNA断片の挿入などが高頻度で起こる
→ DNA鎖を切断しない編集(塩基置換など)へ移行する(?)

Off-target評価を迅速・正確に行う手法の開発

Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq. Wienert et al., Science 2019

- ・エピゲノム編集の現状

ゲノムDNAを変化させることなしに狙った遺伝子の発現を長期的に制御する

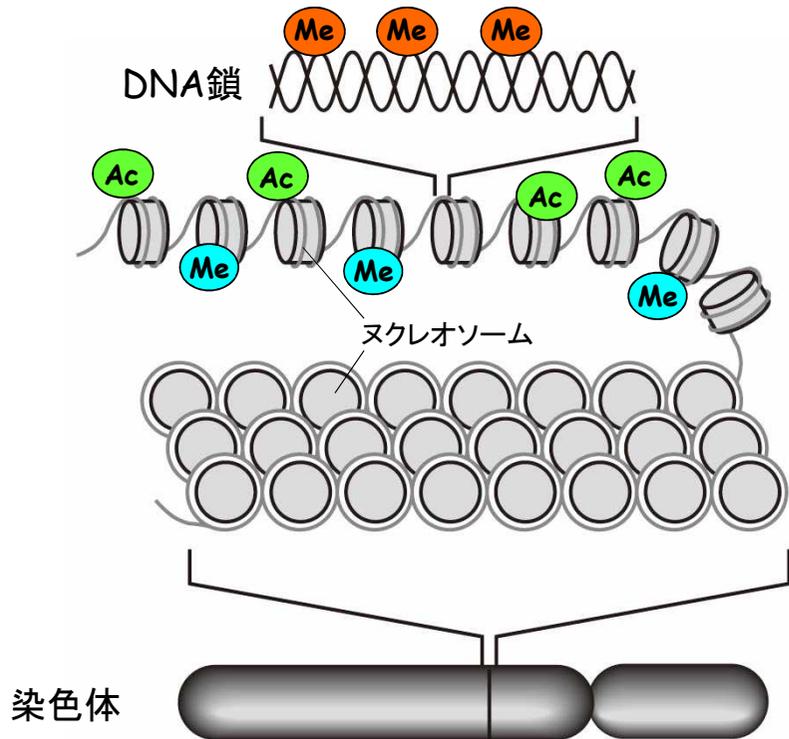
技術的には可能であるが評価はこれから。

Off-target効果の検証はこれから

長期間の影響、次世代への影響が未確定

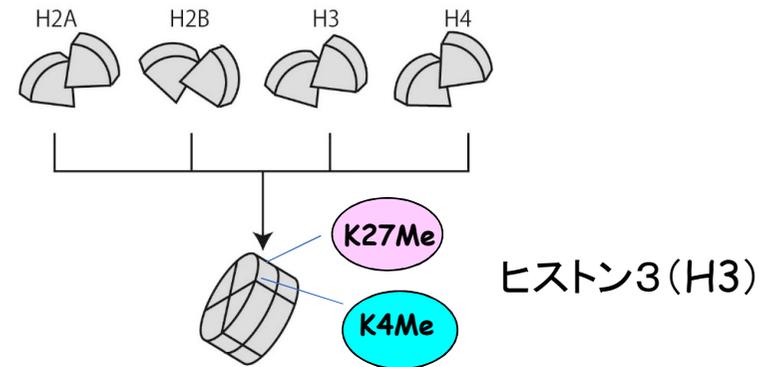
ゲノムDNAが変化していないので、操作が実際に行われたかどうかの検証が難しい

エピジェネティック修飾と生物機能



- Ac : アセチル基(ヒストンのリジン残基)
- Me : メチル基(ヒストンのリジン残基)
- Me : DNA のシトシンに対するメチル化

ヌクレオソーム
= 4種類のヒストンタンパク質の8量体



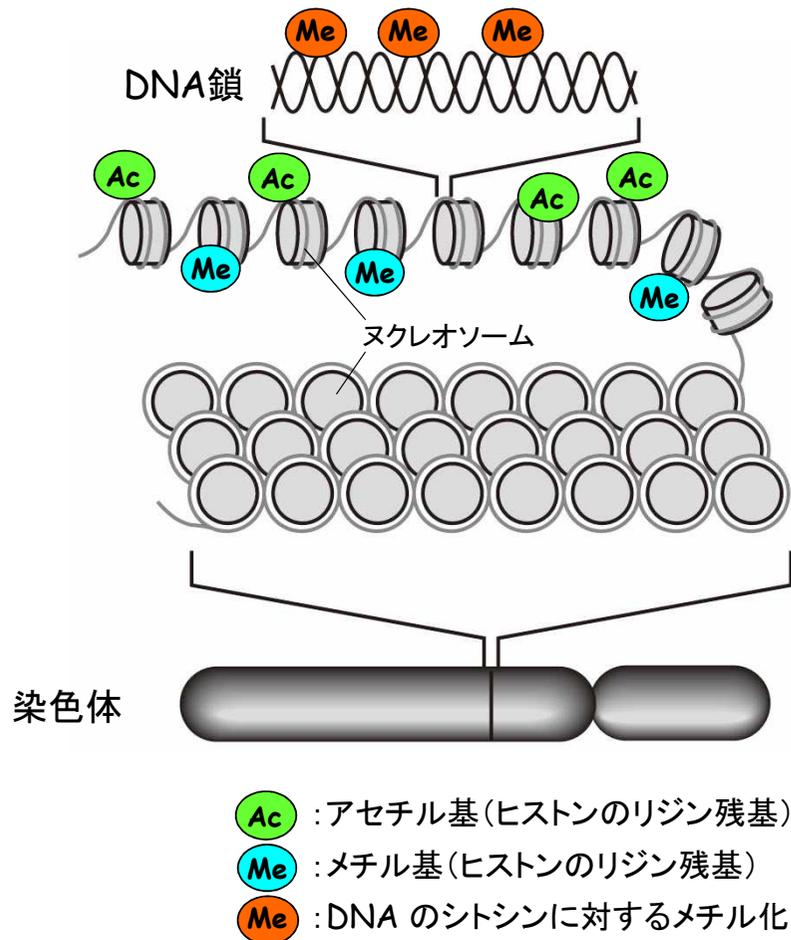
主な修飾と機能(例)

H3K4me(遺伝子発現の活性化)

H3K27me(遺伝子発現の抑制化)

H3K9me(ヘテロクロマチン化、
長期的遺伝子発現抑制)

エピジェネティック修飾と生物機能



Development and Growth 発生と成長
pluripotency 多分化能の維持(幹細胞の性質)
memory/competency 環境刺激の記憶
cell differentiation 細胞分化
Disease 疾病
cancer, neurodegeneration, 癌、神経変性
aging etc.... 老化など
Genome stability ゲノムの安定性
transposons トランスポゾンの不活性化

細胞分裂後に娘細胞に伝播する
遺伝子配列に変化のない長期的影響

長期的影響

次世代への影響

第2の遺伝情報

H3K4me(活性化), H3K27me(抑制化), H3K9me(ヘテロクロマチン化、長期的発現抑制)

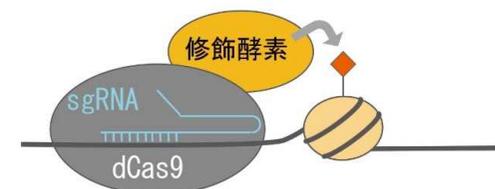
環境刺激がエピゲノム修飾として記憶されていることを示唆する論文

| 環境刺激 | 修飾 | 生物種/細胞種 | 表現型 | 論文名 |
|---|------------------|-----------------|---|---|
| 母親の栄養状態 (メチル基供与体の量) | DNA methylation | マウス | Agoutiマウス・毛色および肥満形質 (agouti遺伝子上流のDNAメチル化の変化) | Waterland RA. & Jirtle RL., MCB, 2003 Morgan HD. et al., Nat. Genet., 1999 |
| 母親の世話 (grooming) | DNA methylation | マウス・海馬 | ストレス耐性 (海馬におけるGR遺伝子のDNAメチル化の変 化) | Weaver JCG. et al., Nat. Neurosci., 2004 |
| 栄養状態 (inositol欠乏) 高塩濃度 | H3K4me2 | 出芽酵母 | 2度目の刺激の際、1度目と比較し応答能が向 上 (H3K4me2が刺激解除後も維持) | Urso AD et al., eLIFE, 2016 など |
| サイトカイン (IFN- γ) | H3K4me2 | ヒト・HeLa細胞 | 2度目の刺激の際、1度目と比較し応答能が向 上 (H3K4me2が刺激解除後も維持) | Light WH. Et al., PLOS Biology, 2013 |
| 1度目: Concanavalin A (レ クチン、リンパ球刺激) 2度目: PMA (TCR刺激) | H3K4me2, H3K27Ac | マウス・T細胞 | 2度目の刺激の際、1度目と比較し応答能が向 上 (H3K4me2, H3K27Acが刺激解除後も維持) | Bevington SL et al., EMBO J., 2016 |
| LPSなど | H3K4me1 | マウス・マクロ ファージ | 2度目の抗原刺激の際、1度目と比較し応答能 が向上 (H3K4me1が刺激解除後も維持) | Ostuni R. et al., Cell, 2013 |
| 熱ストレス 高浸透圧 | H3K9me2 | ショウジョウバ エ | 熱ストレスによる pericentromeric heterochromatinの脱凝集・近傍遺伝子の活性 化状態が、刺激解除後も長期間維持 (H3K9me2の低レベル状態が維持) | Seong KH et al., Cell, 2011 |
| LPSなど | H3K9me2 | マウス・マクロ ファージ | 抗原刺激後長期間にわたり炎症関連遺伝子 の高発現状態が維持 (H3K9me2の低レベル状態が維持) | Yoshida K. et al., Nat. Immunol., 2015 |
| 熱ストレス | H3K9me3 | 線虫 | 熱ストレス解除後も数世代にわたって Transgeneおよびトランスポゾン配列の高発 現状態が維持 (H3K9me3の低レベル状態が維持) | Klosin A. et al., Science, 2017 |
| DDT (環境ホルモン・エ ストロゲン様) | H3K27me3ほか | マウス | F0妊娠雌マウスに対するDDT処理 →F1~F3の雄マウスの精子において、一部の 遺伝子でH3K27me3レベルが変化 | Skinner MK. Et al., Epigenetics & Chromatin, 2018 |

問題点:

殆どの知見ではエピジェネティック修飾自体が本当にメモリーとしての機能を担っているのかを検証できていない。即ち因果関係が不明。

修飾酵素を操作する実験は行われておらず、あくまで刺激解除後も修飾変化が維持されていることを示すまでに留まっている。



dCas9: DNA切断活性欠失したCas9
sgRNA: ガイドRNA

個々の遺伝子座に対して特異的に、エピジェネティック修飾を操作し、長い期間にわたり、その消長および遺伝子発現への影響を調べる系の確立が必要

dCas9エピゲノム編集の研究例

| 操作修飾 | コンストラクト | 生物種 | 細胞種 | 論文名 |
|-------------------|---|---------------------------|------------------|---|
| H3K27ac | dCas9-p300 dCas9-HDAC | ヒト培養細胞 | HEK293T 脳 | Hilton et al., Nature Biotechnology, 2015 Chen et al Cell Rep 2019 |
| H3K9me3 | dCas9-KRAB | ヒト培養細胞 | K562, HEK293T | Thakore et al., Nature Methods, 2015 |
| H3K4me3 | dCas9-PRDM9 | ヒト培養細胞 | HEK293T | Cano-Rodriguez et al., Nature Communications, 2016 |
| H3K27me3 | dCas9-EZH2 | ヒト培養細胞 | HCT116T | O'Geen et al., Nucleic Acids Research, 2017 |
| H3K79me3 | dCas9-DOT1L | ヒト培養細胞 | HEK293T | Cano-Rodriguez et al., Nature Communications, 2016 |
| H2AK119ub 脱ユビキチン化 | dCas9-USP21 | アフリカツメガエル胚へ核移植されたマウス線維芽細胞 | | Jullien et al., Molecular Cell, 2017 |
| DNA メチル化 | dCas9-DNMT3a / dCas9-Sssl | マウス | ES細胞/ マウス脳 | Liu et al., Cell, 2016; Yamazaki et al., PLOS ONE, 2017 |
| DNA 脱メチル化 | dCas9-TET1 / dCas9-(SunTag)- TET1 | マウス | ES細胞/ マウス脳 | Liu et al., Cell, 2016; Morita et al., Nature Biotechnology, 2016 |

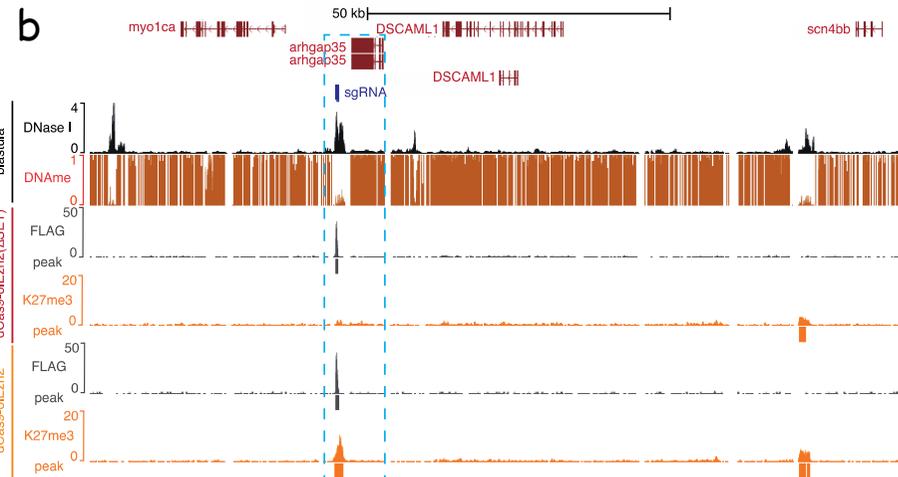
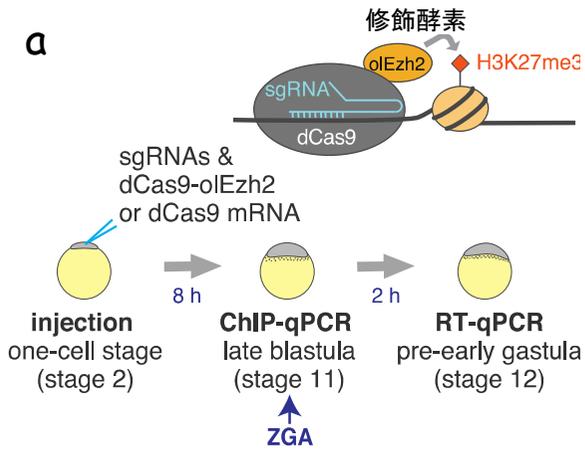
赤字...*in vivo*(個体)エピゲノム編集

個体レベルでのゲノム編集は原理的には可能であるが成功例は限定的

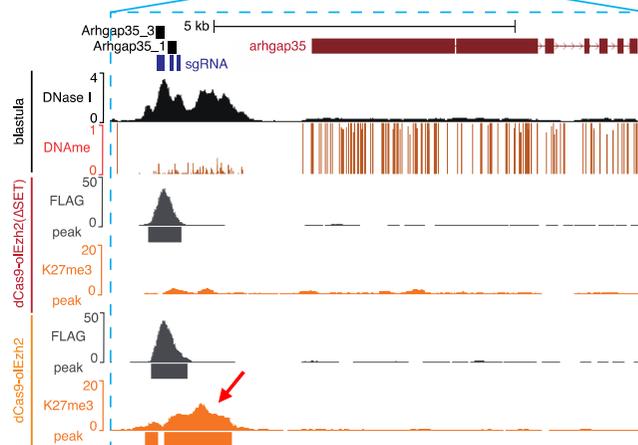
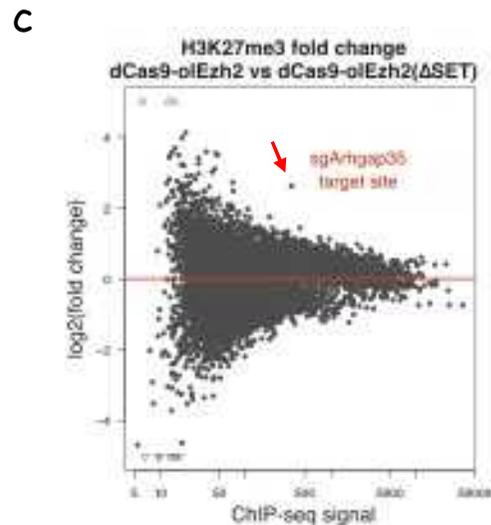
第2回ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用のあり方に関する専門委員会

in vivo エピゲノム編集により導入されたエピジェネティック修飾とその影響

領域特異的 (promoter) ヒストン H3K27me3 (抑制性) 修飾導入と発現抑制 (メダカ、武田研究室)



Fukushima et al. *Epigenetics & Chromatin* (2019)
Targeted in vivo epigenome editing of H3K27me3



標的遺伝子の
発現低下を誘発

第2回ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用のあり方に関する専門委員会 12

発生・成長期の環境刺激はゲノム中にエピジェネティック修飾として記憶

DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説

影響は長期的

【The Dutch Hunger Winter(ヒト)】

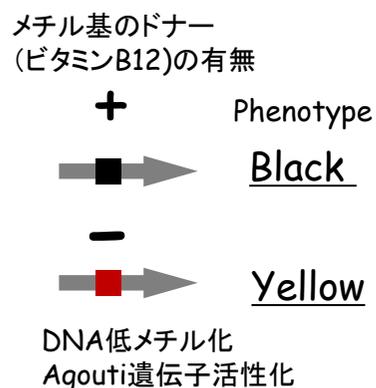
オランダで第二次世界大戦中に起こった飢饉の影響

胎児期に飢饉(母親)を経験した人は
後年、代謝疾患のリスクが高くなる

代謝関連遺伝子プロモーターの
DNAメチル化状態の変化

Nat Commun. 2014 Nov 26;5:5592

【Agouti マウス】



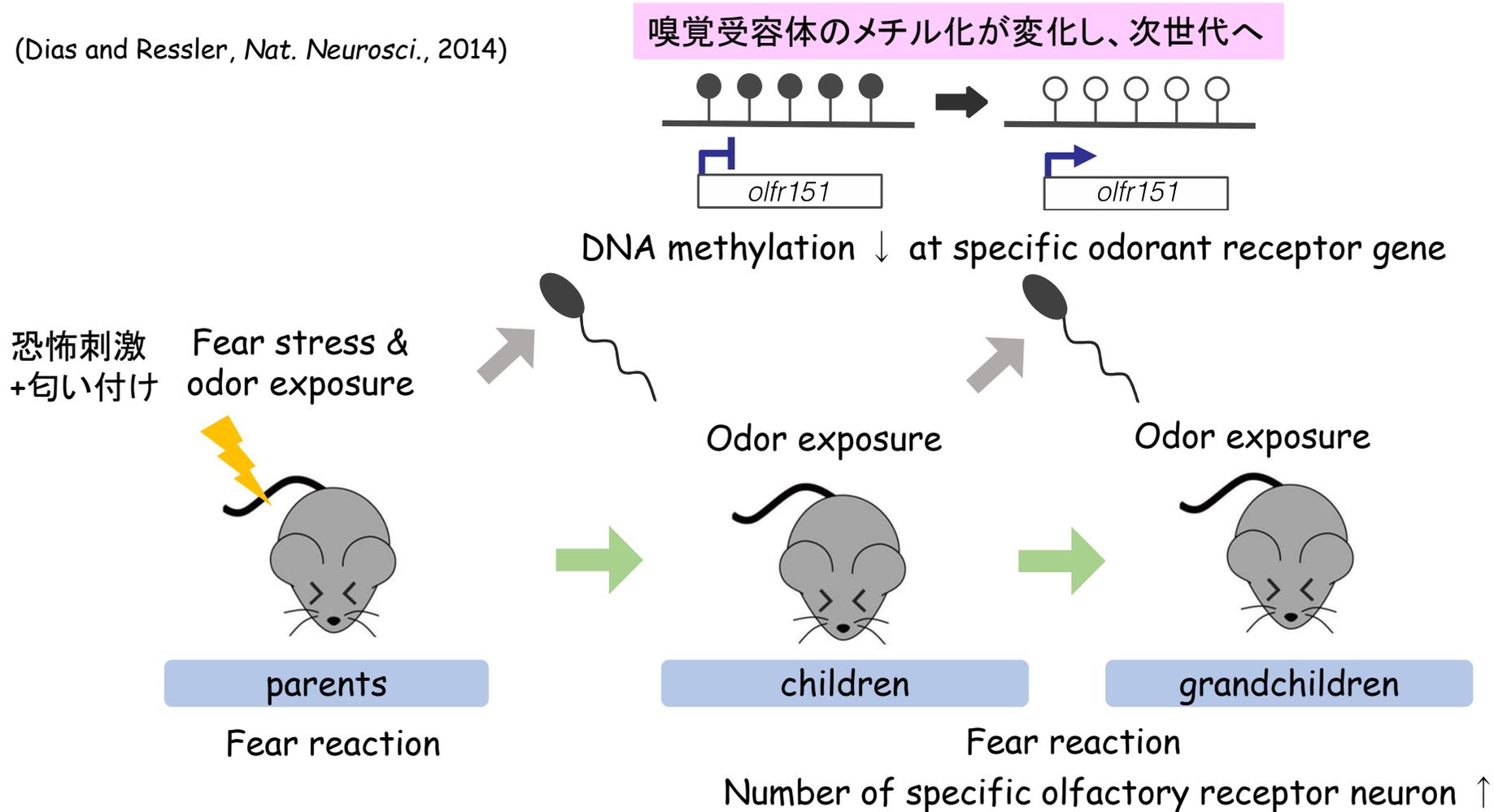
母親の栄養条件により、毛色を制御するAgouti遺伝子制御領域の
DNAメチル化が変化し、仔の体色に長期間(次世代も含む)影響する

Mol Cell Biol. 2003 Aug;23(15):5293-300.

Nat Genet. 1994 Sep;8(1):59-65.

雄マウスの匂いに対する条件付けとその次世代への影響

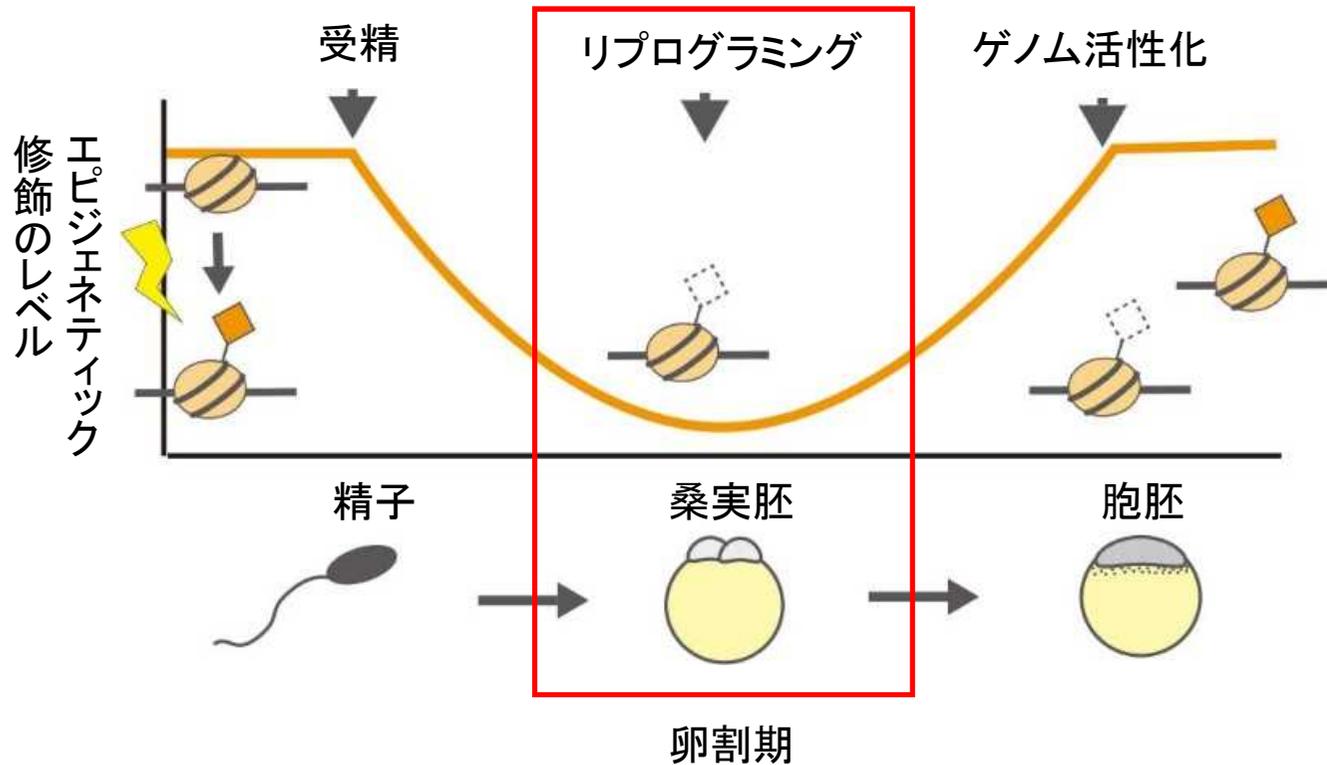
(Dias and Ressler, *Nat. Neurosci.*, 2014)



第2回ゲノム編集技術等を用いたヒト受精胚等の臨床利用の
あり方に関する専門委員会

獲得されたエピジェネティック修飾は次世代に伝わるのか？

動物の発生では受精直後にほとんどのエピジェネティック修飾が消去・リセットされ则认为られている



未解明な点

- ・どのように生殖細胞のエピゲノムは環境などの影響を受けて変化するのか。
- ・獲得した生殖細胞のエピゲノム変化がプログラミング過程を経ても残るメカニズム

ゲノム編集技術の現状

- ・ゲノム編集技術とOff-targetの問題（変化は不可逆的）
特異性は高いが、間違いは“ゼロ”ではない
--- ターゲット配列の類似性、生物現象のStochasticity

Off-targetが少ないゲノム編集手法の開発

DNA鎖を切断 ----> 修復過程で目的外のDNA断片の挿入などが高頻度で起こる
→ DNA鎖を切断しない編集(塩基置換など)へ移行する(?)

Off-target評価を迅速・正確に行う手法の開発

Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq. Wienert et al., Science 2019

- ・エピゲノム編集の現状

ゲノムDNAを変化させることなしに狙った遺伝子の発現を長期的に制御する

技術的には可能であるが評価はこれから。

Off-target効果の検証はこれから

長期間の影響、次世代への影響が未確定

ゲノムDNAが変化していないので、操作が実際に行われたかどうかの検証が難しい