

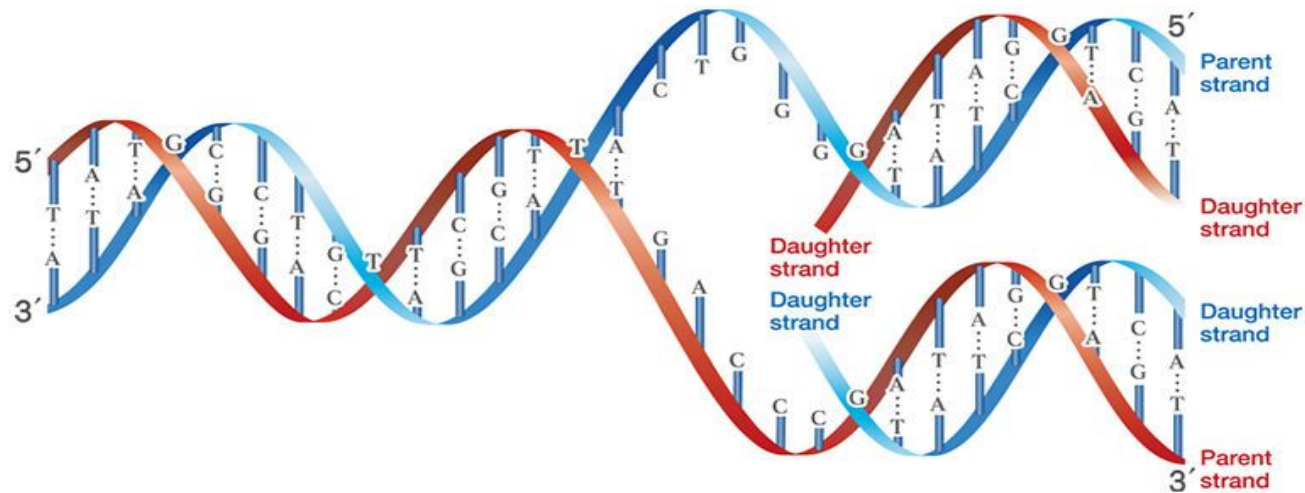
# 生体内 (in vivo) ゲノム編集の新技術 について

第2回遺伝子治療等臨床研究に関する  
指針の見直しに関する専門委員会

平成29年5月15日(月)

資料

3-1



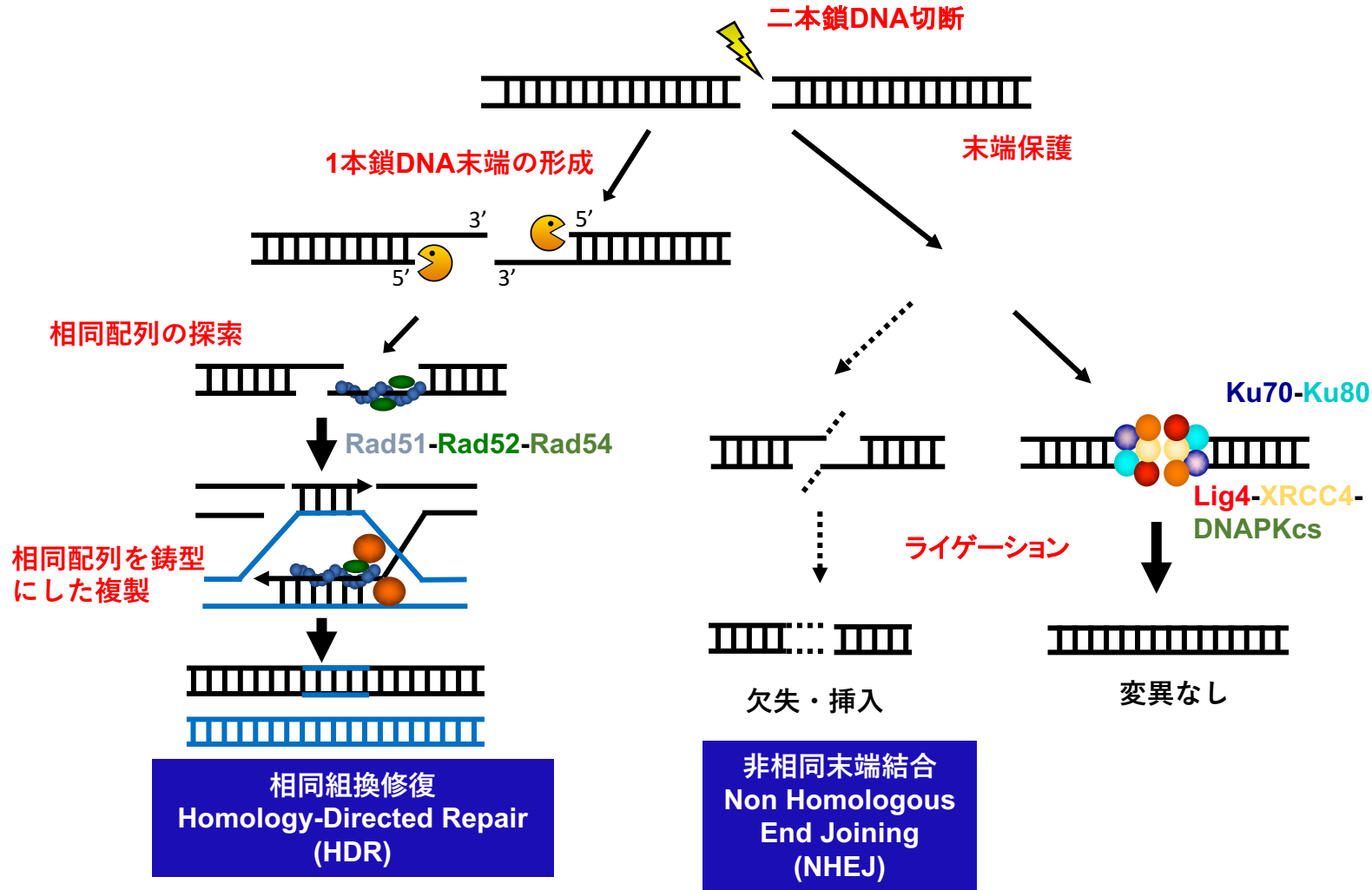
© CSLS/The University of Tokyo

2017年 5月15日

第2回遺伝子治療等臨床研究指針の見直しに関する専門委員会  
理研 多細胞システム形成研究センター(CDB)

松崎文雄

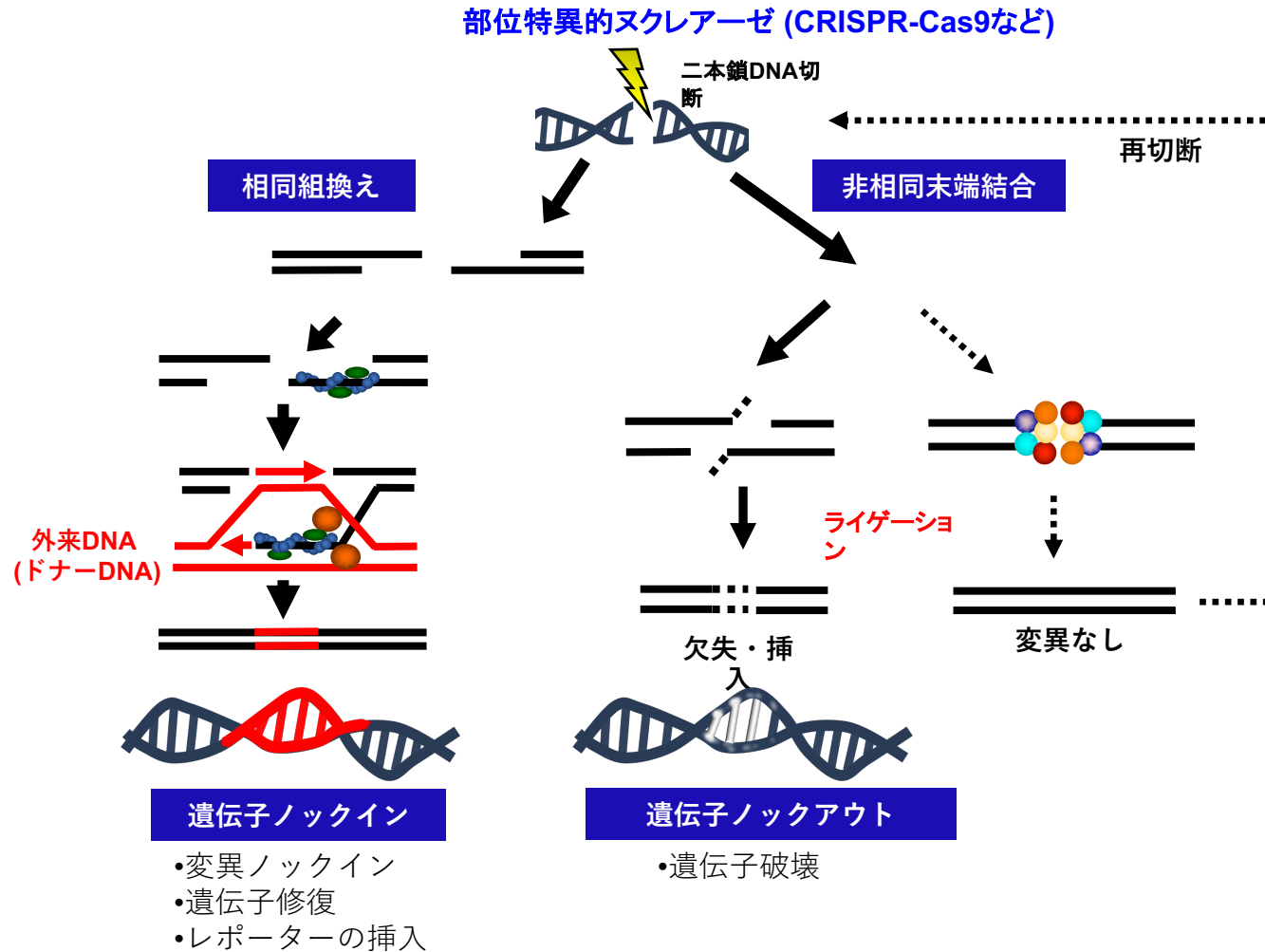
# ゲノム編集：細胞が備えている二本鎖DNA修復機構を利用



- 遺伝子ノックアウト
- 遺伝子ノックイン
- 遺伝子修復

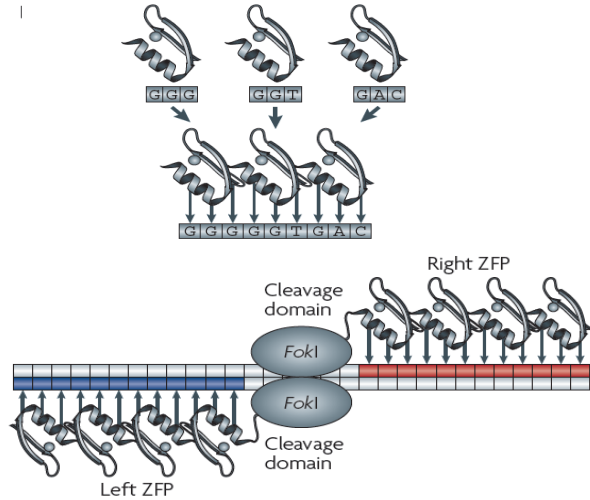
- 塩基配列の挿入・欠失  
Insertion & Deletion (InDel)
- 遺伝子ノックアウト

# ゲノム編集：細胞が備えている二本鎖DNA修復機構を利用



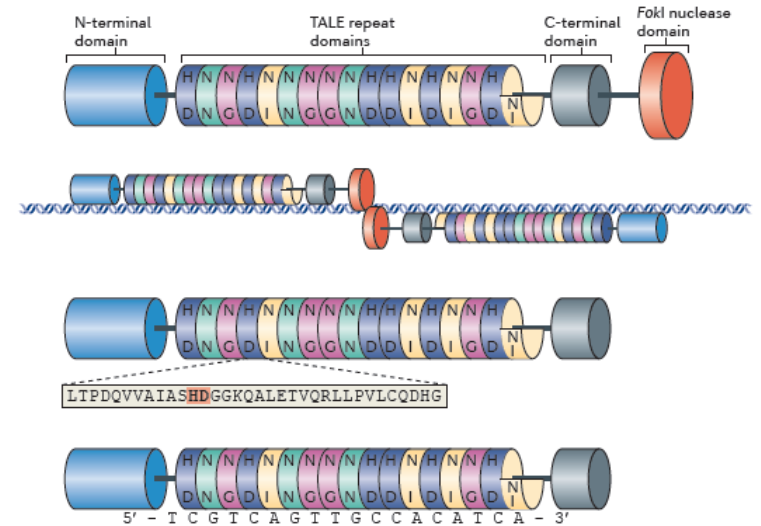
# 標的遺伝子配列を特異的に切断する方法

- Zinc Fingerヌクレアーゼ



Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010) Modified

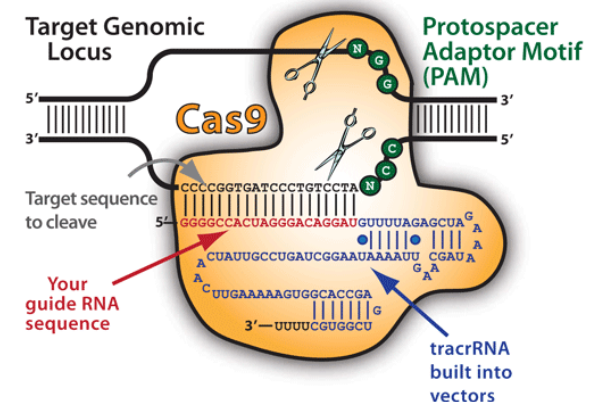
- TALEN: Transcription Activator-like Effector Nucleases



Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013) modified

- CRISPR/Cas9 system: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein 9 (Cas9)

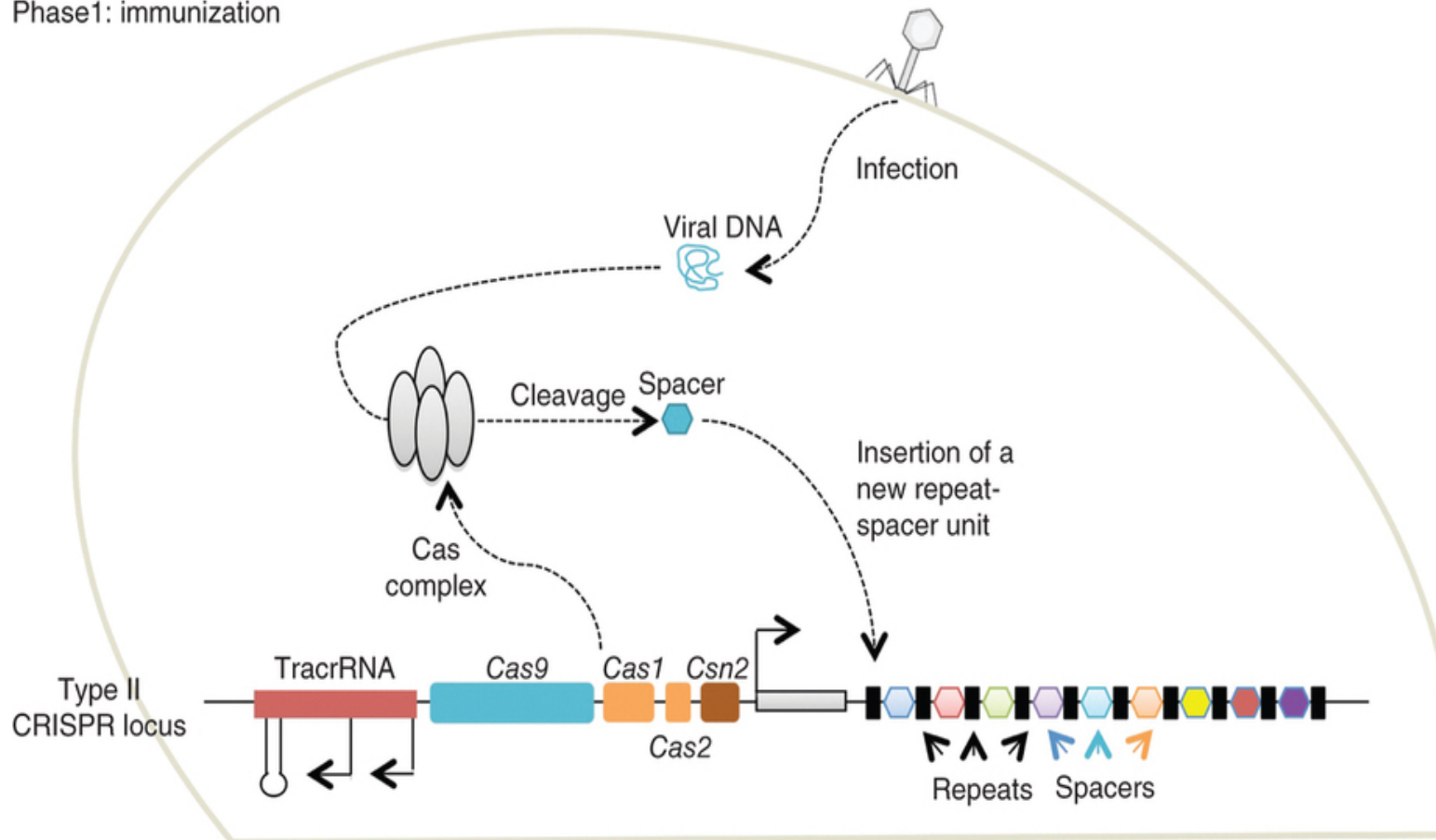
## The CRISPR-Cas9 Nuclease Heterocomplex



# CRISPRシステムは元々バクテリアの免疫システムである

Streptococcus pyogenes SF370 type II CRISPR locus

Phase1: immunization



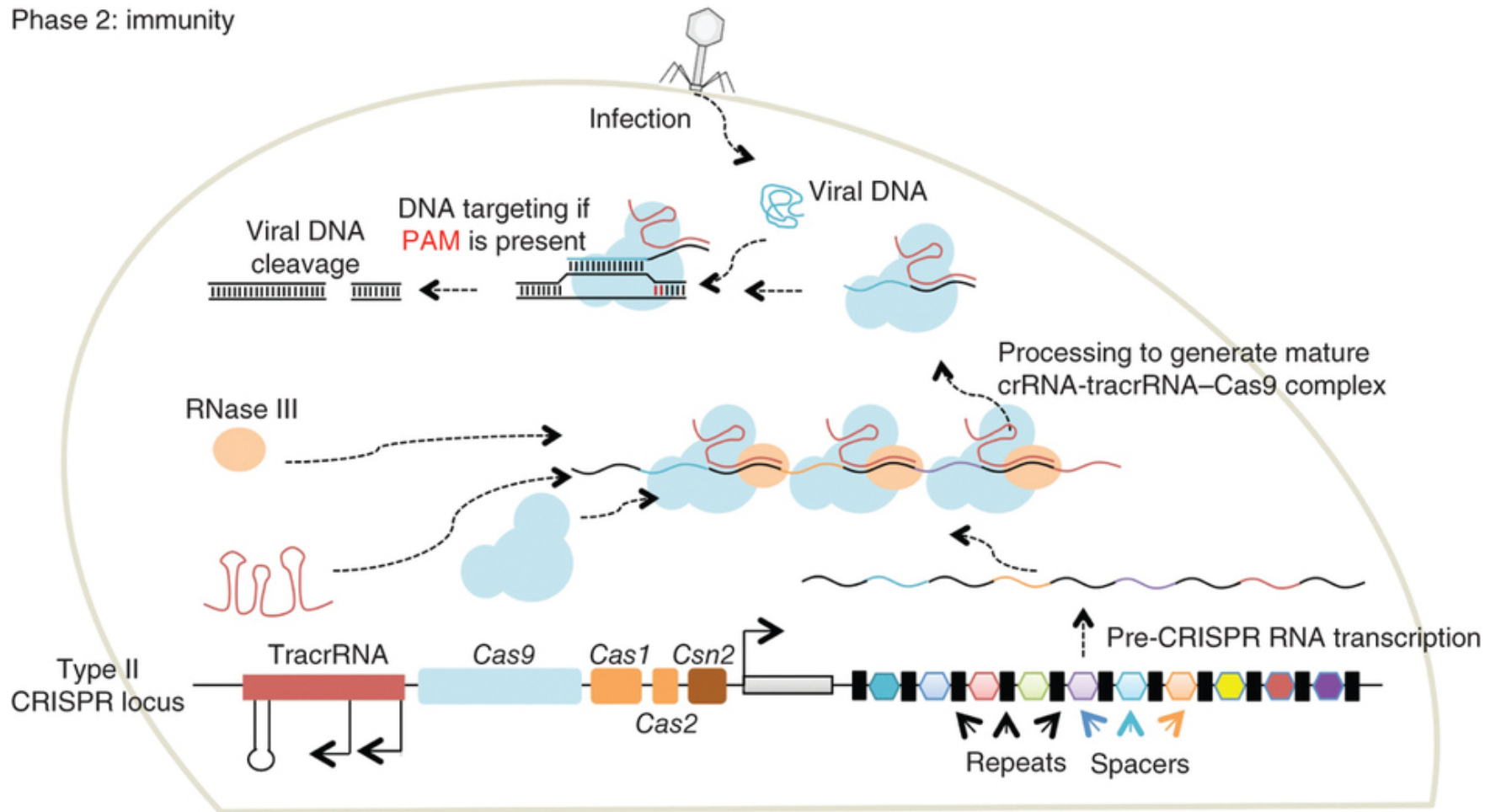
Jinek M<sup>1</sup>, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. [Science](#). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.

2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28.

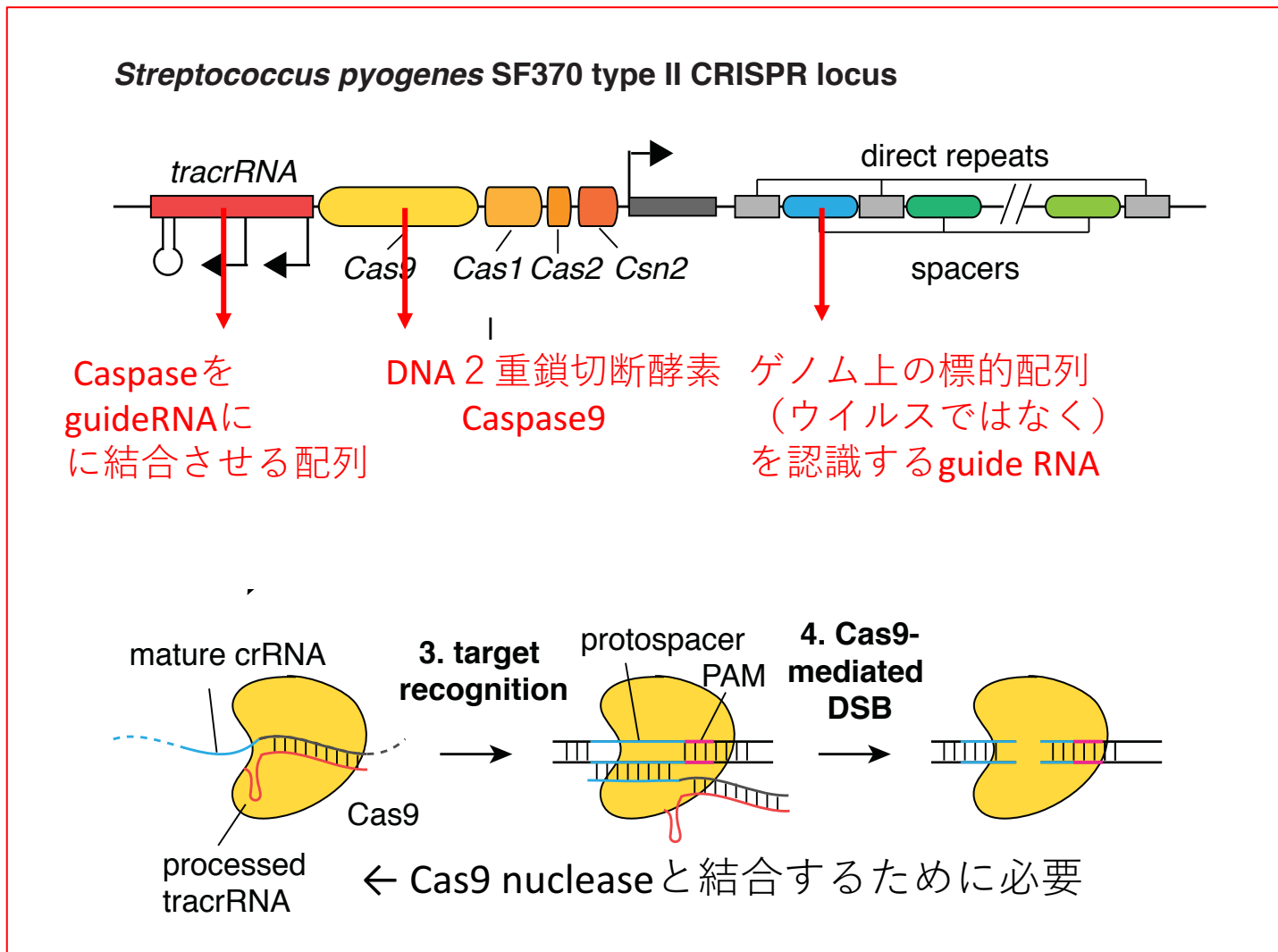
# CRISPRシステムは元々バクテリアの免疫システムである

*Streptococcus pyogenes* SF370 type II CRISPR locus

Phase 2: immunity



# CRISPRシステムは特異的DNA配列の切断に応用できる

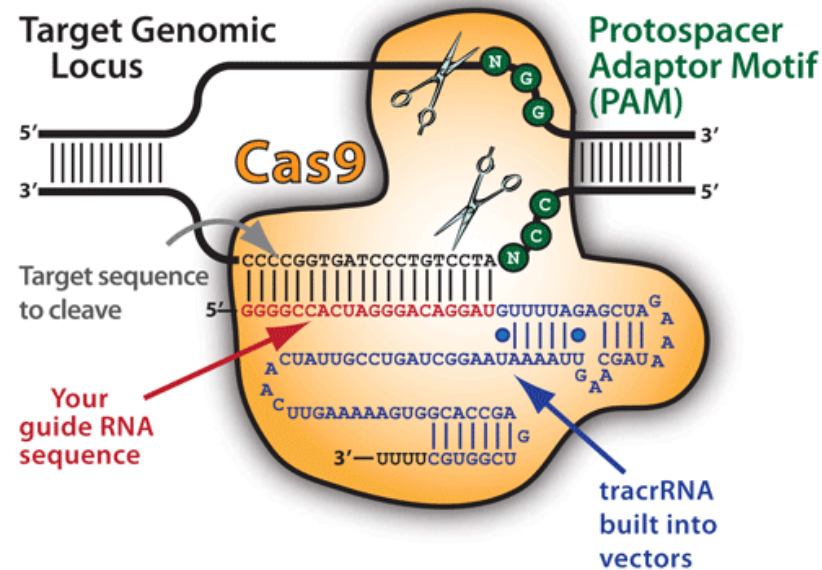


CRISPR/Cas9システムはどのような動物種のゲノムの配列も切断する。

→

このシステムを使ったゲノムknock-inにより  
“ねらったDNA配列を書き換えることが可能である”

The CRISPR-Cas9 Nuclease Heterocomplex



CRISPR/Cas9 systemのguide RNA vectorの工夫

- Spacer RNA → guide RNA
- Processed tracrRNA とguide RNAを一本につなぐ

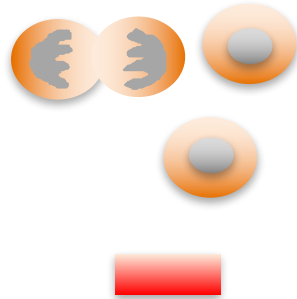
Jenek et al. Science 2012

<https://www.systembio.com/crispr-cas9-plasmids>



# DNA修復経路は細胞周期に依存する

細胞分裂をしている細胞  
(幹細胞など未分化な細胞)  
DNA合成期とG2期

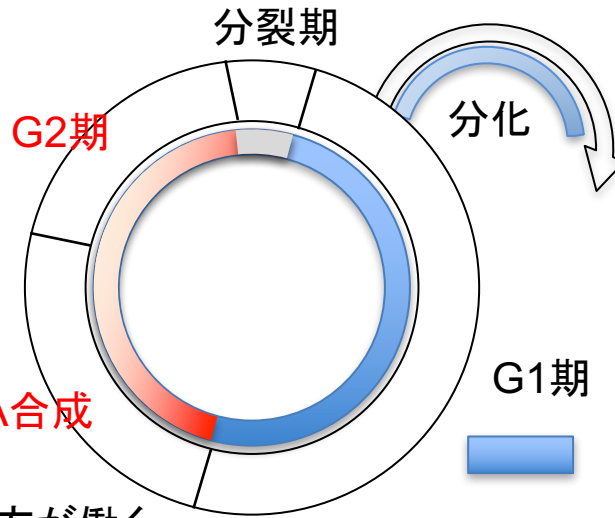


相同組み換え修復HDRと  
非相同末端結合 NHEJの両方が働く

Knockout : ○  
Knock-in : ○

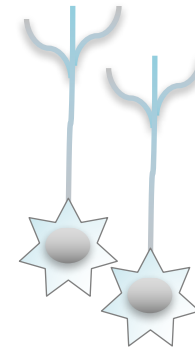
現在までの主流のゲノム編集法  
マウスの相同組み換え等

分化細胞—非増殖  
(神経、筋肉など、成体の大部分を構成する)  
DNA合成を行わない



非相同末端結合 NHEJ のみが起きる

Knockout : ○  
Knock-in : X 効率が極めて低かった



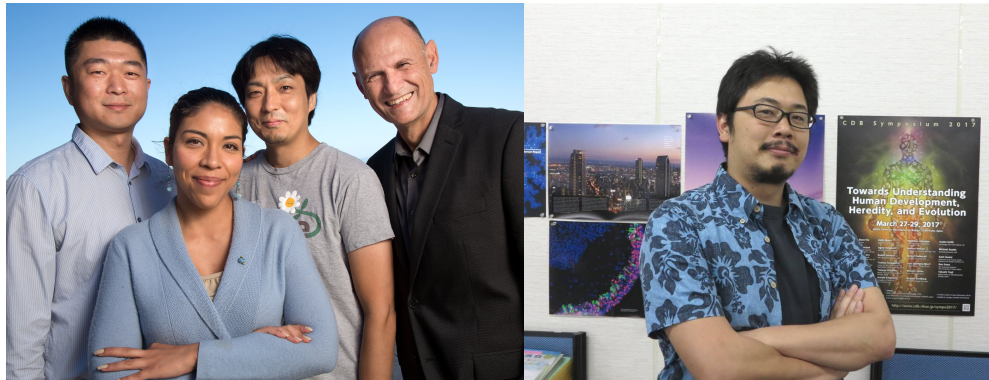
問題点: 体の大部分を占める非増殖細胞に対して、ゲノム編集が困難であった!

# 非相同末端結合 NHEJを利用した遺伝子ノックインにより 非増殖細胞で遺伝子編集を行う方法 HITIの開発

## *In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration*

Keiichiro Suzuki<sup>1\*</sup>, Yuji Tsunekawa<sup>2\*</sup>, Reyna Hernandez-Benitez<sup>1,3\*</sup>, Jun Wu<sup>1,4\*</sup>, Jie Zhu<sup>5,6</sup>, Euseok J. Kim<sup>7</sup>, Fumiyouki Hatanaka<sup>1</sup>, Mako Yamamoto<sup>1</sup>, Toshikazu Araoka<sup>1,4</sup>, Zhe Li<sup>8</sup>, Masakazu Kurita<sup>1</sup>, Tomoaki Hishida<sup>1</sup>, Mo Li<sup>1</sup>, Emi Aizawa<sup>1</sup>, Shicheng Guo<sup>8</sup>, Song Chen<sup>8</sup>, April Goebel<sup>1</sup>, Rupa Devi Soligalla<sup>1</sup>, Jing Qu<sup>9,10</sup>, Tingshuai Jiang<sup>6,11</sup>, Xin Fu<sup>5,6</sup>, Maryam Jafari<sup>6</sup>, Concepcion Rodriguez Esteban<sup>1</sup>, W. Travis Berggren<sup>12</sup>, Jeronimo Lajara<sup>4</sup>, Estrella Nuñez-Delicado<sup>4</sup>, Pedro Guillen<sup>4,13</sup>, Josep M. Campistol<sup>14</sup>, Fumio Matsuzaki<sup>2</sup>, Guang-Hui Liu<sup>10,15,16,17</sup>, Pierre Magistretti<sup>3</sup>, Kun Zhang<sup>8</sup>, Edward M. Callaway<sup>7</sup>, Kang Zhang<sup>5,6,18,19</sup> & Juan Carlos Izpisua Belmonte<sup>1</sup>

Nature 540, 144–149 (01 December 2016) doi:10.1038/nature20565 Received 10 February 2016 Accepted 27 October 2016 Published online 16 November 2016



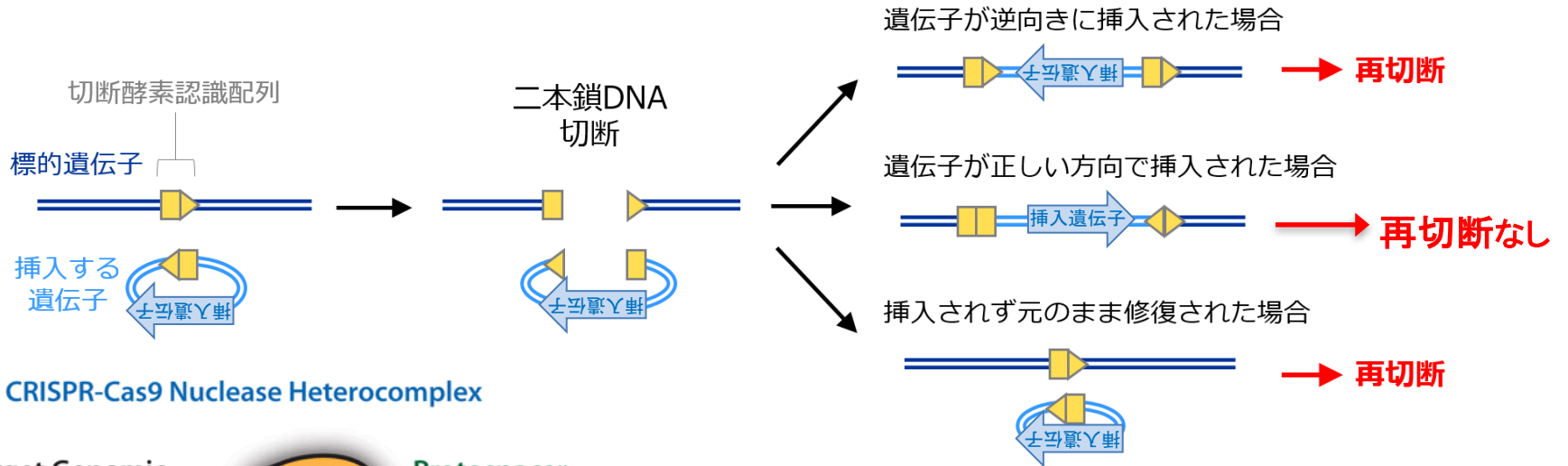
米国ソーク生物学研究所の主要メンバー  
左からJun Wu、Reyna Hernandez-Benitez、  
鈴木啓一郎、Juan Carlos Izpisua Belmonte

理化学研究所 多細胞システム形成研究センターCDB  
非対称細胞分裂研究チーム  
恒川雄二 研究員

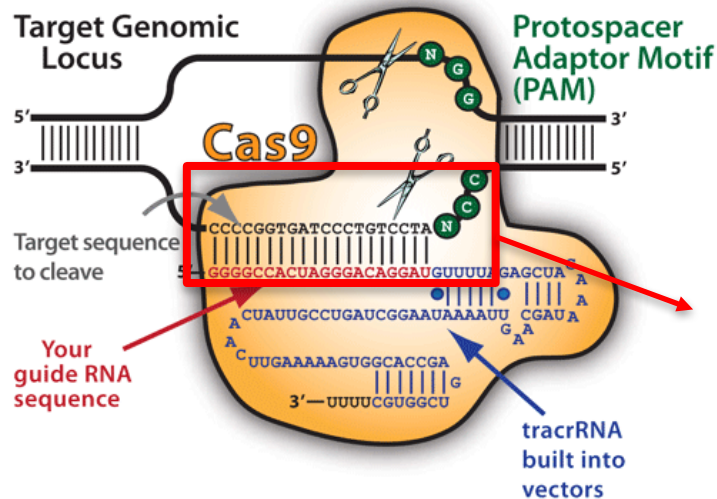
# HITI法の工夫

## ◀ 挿入遺伝子の端に認識配列を逆方向に挿入 ▶

- Cas9がリクルートされるゲノムの標的付近に開裂した挿入用DNAが濃縮
- 挿入DNAが正しい方向に挿入されない限り、限りなく認識配列が再切断され、挿入可能。



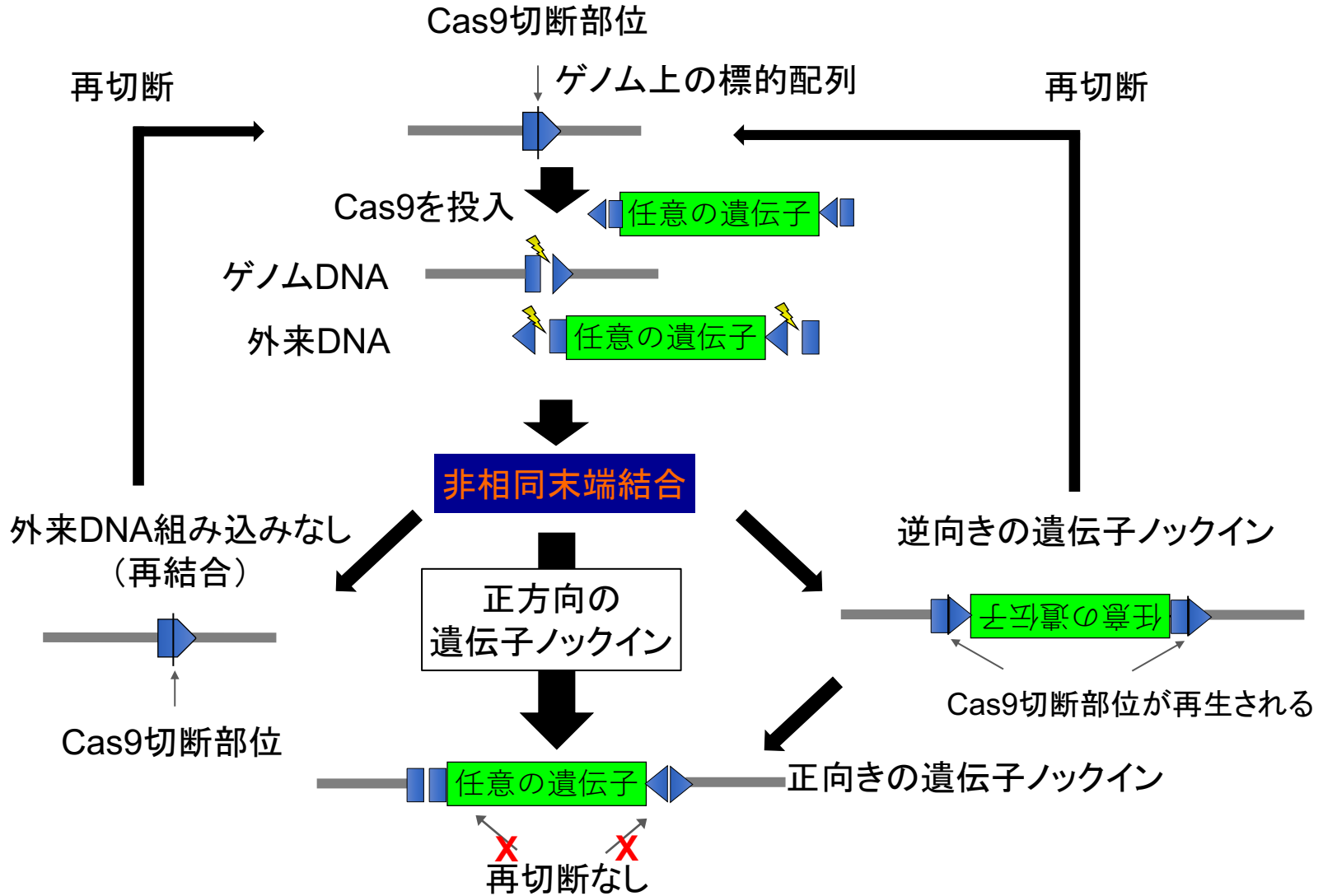
The CRISPR-Cas9 Nuclease Heterocomplex



認識切断配列



# Homology-Independent Targeted Integration (HITI)法がNHEJに基づきながらも、効率良くノックインする仕組み

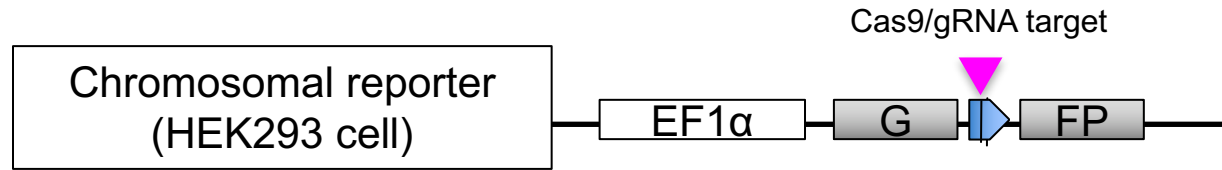


HITI法の働き方のアニメーション

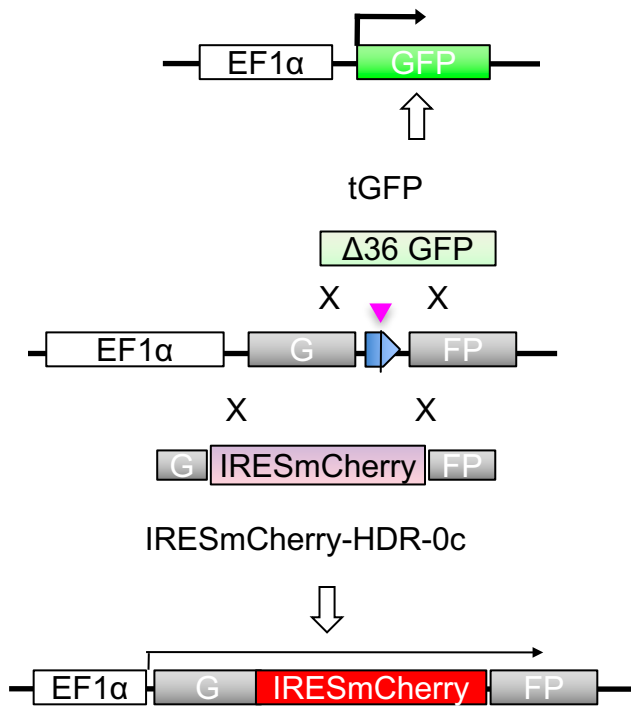
Salk Institute 鈴木啓一郎氏より



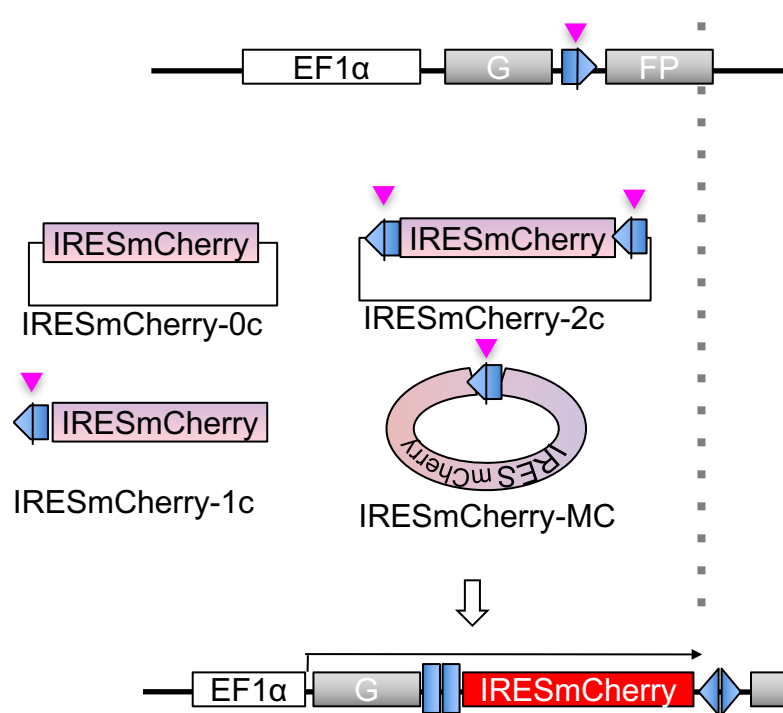
# 様々なgene knock-in 法の効率比較: 増殖するHEK293 細胞を用いた



## 1. 相同組み換え HDR

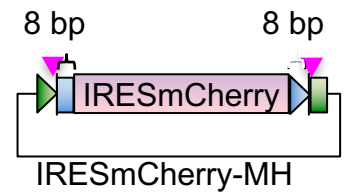


## 2. 非同相末端結合 NHEJ (Maresca et al Genome Res. 2013)

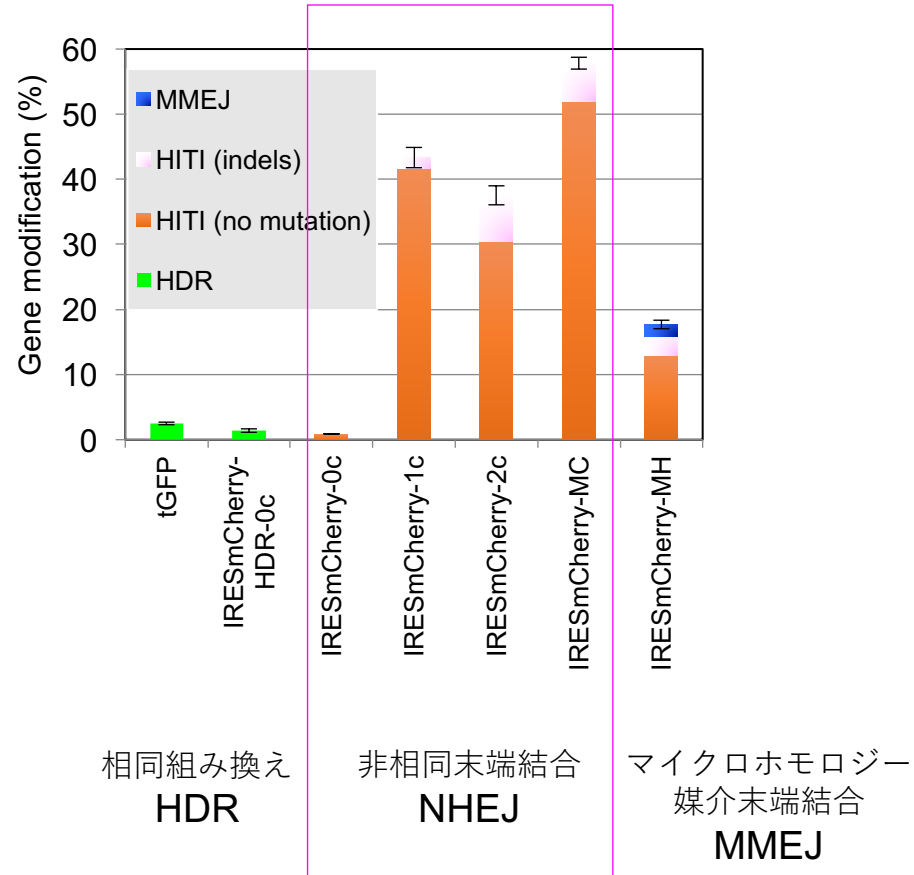


## 3. マイクロホモロジー 媒介末端結合 MMEJ (PITCh)

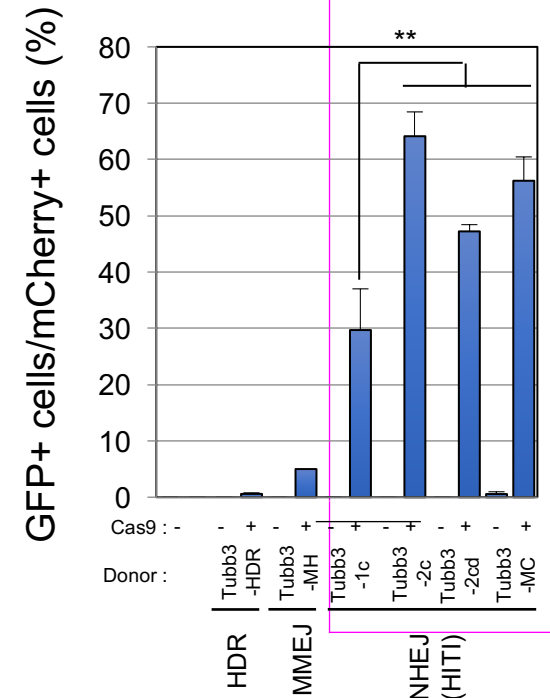
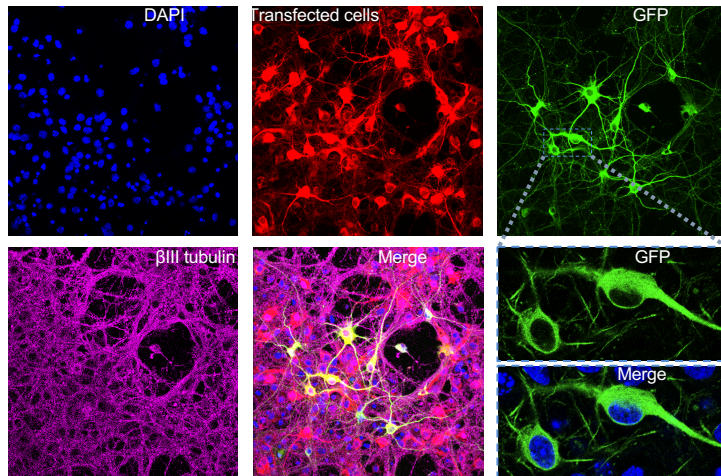
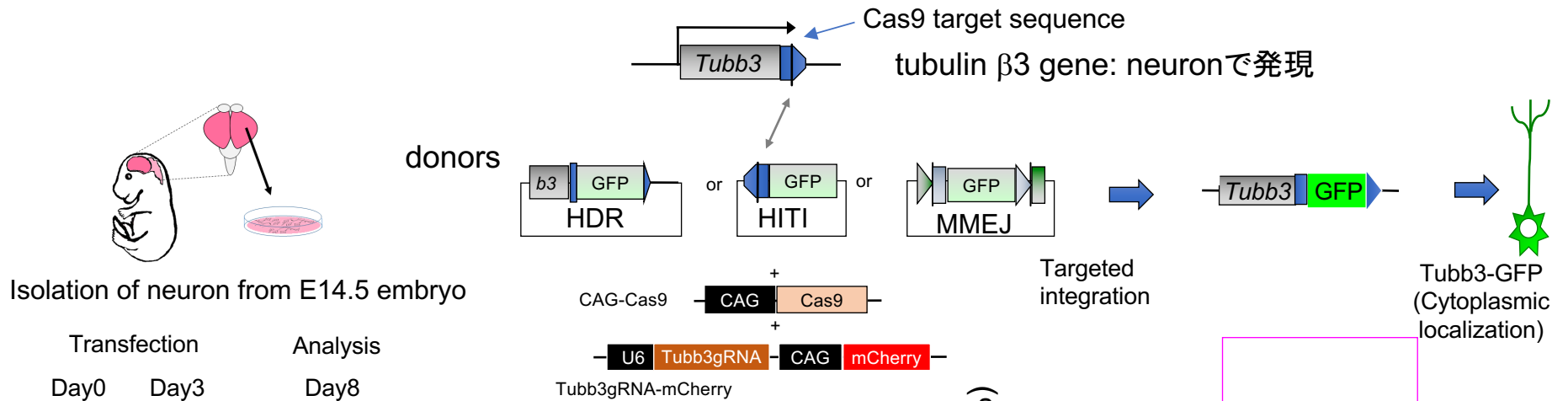
(Nakade et al Nature  
Commun 2014)



# 様々なgene knock-in 法の比較: 増殖するHEK293 細胞の場合



# in vivo (生体) における神経細胞 (分裂しない) でのHITI法の検討



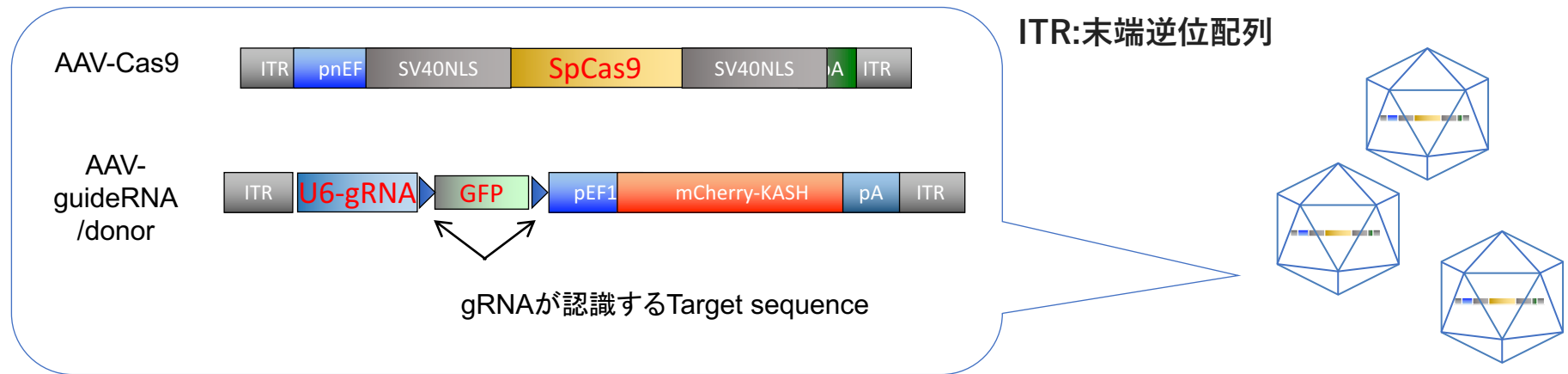


# アデノ随伴ウイルスを用いたHITIシステムのマウス個体への導入

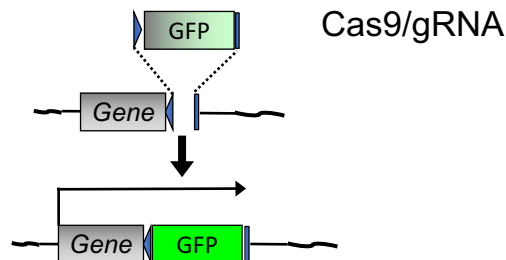
アデノ随伴ウイルス AAV：ヘルパー依存型でエンベロープを持たない一本鎖DNAウイルス  
([Helper Free Cell System](#)もある)

特徴：受容体：インテグリン 感染細胞を選ばない  
非増殖細胞、増殖細胞の両方に感染  
作用期間が長い

免疫原性をほとんど持っていない。P1レベルの施設でも取扱いが可能



AAVにパッケージ  
(AAV8 or AAV9)



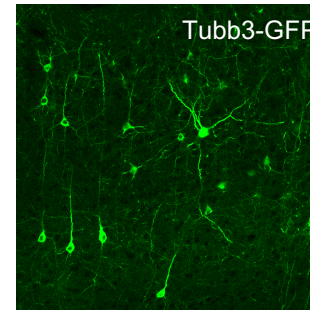
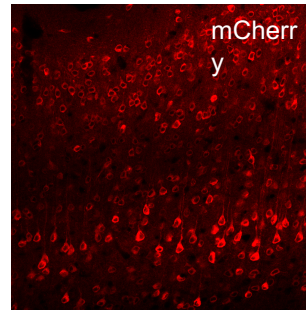
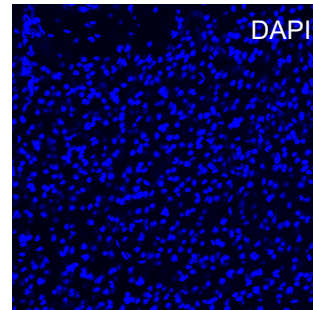
# アデノ随伴ウイルスを用いたHITIシステムによるマウス成体での局所的遺伝子改変

## In vivo brain



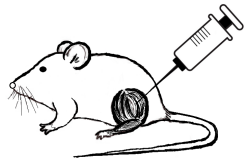
12 weeks old mouse

Target: *Tubb3*

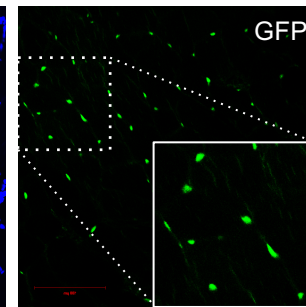
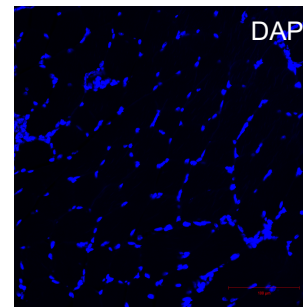


3.5% / cell  
10.6% / infected cell

## In vivo muscle



8 weeks old mouse

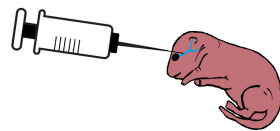
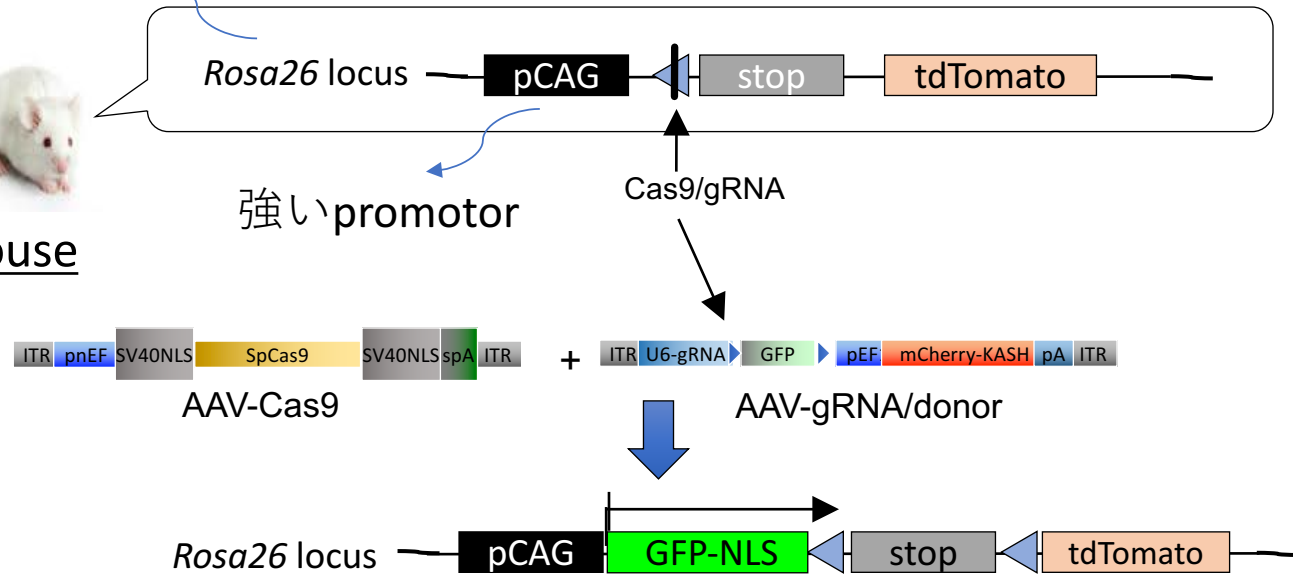


# アデノ随伴ウイルスを用いたHITIシステムによる 成体マウスの全身での遺伝子改変

全身性の発現をする遺伝子

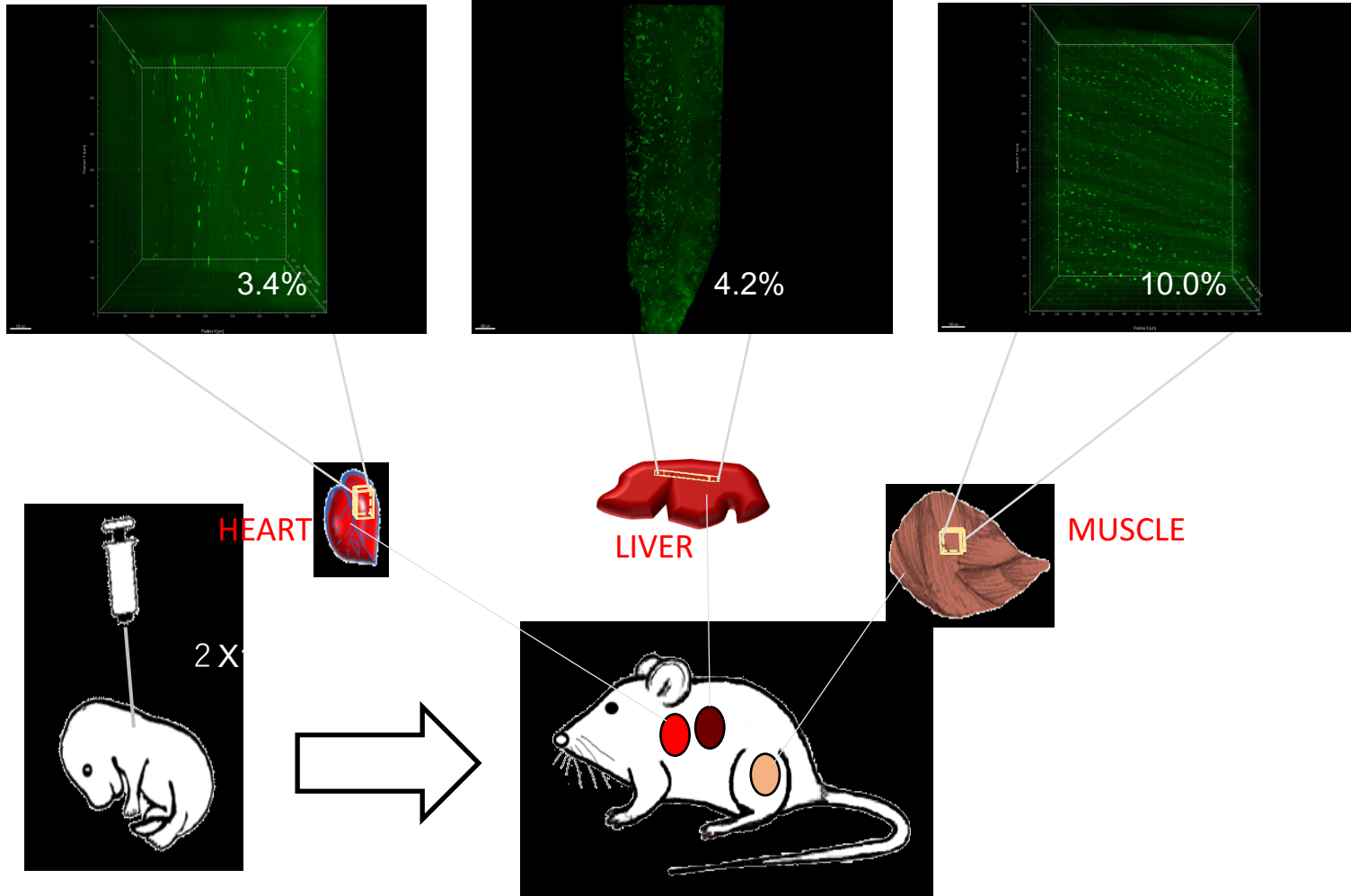


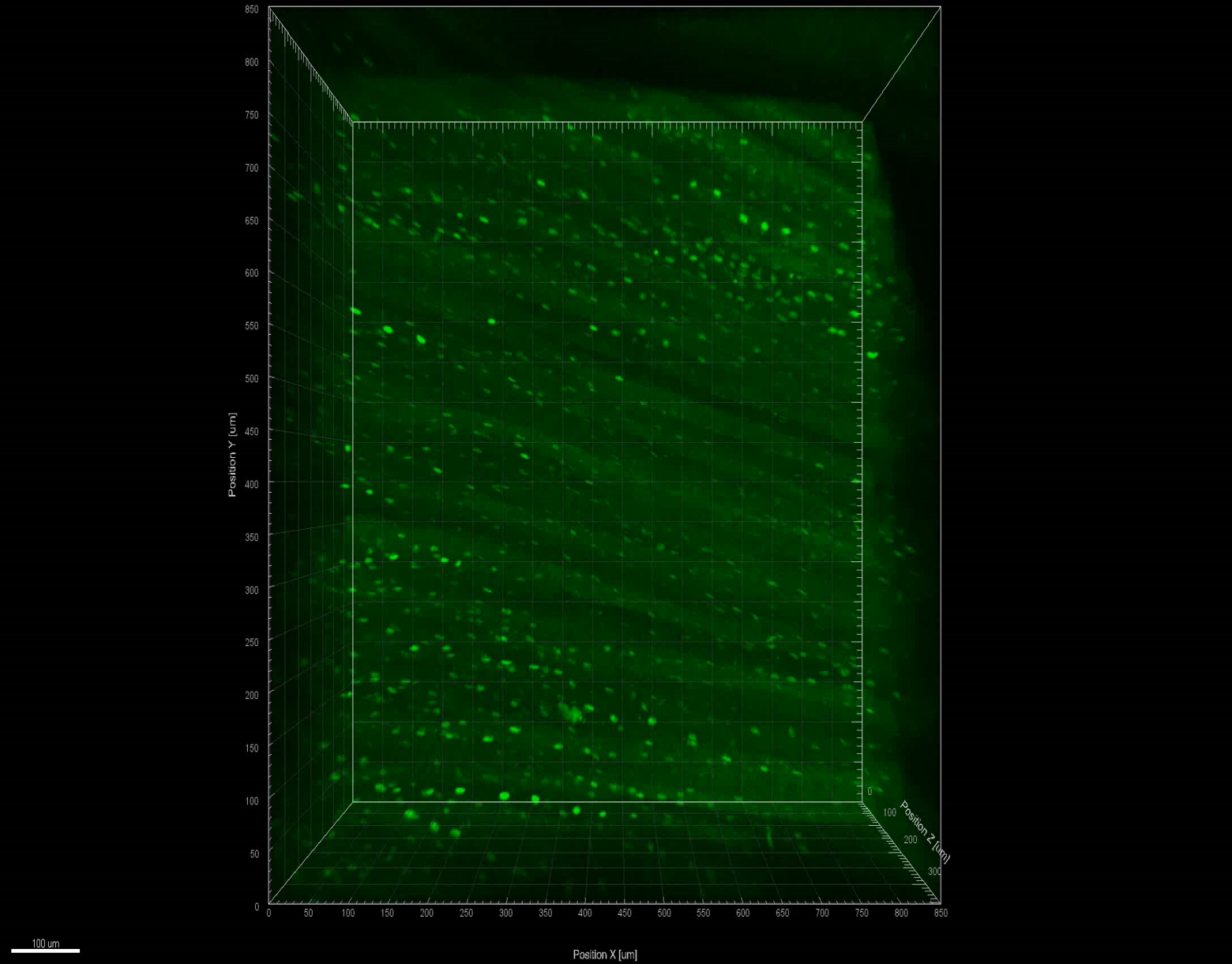
Ai14 mouse



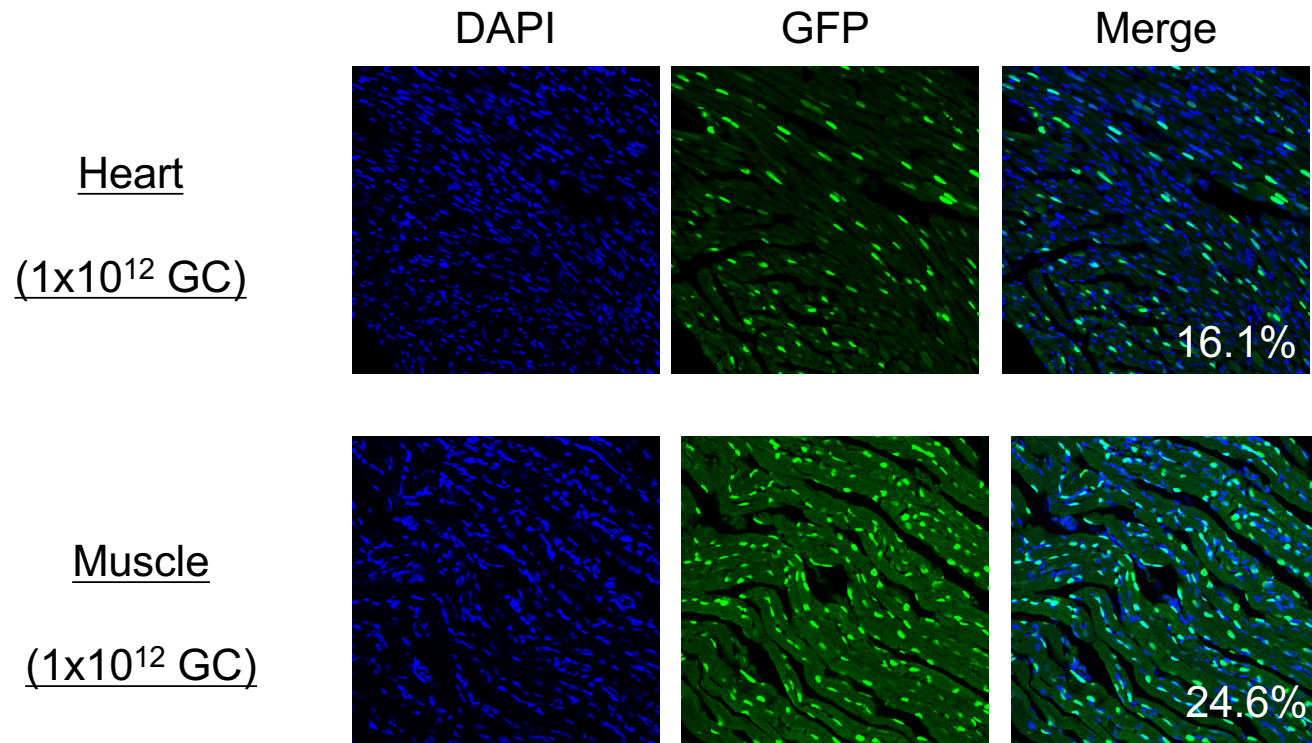
静脈注射

# アデノ随伴ウイルスを用いたHITIシステムによる 成体マウスの全身での遺伝子改変



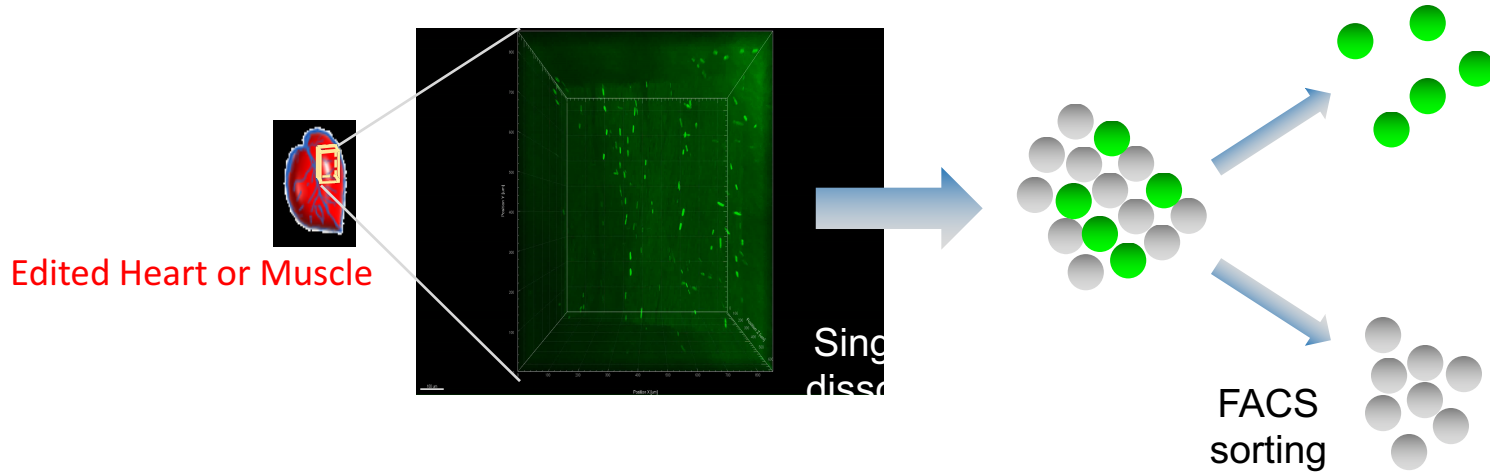


# 高力価アデノ随伴ウイルスを用いたHITIシステムによる 成体マウスの全身での遺伝子改変

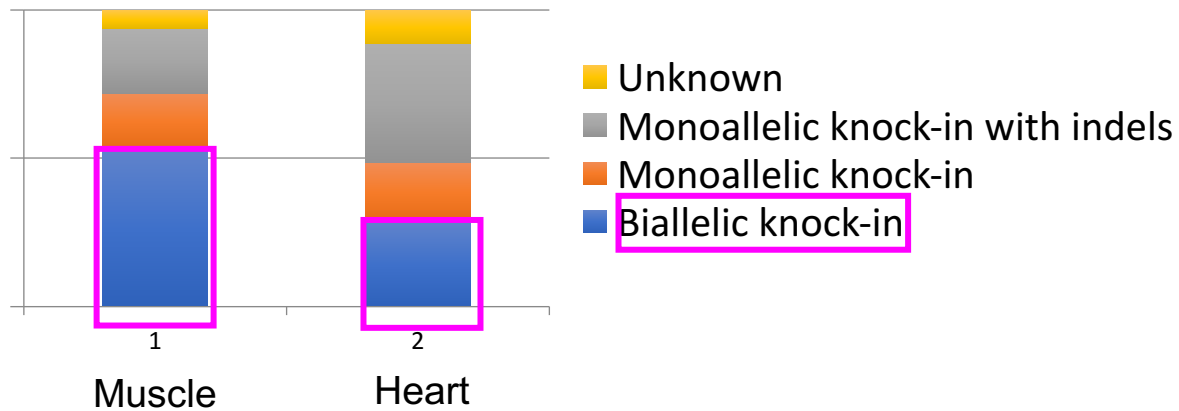


# 単一細胞分析： Single cell analysis

## 感染細胞を個々に調べる



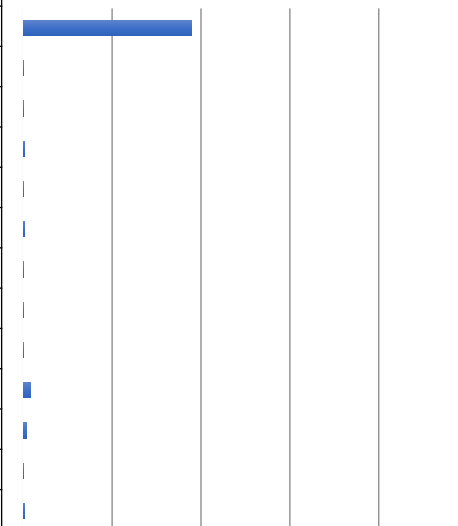
### Single cell genotyping



# 次世代シーケンスを用いたHITIの安全性テスト

Indel (%)

#	Chromosome	Position	Sequence	PAM	% indel (MLE)
<b>On_Target</b>	chr6		GAGGAACTTCTTAGGGCCCGCGG	CGG	18.9170
<b>OTS1</b>	chr13	9534141	CAGGAACTTCTTAGGTCCCGTGG	TGG	0.0001
<b>OTS2</b>	chr14	85157555	CGGAACATCTTAGGGCCCGGG	GGG	0.0001
<b>OTS3</b>	chr2	74925639	GGAGTACTTCTTAGGGCCACAG	CAG	0.1400
<b>OTS4</b>	chr15	69159526	CAGGAACATTAGGGCCAGGG	GGG	0.0001
<b>OTS5</b>	chr12	100704049	CAGGAACATGTTAGGGTCCGAGG	AGG	0.2150
<b>OTS6</b>	chrX	91969928	CAGGAACGTGTTCTGGGCCCGCGG	CGG	0.0001
<b>OTS7</b>	chrX	92043584	CAGGAACGTGTTCTGGGCCCGCGG	CGG	0.0001
<b>OTS8</b>	chr10	17440682	CAGGAACTTCTTAGTGCCCTAAG	AAG	0.0040
<b>OTS9</b>	chr18	25702486	GTGGACCTTTTCAGGGCCCGTGG	TGG	0.7840
<b>OTS10</b>	chr18	9212447	GAGGCCCTCTTCGGGCCCGGAG	GAG	0.3880
<b>OTS11</b>	chr14	46862821	GTGGAGCATCTTAGGGCCAGTGG	TGG	0.0001
<b>OTS12</b>	chr12	31652981	GAGCAACAACCTTAGGGCCTGCAG	CAG	0.1970





# Retinitis pigmentosa (RP) 網膜色素変性症

- 比較的によく見られる遺伝性網膜疾患の一つで日本人の罹患率は四千から八千分の一とされている。
- 進行性に網膜の桿体光受容体細胞と網膜色素上皮細胞が障害される。
- 現在までに54個の原因遺伝子が見つかったいる (*RP1*, *RP2*, *MERTK* など)。



<http://www.blindness.org/retinitis-pigmentosa>

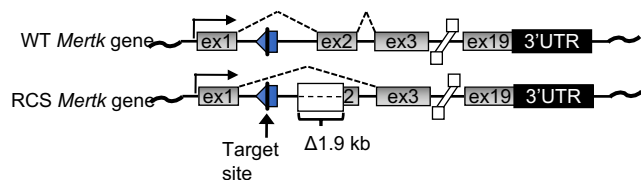
## モデル動物



Retinal degeneration model rat  
(RCS rat)

- ヒト網膜色素変性症のモデル動物。原因遺伝子 *Mertk* 遺伝子の欠失変異個体。網膜障害は3週齢より進行する。

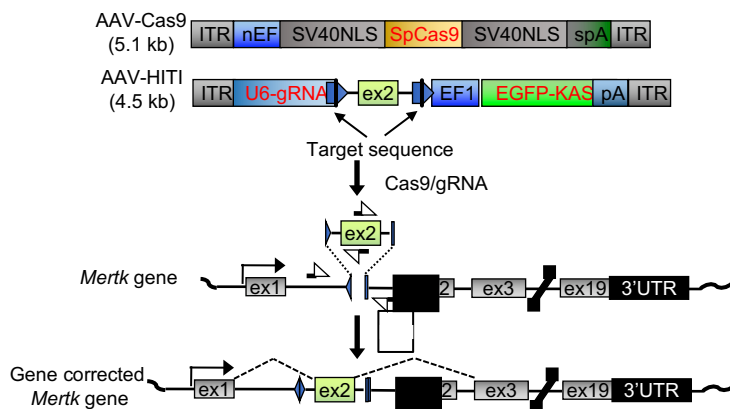
# HITIを用いた網膜色素変性症 モデルラットの治療の試み



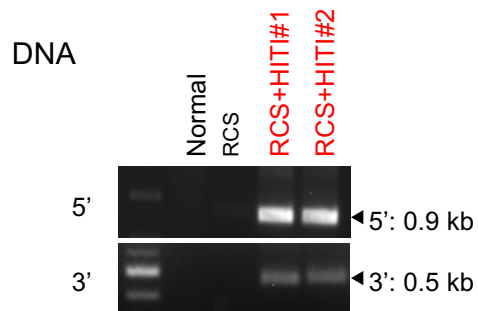
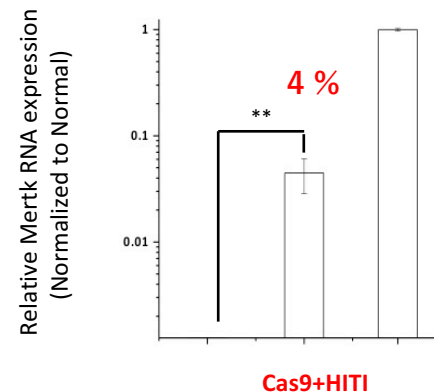
網膜に局所注射 解析

3 週齢

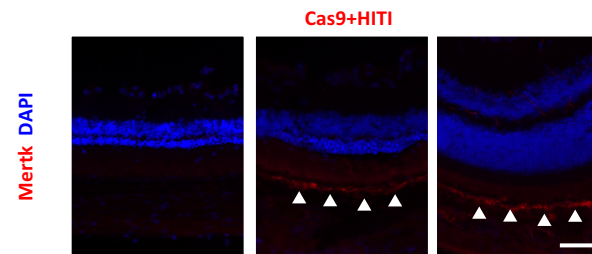
7-8 週後



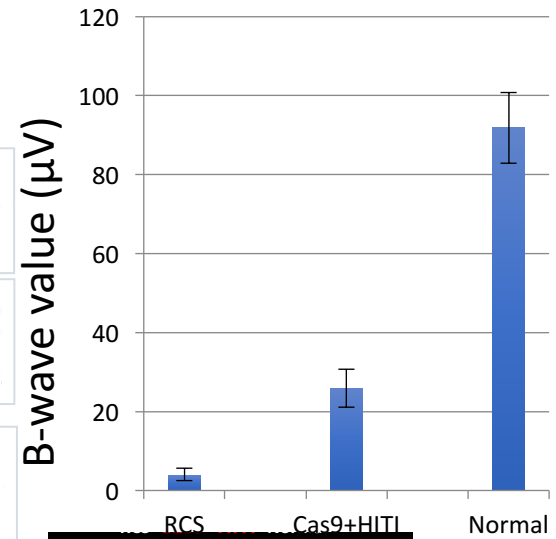
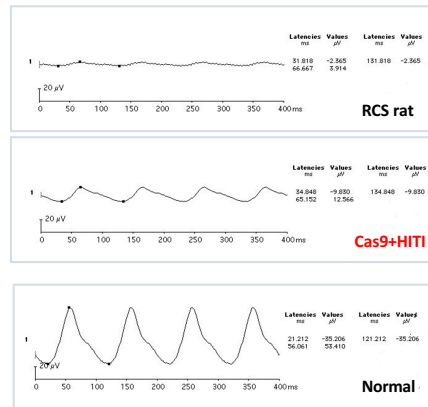
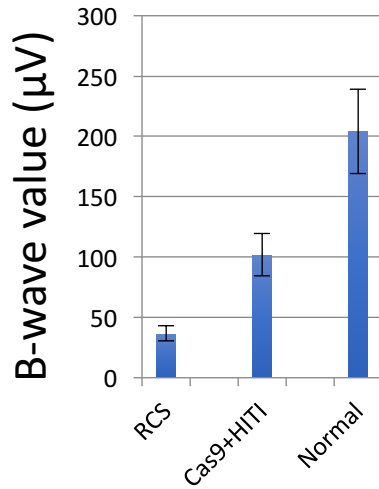
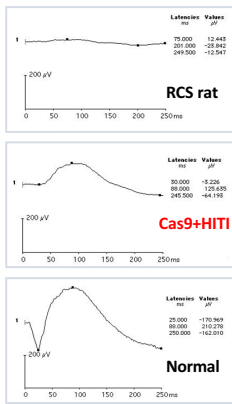
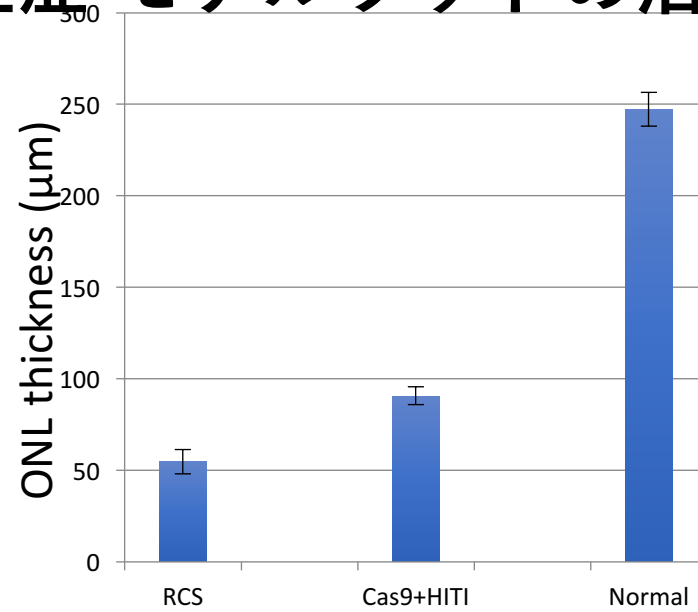
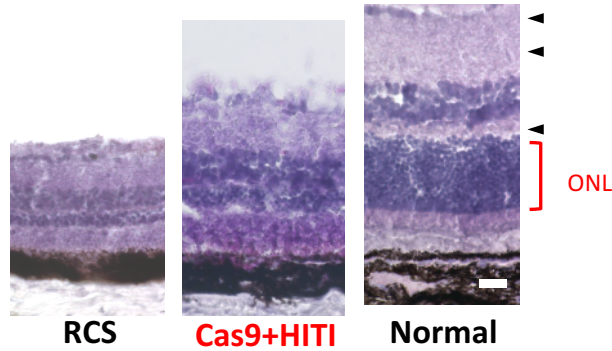
mRNA



Protein



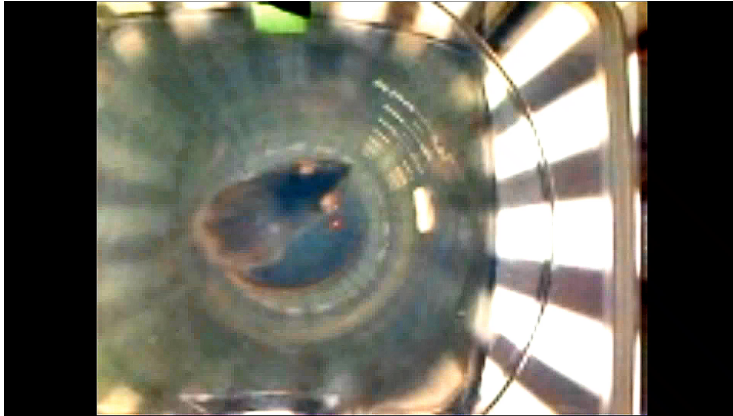
# HITI法によるの網膜色素変性症 モデルラットの治療一結果



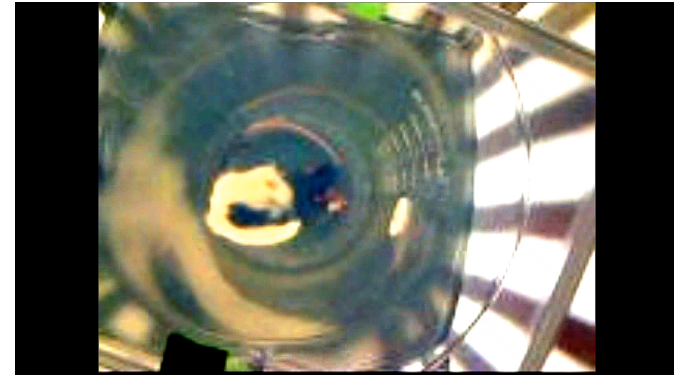
# HITI法によるの網膜色素変性症 モデルラットの治療一結果

OKN recording (8 weeks rats)

Normal



Retinitis model



Treated by HITI method



# HITI法による遺伝子挿入のまとめ

## アドバンテージ

- 非分裂細胞への効率のよい遺伝子ノックインがHITI法によって可能になった。
- 理論上かなり多くの遺伝病が将来治療の対象となる。
- 例：遺伝子活性が存在しないため引き起こされる劣性遺伝の遺伝病  
突然変異のため、病原タンパク質が産生されてしまう疾患など
- 全身性のAAV感染を行わない限り、子孫個体に受け継がれることはない。

## 問題点

- off target効果：標的遺伝子以外の箇所が切断され、ドナー配列の挿入が起こり得る。

## 改善策

- off targetの少ないgRNAを選ぶ。
- EspCas9の様にoff target effectが起きにくいCas9を使う。

# 参考資料

## 2015年の技術水準における各ヌクレアーゼの比較 <sup>[27]</sup>

	ZFN	TALEN	Platinum TALEN	CRISPR/Cas9
DNA結合ドメイン	ジンクフィンガー	TALE	TALE (改良型)	ガイドRNA
DNA切断ドメイン	FokI	FokI	FokI	Cas9
部位選択の自由度	限定的	中程度	中程度	ほぼ全部
ヌクレアーゼの構築	困難	中程度	容易	容易
インビボでの試験	困難	困難	困難	容易
ターゲティング効率	小さい	中程度	大きい	大きい
オフターゲット	小さい	小さい	小さい	大きい
多重化	困難	困難	困難	容易
実験効率	中程度	中程度	大きい	大きい
実験費用	中程度	中程度		低価格