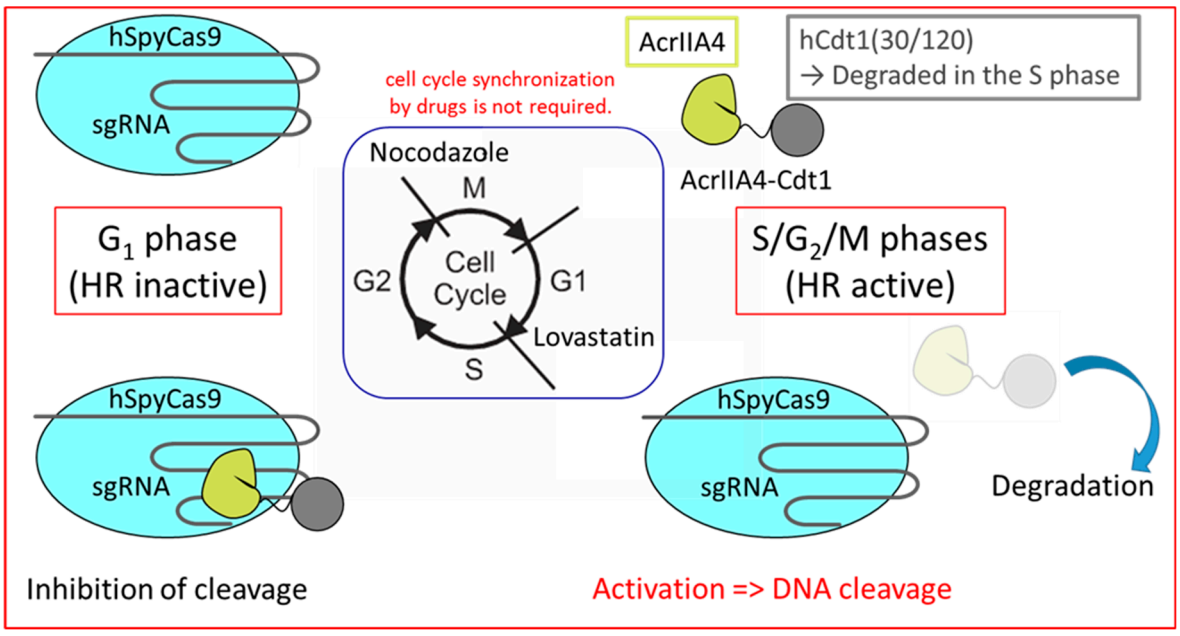
101　高精度ゲノム編集用ウイルスデリバリー技術の構築	野村　渉

【目的】ゲノムを構成する塩基配列を容易に置換、変換する手法として CRISPR-Cas システムを利用したゲノム編集技術が急速に発展し、細胞治療法や遺伝子治療への応用も期待されている。哺乳動物細胞をはじめ、適用範囲の拡張が進められており、塩基配列変換手法として中心的な役割を担う。その一方で、解決すべき課題も挙げられており、その中でも最も重要な課題の一つと考えられるのがオフターゲット作用の抑制である。また、Cas ヌクレアーゼ切断後の修復パスウェイのうち相同組換えでは外部ドナー配列を加えることで修復後に生成する配列を制御できるため、より精密なゲノム編集が可能になる。本研究では細胞周期を利用した手法を開発することによって外部刺激の必要ない高精度なゲノム編集方法の開発、またその *in vivo* への利用を見据えたデリバリー手法の確立を目的とした。

【方法】汎用されている SpCas9（*Streptococcus pyogenes* 由来）に対して阻害作用を有している Anti-CRISPR である AcrIIA4 を利用して、G1 期特異的に発現する Cdt1 ドメインとの融合体を構築した。これによって G1 期では AcrIIA4 - Cdt1 が Cas9 を阻害し、非相同末端結合（Non homologous End Joining）による修復過程が抑制され、G1 期以外の細胞周期においては Cas9 が活性化されるため、相同組換えによる正確な修復過程が優先して起こると考えられた。AcrIIA4 - Cdt1 融合タンパク質と Cas9 を細胞内において等量発現させるためにエピソーマルベクター上に T2A ペプチド配列を介してそれぞれの遺伝子を搭載した。また、ドナー遺伝子には環状プラスミドと ssODN を利用して効率の比較を行った。アデノ随伴ウイルス（Adeno associate virus：AAV）ベクターでは搭載できる遺伝子サイズが限定されるため、*SpCas9* の前半部分と後半部分の遺伝子を 2 種類のベクターに分けることで、細胞への導入後に *SpCas9* 遺伝子が再構成されて全長の SpCas9 が発現する手法を利用することにした。

【結果】SpCas9 と AcrIIA4-Cdt1 を同時に発現させることで相同組換え効率が向上していることが示された。さらに、オフターゲット作用の抑制にも効果があることが示された。また、ssODN を利用することで相同組換え効率がより向上することが示された。オフターゲット作用をより効率的に抑制する手法としてガイド RNA の配列認識部位の長さを短くすることが有効であると考えられた。外部からの刺激を必要としない仕組みのため、細胞に対する毒性も低く、*in vivo* での利用にも適しているゲノム編集技術として期待されるため、AAV ベクターを利用したデリバリーの適用も進めていく。

細胞周期特異的な発現量変化とアンチクリスパーを利用した高精度ゲノム編集技術の概要



101. 高精度ゲノム編集用ウイルスデリバリー技術の構築

野村　渉

広島大学 大学院医系科学研究科（薬） 創薬標的分子科学研究室

Key words：クリスパーキャス，ゲノム編集，細胞周期，相同組換え

緒　言

CAR-T 治療などに代表される細胞治療法や遺伝子治療、核酸医薬品など、いわゆるバイオ医薬品の利用はこれまでに多くのブロックバスターを担う抗体を中心とした医薬品市場を根本から変えていく可能性を示している。これらの治療法に深く関わり、利用が進んでいくと考えられる技術としてゲノム編集技術が挙げられる。ゲノムを構成する塩基配列を容易に置換、変換する手法として CRISPR-Cas システムを利用したゲノム編集技術が急速に発展している［1～3］。CRISPR-Cas システムで SpCas9 が最初に哺乳動物細胞で利用できることが示され、適用範囲の拡張が進められている。DNA 二重鎖切断だけではなく、様々な利用方法が提案されてきており、細胞における塩基配列変換手法として中心的な役割を今後も果たしていくと期待される。一方で、解決すべき課題も挙げられており、その中でも最も重要な課題の一つと考えられるのがオフターゲット作用の抑制である。Cas ヌクレアーゼによる切断後に起こる修復過程においては非相同末端結合（Non homologous End Joining：NHEJ）と相同組換え（Homologous Recombination：HR または Homology-Directed Repair：HDR）の 2 つのパスウェイが存在することが知られているが、HR／HDR では外部ドナー配列を加えることで修復後に生成する配列を制御できるため、より精密なゲノム編集が可能になる。NHEJ では様々な配列が生成するため、目的配列をもつ細胞をゲノム編集後に選抜するために労力を要する。そのため、HR／HDR を優位に起こす手法が様々に考案されているが、薬剤の添加や光刺激など外部からの刺激を必要とする手法では *in vivo* での応用などにおいて制限が加わる。そこで、本研究では細胞周期を利用した手法を開発することによって外部刺激の必要ない高精度なゲノム編集方法の開発を目的とした。また、*in vivo* での応用では CRISPR-Cas のデリバリー手法が必要となるためアデノ随伴ウイルス（Adeno associate virus：AAV）を利用した手法への適用も検討する。

方法および結果

1. 細胞周期特異的な CRISPR-Cas9 の活性化システム

DNA 二本差切断後に起こる NHEJ、HR／HDR のパスウェイは細胞周期に依存していることが知られており、G1 期においては NHEJ、G2/S 期においては HR／HDR がそれぞれ優位に働いている（図 1a）［4］。これまでに、G2/S 期で発現量が増大する Geminin を Cas9 に融合した Cas9 - Geminin を利用することで HR／HDR 効率の向上を試みた報告があったが、1.6 倍程度の効率向上に留まっていた［5］。Geminin はユビキチン-プロテアソーム系によって分解を受けるため、分子量が大きい Cas9（約 160 kDa）との融合体では分解速度が遅くなっているのではないかと推測できた。そこで、汎用されている SpCas9（*Streptococcus pyogenes* 由来）に対して阻害作用を有している Anti-CRISPR である AcrⅡA4 を利用することを着想した。すなわち、G1 期特異的に発現する Cdt1 ドメインと AcrⅡA4 を融合することで、G1 期では AcrⅡA4 - Cdt1 が Cas9 を阻害し、NHEJ による修復過程が抑制されることが期待された（図 1b）。G1 期以外の細胞周期においては Cas9 が活性化しているため、HR／HDR による正確な修復過程が優先して起こる。

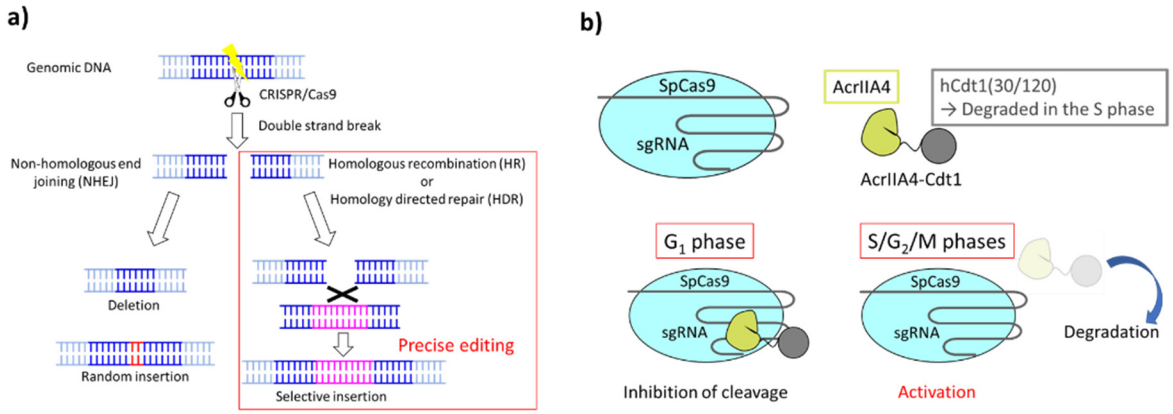


図 1. ゲノム編集に関係する修復パスウェイと細胞周期に依存したタンパク質分解の利用について

a) ヌクレアーゼによる DNA 切断後に NHEJ と HR／HDR の経路によって変異が導入される。

b) Anti-CRISPR と Cdt1 を利用した細胞周期を限定した SpCas9 の活性化システムを示す。G1 期では AcrⅡA4 によって SpCas9 は阻害された状態であり、S 期に移行した場合に Cdt1 が分解を受け、SpCas9 の活性が回復する。

まず、SpCas9 発現ベクターと Cdt1 - AcrⅡA4 発現ベクターを構築して、293A 細胞にトランスフェクションにて導入することでゲノム編集効率に対する影響を検討した。その結果、AcrⅡA4 単独のドメインを SpCasa9 と同時にトランスフェクションした場合と比較して AcrⅡA4 - Cdt1 融合体の場合は阻害効果が若干低下していることが確認された。また発現プラスミドの導入量比を変化させた場合に阻害効果が異なることも示された。そのため、AcrⅡA4 による阻害効果を向上させるためには SpCas9 との発現量を同等程度に保つ必要があると考えられた。そこで、*SpCas9* と *AcrⅡA4+Cdt1* の各遺伝子を同一のエピソーマルベクター上に搭載し、自己分解性ペプチド（T2A）配列を介した状態で発現されるように設計した。これによって、①エピソーマルベクターによる細胞分裂と同期した自己複製が起こる、②SpCas9 と AcrⅡA4＋Cdt1 が等量発現される、という 2 つの利点がもたらされると考えられた。HDR ではドナー配列を利用する修復が起こるため、ドナーDNA として環状プラスミドも同時に導入する手法を取った。その結果、HDR 効率は 1.3 倍程度の向上が確認されたため、より高い効率を得るには導入方法やドナーDNA の改善が必要であると考えられた（図 2a）。標的配列に類似する配列におけるオフターゲット作用を検出、定量した結果、SpCas9 だけを利用したゲノム編集では約 8%近くのオフターゲット作用が見られるが、Anti-CRISPR＋Cdt1 を SpCas9 と同時に発現させた場合ではオフターゲット作用が全く観察されず、劇的に抑制されていることが明らかになった（図 2b）。オフターゲット作用が抑制される理由として、ドナー配列には標的配列に当たる部分の両端に 50～100 塩基程度の相同配列が付加しているため、HDR を介した修復が優先して起こる細胞周期においてはオフターゲット配列での修復（変異導入）が抑制されていると考えられた。

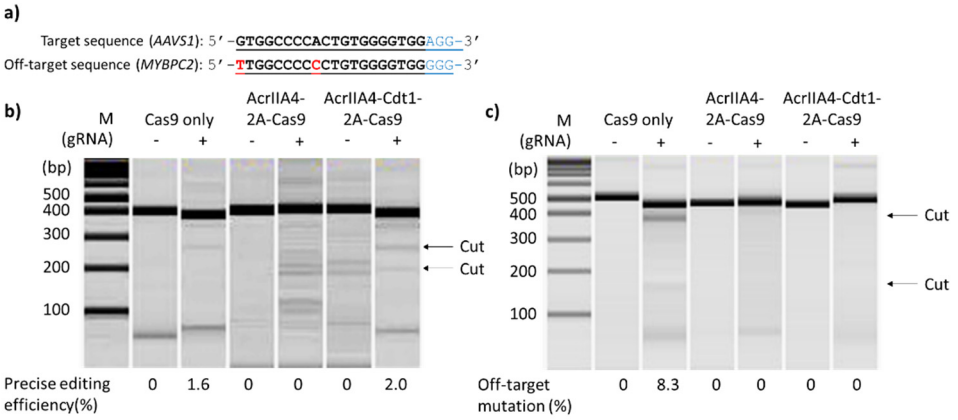


図 2. HDR 効率の向上作用とオフターゲット作用の抑制について

a) 標的配列に使った AAVS1 の配列とオフターゲット候補配列について。

b) Cas9／AcrⅡA4 の組み合わせによる HDR 効率への影響。Cas9 のみの場合と比較して Cas9／AcrⅡA4 - Cdt1 では約 1.3 倍の向上が認められた。Cas9／AcrnⅡA4 では HDR 効率は低下している。

c) Cas9／AcrIIA4 の組み合わせによるオフターゲット作用への影響。Cas9 のみの場合は約 8%と比較的高いオフターゲット作用が見られたが、Cas9／AcrIIA4 - Cdt1 ではオフターゲット作用が検出されなかった。

2. 相同組換え効率の向上とオフターゲット作用抑制効果

細胞周期特異的に発現量が変化する Cdt1 と Cas9 阻害作用のある AcrⅡA4 を組み合わせることで Cas9 の活性を制御することが示されたが、さらに HDR 効率の向上が必要であると考えられた。そのために、ドナーDNA として 1 本鎖 DNA である ssODN を利用することにした。ssODN によって HDR が起こった場合には標的配列に制限酵素 HindⅢで切断される配列が導入される。そのことから、ゲノム編集後の細胞からゲノム抽出を行い、標的配列近傍を PCR で増幅し、得られたフラグメントの HindⅢによる切断効率によって定量できる（図 3a)。標的とする遺伝子についても *AAVS*、*VEGFA*、*EMX1* の 3 種類に拡大して HDR 効率とオフターゲット作用について検討した。いずれの標的配列においても HDR 効率の向上とオフターゲット作用の抑制が示された。*EMX1* 遺伝子の場合では HDR 効率が約 4 倍に向上し、オフターゲット作用についても、確認した 2 箇所の配列（HCN1、MFAP1）のいずれにおいても大幅な抑制が確認された（図 3b)。HDR 効率の向上に加えてさらにオフターゲット作用を抑制する方法として、ガイド RNA の標的認識配列（プロトスペーサー配列）を通常 SpCas9 では 20 塩基を利用するところ、17～18 塩基に短縮する方法を適用した。この場合、標的配列によっては SpCas9 単独で作用させた場合でも大幅にオフターゲット作用が抑制されていることが示された。HDR 効率の向上は確認されているため、オフターゲット作用の予測は現時点でも非常に難しいため標的配列によらず短いプロトスペーサー配列を利用することが有効なアプローチの一つとなると考えられる。

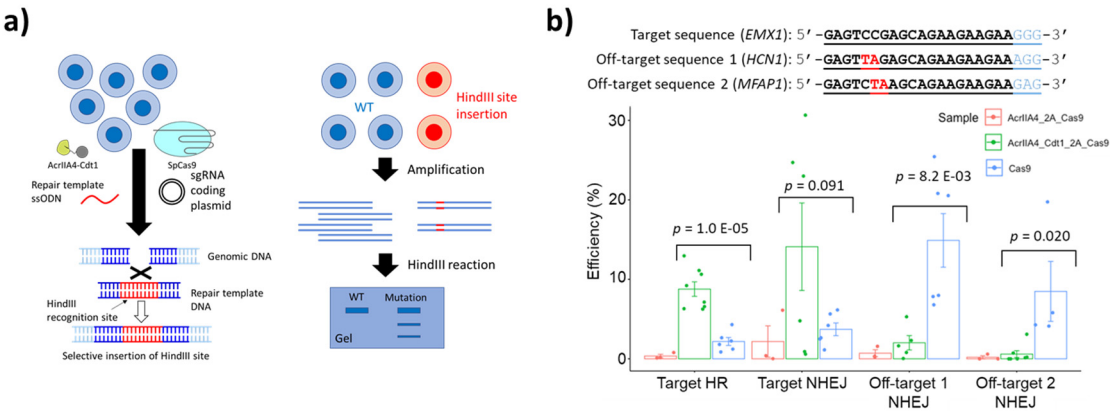


図 3. ssODN を用いた HDR 効率の向上作用とオフターゲット作用の抑制について

a) ssODN を利用した HDR 反応と HindⅢ切断を利用した検出方法について。

b) Cas9／Acr Ⅱ A4 の組み合わせによる HDR 効率への影響。Cas9 のみの場合と比較して Cas9／Acr Ⅱ A4 - Cdt1 では約 1.3 倍の向上が認められた。Cas9／AcrIIA4 では HDR 効率は低下している。

3. AAV ベクターを利用した発現システムへの応用

エピソーマルベクターと同じ複製機能を有しており、かつ細胞・組織へのデリバリー効率が優れていて、臨床での利用も増えてきている AAV ベクターが利用できると期待された。AAV ベクターでは搭載できる遺伝子サイズに制限があることが大きな課題として残っており、特に CRISPR-Cas システムのような分子量の大きいタンパク質ではハードルが高い。そこで *SpCas9* 遺伝子の前半部分と後半部分を別のウイルスベクター上にコードする手法を利用することにした。このベクターを利用することで AAV を標的細胞に感染後に *SpCas9* 遺伝子が再構築されて SpCas9 が発現される。現在、上記 3 種類の標的遺伝子における AAV デリバリーを利用したゲノム編集については SpCas9 の発現とともに TIDE 法によって検出されている。今後、T2A を利用した AcrIIA4 - Cdt1 との共発現系を構築することで AAV デリバリーを利用したゲノム編集法における細胞周期依存的な Cas9 活性化の有効性を確認する予定である。

考　察

ゲノム編集技術における HDR 効率の向上は精度の高い編集効果を得るために特に重要な課題である。これまでにも NHEJ を抑制する薬剤の利用や、特定の細胞周期で作用させるため細胞同期を利用する手法なども報告されてきている。一方、より安全なゲノム編集を実現するためにはオフターゲット作用を可能な限り抑制することは必須である。この点においても、これまでにヌクレアーゼの作用時間を短縮する手法などが報告されている。いずれの場合においても外部からの刺激などが必須である、あるいは細胞への導入手法が限られるなどの理由から、その利用には制限が存在した［6～9］。今回の手法では、細胞周期を利用するという特徴から特に外的な刺激を必要とせず、*in vivo* での利用も可能であるという特徴が示された［10］。また、CRISPR-Cas システムでは SpCas9 の他にも様々なタイプの Cas が存在していることが分かっており、それぞれに対する Anti-CRISPR が存在している。SpCas9 だけでなくその他の単一タイプの Cas の分子量も比較的大きく、Type-I に分類される Cas では複数のユニットが必要とされる。従って、Anti-CRISPR によって活性を制御する手法はいずれの種類においても有効であると考えられる。今後は細胞周期特異性と Anti-CRISPR を利用した HDR 効率の向上、オフターゲット作用抑制効果について幅広い CRISPR-Cas システムで適用可能であることを示すことで、多数存在するゲノム編集技術の手法の中でも重要な位置づけとなる技術への成長が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するに当たり共同研究者としてご協力いただいた広島大学大学院医系科学研究科創薬標的分子科学研究室の松本大亮博士に感謝いたします。広島大学医系科学研究科において新たに研究室を立ち上げ、研究を開始するにあたって、上原記念生命科学財団からのご支援は大きな力となりました。改めて御礼申し上げます。

文　献

1) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745249 DOI: 10.1126/science.1225829

2) Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 2013 Feb 15;339(6121):823-6. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23287722 DOI: 10.1126/science.1232033

3) Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23287718 DOI: 10.1126/science.1231143

4) Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. Cell Cycle. 2008 Sep 15;7(18):2902-6. PMID: 18769152 DOI: 10.4161/cc.7.18.6679

5) Gutschner T, Haemmerle M, Genovese G, Draetta GF, Chin L. Post-translational regulation of Cas9 during G1 enhances homology-directed repair. Cell Rep. 2016 Feb 16;14(6):1555-1566. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26854237 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.019

6) Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nat Biotechnol. 2015 Feb;33(2):139-42. PMID: 25643054 DOI: 10.1038/nbt.3149

7) Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. Elife. 2014 Dec 15;3:e04766. PMID: 25497837 DOI: 10.7554/eLife.04766

8) Matsumoto D, Tamamura H, Nomura W. TALEN-Based Chemically Inducible, Dimerization-Dependent, Sequence-Specific Nucleases. Biochemistry. 2020 Jan 21;59(2):197-204. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31603654 DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00798

9) Matsumoto D, Nomura W. Molecular Switch Engineering for Precise Genome Editing. Bioconjug Chem. 2021 Apr 21;32(4):639-648. Epub 2021 Apr 7. PMID: 33825445 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00088

10) Matsumoto D, Tamamura H, Nomura W. A cell cycle-dependent CRISPR-Cas9 activation system based on an anti-CRISPR protein shows improved genome editing accuracy. Commun Biol. 2020 Oct 23;3(1):601. PMID: 33097793 DOI: 10.1038/s42003-020-01340-2