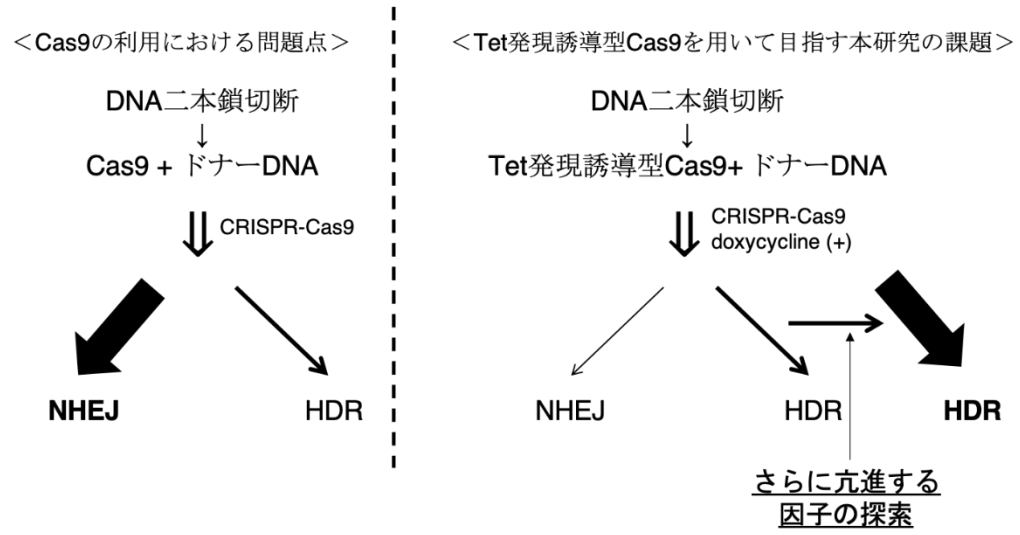
222　不活性型Cas9を用いた新規相同組換え修復因子の探索	加藤　朋子

【目的】CRISPR-Cas9 を中心としたゲノム編集技術は、遺伝性疾患に対する効果的な治療法として注目されている。特に疾患の原因となる変異の修復が高精度に実現されれば、生体内で直接ゲノムを編集することが可能となり、医療応用への期待を更に加速させる。ゲノム編集はゲノム DNA の二本鎖切断後に、ドナーDNA を用いた相同組換えを介して正確な修復を行う HDR と、ランダムな欠失や挿入を伴いながら修復を行う NHEJ によって生じる。しかし、一般的な条件では、HDR に比べて NHEJ がはるかに強く誘導されてしまうことが、医療応用の実現に向けて大きな障壁となっている。本研究では、他の細胞に比べて HDR 活性が高い HEK293T 細胞由来 cDNA ライブラリを用いて、過剰発現により、CRISPR-Cas9 が誘導する HDR を亢進する因子のスクリーニングを行う。本研究で見出された新規の HDR 因子は、疾患ゲノム変異を正確に修復するための医療技術にも応用できることが期待される。

【方法】本研究では FACS ソーティングが必要になるため、ヒト白血病由来 K562 細胞を用いた。HDR と NHEJ の同時活性測定が可能な Traffic Light レポーター、Tet 発現誘導型 Cas9 及び gRNA のそれぞれを Nucleofection により導入し、薬剤選択によって単一クローンを得た。樹立した細胞にドナーDNA を Nucleofection すると同時に、HEK293T 細胞由来の cDNA Library（Lentivirus として導入）と Cas9 の発現を ON にするための doxycyclin を添加した。1 週間後に顕微鏡下で蛍光観察を行い、FACS ソーティングにより HDR が生じている細胞（EGFP 陽性細胞）と NHEJ が生じている細胞（mCherry 陽性細胞)をそれぞれ分取した。分取した細胞からゲノムを抽出し、レンチウイルスベクター特異的なプライマーを用いて PCR により増幅し、その配列を Sanger sequence により確認した。

【結果】K562 細胞に Traffic Light レポーター、Tet 発現誘導型 Cas9 及び gRNA を Nucleofection し、薬剤選択により単一クローン化した細胞（K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞）を樹立した。この細胞は、doxycyclin 存在下で HDR 及び NHEJ 活性を誘導することができた。この細胞を用いてドナーDNA の Nucleofection、Lenti-HEK293TcDNA Library 及び doxycyclin の添加を行った上で FACS ソーティングを行ったところ、EGFP 陽性細胞と mCherry 陽性細胞をそれぞれ分取できた。また、これらの細胞のゲノムを抽出し、レンチウイルス特異的なプライマーを用いて配列を確認したところ、それぞれの集団で特異的な遺伝子配列を見出すことができた。

Cas9 の利用における問題点と Tet 発現誘導型 Cas9 を用いて目指す本研究の課題



222. 不活性型 Cas9 を用いた新規相同組換え修復因子の探索

加藤　朋子

*東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野

Key words：CRISPR-Cas9，HDR 亢進因子，スクリーニング，Traffic light reporter，Tet 発現誘導型 Cas9

緒　言

世界に蔓延する疾患には遺伝性要因により、化学療法を中心とした治療法では劇的な効果が認められないものが数多く存在する。しかし、近年の CRISPR-Cas9 を中心としたゲノム編集技術の台頭により、塩基単位の正確なゲノム修復が実現可能となり、変異を生体内で直接修復する治療も期待されている。ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療は、十分な安全性が担保されるならば、近い将来、効果的な治療法として確立されることが期待されるが、現状では正確なゲノム修復の誘導効率の低さが大きな障壁となっている。ゲノム編集は、ゲノム中の標的領域に DNA 二本鎖切断が誘導された後、共導入したドナーDNA を用いた相同組換えによる修復（HDR）、あるいは塩基欠失や挿入を伴う切断された DNA 末端の結合（NHEJ）のいずれかの経路を介して行われる。このうち正確なゲノム修復を可能にするのは HDR であるが、一般的に HDR に比べて NHEJ がはるかに高頻度に誘導されてしまうことが、医療応用の実現を困難にしている。

私の所属する研究室では、デジタル PCR を駆使した、HDR と NHEJ の活性の同時定量システムを独自に開発し［1］、HDR 活性を亢進するゲノム編集条件の確立を推進してきた。これまでに gRNA や Cas9 を改変するアプローチから、Cas9-gRNA 複合体と標的ゲノム DNA 間の相互作用を変化させることで、より正確にゲノムが編集されることを明らかにした［2］。本研究では、このような Cas9 や gRNA の改変と並行して利用可能な HDR 亢進因子や NHEJ 阻害因子の探索という観点で正確なゲノム編集の促進を目指す。これまでに、HDR 亢進因子である Rad51 や CtIP の過剰発現により、HDR が亢進すること［3，4］、また、NHEJ 阻害因子 i53 の過剰発現によって、HDR が亢進したという報告がある［5］。さらに、DNA 修復に関与するファンコーニ貧血の原因遺伝子ファミリーが、一本鎖ドナーDNA による HDR を亢進し、二本鎖ドナーDNA による HDR とは異なる因子が切断点に集積することが明らかになっている［6］。しかし、これらの実験結果を統合してもなお、CRISPR-Cas9 の分子機構の理解は部分的に過ぎず、NHEJ の抑制かつ HDR 亢進による正確なゲノム編集のみを誘導する系の確立に至っていない。この課題を克服するためには、ゲノムワイドなスクリーニングの中から新たな HDR 亢進因子を探索する必要があると考える。本研究では HDR と NHEJ を蛍光シグナルで効率よく検出できるレポーター細胞と不要なゲノムの切断を防ぎ、DNA 組換えを誘導する能力を持つ不活性型 dCas9 を用いて［7］、新規 HDR 亢進因子のスクリーニングを行う。

方法および結果

1. Traffic light レポーター導入 K562 細胞の作製

鎖状 Traffic light レポータープラスミド［8］をヒト白血球由来 K562 細胞へ Nucleofection により導入した。この鎖状レポータープラスミドは、欠失変異をもつ *EGFP* 遺伝子と、フレームシフト変異を含む *mCherry* 遺伝子が、2A ペプチドを挟んでタンデムに繋がっており、HDR 活性だけでなく、NHEJ 活性も一度の CRISPR-Cas9 の誘導で測定可能であることを特徴とする（図 1）。鎖状レポータープラスミドは染色体中にランダムに挿入されるため、175 μg/ml Puromycin による薬剤選択で目的の細胞を取得し、単一クローン化を行った。細胞数を十分に確保した後、レポーター遺伝子のコピー数を、Puromycin 耐性遺伝子を指標にデジタル PCR を用いて測定した。多数得られたクローンのうち、

*現在の所属：東京都医学総合研究所 疾患制御研究分野

約 25 コピーのレポーター遺伝子が挿入された細胞をレポーター細胞（K562-TLR）として樹立した（図 2A）。

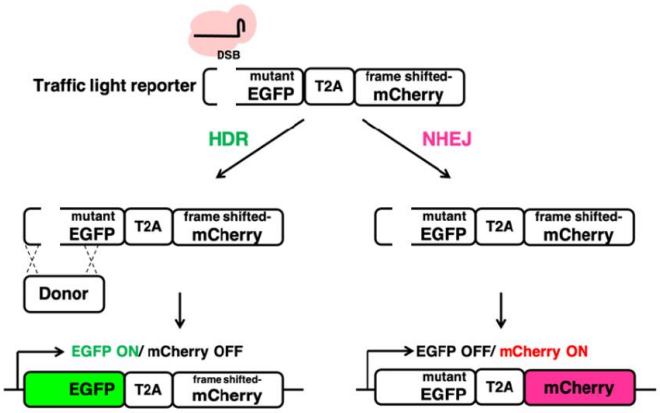


図 1. Traffic light レポーターシステムの概要

レポーターの蛍光標識発現は2パターンあり、向かって左側はHDRが生じた場合、右側はNHEJが生じた場合を示す。NHEJ はコドンの読み枠が合致した時のみ蛍光発現を呈するシステムになっているため、実際の NHEJ は実測値の 3 倍であることが見積もられる。

2. K562-TLR 細胞への gRNA の導入

Traffic light レポーターにおいて、欠失変異を持つ *EGFP* 遺伝子へのノックインを実現するための標的 gRNA を作製し、K562-TLR 細胞へ Nucleofection により導入した。gRNA は染色体中にランダムに挿入されるため、10μg/ml Blasticidin による薬剤選択で目的の細胞を取得し、単一クローン化を行った。クローン化した細胞は、Blasticidin 耐性遺伝子の 5'末端に融合させた HA タグを利用して免疫染色によりその発現を確認し、K562-TLR-EGFPgRNA 細胞として樹立した（図 2B）。

3. K562-TLR-gRNA 細胞への Tet 発現誘導型 Cas9 の導入

上述の通り、当初本研究に用いる Cas9 は不要なゲノムの切断を防ぎ、DNA 組換えを誘導する能力を持つ dCas9 を用いる計画であった。しかし、dCas9 による組換えは非常に効率が低いことや、DNA 二本鎖を解離させて組換えを誘導する事象が半強制的な反応である（通常の相同組換えとは異なる反応である）ことを理由に、dCas9 を用いた実験は一度保留することにし、Tet 発現誘導型 Cas9 を用いることにした。Tet 発現誘導型 Cas9 はヒト安全領域である AAVS1 サイトにノックインするように設計されており、これを K562-TLR-EGFPgRNA 細胞へ Nucleofection により導入した。その後、200μg/ml G418 による薬剤選択で目的の細胞を取得し、単一クローン化を行った。クローン化した細胞は doxycyclin 存在下、非存在下による HDR と NHEJ の活性を比較し、最も反応の良いクローンを選択した（図 2C）。さらにそのクローンについてサブクローニングを行い、K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞として樹立した（図 2D）。

4. HEK293T 細胞由来 cDNA ライブラリの作製

HEK293T 細胞に発現しているヒト遺伝子を対象にスクリーニングを行うため、細胞から RNA を抽出し、それをテンプレートに cDNA ライブラリを作製した。ライブラリ作製には市販のライブラリキットを使用し、レンチウイルスベクターに挿入したところ、2×10^5個程度の遺伝子ライブラリの作製を確認した。

5. レンチウイルスの作製

4 で作製したプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、常法に従ってレンチウイルスの作製を行った。レンチウイルス作製後、K562-TLR 細胞を使い、デジタル PCR によってタイターチェックを行った。その結果、コピー数 13.7 のレンチウイルスが作製できていたことを確認した（図 3A）。

6. 相同組換えに用いる EGFP donor の作製

Traffic light レポーターの欠失変異を持つ *EGFP* 遺伝子の配列を修正するドナーを作製した。ドナーは挿入配列の両端にそれぞれ 500 bp の相同アームを持たせるように設計し、プラスミドドナーDNA を作製した。

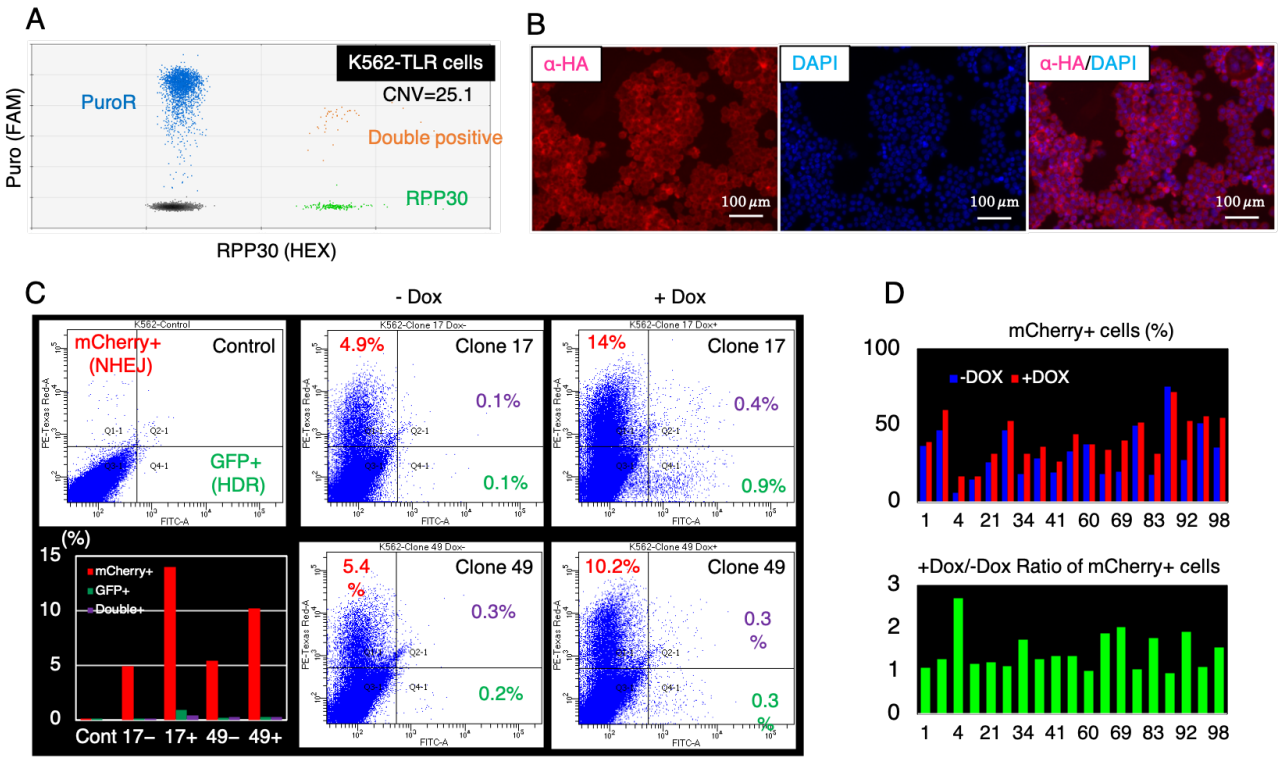


図 2. K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞の樹立過程

A) ddPCR による K562-TLR のコピー数の測定。レポータープラスミドに含まれている Puromycin 耐性遺伝子を指標にコピー数を測定したところ、約 25 コピー挿入されたクローンが存在することを確認した。RPP30 は内在性コントロールとして用いた。

B) K562-TLR-EGFPgRNA 細胞の抗 HA 抗体による免疫染色。Scale bar＝100 μm。

C) K562-TLR-EGFPgRNA 細胞に Tet 発現誘導型 Cas9 を導入した細胞での doxycyclin に応答した HDR と NHEJ の活性の一例。数 clone 検討したうち、Clone17 が最も doxycyclin に応答して HDR と NHEJ の活性が上昇した。

D) Clone17 のサブクローニングによる doxycyclin 存在下、非存在下による各々の mCherry 陽性細胞数と割合の比較。Subclone 4 が最も doxycyclin に応答して mCherry 陽性細胞数の割合を増加させており、この Subclone 4 を K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞として樹立した。

7. EGFP ドナー及び HEK293T 細胞由来の cDNALibrary の導入後の K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞における EGFP 陽性細胞（HDR）及び mCherry 陽性細胞（NHEJ）の分取

K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞を 2×10^7 個調製し、100 μg の EGFP ドナーを Nucleofection により導入した。その後、1 μg/ml の doxycyclin と MO＝5 になるように Lenti-HEK293TcDNA ライブラリを添加して培養を続けた。蛍光観察を行って EGFP 陽性細胞と mCherry 陽性細胞をそれぞれ発現していることを確認した上で、ドナー導入から 1 週間後に EGFP 陽性細胞と mCherry 陽性細胞の分取を FACS により行った。その結果、EGFP 陽性細胞を全体の 1.2%、mCherry 陽性細胞を全体の 3.4%分取できた（図 3B）。

8. ゲノム抽出とレンチウイルス由来配列の PCR による増幅

7 で分取した細胞についてゲノムを抽出し、レンチウイルスベクターのインサートの外側に設計したプライマーを用いて PCR を行った。増幅を確認したのち、その PCR 産物について TA クローニングを行い、Sanger sequence により配列を確認した。その結果、EGFP 陽性細胞、mCherry 陽性細胞それぞれに特異的な遺伝子の配列を見出すことができた。

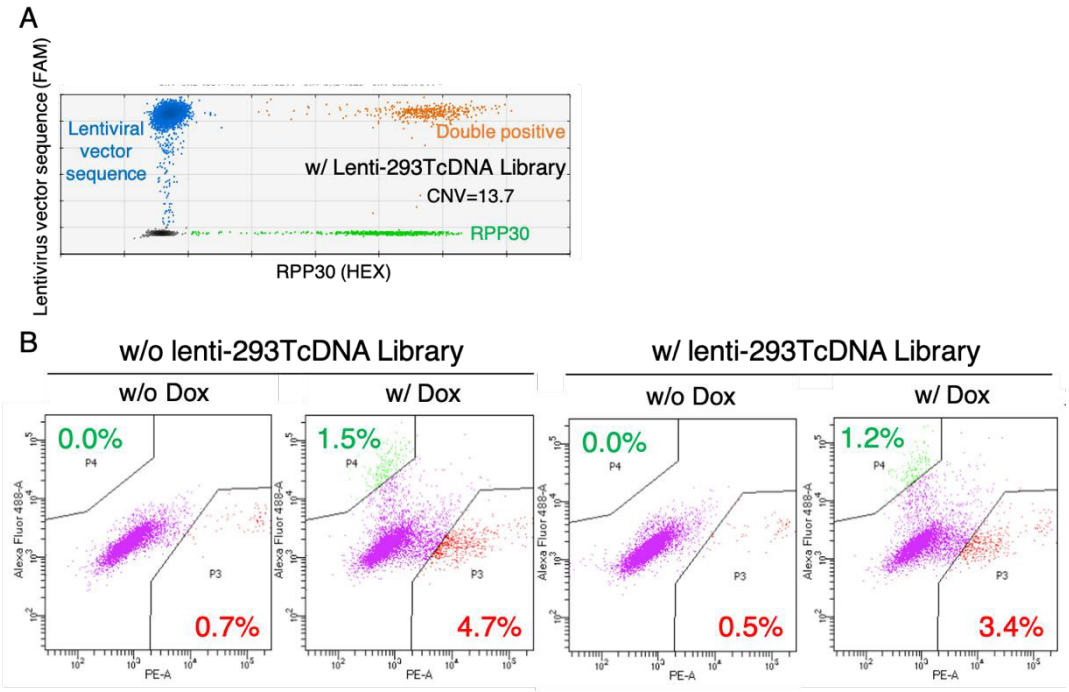


図 3. K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞を用いたスクリーニング

A) HEK293T 細胞由来 cDNALibrary のタイターチェック。レンチウイルスベクター由来の配列を指標にコピー数を測定したところ、13.7 コピー挿入されたクローンが存在することを確認した。RPP30 は内在性コントロールとして用いた。

B) EGFP ドナー及び HEK293T 細胞由来の cDNA Library の導入後の K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞における EGFP 陽性細胞及び mCherry 陽性細胞の割合。HEK293T 細胞由来の cDNA Library の有無、doxycyclin の有無は FACS 解析あるいはこの後のゲノム PCR のコントロールとして用いた。

考　察

本研究では Traffic light レポーター及び Tet 発現誘導型 Cas9 を用いて、生細胞において不要なゲノムの切断を防いで HDR 亢進因子のスクリーニングを行うことを特徴としている。今回樹立した K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞は、FACS ソーティングの結果を見る限りでは、上記の目的に即した反応性を示していると考えられる。スクリーニング実験はまだ十分なサンプル数が揃っていないが、今後サンプル数を増やした上で、次世代シークエンス解析を進めていき、複数回同じ遺伝子が挙がってきた場合は、候補遺伝子とし、Cas9 と共発現した時に HDR 亢進効果があるか否かを確認する。また、現在はプラスミドドナーDNA を用いた実験を中心に行っているが、今後は一本鎖ドナーDNA を用いた実験も進め、複数種のドナーの違いによるスクリーニング結果にも注目していきたい。当初の目的であった dCas9 を用いた研究は困難との判断から Tet 発現誘導型 Cas9 を用いた実験に切り替えたが、Cas9 nickase である Cas9D10A は Cas9 に比べるとより不要なゲノムの切断を防ぐことが期待されるため、将来的には Cas9D10A を用いたスクリーニングも検討していきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は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宮岡佑一郎プロジェクトリーダーである。また、上原記念生命科学財団による手厚いご支援を賜りましたこと、深く御礼申し上げます。

文 献

1) Miyaoka Y, Berman J.R., Cooper, S.B., Mayerl, S.J., Chan, A.H., Zhang B, Karlin-Neumann G.A. Conklin B.R. Systematic Quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. Scientific Reports. 2016 Mar 31; 6: 23549 PMID: 27030102 DOI: 10.1038/srep23549

2) Kato-Inui T, Takahashi G, Hsu S, Miyaoka Y. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair Nucleic Acids Res. 2018 May 18;46(9):4677-4688. PMID: 29672770 DOI: 10.1093/nar/gky264

3) Takayama K, Igai K, Hagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T, Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T, Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system Nucleic Acids Res. 2017 May 19;45(9):5198-5207. PMID: 28334759 DOI: 10.1093/nar/gkx130

4) Charpentier M, Khedher AHY, Menoret S, Brion A, Lamribet K, Dardillac E, Boix C, Perrouault L, Tesson L, Geny S, De Cian A, Itier JM, Anegon I, Lopez B, Giovannangeli C, Concordet JP. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair Nat Commun. 2018 Mar 19;9(1):1133. PMID: 29556040 DOI: 10.1038/s41467-018-03475-7

5) Canny MD, Moatti N, Wan LCK, Fradet-Turcotte A, Krasner D, Mateos-Gomez PA, Zimmermann M, Orthwein A, Juang YC, Zhang W, Noordermeer SM, Seclen E, Wilson MD, Vorobyov A, Munro M, Ernst A, Ng TF, Cho T, Cannon PM, Sidhu SS, Sicheri F, Durocher D. Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency Nat Biotechnol. 2018 Jan;36(1):95-102. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29176614 DOI: 10.1038/nbt.4021.

6) Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, Zelin E, Bray NL, Schäfer AJ, Floor SN, Corn JE.
CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway Nat Genet. 2018 Aug;50(8):1132-1139. Epub 2018 Jul 27. PMID: 30054595 DOI: 10.1038/s41588-018-0174-0.

7) Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, Curie GL, Corn JE. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA Nat Biotechnol. 2016 Mar;34(3):339-44. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26789497 DOI: 10.1038/nbt.3481.

8) Certo MT, Ryu BY, Annis JE, Garibov M, Jarjour J, Rawlings DJ, Scharenberg AM. Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints Nat Methods. 2011 Jul 10;8(8):671-6. PMID: 21743461 DOI: 10.1038/nmeth.1648