

(5) ゲノム編集を用いる基礎医学研究

ゲノム編集技術は、特定の動物種に依存することがなく、また多くの細胞種にも適用可能であることから in vivo および in vitro の研究系で応用が期待されている。ゲノム編集技術は、技術そのものの開発とともに、これまでの基礎医学研究領域で革新的な基盤技術として今後さらに活用されていくであろう。

① ゲノム編集技術の比較

ゲノム編集技術では、人工制限酵素のタイプにより大きく 3 つに分けられ、発表順に ZFN[1]、TALEN[2] と CRISPR/Cas9[3, 4] と呼ばれている。人工制限酵素の活性や特異性、そして技術の簡便性・汎用性からそれぞれに特徴がある。ZFN は、標的ゲノムへ結合するタンパク質作製の自由度に制限があるため簡便性に課題があったが、その課題が克服された TALEN によりゲノム編集技術は注目を集めた。CRISPR/Cas9 は、標的ゲノムへの結合に一本鎖 RNA を用いるのでより簡便に作製が可能となった上、酵素の活性能もより高まった。これによりゲノムのあらゆる領域が標的となり、遺伝子変異導入効率もより高くなった。CRISPR/Cas9 によりゲノム編集の質と汎用性が高まり、ゲノム編集技術が一気に普及していった。

② ゲノム編集技術を応用した基礎医学研究の現状と可能性

ゲノム編集技術は、変異による遺伝子機能の欠失（主に NHEJ による）と変異による遺伝子機能の獲得（HDR による）の二つの特性がありその応用により用途が判別できる。基礎医学研究の貢献として大きいのは、特に CRISPR/Cas9 によりヒト細胞のゲノムでも比較的容易に変異が可能となったことと、動物種に依存せずゲノム変異が可能となったことで動物モデルの多様化と高度化が可能となった。

ア 幹細胞研究への応用

ES 細胞や iPS 細胞のようなヒト多能性幹細胞は、培養皿で無限に増殖しかつあらゆる細胞へ分化可能である。そのため、ゲノム編集技術との併用は、ヒト遺伝子やゲノムの生物学的機能解析の機会を大幅に広げた。培養皿で細胞分化の過程を再現することも可能であるため、遺伝子の働きを発生の流れの中で解析する研究も今まで以上に汎用性が高い。

イ 疾患研究への応用

多能性幹細胞は、培養皿で疾患を再現し発症機序や疾患動態の解明に有用であることが示され [5, 6, 7]、ヒト多能性幹細胞による疾患研究

が世界的に活発になった。患者組織由来の iPS 細胞（疾患 iPS 細胞）では、標的遺伝子の変異を修正することで疾患との関係性を実証する研究が行われている[8]。加えて、CRISPR/Cas9 を用いることで疾患責任遺伝子のどのようなゲノム構造異常が、遺伝子機能の逸脱と疾患の発症とに関わるかを明らかに出来るようになってきた[9]。これまでは解析の難しかった遺伝子非コード領域でもゲノムワイド関連解析（GWAS）などで明らかとなった一塩基多型（SNP）なども解析が可能となった。一方で、ゲノム編集技術を正常な多能性幹細胞に対して応用し、新たに遺伝子機能を欠失させることで遺伝子機能と疾患との関係性を解析する研究も盛んに行われている[10]。このように疾患モデルと関係する研究系は、診断・治療法や創薬研究開発などへも展開が可能であることから疾患 iPS 細胞の研究とともに研究が大きく進んでいる分野である。

ウ 治療法開発への応用

遺伝性疾患を対象に責任遺伝子の一部の変異による遺伝子の機能の回復から新たな遺伝子治療の開発を進めることも期待されている。ゲノム編集技術を応用したデュシャンヌ型筋ジストロフィーの治療法開発が進められている[11]。

エ 新たな発展性

最近、わが国でも希少・未診断疾患に対する次世代シーケンサー等を用いた大規模なゲノム医学研究が進展している。得られた原因遺伝子候補は、疾患との関連性解析のためゲノム編集技術を応用したノックアウトマウスでの検証とヒト多能性幹細胞による in vitro 系での遺伝子機能評価が必要となる。

がん研究の分野では、がん幹細胞モデルにゲノム編集を応用することで新規的な大腸がん幹細胞標的治療モデル開発を大きく進展させた[12]。

オ 動物モデルへの応用

医学研究では、動物モデルでの遺伝子機能解析は重要な研究手段の一つである。ゲノム編集技術は、マウスやラットでの遺伝子ノックアウトモデル作製効率を著しく高めた。さらに、中動物モデルであるブタでも遺伝子改変モデルを可能とし、疾患研究や再生医療研究の分野で期待されている。

霊長類でもゲノム編集技術によるモデル動物作製が報告されている。ヒト疾患のマーモセットモデルが作製され、自閉症、統合失調症などの精神・神経疾患の疾患研究にも貢献が期待される[13]。

カ ゲノム編集技術自体の開発研究

導入方法では、プラスミドではなく制限酵素としての合成タンパク質と RNA の導入で機能する方法が基盤となっている。制限酵素タンパク質の改変やガイド RNA の配列の洗練化などで効率向上と標的外効果の低下の開発が進められている。一方で、生体 (in vivo) で機能する方法の開発も進められている。標的組織で制限酵素が特異的に発現し活性化するように機能化した上、コンパクトにした制限酵素タンパク質をアデノ随伴ウイルスベクターで生体内 (動物モデル) へ導入する方法も開発されている[14]。このシステムが肝臓や脳で機能することが確認されている[15, 16]。

③ ゲノム編集技術を用いた研究の留意点

ゲノム編集技術は革新的な技術ではあるが、まだ開発途上であるとも言える。CRISPR/Cas9 は簡便かつ高効率で汎用性も高いが、特異性にまだ課題にある。標的外 (オフターゲット) のゲノム配列を誤認し切断してしまう可能性がある。これに対し、特異性を上げる開発を進めるとともに、オフターゲット変異を解析する技術開発も進んでいる。第二回医学・医療領域におけるゲノム編集技術のあり方検討委員会では、説明者として宮岡佑一郎先生を招請し、必要性に応じ全ゲノム配列解析を行うか限定的な領域ではデジタル PCR 法などの簡便かつ正確性の高い方法が適応されるとの報告を受けた。

④ 展開と課題

ゲノム編集技術の酵素活性や特異性の向上を目的に技術自体の開発は日進月歩で進んで行くと思われる。ゲノム編集技術を応用した基礎医学研究の展開は、ゲノム編集技術自体が主たる要素となるだけではなく、標的となる細胞の多様性 (疾患 iPS 細胞やがん幹細胞など) や解析方法の多様化により今まで以上に研究領域の拡がりをもって加速度的に進展していくと想定される。再生医療や遺伝子治療の開発でも、治療の有効性や作用機序の検証のためにも益々ゲノム編集技術の応用した評価系が重要になると考えられる。希少・未診断疾患に対するゲノム医学研究の発展では、原因遺伝子あるいはゲノム変異を同定することが求められている。次世代シーケンサーによる疾患起因候補抽出から機能解析系としてのゲノム編集技術を応用した動物モデル作製・解析とヒト多能性幹細胞による in vitro 評価系は連結した研究開発系としてゲノム医学研究の開発基盤となりつつある。

動物モデル作製では、マウス、ラットやブタのみならず、霊長類疾患モ

デルの開発にも成功している。特に霊長類に関する疾患モデル開発では、動物福祉の観点から適切な管理が求められる。

<参考文献>

- [1] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 1156-1160.
- [2] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010; 186: 757-761.
- [3] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013; 339: 823-826.
- [4] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339: 819-823.
- [5] Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci*. 2007;10(5):608-614.
- [6] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008; 321(5893): 1218-1221.
- [7] Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan KC. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(6): 637-648.
- [8] CY Park, DH Kim, JS Son, JJ Sung, J Lee, S Bae, Kim JH, Kim DW, Kim JS. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2015; 17(2):213-220.
- [9] Guo Y, Xu Q, Canzio D, Shou J, Li J, Gorkin DU, Jung I, Wu H, Zhai Y, Tang Y, Lu Y, Wu Y, Jia Z, Li W, Zhang MQ, Ren B, Krainer AR, Maniatis T, Wu Q. CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function Cell. 2015; 162: 900-910.
- [10] Hendriks WT, Warren CR, Cowan CA. Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. *Cell Stem Cell*. 2016; 18(1): 53-65.
- [11] Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, Hotta A. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular

- dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*. 2015; 4(1): 143–154.
- [12] Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, Sato T. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature*. 2017; 545(7653): 187–192.
- [13] Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*. 2016; 19(1): 127–138.
- [14] Truong DJ, Kühner K, Kühn R, Werfel S, Engelhardt S, Wurst W, Ortiz O. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(13): 6450–6458.
- [15] Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, Sur M, Zhang F. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*. 2015; 33(1): 102–106.
- [16] Yang Y, Wang L, Bell P, McMenamin D, He Z, White J, Yu H, Xu C, Morizono H, Musunuru K, Batshaw ML, Wilson JM. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*. 2016; 34(3): 334–338.