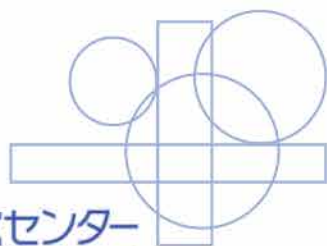


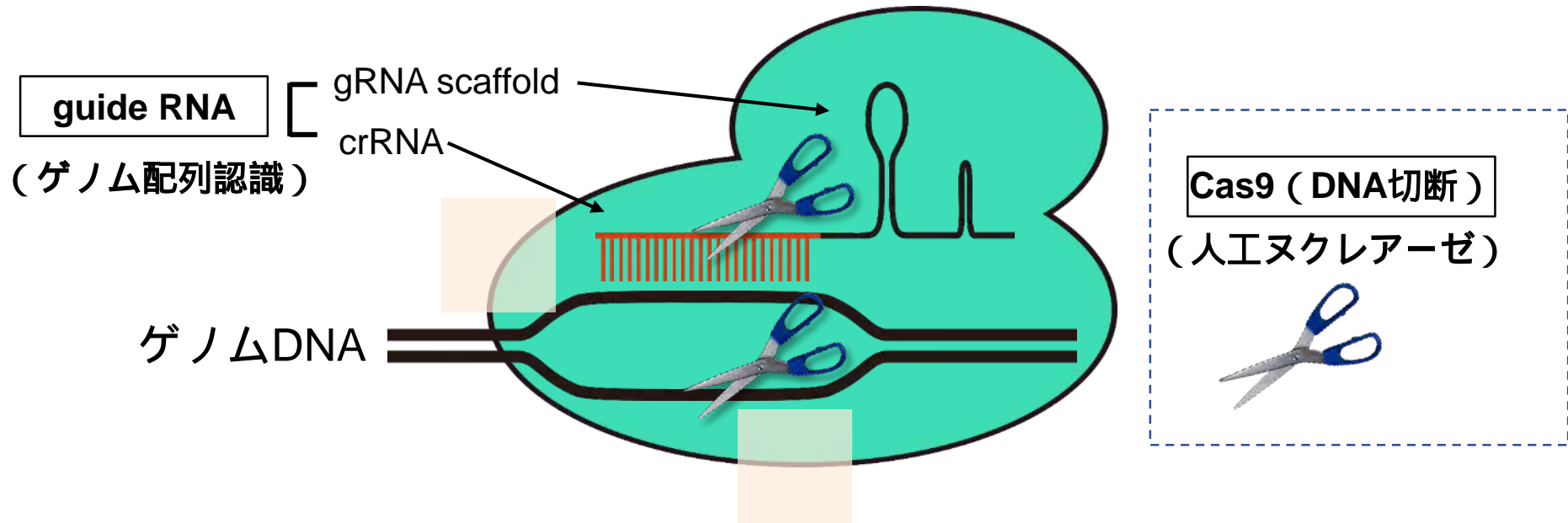
2020.7.31

第123回 生命倫理専門調査会

新規作成胚とゲノム編集研究



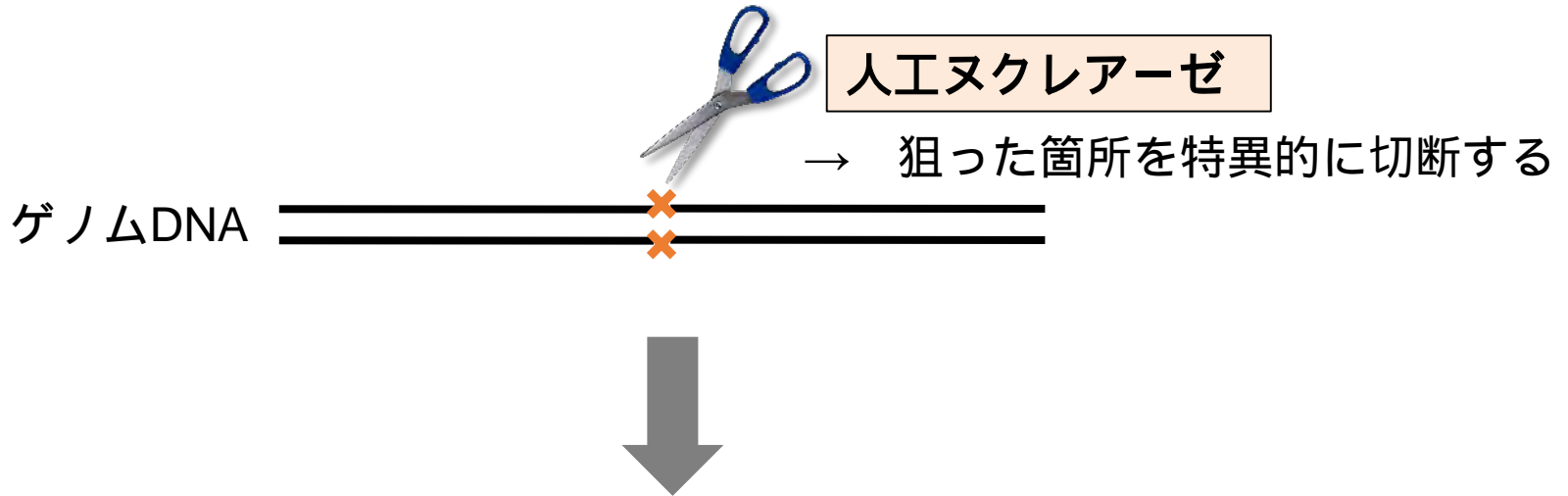
ゲノム編集技術：CRISPR/Cas9



RNA (gRNA) が約20塩基を認識 .

人工ヌクレアーゼ (Cas9) が切断 .

ゲノム編集技術



人工ヌクレアーゼ： ゲノムDNAを切断する酵素。

特別な設備が無くても誰でも作成できる。

狙った箇所を切断： ほぼあらゆる遺伝子・配列が標的。

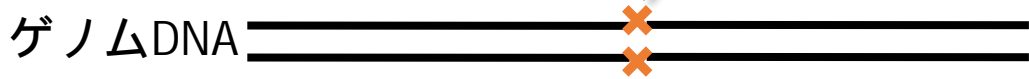
ゲノムDNAが対象： 変化が不可逆的。

ゲノム編集:細胞の持つDNA修復機構を利用



人工ヌクレアーゼ

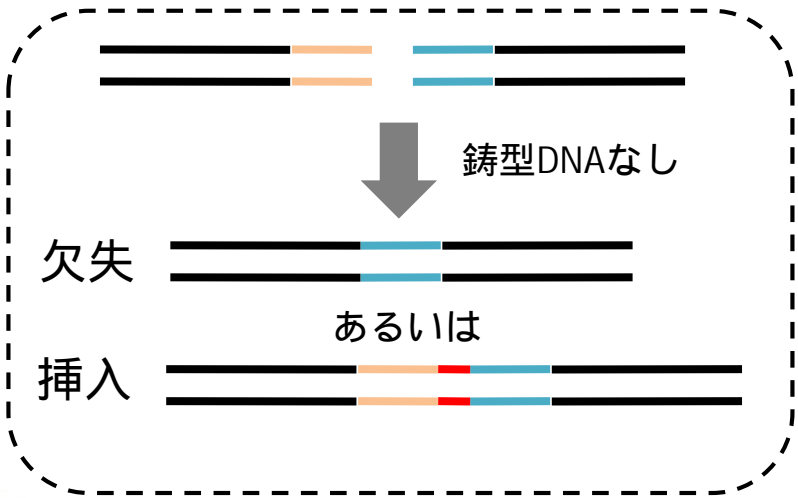
→ 狙った箇所を特異的に切断する



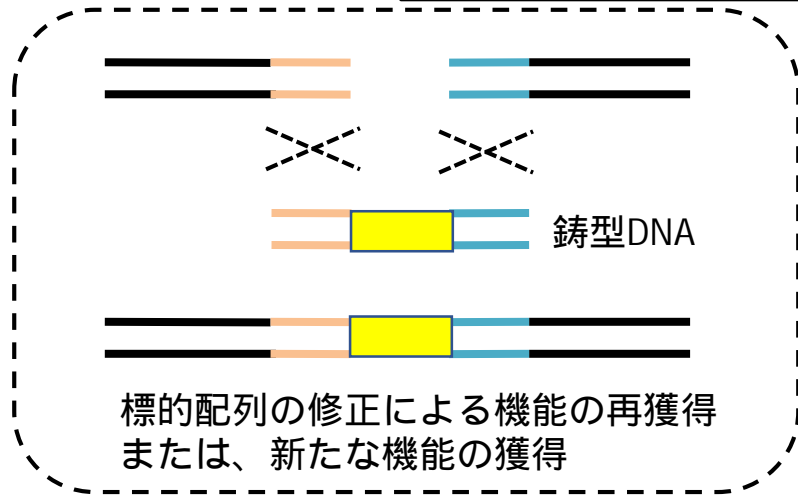
二本鎖切断
Double-strand break (DSB)

非相同末端結合
Non-Homologous End Joining (NHEJ)

相同組換え修復
Homologous Recombination (HDR)



変異により機能の喪失
(遺伝子をこわす)



変異により機能の獲得
(遺伝子をなおす)



ヒト受精卵ゲノム編集の基礎研究の動向（2020年7月時点）

| 所属 | 研究目的 | 遺伝子 | 胚の種類,数 | 研究概要 | 報告 |
|------------------------------|--|---|------------------------------|--|---|
| 中国 中山大学 | ・ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防目的 | 【HBB】 サラセミア症原因遺伝子 | 3PN胚 86個 | 3前核胚に対しCRISPR/Cas9を用いて サラセミア原因遺伝子 (HBB) を欠損 (ランダム変異導入) | 2015.4 <i>Protein cell</i> |
| 中国 広州医科大学 | ・ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 ・疾患予防(HIV感染予防) | 【CCR5】 HIVの感染受容体遺伝子 | 3PN胚 213個 | 3前核胚に対し、CRISPR/Cas9を用いてHIVの感染受容体遺伝子 (CCR5) を欠損 (ランダム変異導入) | 2016.4 <i>J Assist Reprod Genet</i> |
| 中国 広州医科大学 | ・ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防 | 【HBB】 【G6PD】 グルコース6リン酸欠損症 (溶血性貧血) 原因遺伝子 | 新規作成胚 HBB:10個 G6PD:10個 | サラセミア症又はグルコース6リン酸欠損症患者の配偶子を用いて、受精卵を新たに作成し、CRISPR/Cas9のゲノム編集の修復効率を検証 | 2017.6 <i>Mol Genet Genomics</i> |
| 中国 広州医科大学 | ・ヒト受精卵への1塩基編集技術 (BE3)の検証 | 【RNF2】 E3 北' 杉リガ'セ' RING2 | 3PN胚 25個 | 3前核胚に1塩基編集技術 (BE3) を用いて編集効率を検証 | 2017.10 <i>Protein cell</i> |
| 中国 上海交通大学 | ・ヒト受精卵への1塩基編集技術 (BE3等)の確認 | 【HBB】 , 【FANCF】 , 【DNMT3B】 | 3PN胚 49個 | 3前核胚に1塩基編集技術 (BE3等) を用いて編集効率を検証 | 2017.10 <i>Protein Cell</i> |
| 中国 中山大学 | ・ヒト受精卵への1塩基編集技術 (BE3)の検証 ・遺伝性難病予防 | 【HBB】 | 人知ン胚 35個 | サラセミア患者の人クローン胚を作成し、1塩基を置き換えるゲノム編集 (塩基編集) 技術 (BE3) を用いて原因遺伝子 (HBB) の変異の修復を検証 | 2017.11 <i>Protein cell</i> |
| 中国 上海科技大学 | ・ヒト受精卵への1塩基編集技術 (BE3等)の検証 ・遺伝性難病予防 | 【FBN1】 マルファン症候群原因遺伝子 | 新規作成胚 46個 | マルファン症候群患者由来精子とICを受けて入手した未成熟卵をin vitroで成熟させたものを顕微授精させ、1塩基編集技術 (BE3等) により原因遺伝子 (FBN1) の修復を検証 | 2018.11 <i>Mor Ther</i> |
| 中国 中国科学院 神経科学研究所 | ・ヒト受精卵へのTild-CRISPR法の確認 | 【OCT4】 , 【GATA6】 | 3PN胚 | ヒト胚への効率、精密な遺伝子編集法Tild-CRISPR (targeted integration with linearized dsDNA-CRISPR) を開発し改変効率を検証 | 2018.5 <i>Dev Cell</i> |
| 中国 合肥医科大学 | ・ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防 | 【MYBPC3】 肥大型心筋症原因遺伝子 | 3PN胚 | 3PN胚を用いて、CRISPR/Cas9による二本鎖DNA切断のメカニズムを検証。 | 2018.6 <i>Mol Reprod Dev</i> |
| 中国 中国科学院 神経科学研究所 | ・ヒト受精卵、新規作成胚、2細胞期および4細胞期胚割球への1塩基編集技術 (BE3等)の確認 | 【HBB】 , 【OCT4】 , 【EMX1】 , 【MUT】 | 3PN胚、新規作成胚、2および4細胞期胚 | 受精卵、新規作成胚、受精卵の割球に1塩基編集技術 (BE3) を用いて編集効率を検証 | 2019.5 <i>Genome Biol</i> |
| 中国 広州医科大学 | ・ヒト受精卵への1塩基編集技術 (BE3)の検証 | 【TTR】 , 【ALDOB】 , 【COL9A2】 , 【PRE65】 , 【KCNJ11】 | 3PN胚 93個 | 3前核胚に1塩基編集技術 (BE3等) を用いて編集効率を検証 | 2019.9 <i>Mol Ther Nucleic Acids</i> |
| 米オレゴン健康科学大 | ・ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 ・遺伝性難病予防 | 【MYBPC3】 | 新規作成胚 145個 | 肥大型心筋症患者の精子と正常な卵子から新たに受精卵を作成。受精卵を作成する際、同時にゲノム編集することによる修復効率化の検証 | 2017.8 <i>Nature</i> |
| イギリス フランス・ク リック 研究所 | 不妊、初期発生の理解に資する発生学研究 | 【OCT4】 | 前核期胚 37個 | 受精卵や胚性幹細胞で特異的に発現している遺伝子 (OCT4) を欠損させて、受精卵の発生における役割を解析 | 2017.10 <i>Nature</i> |

ヒト受精卵ゲノム編集の基礎研究の動向（2020年7月時点）

| 所属 | 研究目的 | 遺伝子 | 胚の種類,数 | 研究概要 | 報告 |
|--------------------------|---|--------------------------------------|--|--|-------------------|
| 米コロンビア大学 | ・ヒト新規作成胚、2細胞期へのゲノム編集効率の確認 ・父型変異の編集効率、モザイク発生メカニズム | 【EYS】 網膜色素変性症原因遺伝子 | 新規作成胚、 2細胞期胚、 雄性胚 | 新規胚、2細胞期胚およびEYS遺伝子変異雄性胚に対しCRISPR/Cas9を用いてEYS遺伝子の編集効率、モザイク率等の検証 | 2020.6 bioRxiv |
| イギリス フランス・ウィック 研究所 | ・ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 | 【OCT4】 | 受精卵30個 | 受精卵でのOCT4遺伝子を欠損させて、on-,off-targetのゲノム変異を解析 | 2020.6 bioRxiv |
| 米オレゴン健康科学大他 | ・ヒト受精卵へのゲノム編集効率の確認 | 【MYH7】 【MYBPC3】 家族性肥大型心筋症原因遺伝子 | 新規作成胚 MYBPC3: 32個 受精卵 MYBPC3: 21個 MYH7: 86個 | 肥大型心筋症患者の精子と正常な卵子から新たに受精卵を作成。ES細胞も多数樹立。受精卵を作成する際、同時にゲノム編集することによる修復効率化の検証 | 2020.6 bioRxiv |

Reading frame restoration at the EYS locus, and allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos

Michael V. Zuccaro^{1,2*}, Jia Xu^{3*}, Carl Mitchell², Diego Marin³, Raymond Zimmerman³, Bhavini Rana^{3,4}, Everett Weinstein¹, Rebeca T. King¹, Morgan Smith¹, Stephen H. Tsang⁵, Robin Goland¹, Maria Jasin⁶, Rogerio Lobo⁷, Nathan Treff^{5,4} & Dieter Egli^{1,2,7 †}

¹ Division of Molecular Genetics, Department of Pediatrics and Naomi Berrie Diabetes Center, Columbia University, New York, NY 10032, USA

Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos

Gregorio Alanis-Lobato^a, Jasmin Zohren^b, Afshan McCarthy^a, Norah M.E. Fogarty^{a,c}, Nada Kubikova^a, Emily Hardman^a, Maria Greco^a, Dagan Wells^{d,1}, James M.A. Turner^b, Kathy K. Niakan^{a,*}

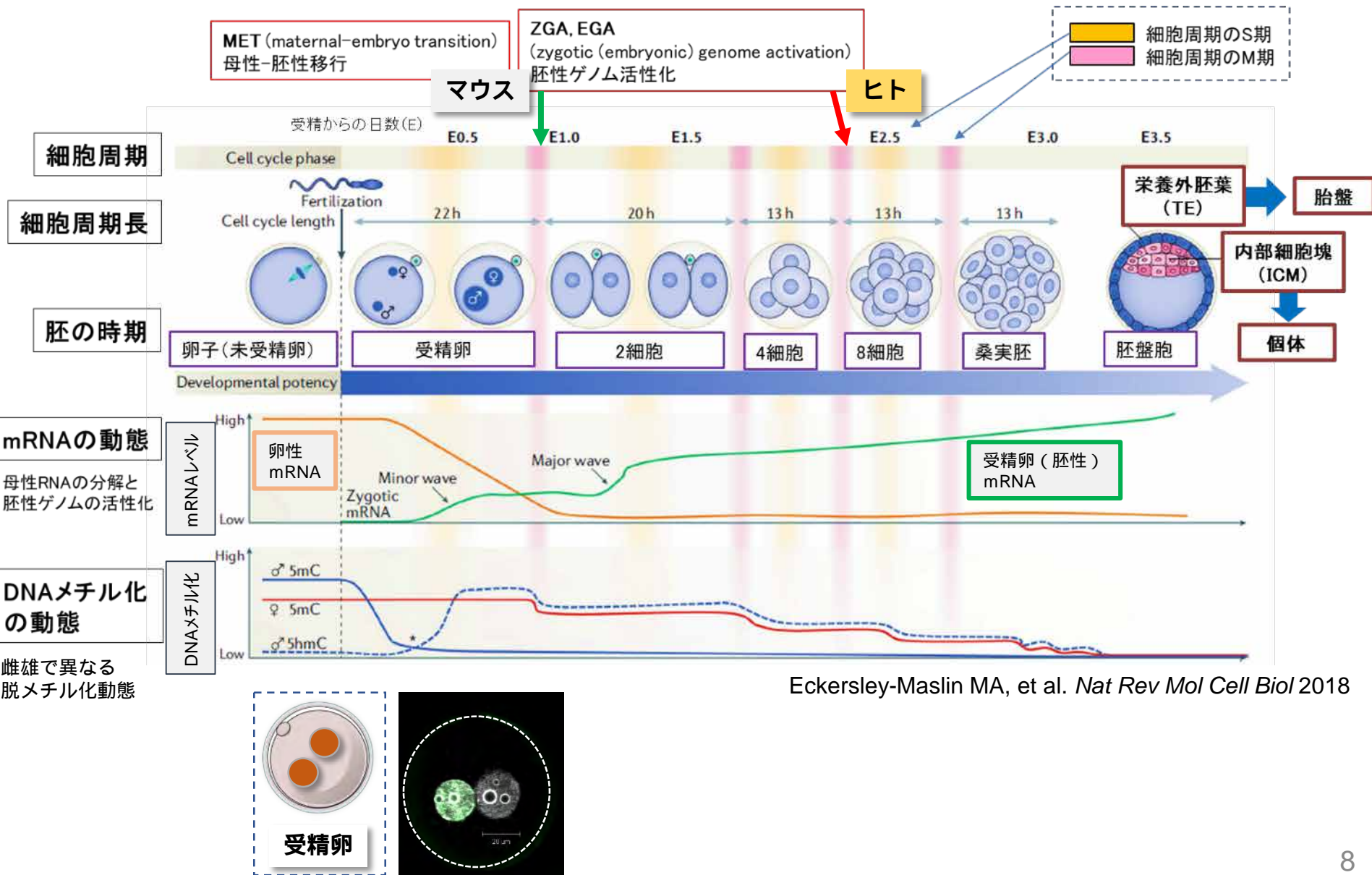
^aHuman Embryo and Stem Cell Laboratory, The Francis Crick Institute, 1 Midland Road, London NW1 1AT, UK

FREQUENT GENE CONVERSION IN HUMAN EMBRYOS INDUCED BY DOUBLE STRAND BREAKS

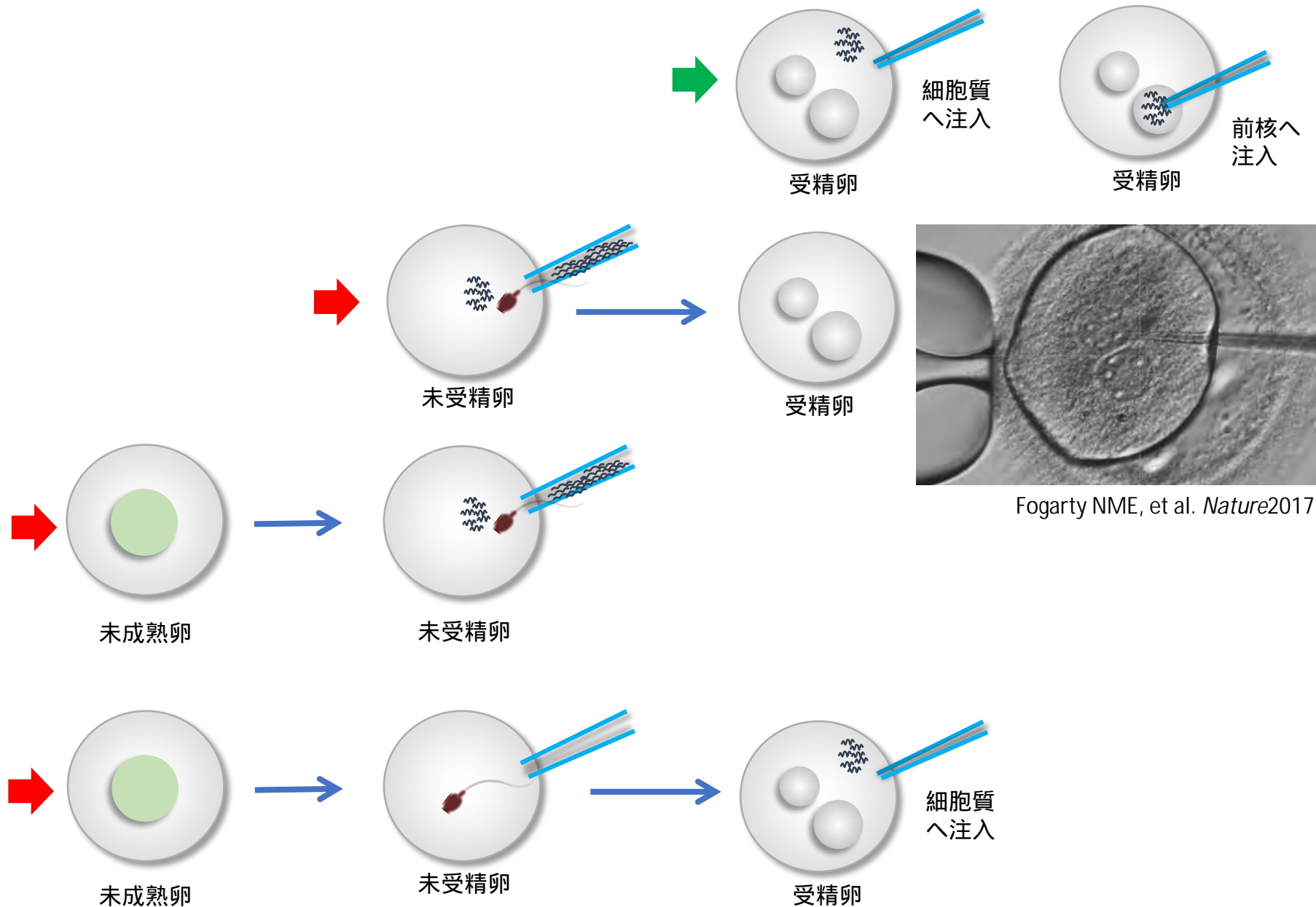
Dan Liang,^{1*} Nuria Marti Gutierrez,^{1*} Tailai Chen,^{2*} Yoonmi Lee,^{3*} Sang-Wook Park,^{4,5} Hong Ma,¹ Amy Koski,¹ Riffat Ahmed,¹ Hayley Darby,¹ Ying Li,¹ Crystal Van Dyken,¹ Aleksei Mikhailchenko,¹ Thanasup Gonmance,¹ Tomonari Hayama,¹ Han Zhao,² Keliang Wu,² Jingye Zhang,² Zhenzhen Hou,² Jumi Park,³ Chong-Jai Kim,³ Jianhui Gong,^{6,7} Yilin Yuan,^{6,7} Ying Gu,^{6,7} Yue Shen,^{6,7} Susan B. Olson,⁸ Hui Yang,⁹ David Battaglia,¹ Thomas O'Leary,¹⁰ Sacha A. Krieg,¹⁰ David M. Lee,¹⁰ Diana H. Wu,¹⁰ P. Barton Duell,¹¹ Sanjiv Kaul,¹¹ Jin-Soo Kim,^{4,12} Stephen B. Heitner,¹³ Eunju Kang,^{3*} Zi-Jiang Chen,^{2,13,1*} Paula Amato,^{1,1*} and Shoukhrat Mitalipov^{1,2*}

¹Center for Embryonic Cell and Gene Therapy, Oregon Health & Science University, 3303 Southwest, Bond Avenue, Portland, Oregon 97239, USA

受精から着床前期胚発生を理解

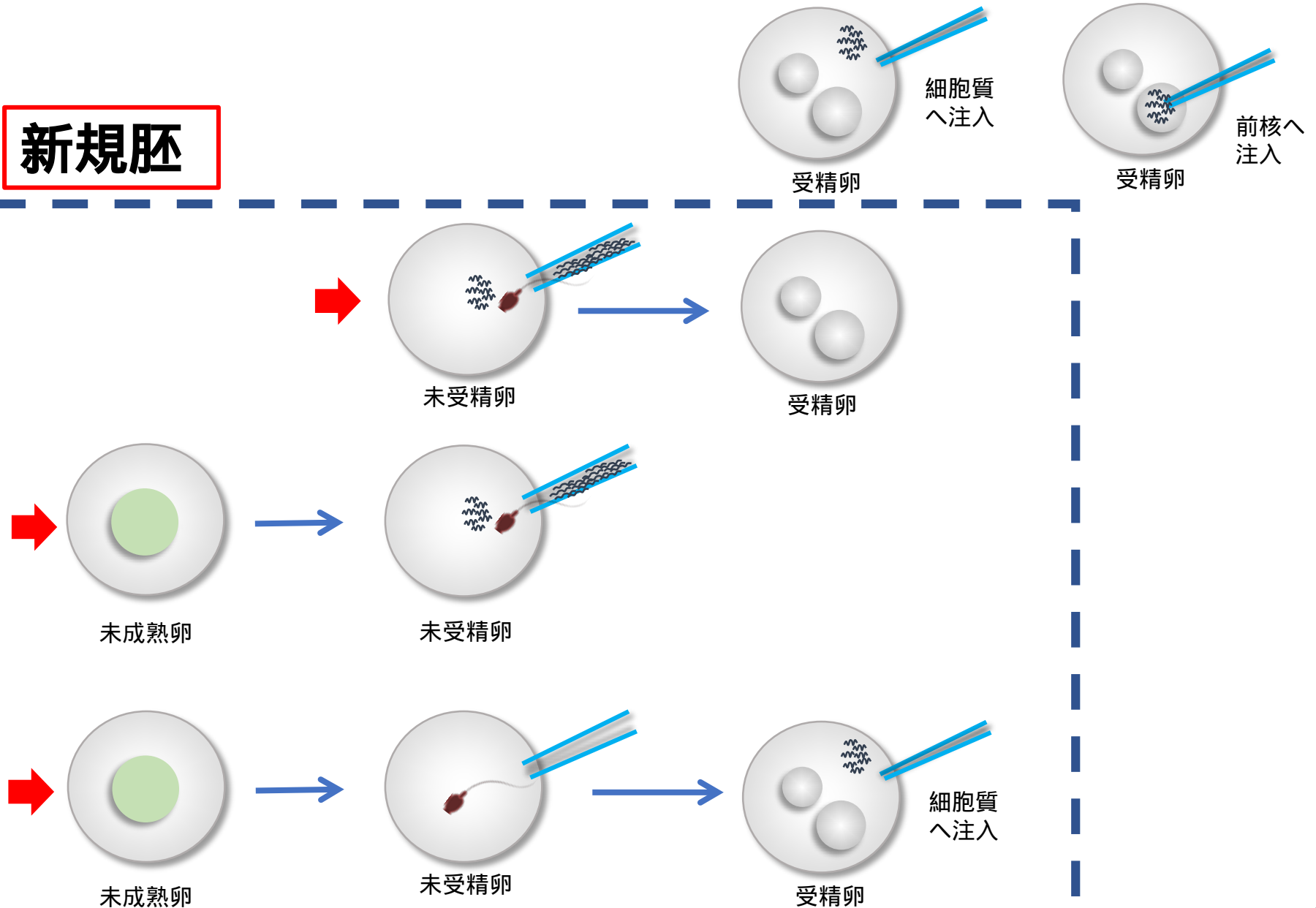


ヒト受精卵ゲノム編集の方法



ヒト受精卵ゲノム編集の方法

新規胚

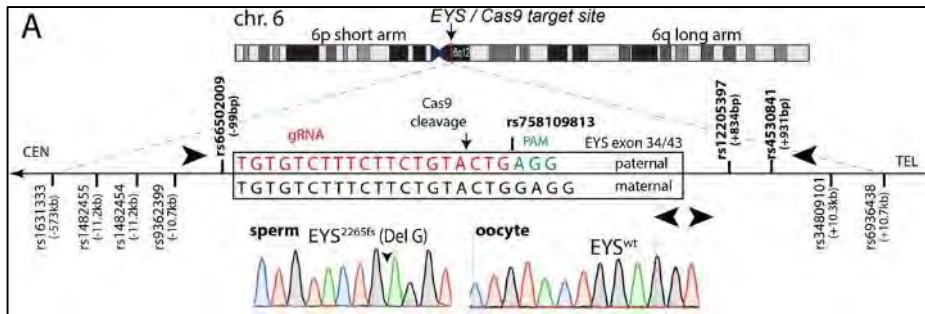


新規胚によるゲノム編集実施例

Reading frame restoration at the EYS locus, and allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos

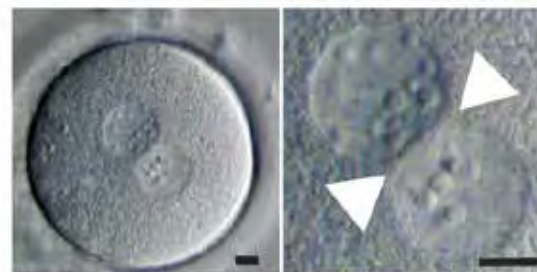
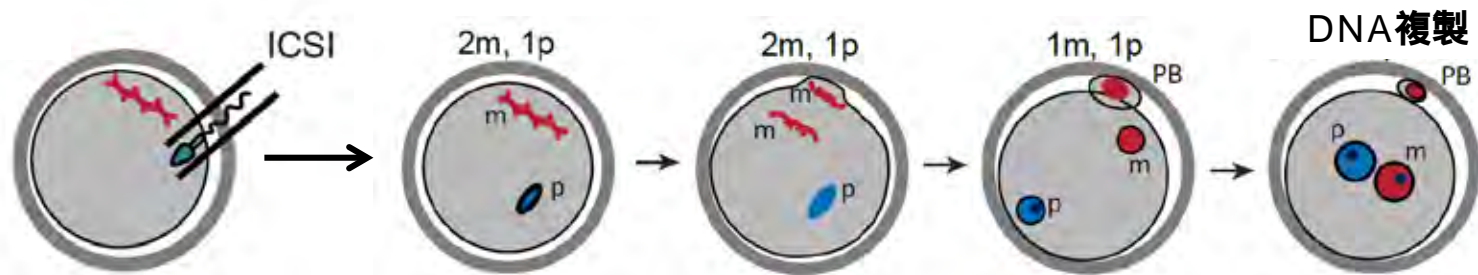
Michael V. Zuccaro^{1,2,*}, Jia Xu^{3,*}, Carl Mitchell², Diego Marin³, Raymond Zimmerman³, Bhavini Rana^{3,4}, Everett Weinstein¹, Rebeca T. King¹, Morgan Smith¹, Stephen H. Tsang⁵, Robin Goland¹, Maria Jasin⁶, Rogerio Lobo⁷, Nathan Treff^{5,1} & Dieter Egli^{1,2,7*}

¹ Division of Molecular Genetics, Department of Pediatrics and Naomi Berrie Diabetes Center, Columbia University, New York, NY 10032, USA



精子：EYS遺伝子に変異（網膜色素変性症発症）
EYS遺伝子は6番染色体長腕のセントロメア付近

卵子：正常EYS遺伝子（健常人ボランティア）



精子・卵子由来の前核でそれぞれDNA複製が行われる