

ゲノム編集の現状について

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター
研究所システム発生・再生医学研究部
乾雅史

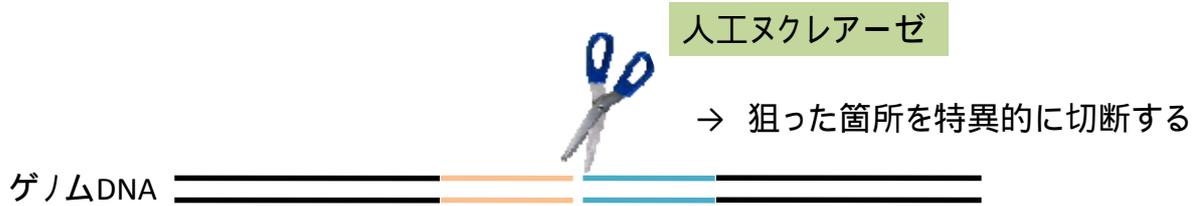
1

ゲノム編集について

- ゲノム編集とはどのような技術か
- 技術的な問題点と今後の方向性
(オフターゲット効果について)
- ゲノム編集で何が出来るようになったか
(疾患モデル研究の例)

2

ゲノム編集とは



- ①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
非常に簡便で効率が高い

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

3

ゲノムの切断について

ゲノムは生命の設計図：変異は機能の異常(疾患)の原因
遺伝性疾患、癌etc

ゲノムの切断・組み換え・修復は我々の生命活動の一部：

ヒトのゲノム：約30億塩基対 1000万程度のSNPs

(生き物の集団として我々のゲノムは均一ではない)

細胞分裂に伴うDNA複製エラー、紫外線、活性酸素などによって変化は常に起こる。

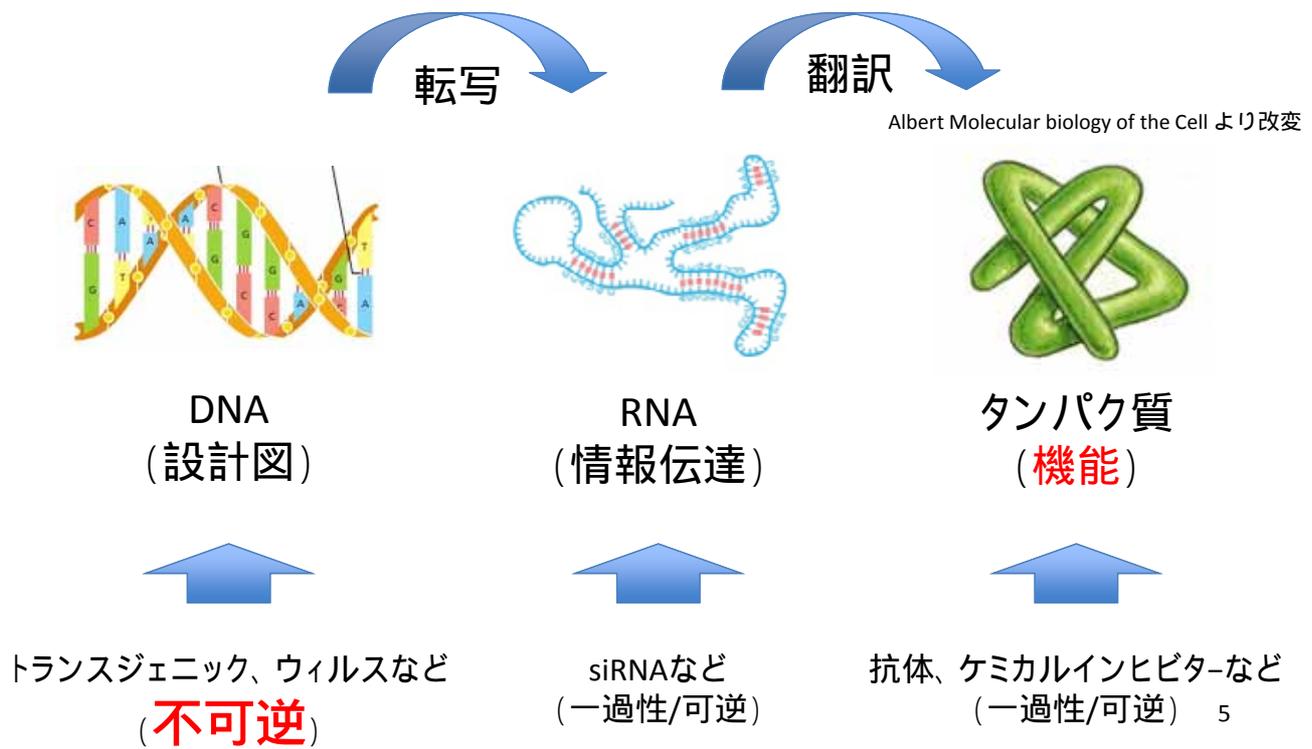
減数分裂時の乗換え、免疫細胞における相同組換え etc 意図的なゲノム変化も存在。

不要な変異はDNA修復機構等で抑えているが我々の体のゲノムは均一ではない。

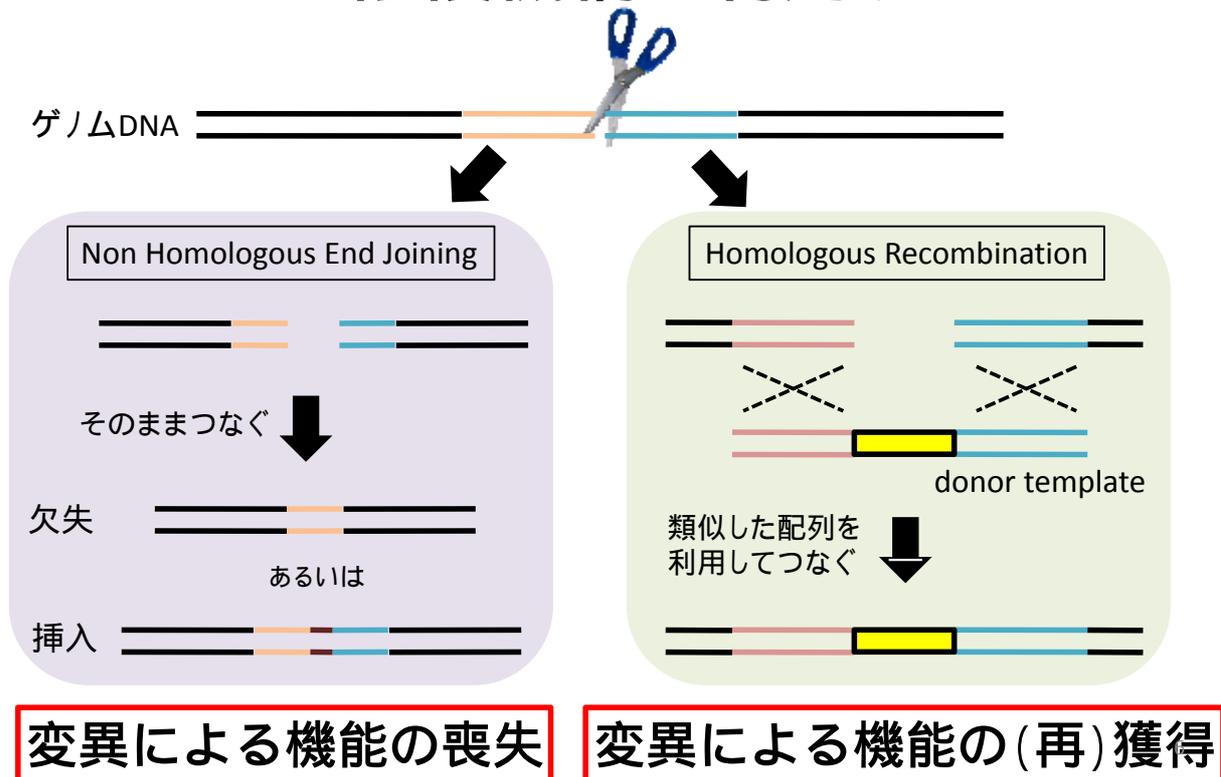
ゲノム編集はゲノムの特定の箇所における切断を促進するもの

4

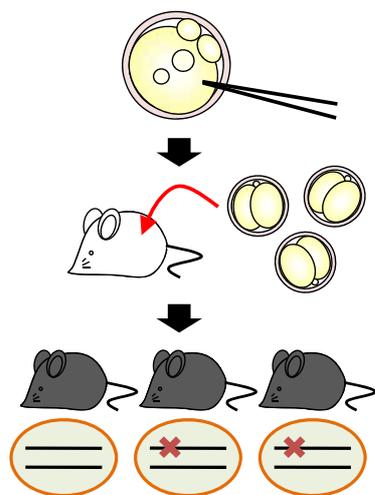
DNAに対する機能調節は不可逆的



ゲノム編集は細胞の持つDNA修復機構を利用する



ゲノム編集は確率的現象



標的配列

Hara et al. Sci Rep.
2015 (5) 11221

B1 B2
CTGTGGCTCTCTATGATCTGATGATGGATAGATGGACCCAGGGTCTGGCTGGCAGGGCAGTAAAAACAGGAAACCGA

得られたマウスのゲノム配列

wild type	GGTCCTAATGATCTGATGATGGATAGATGGACCCAGGGTCTGGCTGGCAGGGCAGTAAAAACAGGAAACCGA
	GGTCCTAATGATCTGATGATGGATAGATGG-----TCTGGCTGGCAGGGCAGTAAAAACAGGAAACCGA
	GGTCC-----TGGCTGGCAGGGCAGTAAAAACAGGAAACCGA
Mutated alleles	GGTCCTAATGATCTGATG-----GTCTGGCTGGCAGGGCAGTAAAAACAGGAAACCGA
	GGTCCTAATGATCTGATGATGGATAGATGGACC-----aTGGCAGGGCAGTAAAAACAGGAAACCGA
	GGTCCTAATGATCTGATGATGGATctgt-----GGTCGGCTGGCAGGGCAGTAAAAACAGGAAACCGA

変異マウス/生まれたマウス = 10/16

目的とする配列が得られるかどうかは細胞の修復機構による確率事象



試行後の評価・選択が必要(重要)

7

三種類のゲノム編集技術

第一世代: ZFN (Zinc finger Nuclease)

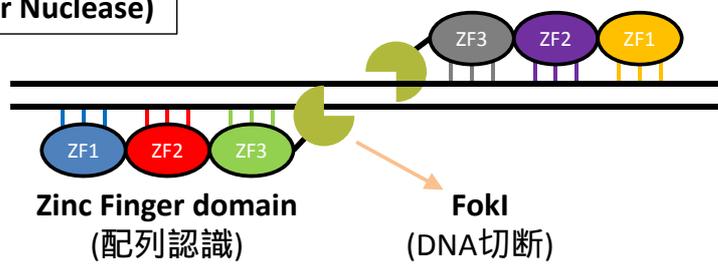
第二世代: TALE (Transcription activator like effector)

第三世代: CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats or CRISPR-associated)

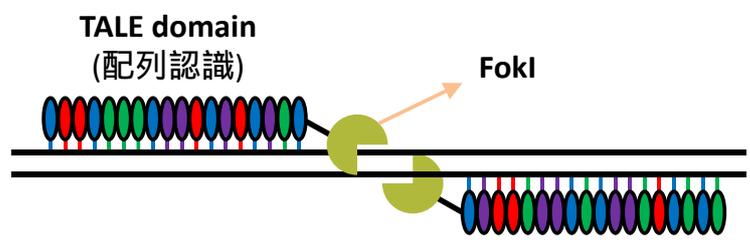
8

ZFN, TALEN : 二量体で30-50塩基を認識し切断

ZFN (Zinc Finger Nuclease)

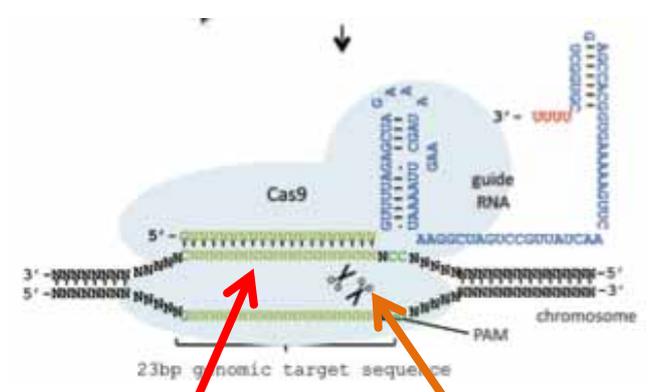


TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)



9

CRISPR/Cas9: gRNAが約20塩基を認識、Cas9が切断



DNAとRNAの相補性による
標的認識

Nuclease活性による
二重鎖切断

5

10

ゲノム編集法の比較

	活性	特異性	簡便性
Zincfinger Nuclease			
TALEN			
CRISPR/Cas9			

活性と利便性からCRISPR/Cas9が今後のゲノム編集の中心となる

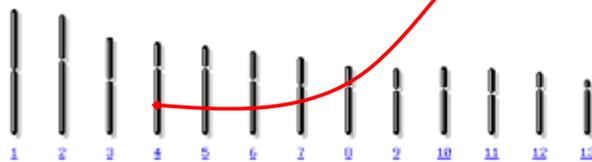


特異性の問題を解決する必要がある

11

CRISPR/Cas9の問題点: 標的外の切断

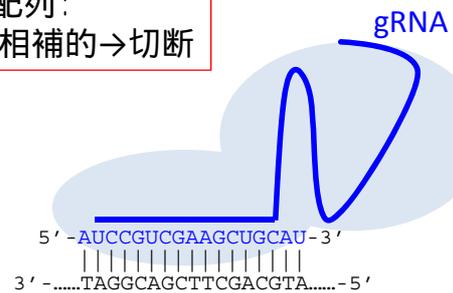
Homo sapiens (human) genome view
Annotation Release 107 statistics [Switch to previous build](#)



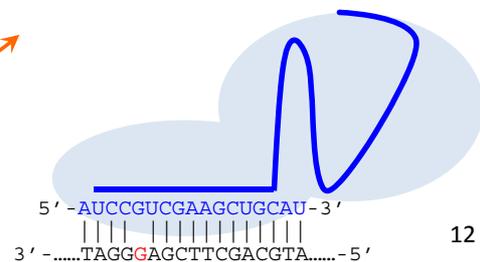
NCBI websiteより

このような標的外の切断の影響を
オフターゲット効果と呼ぶ

標的配列:
100%相補的→切断



標的に似た配列:
100%相補的では無いが切断され得る



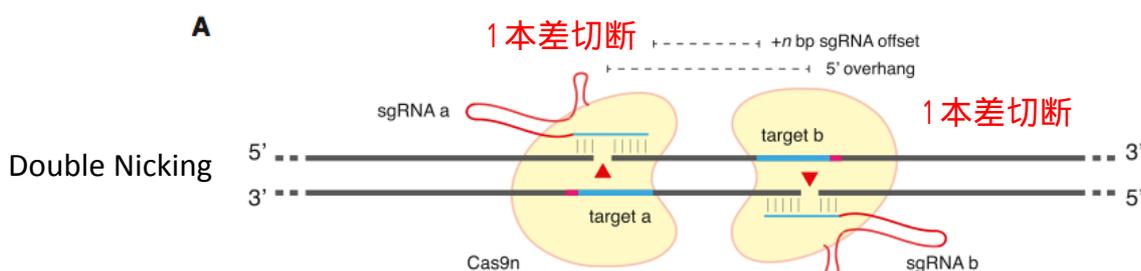
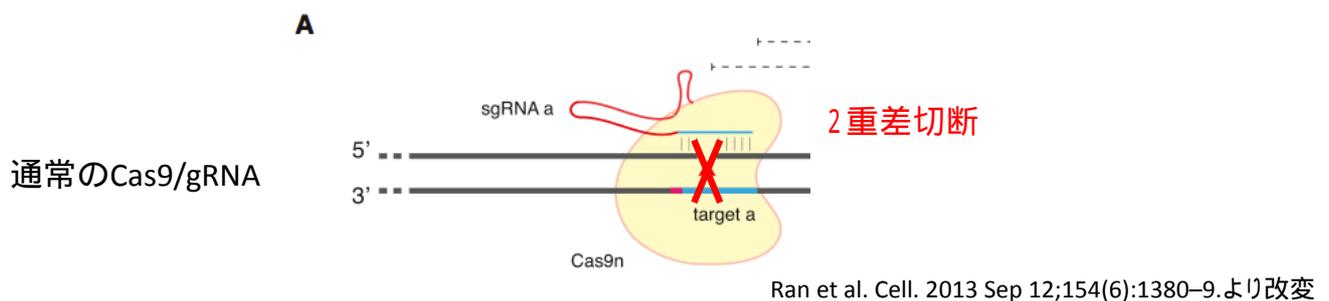
CRISPR/Cas9の問題点：標的外の切断

これまでに癌細胞等では高い頻度で、
初期胚等でも低頻度で目的外の変異が
報告されている。

CRISPR/Cas9がゲノムを切断する活性を持つ以上
標的外切断の可能性をゼロにすることは難しいであるが、
基礎研究から医療応用に進む上で出来る限り
オフターゲットを軽減することが必要

13

今後の技術的な改善の方向： 活性を失わずにオフターゲットを減らす

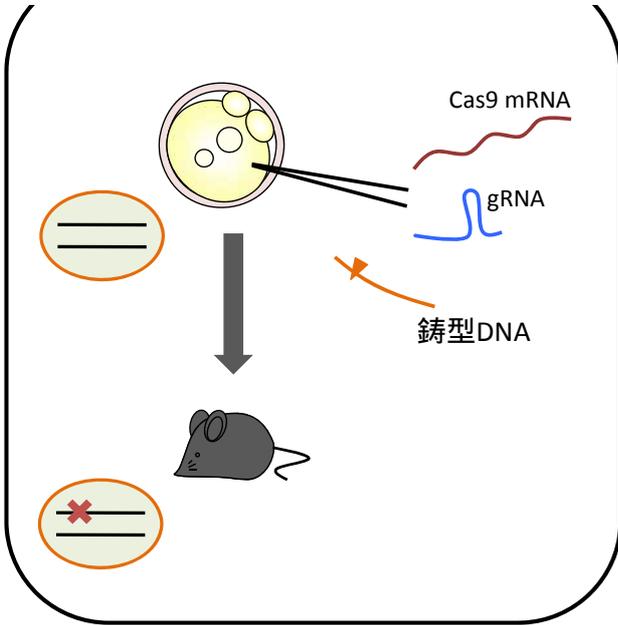


例：2つの標的配列が近くにあった時のみ切断するようなCas9

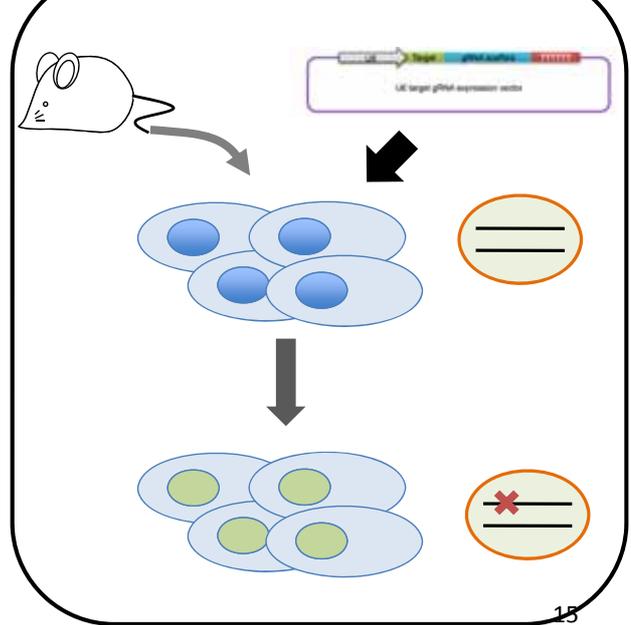
14

ゲノム編集の対象・手法による影響の違い

受精卵へのマイクロインジェクション



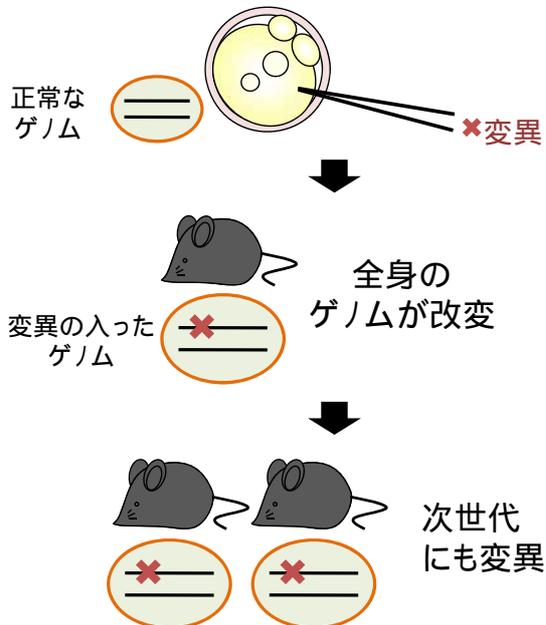
培養細胞への遺伝子導入



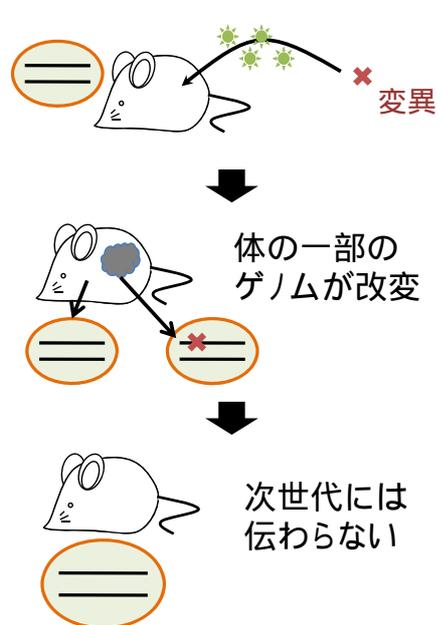
15

ゲノム編集の対象・手法による影響の違い

ゲノム編集による初期胚のゲノム改変



細胞でのゲノム編集やウイルス等での体細胞のゲノム改変



16

小括

ゲノム編集技術により短時間・高効率に細胞やマウスゲノムの改変が行える。

主に機能している遺伝子領域を切断し機能を喪失させる、あるいはゲノム切断後に配列を挿入して機能を獲得させるために用いられる。

CRISPRは簡便かつ高効率だが特異性に懸念があるため、特異性を向上させる改善の取り組みがなされている。今後の医療応用に当たってはオフターゲットを含めゲノム編集後のリスク評価も重要と考えられる。

17

ゲノム編集を用いた疾患研究



イルミナ社HPより

次世代シーケンサーの発展
↓
疾患を持つ患者のゲノム情報の蓄積
↓
多数見つかる変異の評価系が必要

疾患ゲノムの再現/修復と・評価

培養細胞、実験動物で変異を再現し
変異による影響を評価する

患者由来の細胞や疾患モデル動物を
用いて変異を修復し影響を評価する

18

ゲノム編集を用いた研究例

1. 疾患モデルの作成

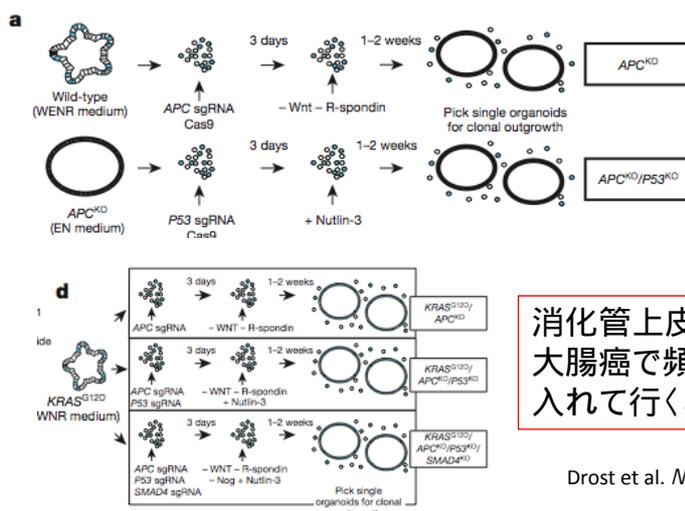
「ゲノムの切断 = 機能の喪失」を利用し、
患者ゲノム情報から見いだされた
変異をマウスで再現

19

消化管上皮細胞に大腸癌で見られる 変異を導入し表現型を再現

Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells

Jarno Drost^{1,2}, Richard H. van Jaarsveld^{2,3*}, Bas Ponsioen^{2,3*}, Cheryl Zimberlin^{2,4*}, Ruben van Bostel^{1,2}, Arjan Buljs⁵, Norman Sachs^{1,2}, René M. Overmeer^{2,3}, G. Johan Offerhaus⁶, Harry Begthel^{1,2}, Jeroen Korving^{1,2}, Marc van de Wetering^{1,2,7}, Gerald Schwank^{1,2}, Melke Logtenberg^{1,3}, Edwin Cuppen^{1,2}, Hugo J. Snippert^{2,3}, Jan Paul Medema^{2,4}, Geert J. P. L. Kops^{2,3} & Hans Clevers^{1,2}



消化管上皮幹細胞の器官培養に
大腸癌で頻出の4遺伝子の変異を
入れて行くことで癌細胞の性質を再現

Drost et al. *Nature*. 2015 May 7;521(7550):43-7. 20