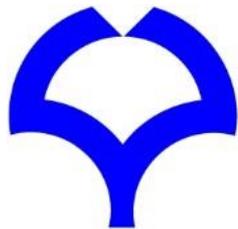


# 科学委員会 ゲノム編集専門部会

2018年11月8日(木)13:00～15:00

独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)会議室1～4

## ゲノム編集の最新技術概要



真下知士

大阪大学大学院医学系研究科



附属共同研ゲノム編集センター／附属動物実験施設

# ゲノム編集の歴史

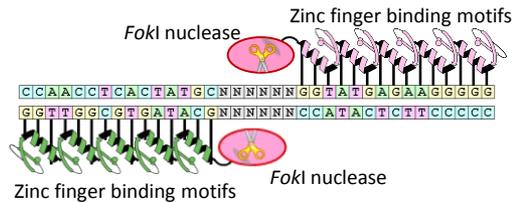
---

- 1973年 組換えDNA技術の開発
- 1989年 ES細胞による遺伝子改変マウスの作製
- 1990年代 メガヌクレアーゼの発見
- 1996年 ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) の開発
- 2003年 ヒト細胞におけるゲノム編集
- 2010年 TALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN)
- 2012年 CRISPR/Cas9の登場
- 2013年～ **CRISPR/Cas9 による様々なゲノム編集!**

# ZFN/TALEN/CRISPRによるゲノム編集

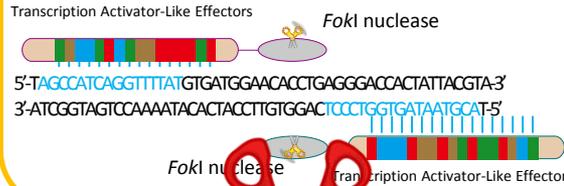
1996年～

## Zinc finger nucleases (ZFNs)



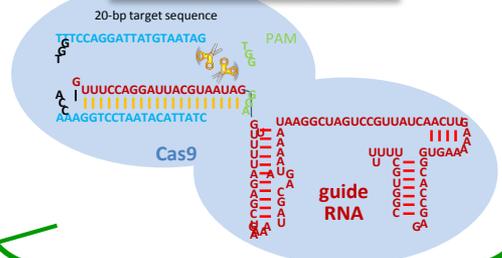
2010年～

## TALE nucleases (TALENs)



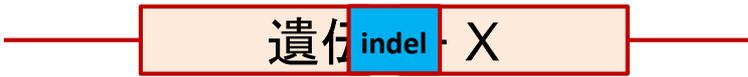
2012年～

## CRISPR/Cas9



non-homologous end joining (NHEJ)

homologous recombination (HR)

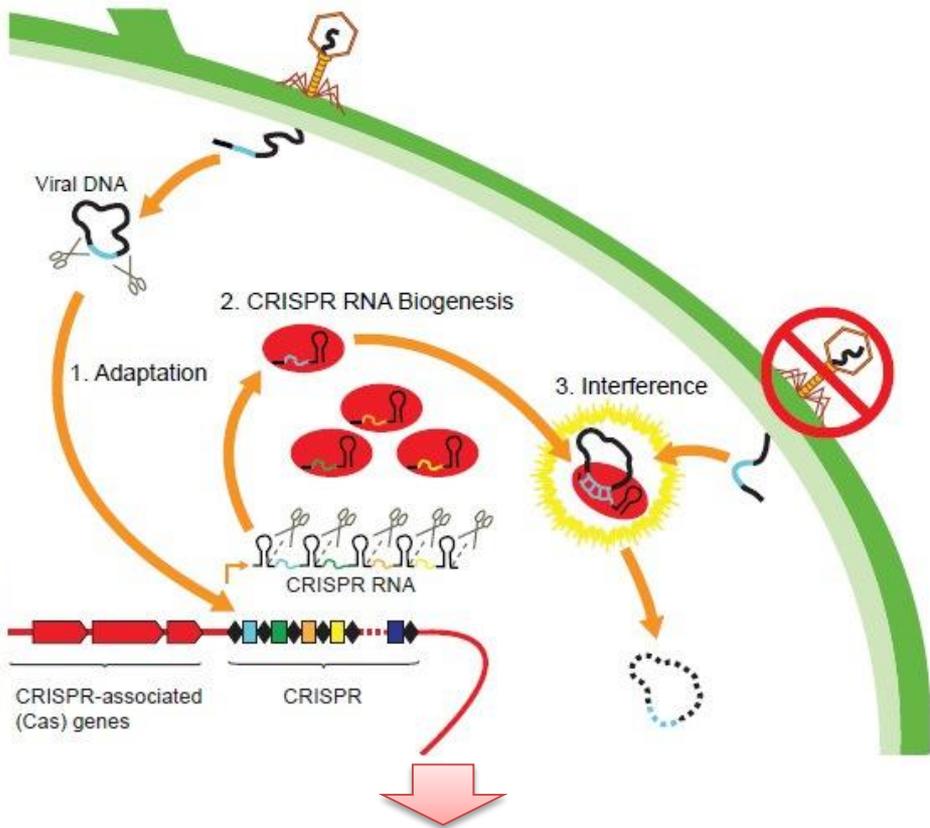


ノックアウト(破壊)

ノックイン(挿入)

# CRISPR/Cas9によるゲノム編集

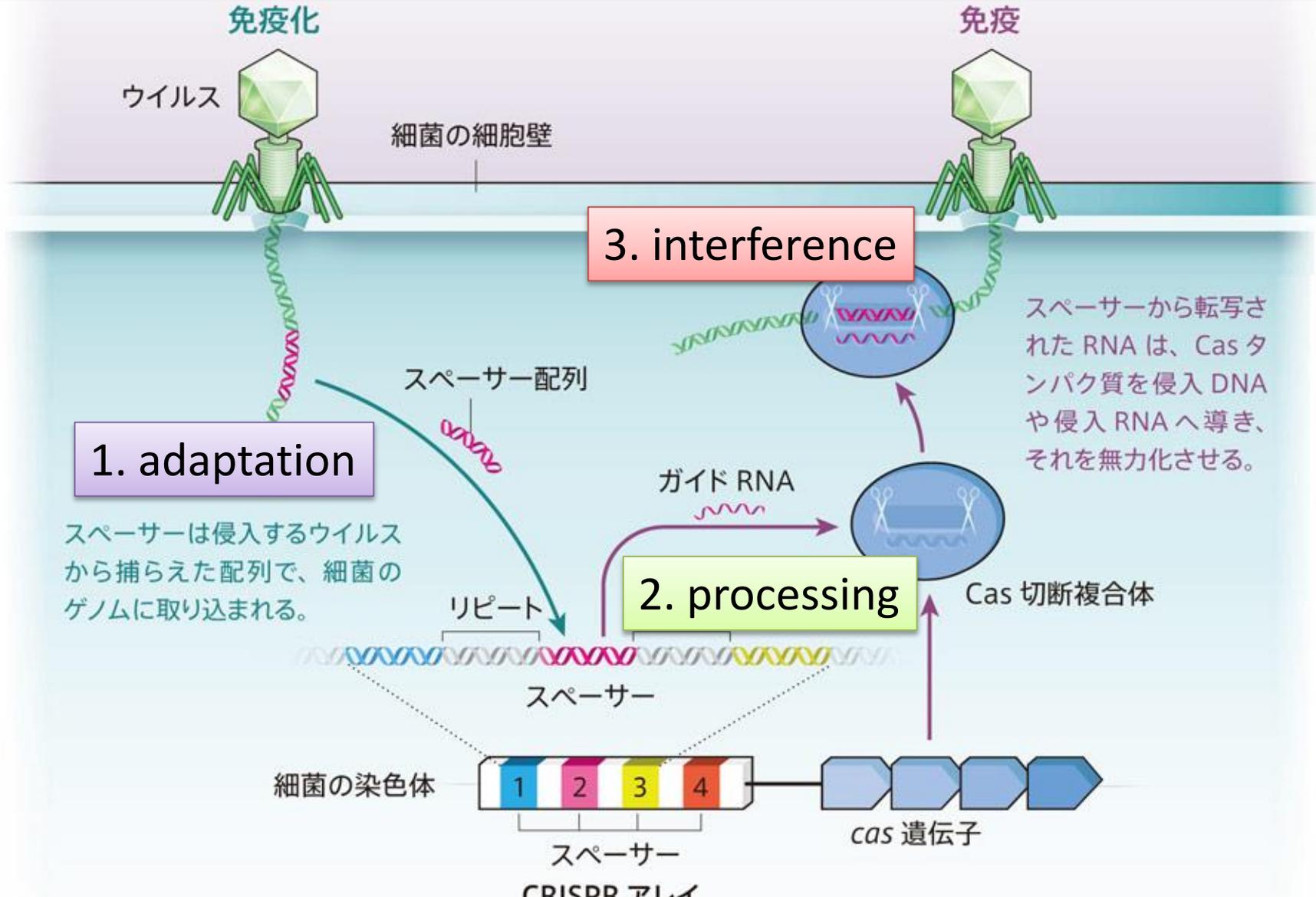
## CRISPR/Cas9システム



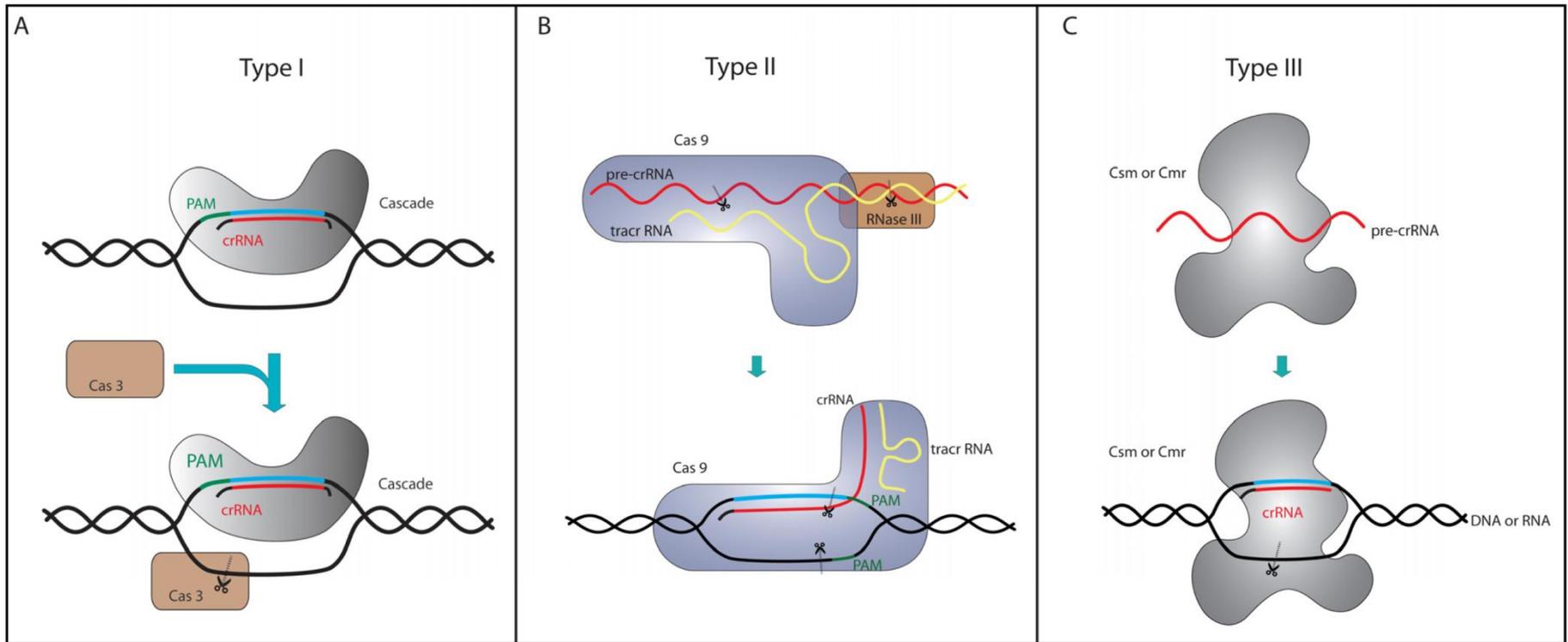
新しいゲノム編集ツール！

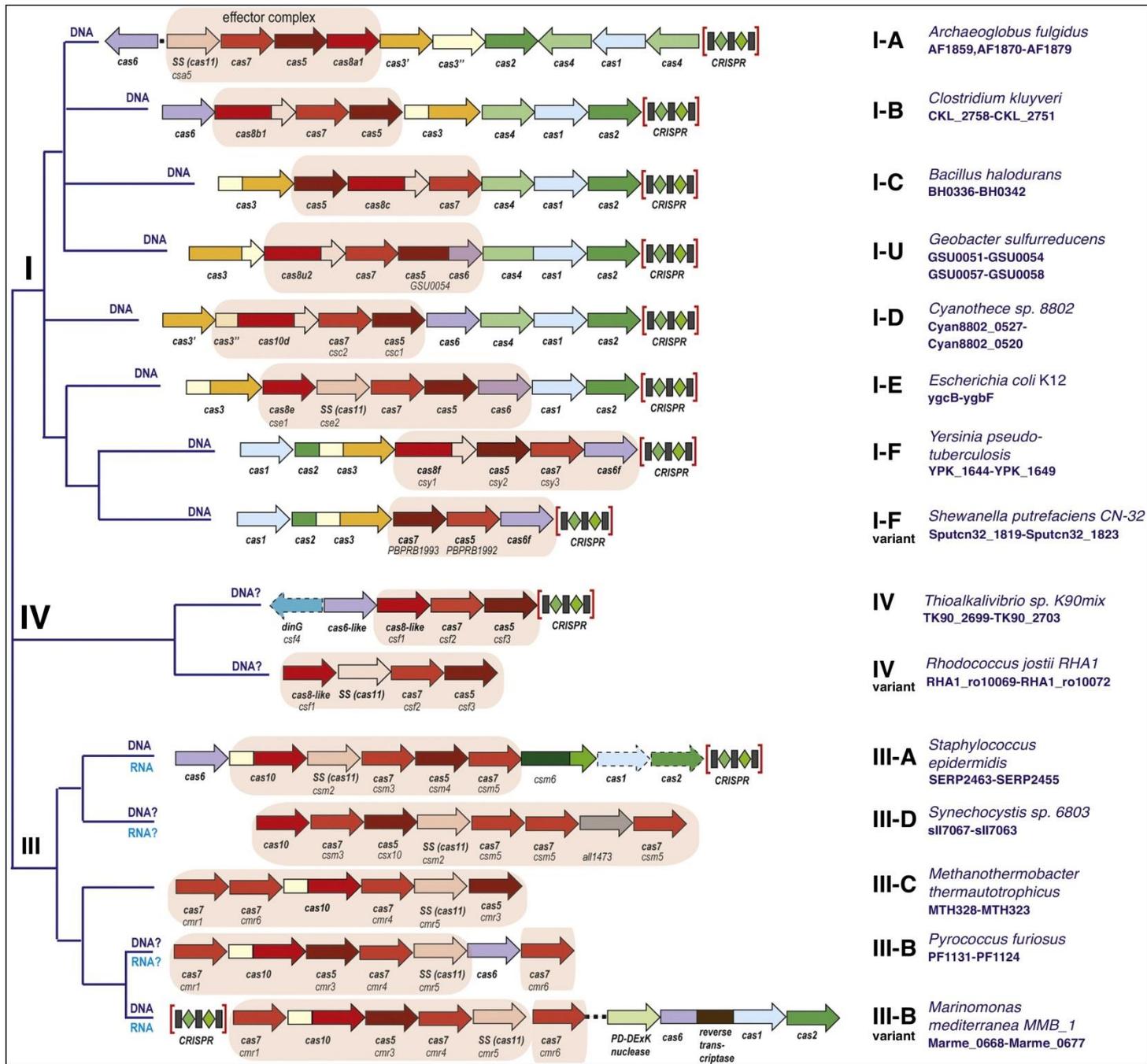
- ✓ 1987年、CRISPRが大阪大学微生物学研究所中田篤男（現大阪大学名誉教授）、石野良純（現九州大学教授）らにより発見！
- ✓ 2007年、CRISPRが細菌・古細菌の獲得性免疫であることを発見！
- ✓ 2012年、Emmanuelle Charpentier、Jennifer Doudnaらがゲノム編集技術として利用！
- ✓ 2013年、細胞や動物の遺伝子改変技術として活用！

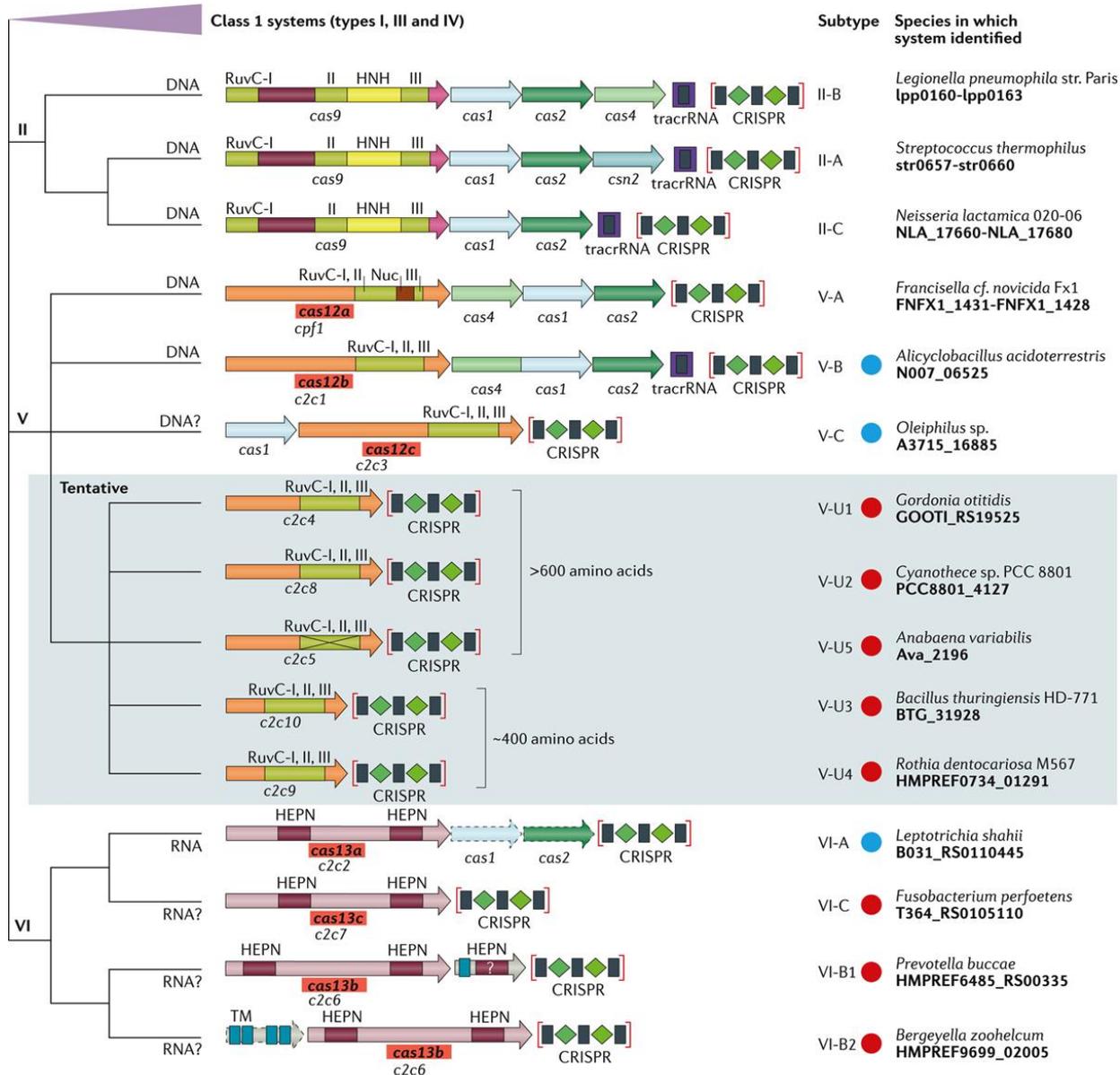
# Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

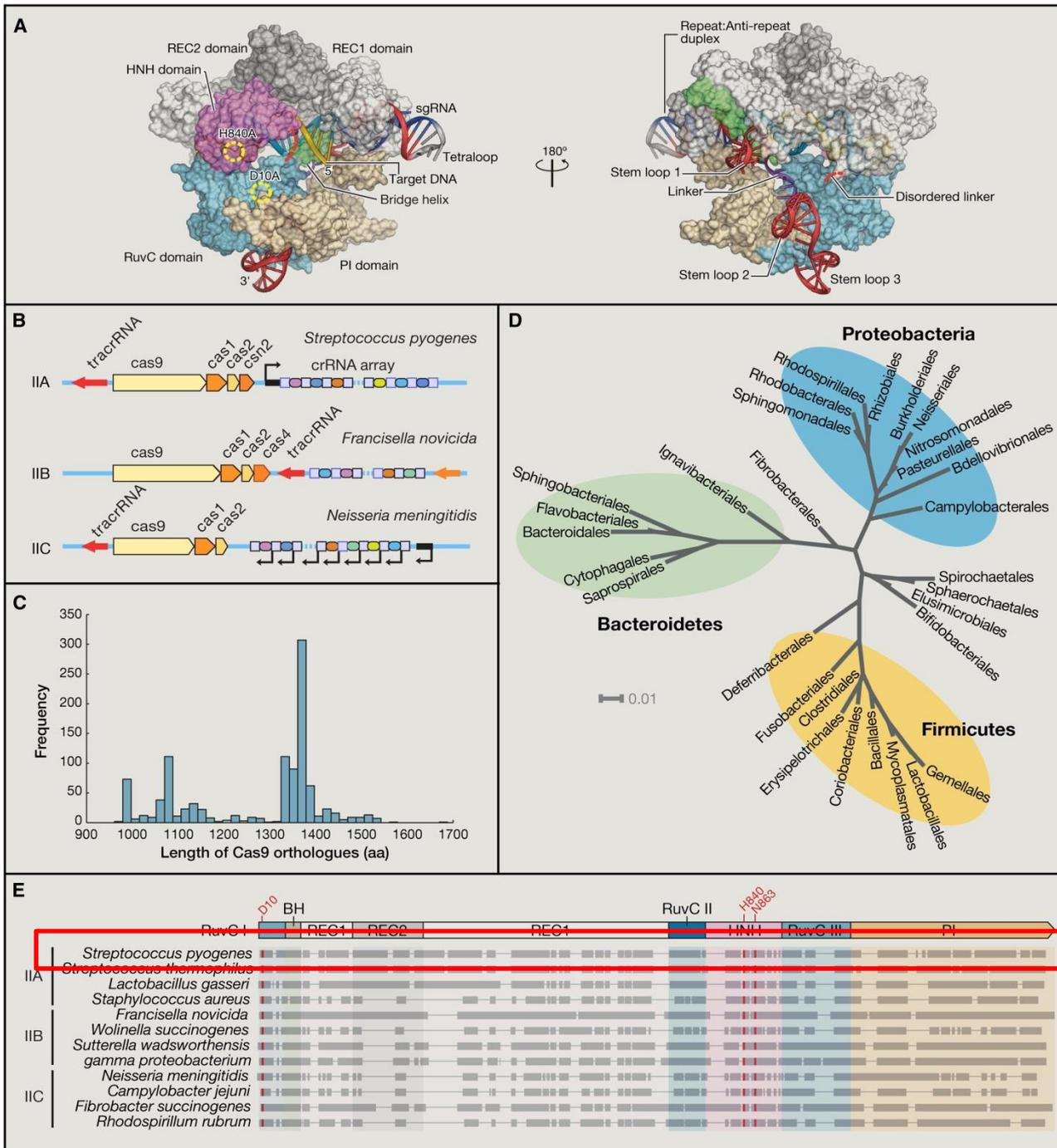


# CRISPR interference

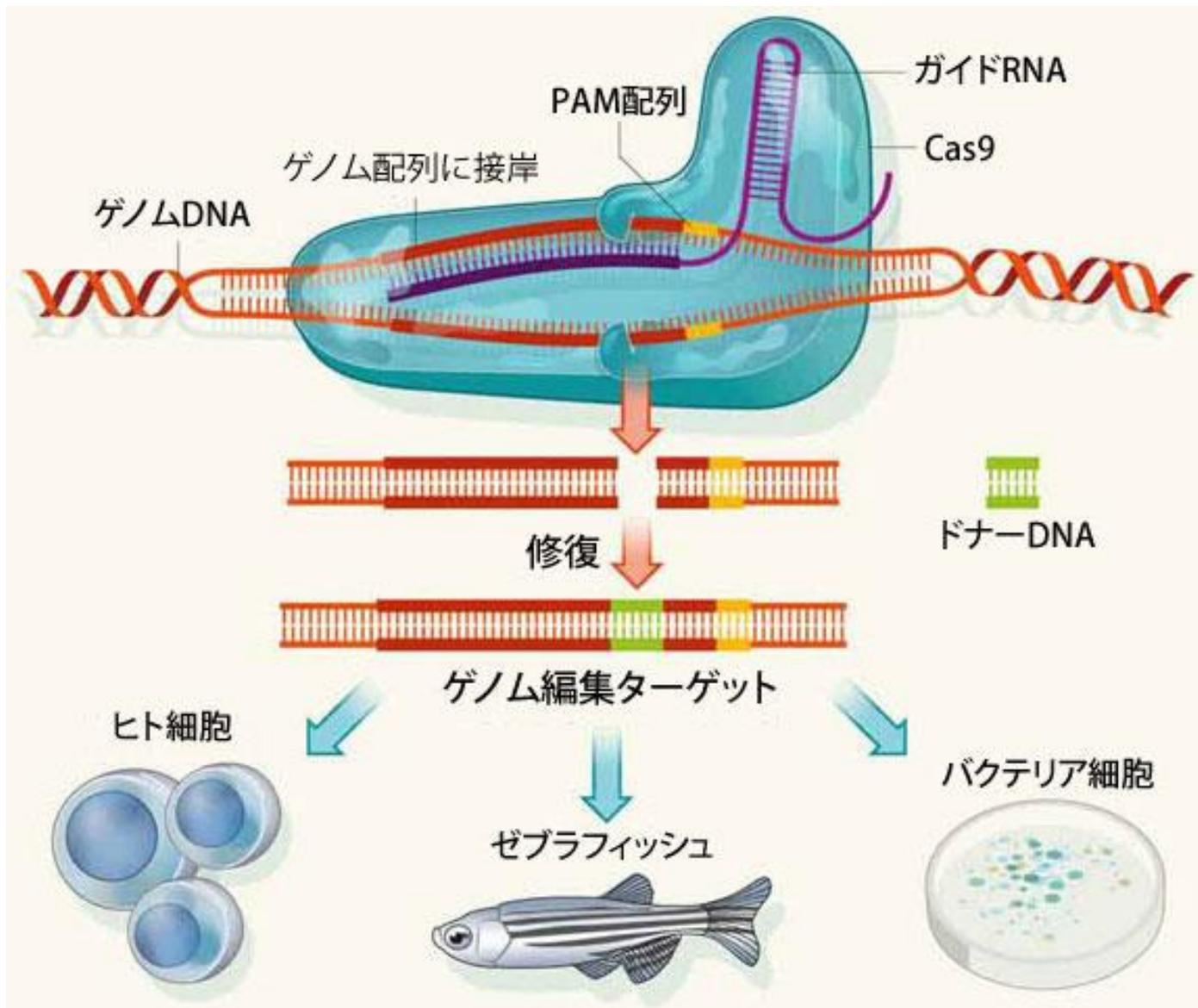






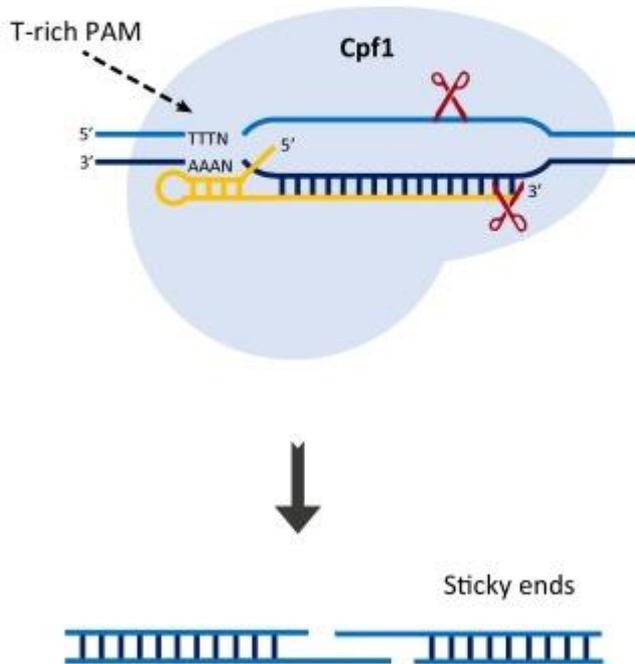


# CRISPR/Cas9によるゲノム編集

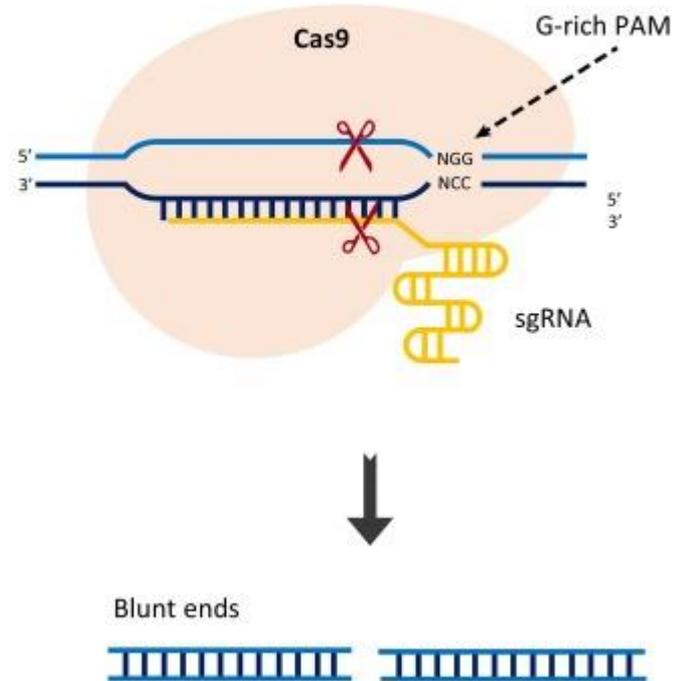


# Cas9 vs Cpf1 (Cas12a)

(A) CRISPR-Cpf1

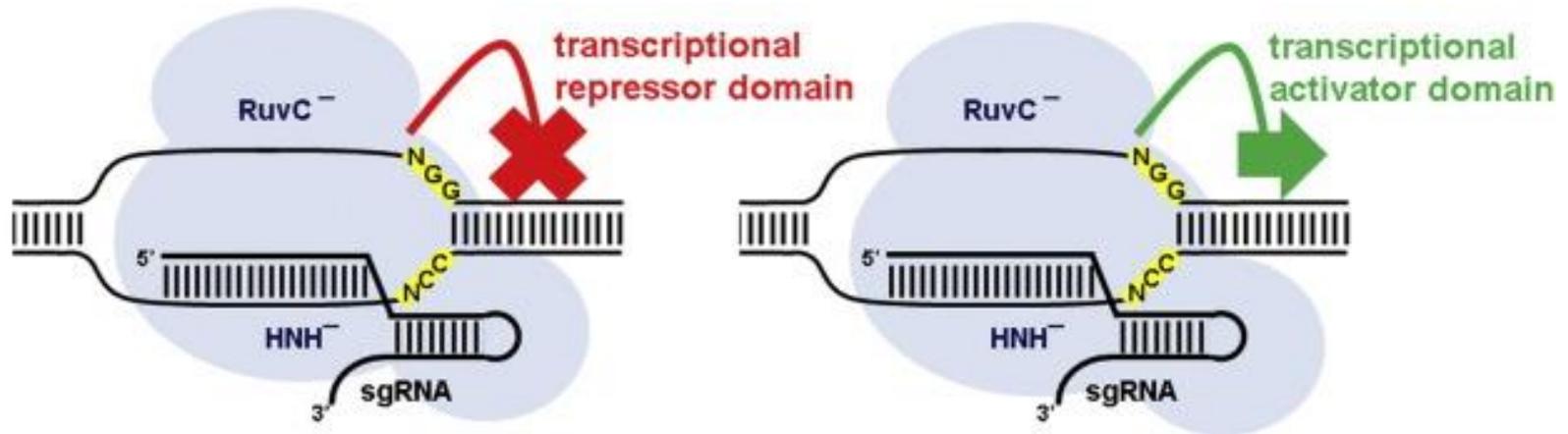


(B) CRISPR-Cas9

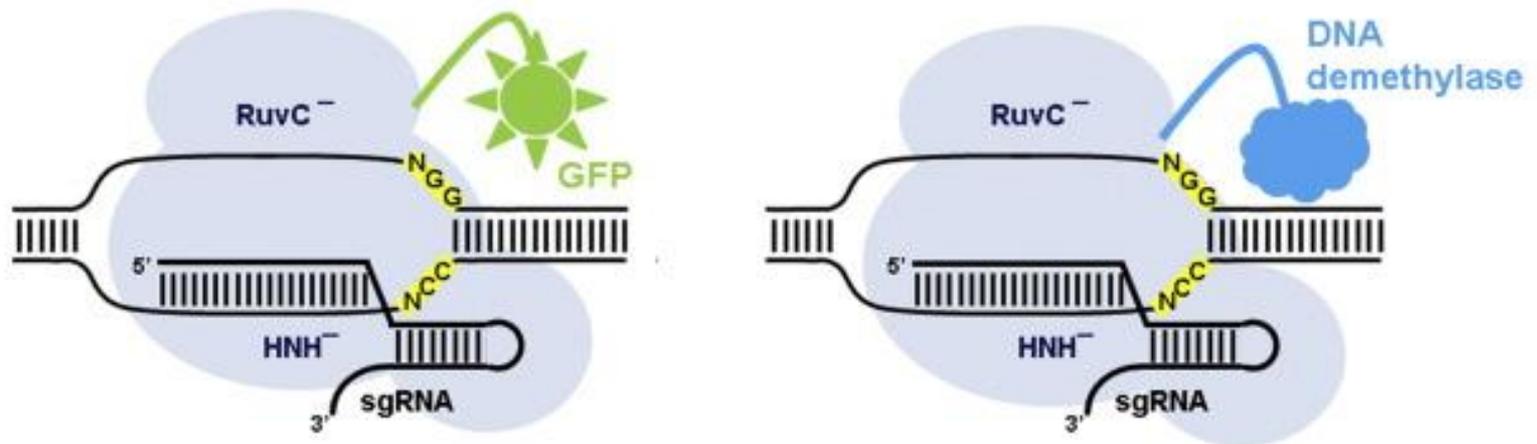


# dead Cas9 (dCas9)

(a)  
Gene  
regulation

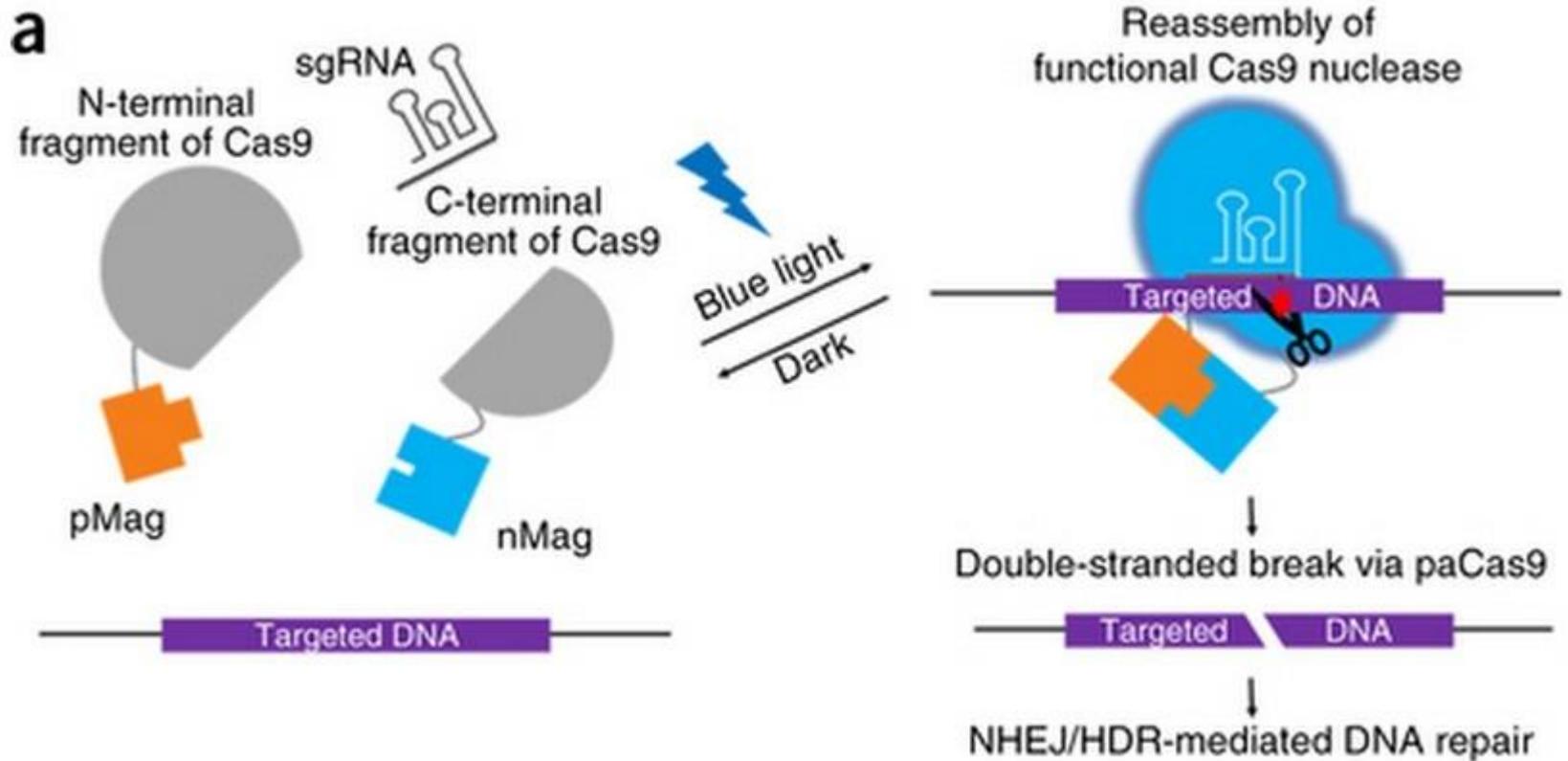


(b)  
Cargo  
delivery



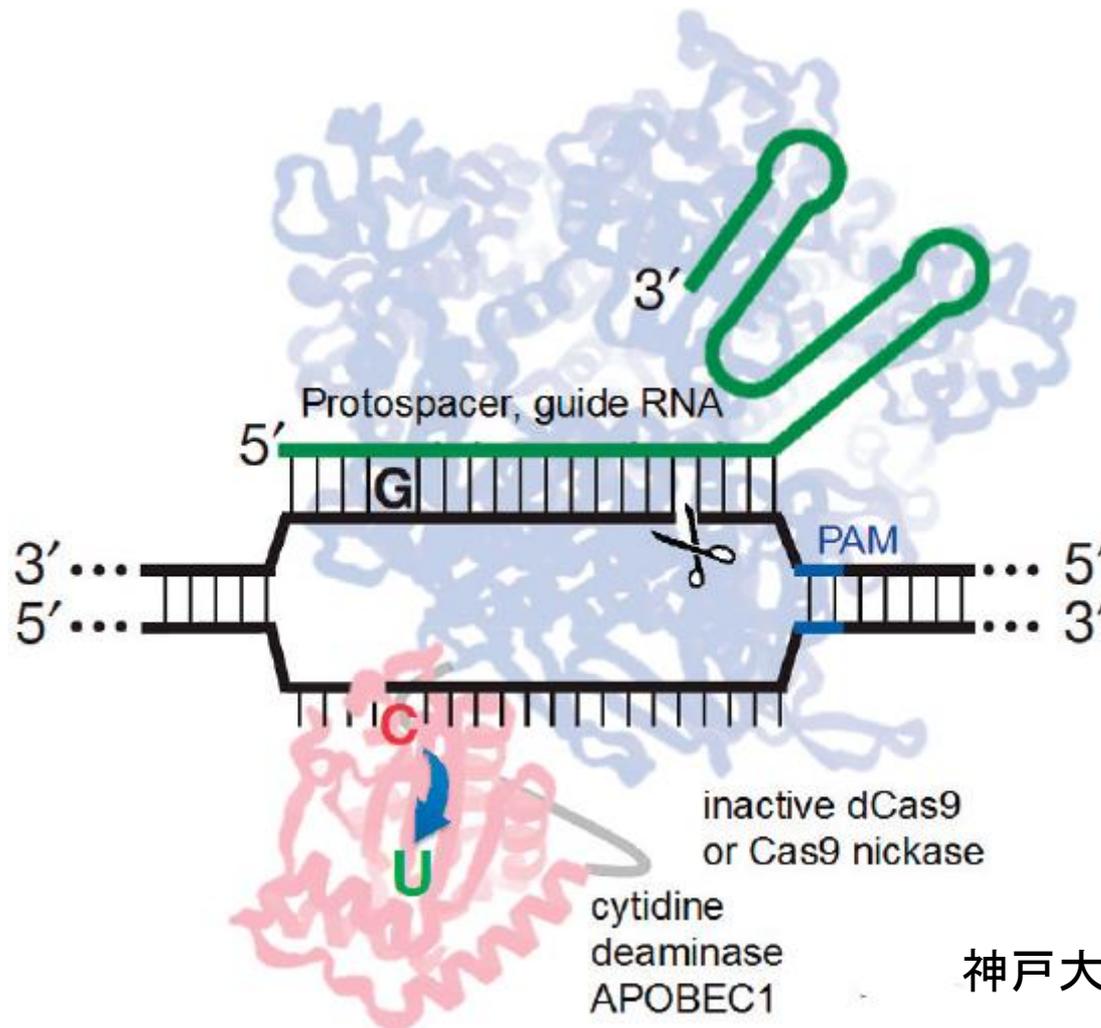
# Photoactivatable Cas9 (Pa-Cas9)

## ‘光誘導型Cas9’

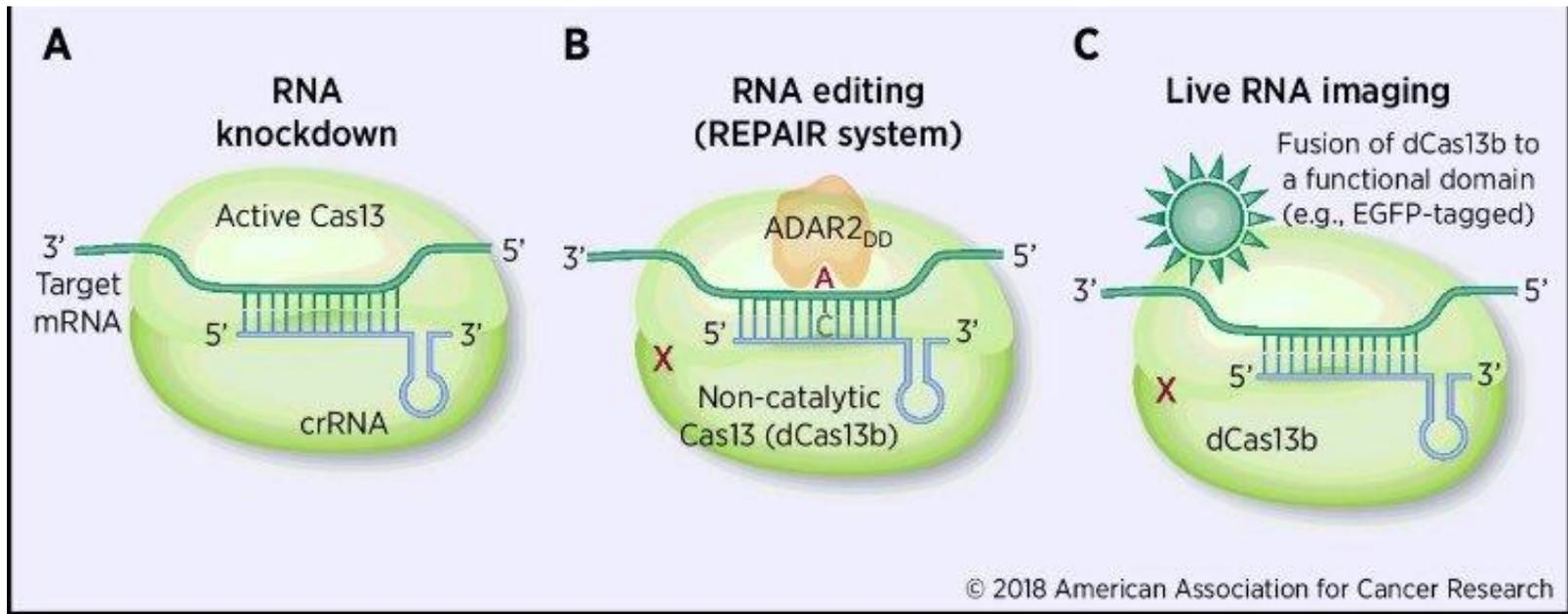


# 切らないゲノム編集 (CRISPR 2.0)

## Target-AID or Base Editor (BE)



# CRISPR/Cas13によるRNA編集



RNA分解  
(ノックダウン)

RNA編集  
(変異修復)

RNA検出  
(スクリーニング)

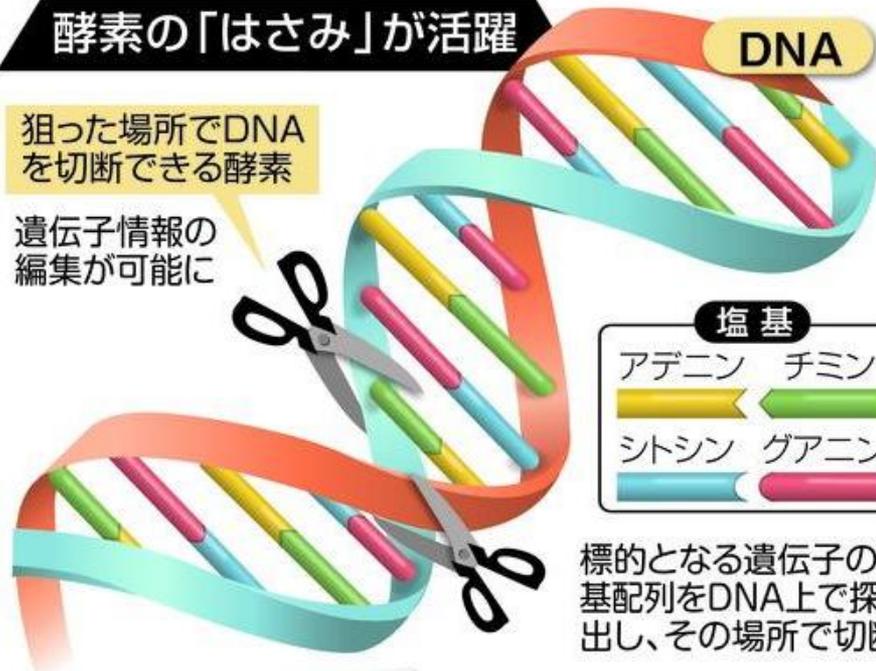
# 遺伝子を正確に切り貼り

※農業生物資源研究所、中央大、京都大、内閣府の資料を基に作成

## 酵素の「はさみ」が活躍

狙った場所でDNAを切断できる酵素

遺伝子情報の編集が可能に



DNA

### 塩基

アデニン	チミン
シトシン	グアニン

標的となる遺伝子の塩基配列をDNA上で探し出し、その場所で切断

## 遺伝子の編集方法

DNA

標的の遺伝子

改変

一部の塩基を別の塩基に置き換え

破壊

切れ目を入れ破壊、機能しない状態に

導入

外部から別の遺伝子を導入

## 広がる応用の可能性

### 品種改良

● トマト



張りを失いにくくして日持ちを向上

● マグロ



激しく泳ぎ回らないようにして養殖しやすくする

● ジャガイモ



芽に有害物質を作る遺伝子を破壊

● イネ



アレルギー物質を作る遺伝子を破壊

### 産業利用

● バイオ燃料



油を作る藻を改良して生産量を増大

● 生物工場



カイコの体内で医薬品や化粧品の原料を生産

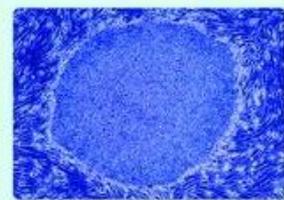
### 医療研究

● 実験用マウス



病気を発症させ新たな治療法を開発

● 難病治療



患者のiPS細胞で病気の原因遺伝子を修復

# 実験動物におけるゲノム編集基盤技術

多重遺伝子ノックアウト



ノックアウト



大規模欠失



非

復

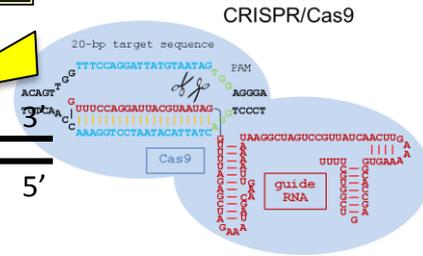
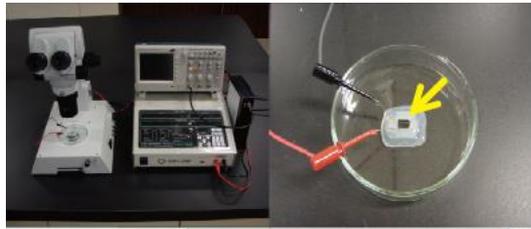
特許申請



エレクトロポレーション

出願人: 京都大学、ネッパジン

出願日: 2013年10月4日



迅速  
 簡単  
 低コスト  
 で作製!

ssODN (80-120bp)



相同組換え修復



カセットの挿入



コンディショナル (floxed)



# 2-Hit 2-Oligo (2H2OP) 法 !

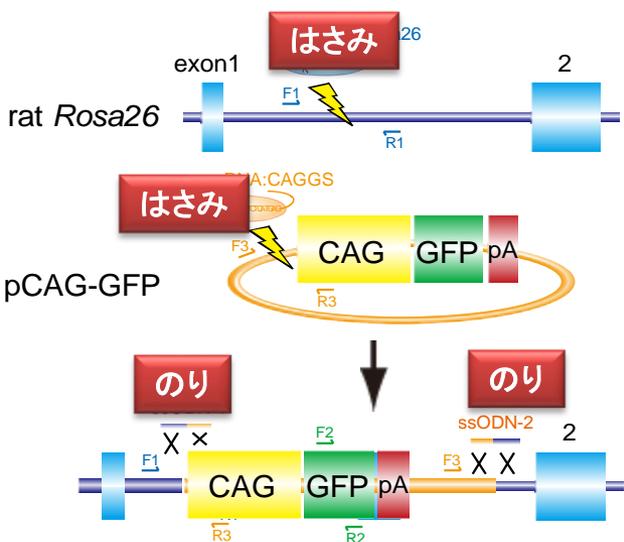
特許申請

哺乳動物の標的ゲノム領域にDNAをノックインする方法及び細胞

出願人: 京都大学 (真下知士、吉見一人、金子武人)

出願日: 平成26年11月20日、出願番号: 2014-235898

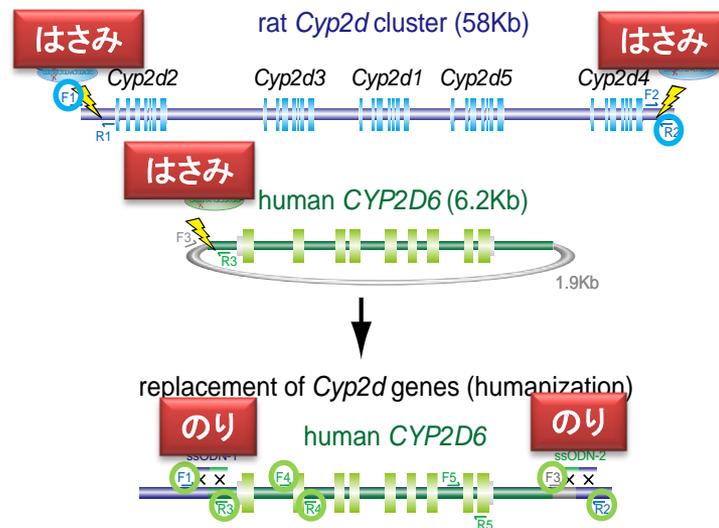
## GFPノックイン (*Rosa26*)



17.6% (3/17 knock-in pups/offspring)

✓ プラスミド、BAC(200 Kb)ノック.

## Cyp2d置換 (ヒト化)



✓ 遺伝子クラスター置換 !

(Yoshimi et al, Nature Commun 2016)

# CLICK!

(CRISPR with lssDNA inserts conditional knockout alleles)

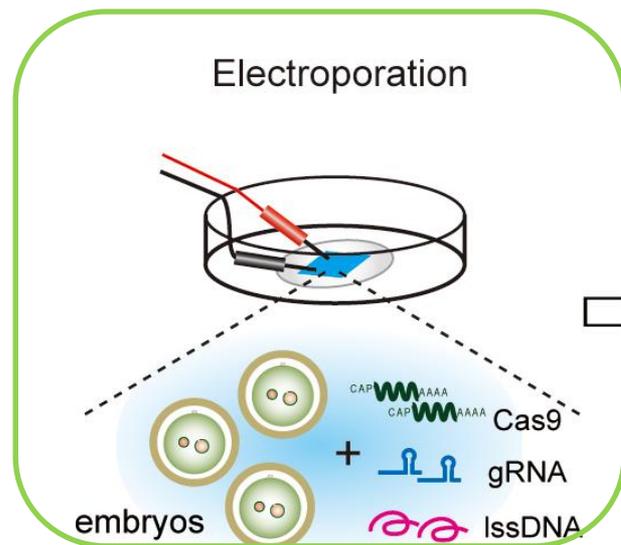
特許申請

## ゲノム編集方法

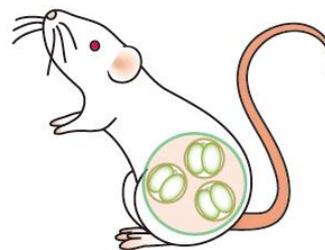
出願日:平成28年11月28日、出願番号:2016-229976

出願人:大阪大学(真下知士、宮坂佳樹)

CLICK

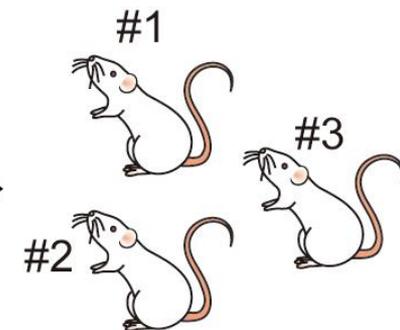


Embryo transfer



Foster mother

Delivery



F0 (genotyping)

# CRISPR/Cas9による動物ゲノム編集の課題

	ノックアウト (KO)		ノックイン (KI)				
	indels	大規模欠失	SNP	Tag	flox	Reporter (GFP, Cre)	Human genes
ゲノムサイズ	数bp	~100Kb	1 bp	数十bp	数百bp	数Kb	~200Kb
方法	gRNA Cas9 RNP	2 gRNAs Cas9 RNP	gRNA Cas9 RNP ssODN		2 gRNAs Cas9 RNP LssDNA	gRNA Cas9 RNP LssDNA	2 gRNAs Cas9 2 ssODNs
名称	受精卵エレクトロポレーション			CLICK		LssDNA	2H2OP
効率 (%)	50-100	10-30	10-30		5-20	0-10?	5-10

問題点: サイズが大きいと困難、不完全挿入が多い!

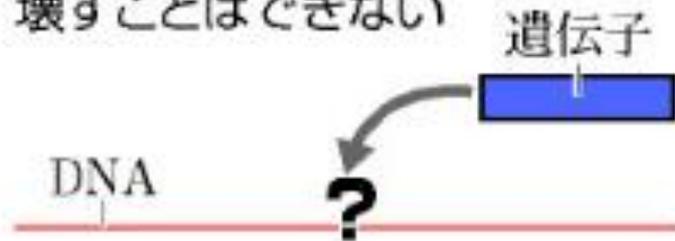
今後の課題: 数kbノックインのゲノム編集技術が必要!

## ゲノム編集と従来の遺伝子治療

これまでの遺伝子治療

どこかに遺伝子を追加する。

壊すことはできない



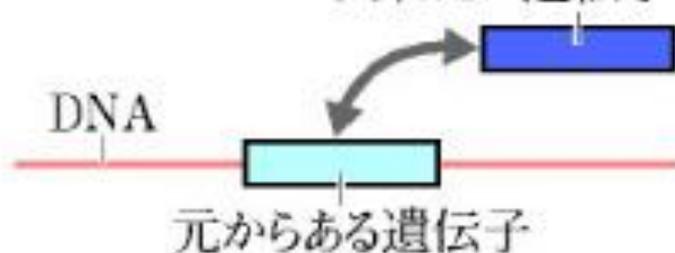
ゲノム編集でできること

①狙った遺伝子を壊す



②狙った遺伝子を置き換える

入れたい遺伝子



# ヒトの 遺伝子改変は どこまで 許されるのか

## ゲノム編集の光と影

石井哲也 北海道大学教授



「がん」「HIV」「不妊」難病治療から

「外見」「運動能力」デザイナーベビーまで

## 生命の設計図

## DNAにメスが入る!

ノーベル賞有力候補「ゲノム編集」  
その可能性と問題点に迫る——。



# ゲノム編集治療

患者の体外で遺伝子を  
を改変するケース

ウイルスを使って  
薬にするケース

患者の細胞  
を取り出す



遺伝子の「運び屋」  
となるウイルスに  
遺伝子を挿入



①体外 (ex vivo)

②体内 (in vivo)

遺伝子の  
挿入や改変



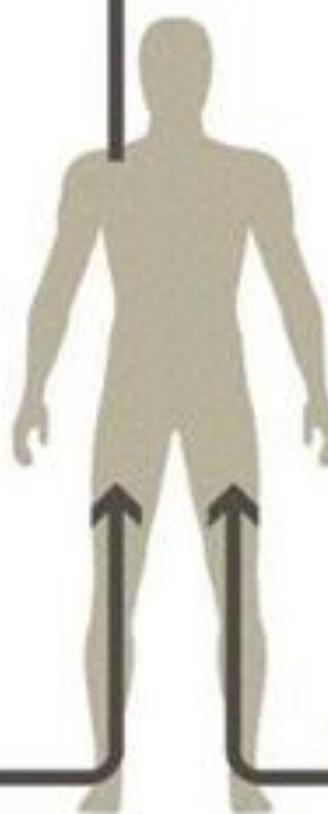
ウイルスを  
培養

細胞が活性  
化



薬剤化して  
患者に投与

患者の体内  
に戻す



## Gene editing saves girl dying from leukaemia in world first



Layla is doing well so far  
Sharon Lees/GOSH

By Michael Le Page

For the first time ever, a

①体外 (ex vivo)

One-year-old Layla was dying from leukaemia after all conventional treatments failed. "We didn't want to give up on our daughter, though, so we asked the doctors to try anything," her mother Lisa said in a statement released by Great Ormond Street Hospital in London, where Layla (pictured above) was treated.

And they did. Layla's doctors got permission to use an experimental form of gene therapy using genetically engineered immune cells from a donor. Within a month, those cells had killed off all the cancerous cells in her bone

# 血友病患者の遺伝子治療

遺伝子修復配列をもつAAVベクター



ゲノム編集ツールを発現する AAV ベクター



## ②体内 (in vivo)

静脈投与



生後の血友病 B マウス

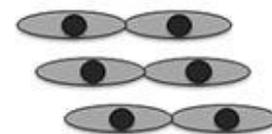
凝固因子活性の上昇  
出血傾向の改善

## 血友病に対する遺伝子細胞治療

ベクター直接投与



細胞の移植



凝固因子発現細胞

血友病患者

科学が深まる、世界が広がる

# nature ダイジェスト

07  
2015

## ヒト胚ゲノム編集の波紋

4世代前にネアンデルタール人  
がんDNA分析の3割は偽陽性  
ニワトリ胚で恐竜の顔を再現  
三親胚に代わる?新手法

遺伝子治療用ベクターに入る  
小さな Cas9 発見

非コード RNA にペプチド!

細胞が重力で  
つぶれないわけ

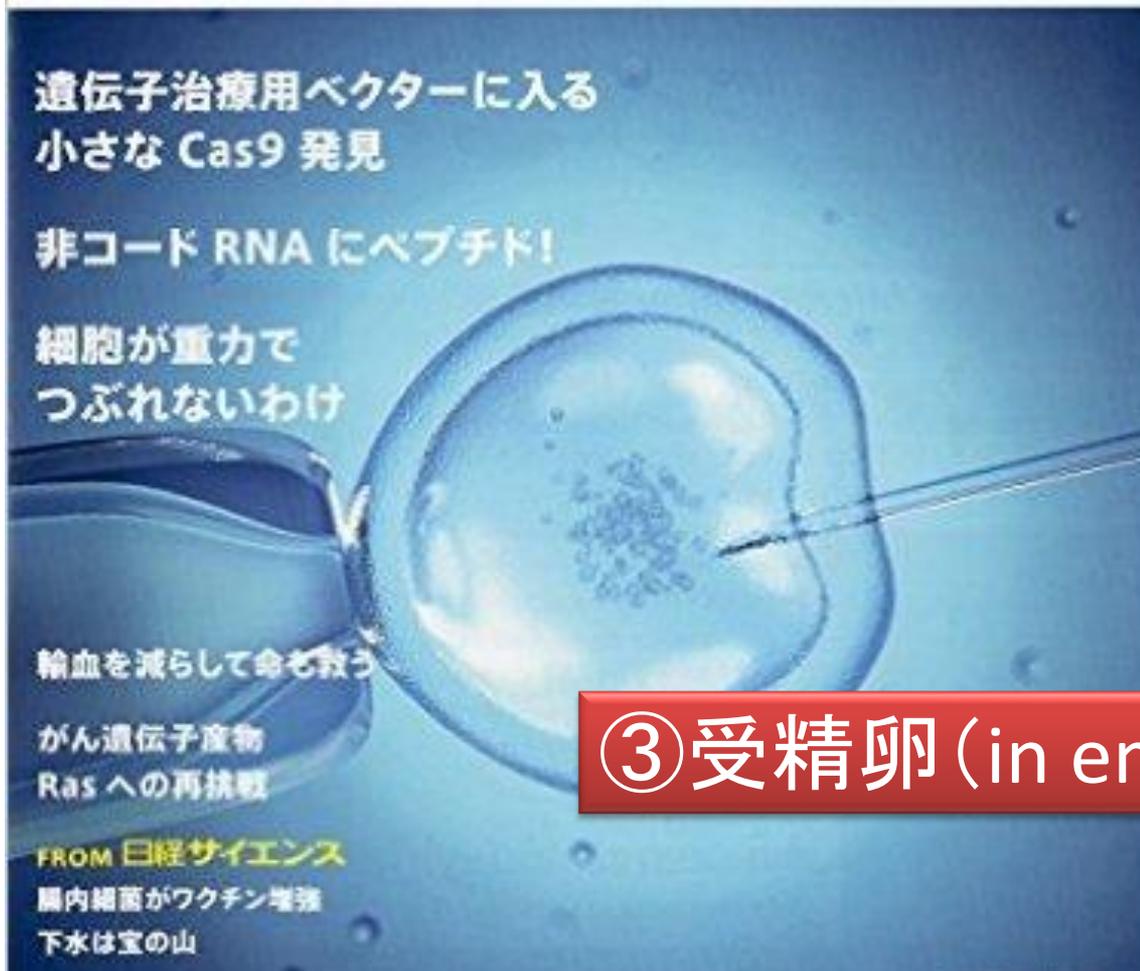
輸血を減らして命を救う

がん遺伝子産物  
Ras への再挑戦

FROM 日経サイエンス

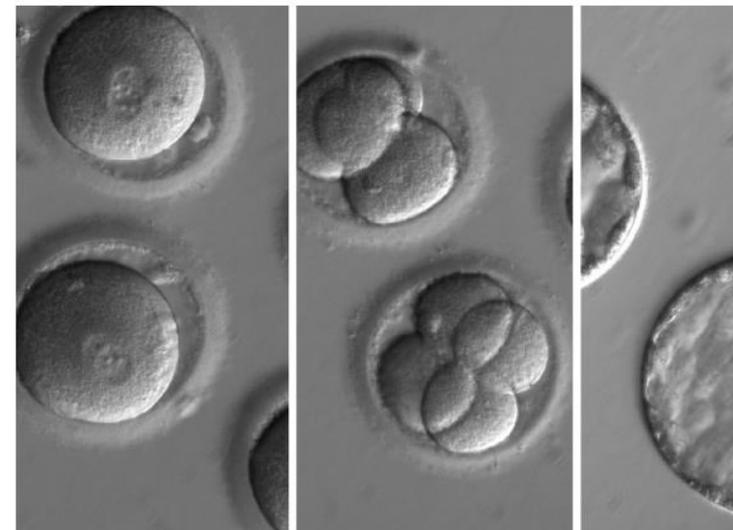
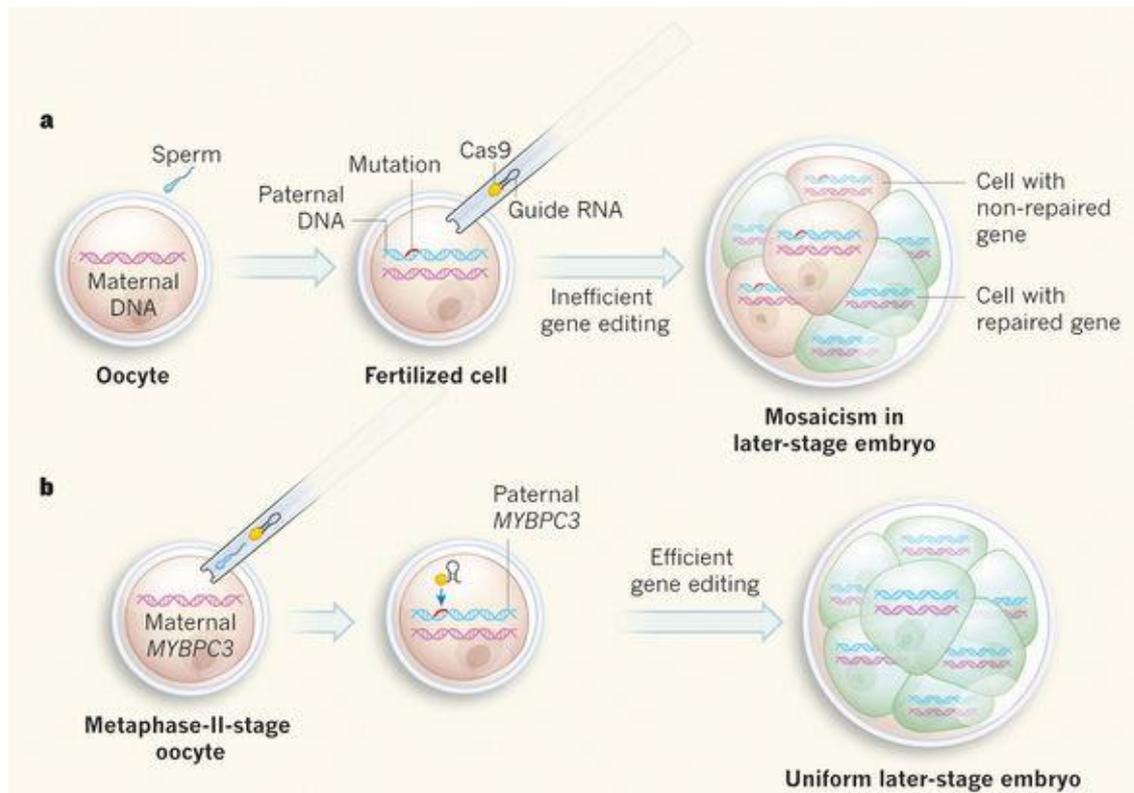
腸内細菌がワクチン増強  
下水は宝の山

③受精卵 (in embryo)



# Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Hong Ma<sup>1\*</sup>, Nuria Marti-Gutierrez<sup>1\*</sup>, Sang-Wook Park<sup>2\*</sup>, Jun Wu<sup>3\*</sup>, Yeonmi Lee<sup>1</sup>, Keiichiro Suzuki<sup>3</sup>, Amy Koski<sup>1</sup>, Dongmei Ji<sup>1</sup>, Tomonari Hayama<sup>1</sup>, Riffat Ahmed<sup>1</sup>, Hayley Darby<sup>1</sup>, Crystal Van Dyken<sup>1</sup>, Ying Li<sup>1</sup>, Eunju Kang<sup>1</sup>, A.-Reum Park<sup>2</sup>, Daesik Kim<sup>4</sup>, Sang-Tae Kim<sup>2</sup>, Jianhui Gong<sup>5,6,7,8</sup>, Ying Gu<sup>5,6,7</sup>, Xun Xu<sup>5,6,7</sup>, David Battaglia<sup>1,9</sup>, Sacha A. Krieg<sup>9</sup>, David M. Lee<sup>9</sup>, Diana H. Wu<sup>9</sup>, Don P. Wolf<sup>4</sup>, Stephen B. Heitner<sup>10</sup>, Juan Carlos Izpisua Belmonte<sup>3§</sup>, Paula Amato<sup>1,9§</sup>, Jin-Soo Kim<sup>2,4§</sup>, Sanjiv Kaul<sup>10§</sup> & Shoukhrat Mitalipov<sup>1,10§</sup>



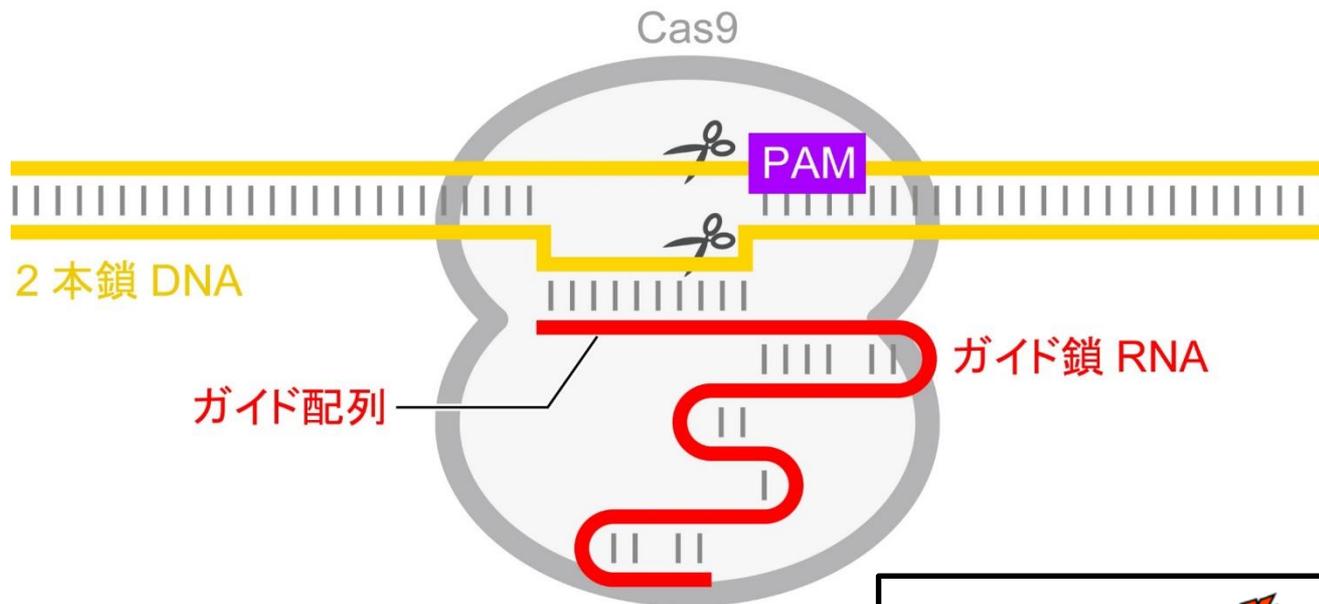
生命の再定義

Gene Editing Study in Human Embryos Points toward Clinical Trials

米国初のヒト胚遺伝子改変の詳細が明らかに、臨床試験も間近か

米国初の大規模なヒト胚の遺伝子改変実験の詳細が明らかになった。実験をした研究者によると、肥大型心筋症として知られる致命的な遺伝的心臓疾患に対して、この手法が驚くほど効果的であり、臨床試験が検討される可能性があるとしている。

# オフターゲット効果



オンターゲット



オフターゲット

# オフターゲット効果を減らすために

- コンピュータ予測

**CRISPRdirect** - Rational design of CRISPR/Cas target.

Enter an accession number (e.g. NM\_006299) or gene location (e.g. hg19:chr7:30000-90100):

or Paste a nucleotide sequence:

or upload sequence file:  no file selected

FAM sequence requirement:  (e.g. NGG, NIG)

Specificity check:  Human genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)

設計結果

Show  entries

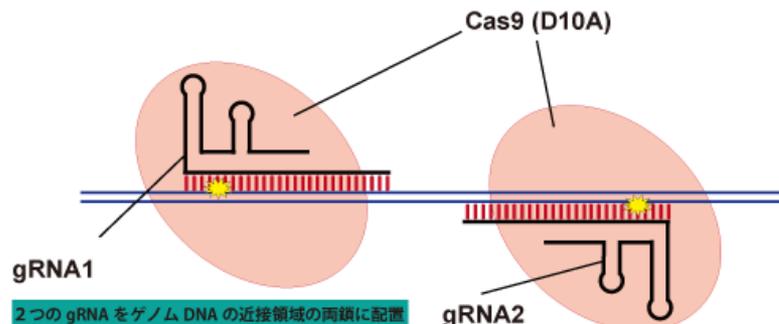
position	target sequence	sequence information	number of target sites
start - end	20mer (PAM) (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer
4 - 26	CGGAGCGTGGCGGACGAG	75.00 % 82.34 °C	1 (default)
16 - 38	CGGAGCGTGGCGGACGAG	50.00 % 71.17 °C	26 (default)
17 - 39	CGGAGCGTGGCGGACGAG	50.00 % 71.53 °C	8 (default)
21 - 43	CGGAGCGTGGCGGACGAG	50.00 % 69.25 °C	24 (default)
24 - 46	CGGAGCGTGGCGGACGAG	50.00 % 69.25 °C	2 (default)
30 - 52	CGGAGCGTGGCGGACGAG	41.67 % 76.64 °C	0 (default)
55 - 77	CGGAGCGTGGCGGACGAG	0 (default)	20 (default)
59 - 81	CGGAGCGTGGCGGACGAG	0 (default)	26 (default)
79 - 101	CGGAGCGTGGCGGACGAG	0 (default)	5 (default)
77 - 99	CGGAGCGTGGCGGACGAG	1 (default)	1,306 (default)
78 - 100	CGGAGCGTGGCGGACGAG	1 (default)	9 (default)
83 - 105	CGGAGCGTGGCGGACGAG	6.0 (default)	6,037 (default)
93 - 115	CGGAGCGTGGCGGACGAG	1 (default)	7 (default)
102 - 124	CGGAGCGTGGCGGACGAG	80.00 % 86.67 °C	1 (default)
102 - 124	CGGAGCGTGGCGGACGAG	75.00 % 84.18 °C	8 (default)
106 - 128	CGGAGCGTGGCGGACGAG	75.00 % 80.55 °C	1 (default)
107 - 129	CGGAGCGTGGCGGACGAG	75.00 % 82.61 °C	2 (default)
108 - 130	CGGAGCGTGGCGGACGAG	75.00 % 82.52 °C	2 (default)
120 - 142	CGGAGCGTGGCGGACGAG	65.00 % 80.61 °C	1 (default)
133 - 155	CGGAGCGTGGCGGACGAG	65.00 % 80.58 °C	1 (default)

Showing 1 to 20 of 77 entries

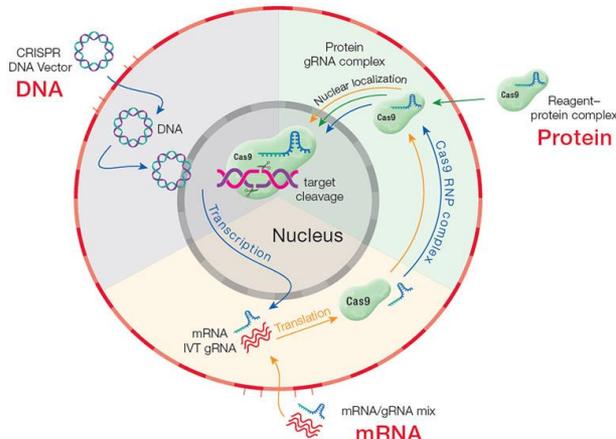
遺伝子のIDや塩基配列を入力

特異性の高いガイドRNAの候補

- 改良型Cas9



- Cas9タンパク質



- 全ゲノム解析

Integrative Genomics Browser (IGV)

VCF file

BAM file

snv\_annotation.xlsx

Jump

Click

#	Chromosome	Position	RefSeq	Chrom	Gene	Effect	Impact	Strand	Link
131	chr1	90,730 G	A	SNP	100 PLEKHA1	UPSTREAM 1147 bases	low		
132	chr1	90,652 A	G	SNP	879 PLEKHA1	UPSTREAM 225 bases	low		
133	chr1	90,652 A	G	SNP	879 PLEKHA1	UPSTREAM 225 bases	low		
134	chr1	907,631 A	C	SNP	18 PLEKHA1	INTRON	low		
135	chr1	907,631 A	C	SNP	18 PLEKHA1	INTRON	low		
137	chr1	907,631 A	C	SNP	18 PLEKHA1	DOWNSTREAM 2348 bases	low		
139	chr1	908,822 G	A	SNP	108 PLEKHA1	INTRON	low		
140	chr1	908,822 G	A	SNP	108 PLEKHA1	INTRON	low		
141	chr1	908,822 G	A	SNP	108 PLEKHA1	INTRON	low		
142	chr1	908,238 G	C	SNP	187 PLEKHA1	NON SYNCHRONOUS	low		
143	chr1	908,238 G	C	SNP	187 PLEKHA1	NON SYNCHRONOUS	low		
144	chr1	908,200 T	C	SNP	186 PLEKHA1	NON SYNCHRONOUS	low		
145	chr1	908,200 T	C	SNP	186 PLEKHA1	NON SYNCHRONOUS	low		
146	chr1	908,200 T	C	SNP	186 PLEKHA1	NON SYNCHRONOUS	low		
147	chr1	908,555 A	G	SNP	187 PLEKHA1	INTRON	low		
148	chr1	908,555 A	G	SNP	187 PLEKHA1	INTRON	low		
150	chr1	908,768 A	G	SNP	176 PLEKHA1	INTRON	low		
151	chr1	908,768 A	G	SNP	176 PLEKHA1	INTRON	low		
152	chr1	908,768 A	G	SNP	176 PLEKHA1	DOWNSTREAM 811 bases	low		
153	chr1	911,585 A	G	SNP	225 PLEKHA1	DOWNSTREAM 1115 bases	low		
154	chr1	911,585 A	G	SNP	225 PLEKHA1	DOWNSTREAM 1115 bases	low		

# CRISPR/Cas9は予期しない大きな欠失変異や染色体再構築を引き起こす！？

## Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements

Michael Kosicki, Kärt Tomberg & Allan Bradley

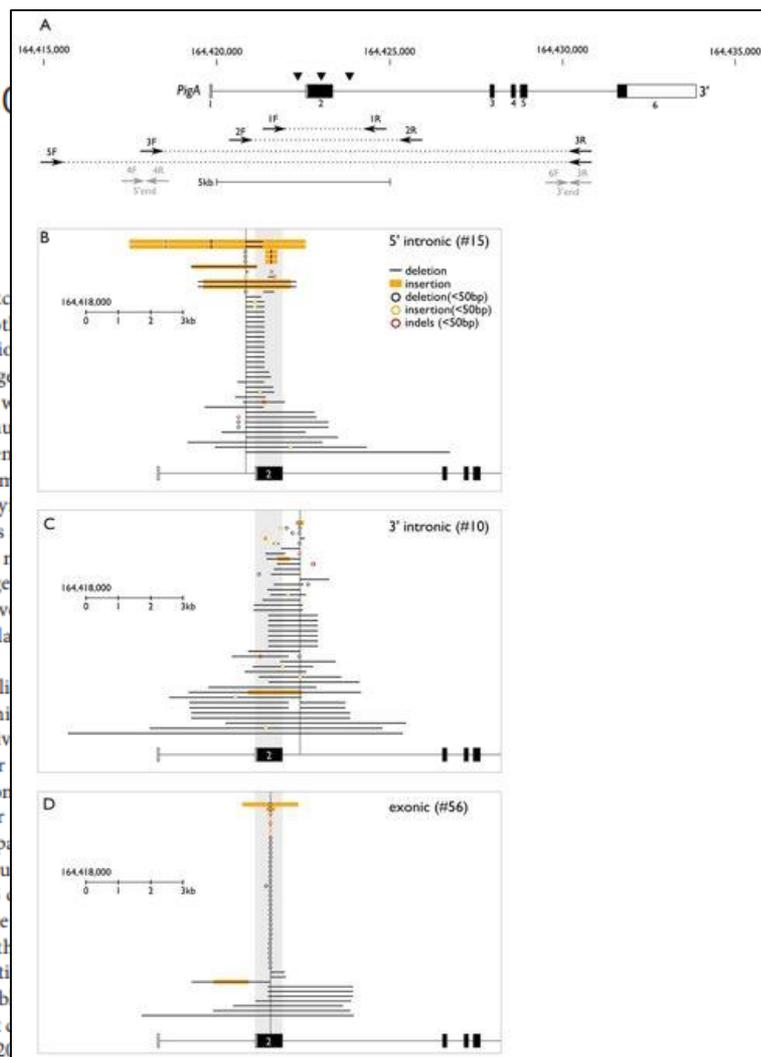
CRISPR–Cas9 is poised to become the gene editing tool of choice in clinical contexts. Thus far, exploration of Cas9-induced genetic alterations has been limited to the immediate vicinity of the target site and distal off-target sequences, leading to the conclusion that CRISPR–Cas9 was reasonably specific. Here we report significant on-target mutagenesis, such as large deletions and more complex genomic rearrangements at the targeted sites in mouse embryonic stem cells, mouse hematopoietic progenitors and a human differentiated cell line. Using long-read sequencing and long-range PCR genotyping, we show that DNA breaks introduced by single-guide RNA/Cas9 frequently resolved into deletions extending over many kilobases. Furthermore, lesions distal to the cut site and crossover events were identified. The observed genomic damage in mitotically active cells caused by CRISPR–Cas9 editing may have pathogenic consequences.

The utility of the CRISPR–Cas9 system for gene therapy in humans has been recognized and extensively investigated<sup>1</sup>. Initial concerns about the off-target activity have been addressed by the development of sensitive detection methods, as well as modified Cas9 enzymes and improved delivery protocols that limit this type of damage<sup>2–12</sup>. The vast majority of on-target DNA repair outcomes after Cas9 cutting in a variety of cell types are thought to be insertions and deletions (indels) of less than 20 bp<sup>13–15</sup>. Although indels a few hundred nucleotides in size were also observed in experiments using Cas9 or other nucleases, they were reported to be rare<sup>16–18</sup>. Consequently, Cas9 has been assumed to be reasonably specific and the first approved clinical trials using Cas9 edited cells are underway (clinicaltrials.gov: NCT03081715, NCT03398967, NCT03166878, NCT02793856, NCT03044743, NCT03164135).

rare double-cutting events cannot be excluded. Our analysis of the alleles generated using both single and dual guides has in most studies relied on amplification of the target and potential off-target sites. Lesions non-contiguous with the target and potential off-target sites, as those reported in yeast upon *I-SceI* nuclease activity, may be missed by such short-range assessments. In mouse ES lines, whose genome and DNA repair mechanisms were often used in the context of studying DNA repair, making extrapolations to normal tissues.

We speculate that current assessments of the relative proportion of potential genotypes generated by double cutting and repair, some of which may have deleterious consequences following somatic editing of large genomic regions in locally active cells.

We first comprehensively explored alleles generated at the X-linked *PigA* locus, which is hemizygous in ES cells. In contrast to cancer-derived ES cells and embryonic fibroblasts that maintain a normal karyotype and intact DNA repair mechanisms, ES cells are more representative of a normal somatic cell. In ES cells and embryonic fibroblasts differentiation pathways, it is not known how they compare. We introduced Cas9 and gRNA constructs targeting exonic sites of *PigA* into JM8 mouse ES cells. Cells with both constructs were stained with FLAER reagent to quantify the efficiency of *PigA* loss (59–97%). Notably, intronic sites also yielded *PigA*-deficient cells. Ten different guides located 263–520 bp away from the target caused 8–20% *PigA* loss, whereas two guides greater than 2 kb away



[ホーム](#)

[お知らせ](#)

[近刊情報](#)

[月刊「化学」](#)

[書店様へ](#)

[教科書をお探しの先生へ](#)

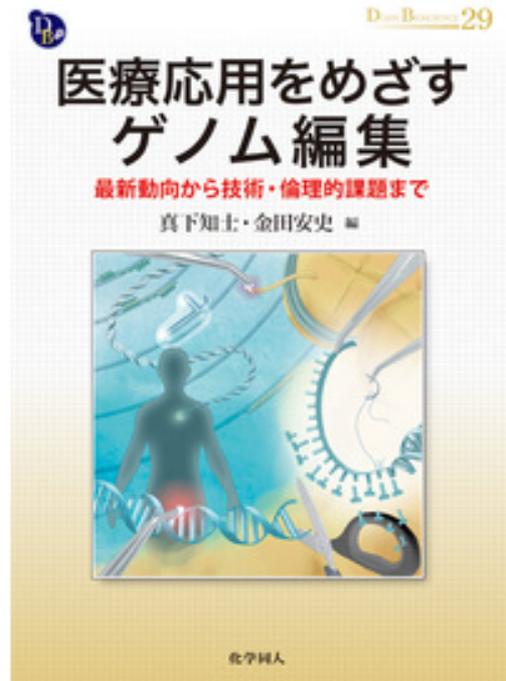
[会社情報](#)

[ホーム](#) > [医療応用をめざすゲノム編集](#)

## 医療応用をめざすゲノム編集

これから出る本

最新動向から技術・倫理的課題まで



○ 著者	真下 知士 編 金田 安史 編
○ シリーズ	DOJIN BIOSCIENCE SERIES
○ 出版年月日	2018/06/15
○ ISBN	9784759817294
○ 判型・ページ数	B5・272ページ
○ 定価	本体5,500円+税
○ 在庫	未刊・予約受付中

平成30年6月22日発刊