

特集 2 精神神経疾患における体細胞変異研究の最前線**4. ゲノム編集技術を用いた体細胞遺伝子操作**鈴木啓一郎^{1~3)}

抄録：近年、CRISPR-Cas システムの登場によりゲノムの標的遺伝子を操作する「ゲノム編集」技術が急速に進歩し、多種多様な細胞や生物種のゲノム配列を選択的に改変することが可能となった。しかしながら、標的配列を任意の配列に改変できる「相同組換え法」は、細胞周期に依存した DNA 修復機構を利用しており、分裂の盛んな細胞にしか用いることができない欠点があった。つまり、非分裂状態にある生体内のほとんどの体細胞では自由な遺伝子改変が困難であった。これに対して、筆者らは非分裂細胞でも有効な新しい遺伝子ノックイン技術 Homology-Independent Targeted Integration (HITI) 法や intercellular linearized Single homology Arm donor-mediated intron-Targeting Integration (SATI) 法の開発に成功し、さまざまな生体内の体細胞で標的ゲノム配列に外来遺伝子を組み込むことに成功した。本稿では、ゲノム編集技術を用いた体細胞遺伝子操作に関する知見と、生体内ゲノム編集技術 HITI 法、SATI 法について紹介する。

日本生物学的精神医学会誌 34 (4) : 165-170, 2023

Key words : genome editing, somatic cell, somatic mosaic mutation, HITI, SATI**はじめに**

先天的な遺伝子変異により発症する遺伝性疾患は 10,000 以上も存在すると推測されている。特に神経発生にかかわる遺伝子の機能異常は、自閉スペクトラム症や小児難治てんかんなどのさまざまな症状を示す発達障害を引き起こし、1,000 以上の遺伝子座においてその原因変異が報告されている。これら疾患の病態メカニズムや治療的介入法の研究開発には、DNA 変異やエピゲノム異常を生殖細胞に持つ「先天的遺伝子疾患」を模倣したモデル細胞・動物が用いられてきた。近年、次世代シーケンサーの台頭により急速に発展したゲノム解析の結果、ヒトの体細胞は多種多様な *de novo* 変異を持つ非均一的な「体細胞モザイク」集団であることが明らかになってきた¹⁾。特に発生初期に生じる体細胞変異は統合失調症や片側巨脳症などさまざまな神経発達障害を

引き起こす「後天的遺伝子疾患」の原因であることが推測されてきたが、これまで適切な体細胞モザイク変異モデルは存在せず、その分子機構や治療標的の探索はほとんど進んでいない。

2010 年代に入り、生物のゲノム配列を自由にデザインし改変する「ゲノム編集」技術の革新が起こり、今日のライフサイエンス研究において必要不可欠な研究手法として用いられてきている²⁾。当該技術を用いることで、巨大なゲノム配列の中から標的とする配列を選択的に認識し、改変することが容易に行えるようになった。これにより標的遺伝子の破壊（遺伝子ノックアウト）、遺伝子そのものや突然変異の挿入（遺伝子ノックイン）を迅速かつ簡便に行うことが多くの細胞種や生物種で可能となった。特に遺伝子ノックインを用いることで、特定の病的変異を修復する「遺伝子修復」も可能となり、遺伝性疾患の根本的治療にも有効な技術として期待され

Gene modification in somatic cells using genome-editing technology

1) 大阪大学高等共創研究院 (〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3) Keiichiro Suzuki : Institute for Advanced Co-Creation Studies, Osaka University. 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-8531, Japan

2) 大阪大学大学院基礎工学研究科 (〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3) Keiichiro Suzuki : Graduate School of Engineering Science, Osaka University. 1-3 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-8531, Japan

3) 大阪大学大学院生命機能研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3) Keiichiro Suzuki : Graduate School of Frontier Bioscience, Osaka University. 1-3 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

【鈴木啓一郎 E-mail : k.suzuki.es@osaka-u.ac.jp】

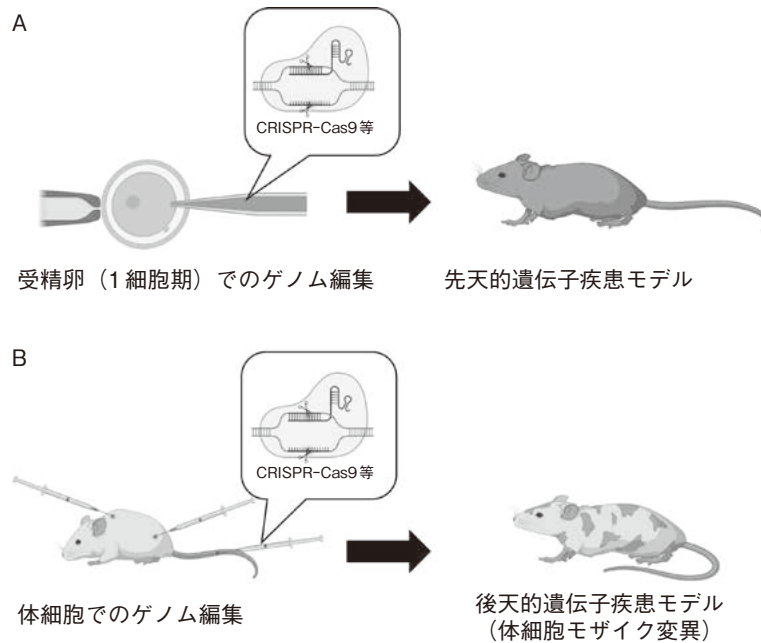


図1 ゲノム編集技術を用いたモデル動物の作製

A: 受精卵 (1細胞期) でのゲノム編集による先天性遺伝子疾患モデルの作製。

B: 体細胞でのゲノム編集による後天性遺伝子疾患 (体細胞モザイク変異) モデルの作製。

ている。マウスやラットを始めとする実験動物モデルの受精卵でゲノム編集を容易に行うことも可能となり、すべての体細胞で均一な遺伝的背景を有する「先天性遺伝子疾患」モデルの作製が短時間かつ低コストで行えるようになった(図1A)。その一方で、主に発生中に体細胞の一部で生じる変異(モザイク変異)が原因となる「後天的遺伝子疾患」のモデル動物作製には、生体組織中で直接遺伝子操作を行う「生体内ゲノム編集技術」が必要となる(図1B)。

ヒトなど哺乳類では生体を構成する体細胞は発生が進むにつれて分裂能を失い、ほとんどの細胞が非分裂状態となる。成人ヒトだと日々分裂している細胞は血球系細胞や腸上皮細胞など限られた細胞種のみで、生体細胞のわずか0.1%以下を占める⁴⁾。つまり成体中の体細胞のほぼすべては、分裂が非常に遅いもしくは分裂を完全に止めた非分裂細胞状態にある。本稿では、このように非分裂状態にある生体内体細胞でも自由に遺伝子操作ができる筆者らが開発した体細胞ゲノム編集技術について紹介する。

1. 体細胞におけるDSB修復機構とゲノム編集技術

ゲノムを構成する二本鎖DNAの切断(double strand break: DSB)は細胞にとって非常に重篤な

損傷である。この損傷を即座に修復する機構として、細胞は「DSB修復機構」を備えている³⁾。DSB修復機構は主要な2つの経路からなり、一つは、無傷な相同配列を鋳型として組換えを起こす相同組換え修復(homology-directed repair: HDR)である。もう一つの修復経路は相同配列を必要とせず切断末端を直接結合する非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)である。ゲノム編集技術は、この細胞内在性のDSB修復機構を利用することでゲノム上の狙ったDNA配列を書き換える技術である(図2A)。ゲノム中の切断部位の両側の配列に相同性を持つ外来DNA(ドナーDNA)を人為的に細胞核内に導入すると、HDRが相同配列間で組換えを起こし、ゲノム標的部位に外来DNAを挿入することができる。これを利用することで標的配列を自由自在に任意の配列に置き換える遺伝子ノックインが可能となる。NHEJによるDSB修復機構は、切断されたDNA末端を直接つなぎ合わせる際に数塩基の挿入や欠失などの修復エラーが起りやすいため、修復部位にランダムな変異が導入される。これにより、遺伝子ノックアウトが可能となる。これらの遺伝子改変を誘発するために、ゲノムの標的配列のみを特異的に切断する「人工ヌクレアーゼ」が開発されてきた。特にCRISPR-Cas9が開発された2012年以降は、さまざまな細胞種・

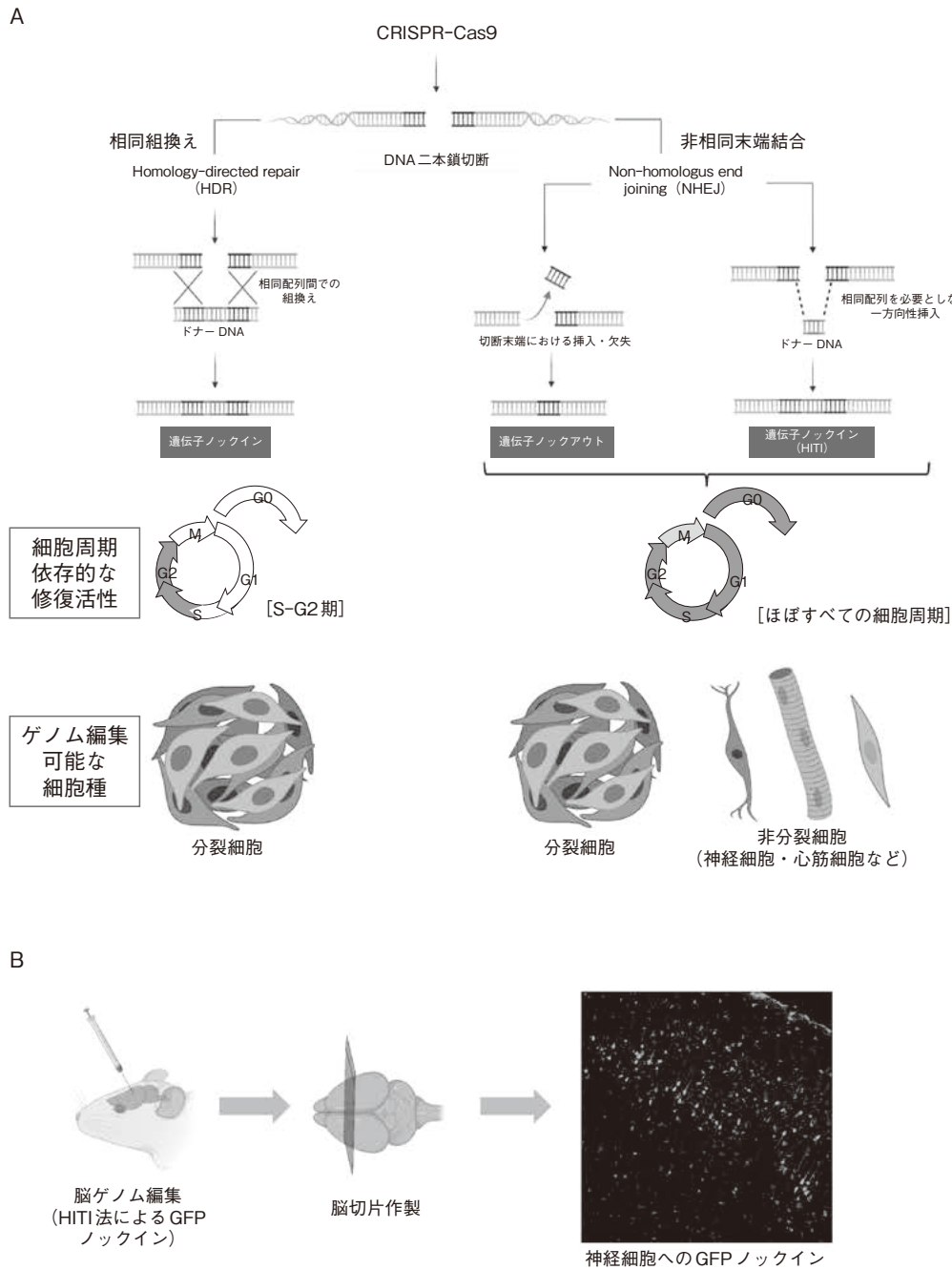


図2 ゲノム編集技術の原理および細胞周期依存性

A: 相同組換え修復 (HDR) は S-G2 期でのみ活性を持つ相同組換え機構を利用するため、分裂細胞のみで有効である。一方、非相同末端結合 (NHEJ) はほぼすべての細胞周期で活性を有するため、分裂細胞および非分裂細胞での遺伝子ノックアウトやノックインに応用できる。

B: HITI 法を用いたマウス脳神経細胞 *Tubb3* 遺伝子座への GFP ノックイン。

生物種で容易にゲノムを編集することが可能となってきた。

これらゲノム編集技術の分子機構である DSB 修復機構の大きな特徴として、細胞周期により厳密に制御されていることが挙げられる。これにより、細胞分裂を繰り返す分裂細胞と分裂を停止した G0 期や G1 期にある非分裂細胞とでは、利用できるゲノ

ム編集機構が異なる。特に、標的配列を任意の配列に自由に改変できる HDR 法は S 期から G2 期にかけてのみ活性化する DNA 修復機構を利用するため、分裂細胞でしか遺伝子ノックインはできなかった。このため、ほとんどの細胞が非分裂細胞状態にある生体内の体細胞では、疾患原因となる遺伝子変異の導入や修復といった体細胞ゲノム編集ができないこ

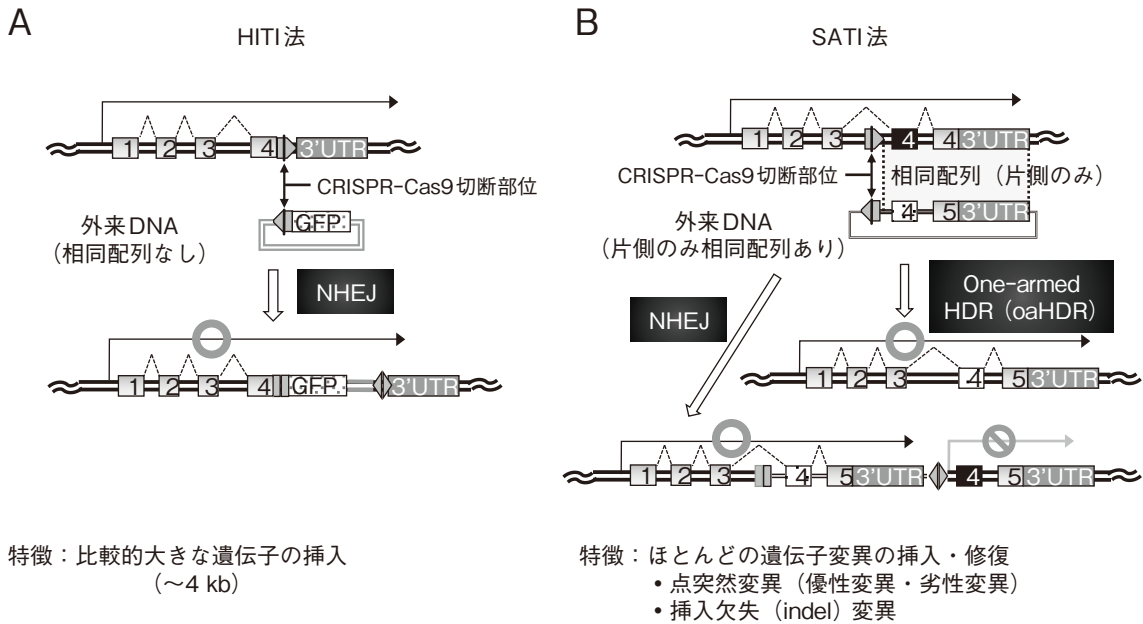


図3 HITI法とSATI法の比較

A: HITI法を利用したノックイン。置換はできないためゲノム上の配列を除けないが、比較的大きめの遺伝子(4 kb 以下)をゲノムの標的部位に挿入できる。

B: SATI法を利用したノックイン。点突然変異など小規模の遺伝子変異の存在するエクソンより上流のイントロンに、変異を持たない遺伝子の一部を持たせた外来DNAをノックインする。ドナーDNAが有する1本のホモロジーアームを介した新規相同組換え経路 (oaHDR) による置換もしくはNHEJによる挿入のどちらの経路で編集されても正常型タンパク質が発現するため、多くの種類の突然変異の導入および修復ができる

とが問題であった。

2. 非分裂細胞に有効な遺伝子ノックイン技術 HITI 法

こういった背景の中、筆者らのグループは非分裂細胞でも有効な遺伝子ノックイン技術、Homology-Independent Targeted Integration (HITI) 法を開発した⁵⁾。この方法では、CRISPR-Cas9によってドナーDNAとゲノムの標的配列が同時に切断され、NHEJ因子が切断末端に集積することでドナーDNAが挿入され、ゲノムとドナーDNAの切断末端が結合修復される(図2A)。また、NHEJにより誤った向きで目的の遺伝子が挿入されてしまうのを防ぐため、導入する遺伝子ベクター上のCas9切断配列の方向を工夫し、逆方向の挿入を抑制して目的の向きで外来遺伝子を目的の部位に挿入できるような仕組みとした。この技術は、ほとんどの細胞で活性の高いNHEJを利用するため、分裂・非分裂を問わず、さまざまな細胞で高い遺伝子ノックイン効率を示す。実際に、マウス胎児脳由来の神経細胞など、従来のHDR法では難しかった非分裂細胞でも高効率の遺伝子ノックインが可能となった。また、生体内への

遺伝子導入効率が高いadeno-associated virus (AAV) ベクターを利用し、GFPなど外来遺伝子を脳など生体内の組織でノックインすることに成功した(図2B)。

この技術は遺伝病の根治的治療を目的とする「ゲノム編集治療」にも応用できる。例えば、網膜色素変性症モデルラットの網膜に *Mertk* 遺伝子変異修復治療を行った結果、*Mertk* 遺伝子の発現量が正常ラットの4.5%まで回復し、視覚障害の部分的な回復がみられた。これらの結果から、生体内で有効なHITI法が難治性遺伝病に対する新しい遺伝子治療法「ゲノム編集治療法」となる可能性が示唆された。

3. 点突然変異を導入可能とする遺伝子ノックイン技術 SATI 法

数kb程度の外来遺伝子を標的配列に挿入するHITI法は、ゲノム中にもともと存在する遺伝子や遺伝子変異を取り除くことができないため、点突然変異の導入や修復が困難である(図3A)。この課題を解決するため、筆者らはintercellular linearized Single homology Arm donor-mediated intron-Targeting Integration (SATI) 法を開発し、生体内

のさまざまな臓器でさまざまなタイプの遺伝子変異を導入もしくは修復することができるようになった⁶⁾。当該技術は、変異の直前のイントロンに正常遺伝子の一部を NHEJ で組み込むことで、さまざまなタイプの変異を治せるゲノム編集技術となっている (図 3B)。生体内外のさまざまな細胞種でこの遺伝子ノックイン機構の分子機構を解明した結果と、NHEJ による遺伝子組み込みのほかに、相同配列を介した組み込みがみられた。この組み込みは、従来の 2 本のホモロジーアームを必要とする HDR 法とは異なり、1 本のホモロジーアームとゲノム間での組換えを利用した新規のノックイン機構であったため、筆者らは one-armed homology-directed repair (oaHDR) と名付けた。挿入する外来 DNA の構造を工夫することで、NHEJ と oaHDR のどちらの経路を介してノックインされても、結果的に遺伝子変異の導入や修復を起こせる系として確立し SATI 法と名付けた。この方法により、点突然変異の導入や修復が可能となった。実際に病的に老化が促進する早老症を発症するプロジェリア症候群のモデルマウスに対して全身で SATI 法によるゲノム編集治療を施したところ、原因変異である優性点突然変異の修復に成功し、老化の表現型の緩和、短縮した寿命を延長する治療効果が得られた。

おわりに

以上のように筆者らが開発した分裂・非分裂細胞にかかわらず有効な独自の体細胞ゲノム編集技術「HITI 法」や「SATI 法」を応用することで、体細胞の一部の細胞へ GFP などの外来遺伝子や疾患遺伝子変異を導入することが可能となり、時間的・空間的制約に縛られない「時空間特異的体細胞モザイク変異挿入技術」として応用できる。これらの技術により、がんや発達障害の起因となる体細胞モザイ

ク変異を模倣したヒトオルガノイドやマウス病態モデルが作製することが可能となり、体細胞モザイク変異に起因する広範ながんや発達障害の分子メカニズム解明と介入標的のシーズ探索など幅広い応用展開を期待している。

本論文に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

謝辞

図 1, 2 は biorender.com で作成された。

文 献

- 1) D’Gama A and Walsh CA (2018) Somatic mosaicism and neurodevelopmental disease. *Nat Neurosci*, 21 : 1504-1514.
- 2) Gaj T, Gersbach CA, and Barbas CF 3rd (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 31 : 397-405.
- 3) Pardo B, Gómez-González B and Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells : DNA double-strand break repair : how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 66 : 1039-1056.
- 4) Sender R and Milo R (2021) The distribution of cellular turnover in the human body. *Nat Med*, 27 : 45-48.
- 5) Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al (2016) In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 540 : 144-149.
- 6) Suzuki K, Yamamoto M, Hernandez-Benitez R, et al (2019) Precise in vivo genome editing via single homology arm donor mediated intron-targeting gene integration for genetic disease correction. *Cell Res*, 29 : 804-819.

■ ABSTRACT

Gene modification in somatic cells using genome-editing technology

Keiichiro Suzuki

- 1) *Institute for Advanced Co-Creation Studies, Osaka University*
- 2) *Graduate School of Engineering Science, Osaka University*
- 3) *Graduate School of Frontier Bioscience, Osaka University*

In recent years, genome-editing technology has made it possible to modify the target genome sequences of a wide variety of cells and organisms. However, the conventional homology-directed repair-mediated editing method can only be applied to rapidly dividing cells because it uses a cell cycle-dependent DNA repair mechanism. Therefore, it has been difficult to modify the target genes in somatic cells that are in a non-dividing state. To overcome this limitation, we have developed robust strategies, Homology-Independent Targeted Integration (HITI) and intercellular linearized Single homology Arm donor-mediated intron-Targeting Integration (SATI), which enable efficient targeted gene knock-in in non-dividing cells, both *in vitro* and *in vivo*. Here, I will introduce the technologies of somatic gene manipulation using HITI and SATI.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 34 (4) : 165-170, 2023)
