

## ゲノム編集の効率や安全性を 100 倍以上高める新技術を開発 遺伝子治療の実用化を加速する次世代型ゲノム編集法として期待

### ポイント

- ① クリスパル・キャス 9 (CRISPR-Cas9) (※1)は簡便なゲノム編集技術として広く使用されていますが、目的以外の変異や細胞毒性等の副作用を回避できず、実用化のための新しい技術開発が求められています。
- ② Cas9 の活性を微調整できる手法を見出し、適切な活性のもとで編集効率と安全性を最大化 (100 倍以上) できる、次世代型のゲノム編集法の開発に世界で初めて成功しました。
- ③ 今回開発したゲノム編集最適化法は、安全で効率的な遺伝子治療を行う際の標準化技術として、今後、世界中で利用されることが期待されます。

### 概要

クリスパル・キャス 9 (CRISPR-Cas9) は、あらゆる細胞の標的ゲノムを自在に編集することができる革新的な技術として、基礎研究分野の飛躍に貢献し、また、医療分野への応用が期待されています。しかし、ゲノム切断の効率を単純に重視した従来型の編集法では、過剰なゲノム切断によって目的以外のゲノム部位に対するオフターゲット変異や細胞毒性が誘導されるなどのリスクをどうしても避けることができません。遺伝子治療などの実用化がなかなか進まない背景には、このような隠れたゲノム編集リスクが大きく影響しており、この問題の解決策が求められてきました。

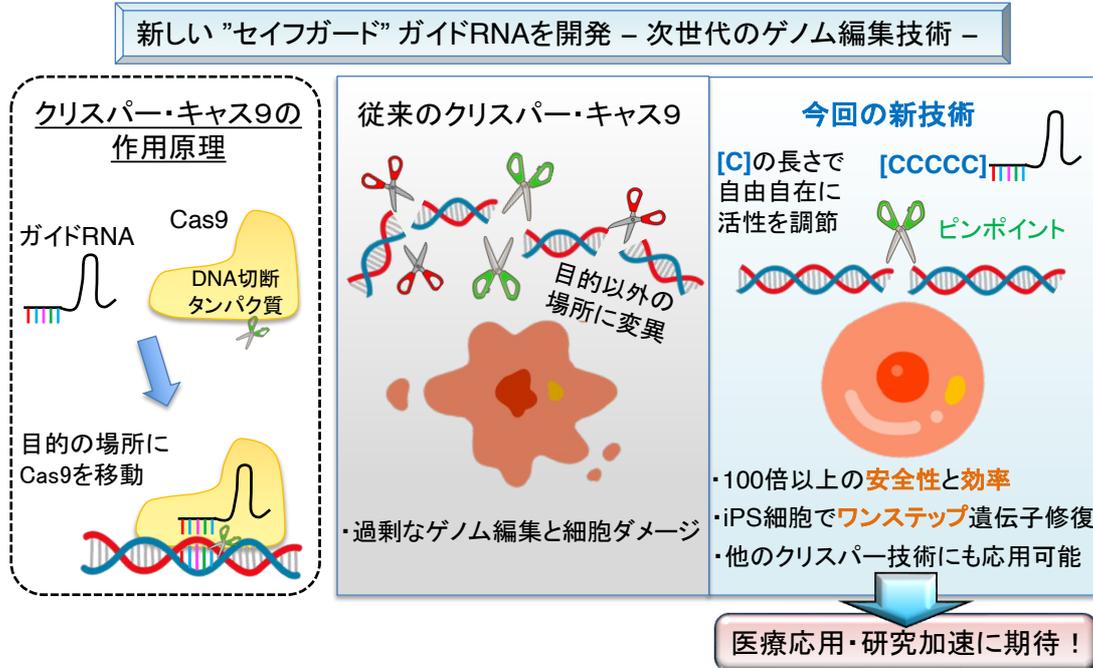
九州大学生体防御医学研究所の川又理樹 助教、木村亮太 (当時、大学院修士課程)、鈴木淳史 教授、名古屋大学大学院医学系研究科の鈴木洋 教授の共同研究グループは、ゲノム切断活性を自在に微調整できる新技術を開発し、過剰な活性の抑制により安全性と正確な編集の効率を数百倍オーダーで高めることができる次世代型のゲノム編集プラットフォームの開発に成功しました (図 1: 概念図)。

研究グループは、ゲノム編集の結果を 1 つ 1 つの細胞で、細胞が生きた状態のまま簡単に判定できる Allele-specific Indel Monitor System (AIMS)(※2)を構築し、Cas9 酵素 (DNA を切断) の活性を簡単、かつ、精密に制御できるガイド RNA (セーフガード gRNA) (※3)を開発しました。セーフガード gRNA では RNA の 5'末端へ様々な長さのシトシン(C)を付加することにより、シトシンの長さ依存的に Cas9 活性を段階的に抑制できることを見出しました。また、AIMS を用いた大規模実験データと数理モデルを組み合わせることで、1 塩基置換の精密編集などの様々なゲノム編集の用途について、それぞれの用途にどの程度の Cas9 活性が最適であるか、その全容と法則性を解き明かすことにも初めて成功しました。これにより、多様なゲノム編集実験のそれぞれの目的に対応した最適な Cas9 活性をシミュレーションできるようになり、最適なセーフガード gRNA を用いることで最も安全で効率的なゲノム編集を実施することが可能になります。

本研究の重要なもう一つのポイントとして、セーフガード gRNA が Cas9 のみならず、Cas12a(Cpf1)や CRISPRa/i (activation/interference)といったゲノム・エピゲノム編集の調節にも適応できることを明らかにしました。各種ゲノム編集ツールが抱える問題を解決し、利便性も向上させたことから、セーフガード gRNA は様々な編集ツールへの適用により幅広い分野への産業応用が期待できます。海外で始まったゲノム編集技術を用いた臨床試験では安全性の問題も報告されており、医療応用への懸念が高まっています。私たちは現在、医療分野を中心に本技術を広く使用して頂くため、アメリカでスタートアップを開始し、安全な遺伝子治療の実現を目指して、更なる研究開発を進めております。

本成果は、日本時間 2023 年 4 月 11 日(火)午前 0 時 (英国時間 4 月 10 日(月)午後 4 時) に国際学術誌「Nature Biomedical Engineering」オンライン版で公開されました。

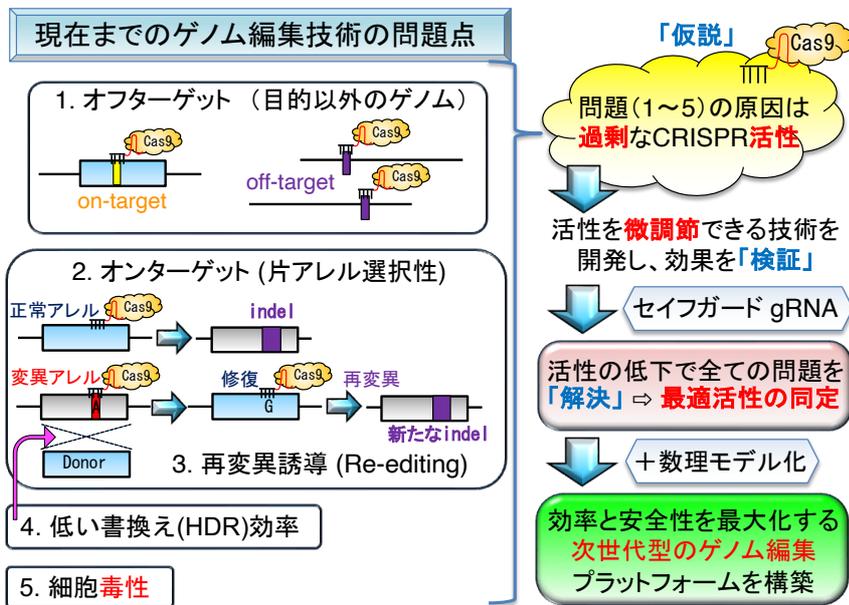
【図1：概念図】



【研究の背景と経緯】

CRISPR-Cas9（2020年ノーベル化学賞受賞）を中心としたゲノム編集技術は現在、世の中に広く普及し、基礎研究の急速な発展だけでなく、既に食品や医療分野では産業応用化が進められています。この技術がこれだけ早く普及した理由は、目的とする編集を誰でも簡単に、且つ、迅速に実施できるツールであるからです。しかし、特に実験ツールとして使用している多くの研究者は、従来よく知られている副作用の原因であるオフターゲット変異以外に、検出が困難な染色体レベルでの巨大変異や、意図したゲノム編集を導入したアレルとは異なるもう1つのアレルに誘導されるオンターゲットのindel変異（※4）、DNA切断後のp53シグナル依存的細胞死などの深刻な編集リスクには気づかず、もしくはそれらを許容したかたちで日々の研究を行なっているのが現状です（図2）。実際にこれらの問題は、海外で進められている遺伝子治療の臨床試験でも発生しており、例えば、CAR-Tがん治療を受けた患者の移植由来T細胞で染色体転座が発生したり、筋ジストロフィー治療を受けた患者が亡くなったりする事例が起きています。つまり、現在のCRISPRツールとその使用方法は、非常に活性が高いために気軽に使いやすい一方で、細胞内でのゲノム編集には最適化されておらず、その認識がようやく共有されるようになってきました。そして、現在、疾患治療をはじめとした様々な産業分野の実用化に向けて、安全性と効率を最大限に引き出すことのできるような標準化技術の開発が世界中で進められています。

最適なゲノム編集法を開発するためには、上記の問題がなぜ発生するかの原因を突き止めることが必要です。研究グループは以前、DNAとの親和性の弱いgRNA（ガイドRNA）を誤って設計した際に、精密編集細胞を効率よく取得できた経験をもとに、現在普及している編集法プロトコルでは、実はCas9のDNA切断活性が過剰であり、これが上記で挙げた様々な問題のトリガーになっているとの仮説を立てました。そこで、この仮説を検証するために、Cas9活性を自在に調節できる新技術を開発し、活性の抑制が安全性や編集効率にどのような影響を与えるかの全容解明を行いました（図2）。さらに、この解析を通して、最適な活性のもとで、目的とする様々な用途のゲノム編集の効率と安全性を最大化できる、次世代型のゲノム編集標準化プロトコルの確立を試みました。



【図2:問題点と解決までの流れ】  
現状のゲノム編集技術における問題点1~5(左図)に対して、なぜこれらの問題が生じるのかの仮説をたて、解決手段の考案とシーズ開発、検証を通して、全ての問題を解決できる新規のゲノム編集法の開発に成功しました(右図)。

【研究の内容と成果】

研究グループは、まず、Cas9の活性(=indel変異の誘導効率)を父母由来の染色体(アレル)毎に蛍光を目印にして別々に評価できるシステム「AIMS」をマウスES細胞で構築しました。実際に通常のgRNAを用いた際のCas9活性をAIMSによって測定した結果、ほぼ全ての細胞の両アレルにindelが誘導されたことから(1455/1464細胞=99.4%)、一般的な方法では非常に高い活性のもとで編集が行われていることが確認されました。次に、AIMSを用いて、このCas9の高い活性を抑制できるgRNA改変法を探索し、5'末端への余分なシトシン[C]の伸長が、過剰活性のブレーキ役「セーフガード(安全装置)」として効果的であることを見出しました(図3A)。  
[C]鎖は長くするほどCas9の活性が段階的に抑制されるという特徴を有し(図3B)、世界初の非常に簡便なfine-tuningシステムの確立・セーフガードgRNAの開発に至りました。

このユニークな活性抑制がどのような機序で起きているのかを解析した結果、以下の3つのメカニズムが相まって[C]鎖長依存的な抑制が細胞内で起きていることを突き止めました。

- ① [C]鎖依存的なgRNA:Cas9複合体の標的DNAへの結合能(親和性)の低下(~1/2.4倍)
- ② [C]鎖依存的なDNA切断能の低下(~1/2倍)
- ③ [C]鎖依存的な細胞内gRNA量の低下(~1/1000倍)

特に③に関しては、細胞内でのU6プロモーター制御のみならず、試験管内のT7プロモーターによる転写実験においても、gRNA発現量が[C]鎖依存的に抑制され、新しい転写制御メカニズムの発見となりました。

次に、活性の段階的な抑制によって、アレル毎の編集パターンや相同組換え修復(homology-directed repair, HDR)を介した精密編集の効率、細胞毒性のバランスにどのような影響が出るかを解析し、以下の効果が得られることが判明しました(図3B)。

- (i) 細胞毒性を回避できる(~1800倍)
- (ii) 両アレルから片アレル選択的な編集効率を高めることができる(~185倍)
- (iii) オフターゲットが抑制できる(~19倍)
- (iv) HDR効率が亢進する(~5倍)
- (v) (ii+iv)より、非HDRアレルに傷のないレポーター等のノックイン(KI)細胞が得られる(~74倍)
- (vi) (iii+iv)より、ワンステップで片アレル1塩基編集が可能になる
- (vii) (i~vi)より、ヘテロ型SNP(※5)疾患モデルの作製や修復が可能になる(~3000倍)

(vii)のヘテロ型SNP疾患モデルのゲノム編集は、同じような配列をもったゲノムの2つのアレルのうち、片側のアレルには何も変異を導入せずに、もう片側のアレルにだけ1塩基のみのゲノム変異を導

入しなければならない最も難易度の高いゲノム編集です。本研究では、実際に、200万人に1人が発症する超希少難病(FOP) (※6)の遺伝子型を忠実に再現した ES 細胞・マウスモデルの作製に成功しました。更に、FOP 患者由来の iPS 細胞に対して、病気の原因となっているアレルの SNP を精密に修復することもでき ([10C]gRNA で 8.7%の効率に対し、従来 gRNA では 0%)、安全で効率的な遺伝子治療法としての有用性を示すことができました。

本研究のもう一つの重要なポイントとして、(ii~vi)を考慮した各種ゲノム編集パターン・効率と Cas9 活性との相関関係の数理モデルを初めて構築しました (図 3C)。本研究では、酵素反応速度理論を応用して[C]鎖依存的な Cas9 活性のメカニズムを理解するというアプローチ、ベータ分布と呼ばれる連続確率分布を応用して1つ1つの細胞での Cas9 活性のバラツキを加味して、細胞集団全体でのゲノム編集の結果を記述・シミュレーションするというアプローチ、これらの手法を用いて Cas9 のオンターゲットとオフターゲットのゲノム編集の相対的な強さを理解したり、精密なゲノム編集に必要な HDR の効率を実際のデータから予測したりするアプローチといった多彩かつユニークなモデリング手法を実装しました。これにより、例えば(vii)のような最高難易度の編集でも、効率を最大化できる Cas9 活性をシミュレーションによって求めることで、最小の労力・コストで確実に組換えクローンを取得できるようになりました。こういった精密編集は疾患モデルの作製や修復などの用途として需要が高いため、シミュレーションをもとにした1ステップ組換えでの迅速なクローン作製法は、基礎研究の発展に大きく貢献します。また、(前)臨床試験の条件検討にかかる莫大な費用と労力の大幅な削減にも繋がる点においても重要な成果と言えます。

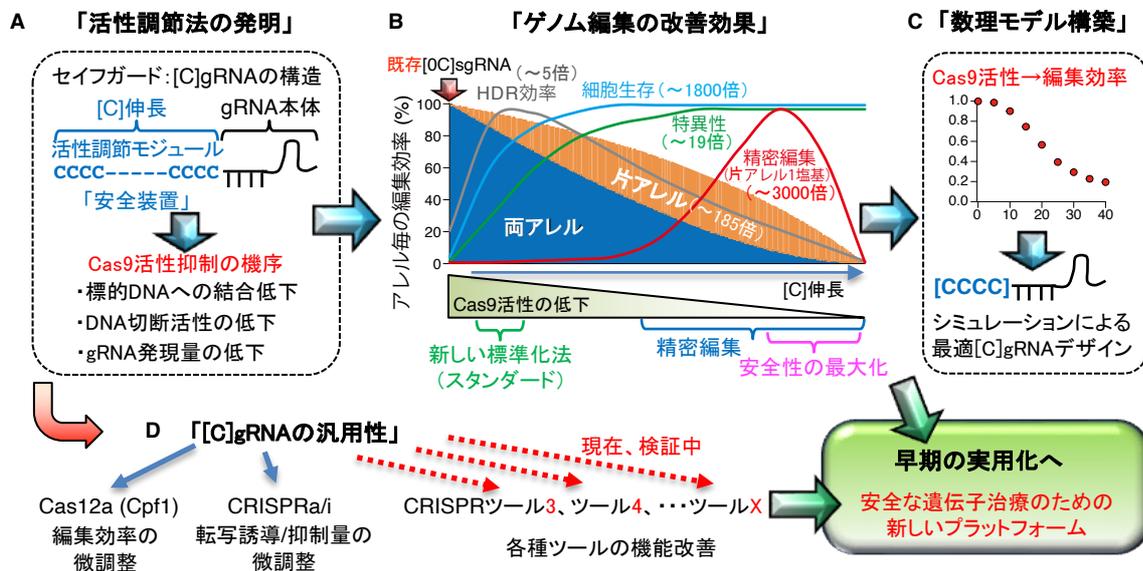
最後に、[C]gRNA 技術の特筆すべき点として、Cas9 以外のゲノム編集プラットフォームにも汎用性があることを見出しました (図 3D)。例えば、DNA 切断メカニズムが異なる Cas12a(Cpf1)に対しても [C]gRNA が段階的な活性抑制作用を示し、両アレルから片アレルの効率的な編集誘導が可能になります。また、DNA 切断型でないエピゲノム編集系にも有用性を示しました。実際に内在遺伝子を転写活性化できる CRISPRa では、神経幹細胞の増殖や分化にかかわる ASCL1 遺伝子の発現量を 1~120 倍の間で fine-tuning でき (既存 gRNA では一気に 120 倍まで上げてしまう)、転写抑制系の CRISPRi では、BRCA1 などの遺伝子発現を 1~1/10 の間で fine-tuning することができました (既存 gRNA では一気に 1/10 倍まで下げてしまう)。過剰な遺伝子発現の誘導や抑制は、細胞にとって有害となりうるため、[C]gRNA による発現量の制御は、精密な遺伝子治療の実施など様々な用途に利用できる重要な技術となります。

以上の結果から、今回、研究グループは活性調節機能を持つ[C]gRNA の開発を通して、適切な Cas9 活性 ([C]gRNA の使用) によって、目的とする編集効率を最大化できる新しいゲノム編集プラットフォームを確立しました。更に、gRNA を必要とする様々な CRISPR ツールに対しても活性の調節により、それらが抱える問題点の解消や機能拡張に応用できることを見出しました。

#### 【今後の展開】

「高い活性のもとで速やかに誘導する編集」は、今まで優れたゲノム編集法として認識されてきました。しかし、Cas9 の高すぎる活性は細胞にとってはむしろ様々な障害を引き起こす原因になっていることを研究グループは突き止め、「最適な活性のもとでゲノム編集を実施する」という新しいゲノム編集のコンセプトを提案するに至りました。今後はこの活性調節[C]gRNA (セーフガード gRNA) を用いた新規ゲノム編集プラットフォームを標準化技術として世界中に普及するために、出願特許をもとにしたスタートアップを通して事業計画を進めております。特に、本技術は医療分野に大きく貢献できるものと考えており、選定した対象疾患に対する治療効果・安全性を細胞や動物実験で評価し、治療薬としての開発を現在行なっております。

上述した通り、セーフガード gRNA 技術の強みは、Cas9 以外の CRISPR ツールにも汎用性があり、それぞれが持つ問題の解決や、不足した機能を補完できる点にあります。今回確認した Cas12a や CRISPRa/i 以外の CRISPR ツールへの汎用性の確認を通して、新たに治療の対象にできる疾患、特に、治療法が未だ確立されていない希少疾患を標的とした遺伝子治療法も開発していく予定です。



【図3：研究成果のまとめ、今後の展望】

(A)活性調節 gRNA の開発を通して、(B)Cas9 活性の抑制によってどのようなゲノム編集効果が得られるかを解析し、(C)活性と編集効率の関係性の全容を数理モデル化した。更に、(D) [C]gRNA の汎用性を Cas9 以外のツールでも確認し、現在、早期実用化を目指している。

【用語解説】

(※1) クリスポー・キャス 9 (CRISPR-Cas9) : **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats / **C**RISPR **A**ssociated proteins **9** の略で、細菌や古細菌においてウイルスやプラスミドといった外来 DNA の排除に関わる獲得免疫機構の一部をゲノム編集に応用したもの。DNA の二本鎖切断を原理とする遺伝子改変ツールとして広く利用されている。

(※2) AIMS : Allele-specific Indel Monitor System の略

父母由来の両染色体 (アレル) 毎の標的ゲノム部位における indel の有無を 1 細胞レベルでリアルタイムに識別できる世界初の細胞計測システム。シーケンス解析を必要とせず、蛍光パターンで両アレルの indel を解析できるため、大規模データを迅速に得ることが可能となる。また、通常のシーケンス法で見逃してしまう巨大変異(数百 bp の large deletion や染色体欠損・転座など)も検出可能なため、99.8%という高精度で indel を判定できる。

(※3) gRNA: guide RNA、ガイド RNA の略。

DNA 切断酵素の Cas9 と結合し、標的 DNA 配列に Cas9 を誘導する RNA 核酸。

一方、今回開発したセイフガード gRNA の命名に関しては、gRNA にシトシンを伸長させることで、細胞毒性やオフターゲットの原因となっている過剰な Cas9 活性を抑えることができ、安全性を飛躍的に高める「安全装置」としての効果を得られたことに由来する。

(※4) indel: insertion and/or deletion の略

ゲノム DNA の切断部位に生じるランダムな塩基挿入(insertion)や欠損(deletion)。Cas9 酵素や UV、放射線などによって DNA が切断されると、細胞内で修復経路が働き、切れた断片同士が再結合するが、その際に一定の頻度でミスマッチ修復=indel が発生する。

(※5) SNP: Single Nucleotide Polymorphism (1 塩基多型) の略

1 個の塩基が他の塩基に置き換わっているもので、多くの疾患発症の原因となっている。

(※6) FOP: 進行性骨化性線維異形成症。Fibrodysplasia Ossificans Progressiva の略。

全身の筋肉やその周囲の膜、腱、靭帯などが骨に変わる病気で、現在治療法はない。ACVR1 遺

伝子の片側のアレルにおける 1 塩基変異（617 番目のグアニン(G)がアデニン(A)に置換）が原因で、200 万人に 1 人の頻度で起きる遺伝性疾患。

#### 【謝辞】

本研究は JSPS 科研費：17K15046, 18H04737, 20H05041, 21K19232 (研究代表者: 川又理樹), 19K24694 (研究代表者: 鈴木洋), 18H05102, 19H01177, 19H05267, 20H05040, 21K19916, 22H05634, 22H04698, 22H00592 (研究代表者: 鈴木淳史)、AMED 研究費：JP20ae0201012h (研究代表者: 川又理樹), JP21bm0704034h, JP22fk0210116h, JP22bm1123005h (研究代表者: 鈴木淳史)、九州大学高深度オミクス医学拠点形成事業、その他の様々なご支援を受けて実施されました。

#### 【論文情報】

掲載誌：Nature Biomedical Engineering

タイトル：Optimization of Cas9 activity through the addition of cytosine extensions to single-guide RNAs.

著者名：Masaki Kawamata\*, Hiroshi I. Suzuki\*, Ryota Kimura, Atsushi Suzuki\* (\*責任著者)

D O I：10.1038/s41551-023-01011-7

#### 【お問合せ先】

<研究に関すること>

九州大学・生体防御医学研究所・器官発生再生学分野 助教 川又理樹（カワマタ マサキ）

TEL：092-642-6449 FAX：092-642-6444

Mail：kawamata@bioreg.kyushu-u.ac.jp

名古屋大学大学院医学系研究科・分子腫瘍学 教授 鈴木洋（スズキ ヒロシ）

TEL：052-744-2459 FAX：052-744-2459

Mail：hisuzuki@med.nagoya-u.ac.jp

九州大学・生体防御医学研究所・器官発生再生学分野 教授 鈴木淳史（スズキ アツシ）

TEL：092-642-6449 FAX：092-642-6444

Mail：suzukicks@bioreg.kyushu-u.ac.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報室

TEL：092-802-2130 FAX：092-802-2139

Mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp

名古屋大学医学部・医学系研究科総務課総務係

TEL：052-744-2804 FAX：052-744-2785

Mail：iga-sous@adm.nagoya-u.ac.jp