

令和3年11月22日  
愛知医科大学

## ゲノム編集による遺伝子書き換えの高効率化に成功

～書き換え効率、正確性、安全性の三拍子そろった遺伝子書き換えへ向けて～

ゲノム編集、特に CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子書き換えは、遺伝性疾患の原因遺伝子変異の修正に利用できる可能性があり、疾患の根治につながるため今後の臨床応用が期待されています。しかし、これまでの書き換えの方法は、効率（書き換えの成功率）、正確性、安全性のいずれにも課題がありました。愛知医科大学医学部生化学講座の小西裕之教授（特任）、兵頭寿典講師、ムハマド・ルトフル・ラーマン大学院生らのグループは、以前の研究で、正確性と安全性を高めた tandem paired nicking 法（TPN 法）という遺伝子書き換えの方法を考案し、その有用性を報告しました<sup>1)</sup>。今回の研究では、TPN 法の残された課題、つまり不十分な遺伝子書き換え効率を改善する方策を検討しました。その結果、TPN 法の施行条件のいくつかを変更することによって書き換え効率を改善できることを見出しました。

研究成果は 2021 年 11 月 19 日、オンライン科学雑誌「Scientific Reports」に掲載されました。

### <研究成果のポイント>

- ✓ 正確で安全性の高いゲノム編集法（TPN 法）を用いた遺伝子書き換えの効率向上を目標として研究を行った。
- ✓ 公開されているソフトウェアを使って TPN 法による高効率な遺伝子書き換えツールを設計できることを示した。
- ✓ 遺伝子書き換えツールの構成要素であるガイド RNA の長さを変更することによって書き換え効率が上昇することを見出した。

## 1. 研究の背景

疾患を引き起こす遺伝子変異の大多数は、塩基置換（特に一塩基置換）であるとされています。そのような異常な塩基配列を健常者と同じ配列へ書き換えることによって疾患を根治できる可能性があります。

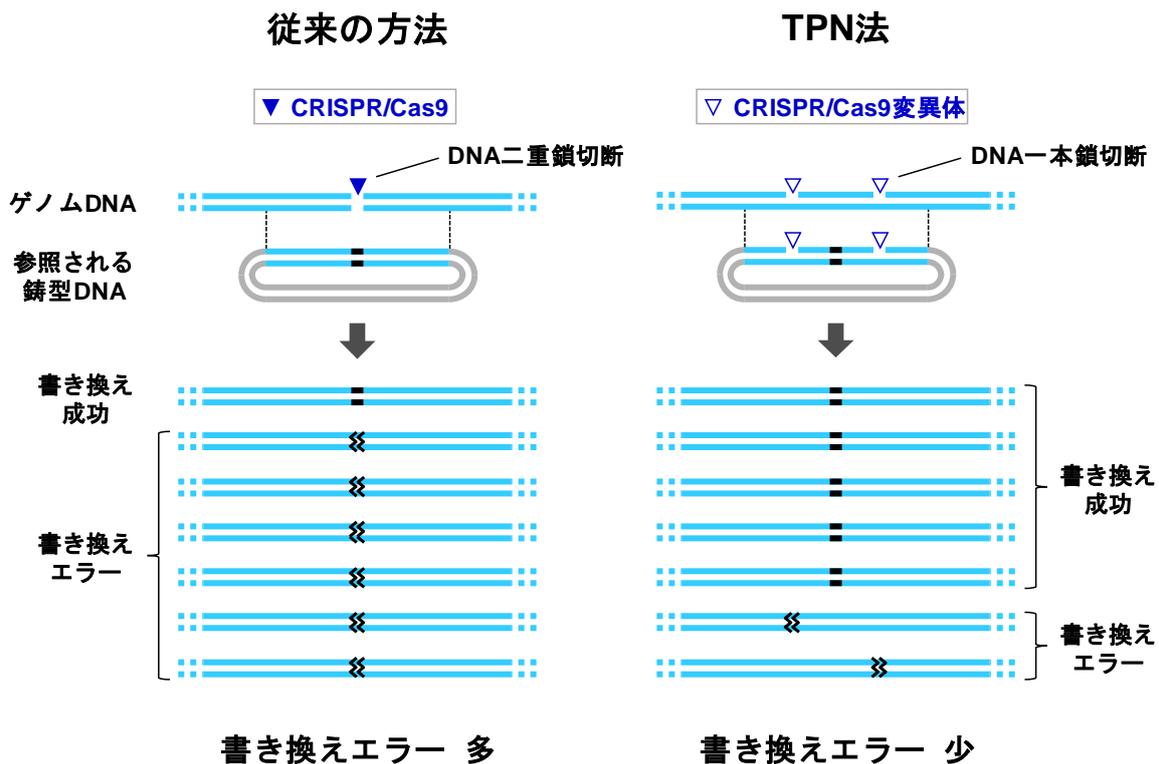


図1 塩基配列の書き換えに係る従来の方法（左）とTPN法（右）の比較

塩基配列の計画的な書き換えは、ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 を使って行うことができます。しかし、CRISPR/Cas9 は書き換えたいゲノム部位の二重鎖 DNA を 2 本とも切断するため、高頻度に書き換えエラーが発生します。また、ゲノム中の思わぬ箇所を書き換えてしまうこともあります。

小西教授（特任）らのグループは、以前、二重鎖 DNA のうちの 1 本だけを切断する CRISPR/Cas9 変異体（CRISPR/Cas9 nickase）をある特定の手法（TPN 法）で使うと、エラー率を飛躍的に抑えた正確な書き換えを行いうることを見出しました（図 1）<sup>1)</sup>。また、CRISPR/Cas9 を使う従来の書き換え方法が「ゲノムの守護神」と呼ばれる p53 がん抑制遺伝子のシグナル経路を攪乱してしまうのに対し、変異体を使う同グループの手法は p53 シグナル経路を攪乱せず、安全性の高い書き換えを行いうることを報告しました<sup>1)</sup>。

しかしながら、従来の方法と TPN 法の両方に共通する課題として、書き換え効率が不十分であることが挙げられます。そこで今回、同グループは TPN 法による遺伝子書き換えの手順を見直し、書き換え効率を上げるための方策を多角的に検討しました。

1) Hyodo T et al. Tandem paired nicking promotes precise genome editing with scarce interference by p53. *Cell Reports*, 30: 1195-1207, 2020.  
doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.064.

## II. 本研究の成果

CRISPR/Cas9 やその変異体による遺伝子書き換えでは、ガイド RNA という短い RNA 断片を使用して、ゲノム中の書き換えたい配列へ CRISPR/Cas9 (または変異体) を誘導します。研究グループは、まず、オンラインで公開されており誰でもアクセスできるプログラム (CRISPick)<sup>2)</sup> を用いて効果的なガイド RNA を選び、それを使って TPN 法による遺伝子の書き換えを行うという手順を試みました。ヒト培養細胞の特定の遺伝子にあらかじめ導入しておいた塩基置換をさまざまなガイド RNA を使って TPN 法で修正し、書き換え効率を測定した結果、CRISPick プログラムで選んだガイド RNA は期待通りの高い書き換え効率をもたらすことが分かりました。

また、同様のヒト培養細胞による実験システムを用いてガイド RNA の長さに関する検討を行った結果、通常使われてきたガイド RNA よりも一塩基短いものを使用すると、多くの場合、TPN 法による遺伝子書き換え効率が上昇することを見出しました。

さらに、TPN 法による遺伝子書き換えを高効率に行うためには、CRISPR/Cas9 変異体によって導入されるゲノム DNA 一本鎖切断の部位が書き換え部位に近い方が好ましいことや、書き換えのために使う鋳型配列 (参照配列) として長さ 1,700~2,000 塩基対の二重鎖 DNA 断片を使用するとよいことなどを明らかにしました。

2) <https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>

## III. 本研究成果の社会的意義と今後の展開

遺伝性疾患では、生まれつきの遺伝子変異に伴う様々な症状が見られ、中には命を脅かす重篤な症状もあります。遺伝性疾患の一部は、ゲノム編集技術によって遺伝子書き換え (変異修正) を行えば根治できる可能性があります。しかし、ゲノム編集を用いる治療法で現在までに臨床開発されているのは、ほぼすべて、遺伝子書き換えではなく遺伝子破壊または遺伝子導入を行うものです。遺伝子破壊や遺伝子導入も遺伝性疾患の治療に有効ですが、対象となる疾患が限定的であること、導入した遺伝子の発現コントロールが正常細胞と異なることなど、それぞれに欠点があります。

遺伝子書き換え (変異修正) によるゲノム編集治療を臨床応用へと推し進めるためには、書き換え効率の低さとエラーの多さを克服し、安全性を高める必要があります。研究グループが行ってきた TPN 法の研究は、これらの課題を克服し、遺伝子書き換えによる遺伝性疾患治療への道を開く可能性があると考えています。今後も TPN 法に多面的な技術的改良を加える研究を続けるとともに、実験動物を使った前臨床研究などにも取り組みたいと考えています。

## IV. 論文情報

**タイトル :** Experimental strategies to achieve efficient targeted knock-in via tandem paired nicking (Tandem paired nicking 法で効率的な遺伝子書き換えを行うための実験戦略)

**著者 :** Md. Lutfur Rahman<sup>1</sup>、兵頭寿典 (Toshinori Hyodo)<sup>1</sup>、Sivasundaram Karnan<sup>1</sup>、太田明伸 (Akinobu Ota)<sup>1</sup>、Muhammad Nazmul Hasan<sup>1</sup>、三原優子 (Yuko Mihara)<sup>1</sup>、Md Wahiduzzaman<sup>1,2</sup>、都築忍 (Shinobu Tsuzuki)<sup>1</sup>、細川好孝 (Yoshitaka Hosokawa)<sup>1</sup>、小西裕之 (Hiroyuki Konishi)<sup>1</sup>

1. 愛知医科大学医学部 生化学講座
2. 現・ Bangladesh 医学研究機構

**掲載誌 :** Scientific Reports (日本時間 11 月 19 日午後 7 時)

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業 (18K14703、19K09292、18K08342、21K08426、18H02645、19K08668、17K07263、20K06613)、公益財団法人日東学術振興財団、公益財団法人武田科学振興財団、公益財団法人ヒロセ国際奨学財団、公益財団法人市原国際奨学財団、公益財団法人高橋産業経済研究財団の支援を受けて行われました。

### <問い合わせ先>

#### 研究に関すること

愛知医科大学医学部 生化学講座  
小西 裕之 教授 (特任)  
TEL: 0561-62-3311 (内線: 12362)  
FAX: 0561-61-4056  
e-mail: hkonishi@aichi-med-u.ac.jp

#### 報道担当

愛知医科大学 庶務課  
TEL: 0561-61-5396  
FAX: 0561-62-6690  
e-mail: syomu@aichi-med-u.ac.jp