

ゲノム編集と iPS 細胞

Genome editing and iPS cells

長 船 健 二

Kenji OSAFUNE

はじめに

近年、ゲノム編集と呼ばれるゲノム DNA 配列の任意の箇所を自在に改変する技術が著しく進展し、医学生物学のさまざまな分野での応用が始まっている。一方、患者由来の体細胞に数種の遺伝子を導入することで樹立され、無限の増殖能と全身の臓器の構成細胞種に分化可能な iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell: 人工多能性幹細胞)^{1,2)}を用いた細胞療法(狭義の再生医療)や、疾患モデル作製による病態解析および治療薬開発など臨床応用を目指した研究が盛んに行われている。特に患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル作製研究は、幼少期など比較的早期から発症する遺伝子変異疾患を扱ったものがほとんどであり、ゲノム編集技術の登場により遺伝子変異の影響を高い精度で検証することが可能となり、より一層の研究進展が期待されている。

本稿においては、ゲノム編集技術の基礎と歴史的経緯をまとめ、iPS 細胞とゲノム編集を組み合わせた細胞療法や、病態解析および治療法開発などの応用研究の現状と展望について概説したい。

ゲノム編集の歴史

1. 相同組換え法

ゲノム DNA 配列の任意の部位を改変する技術は、これまでも長きにわたって研究され、その開発が切望されていた。まず、1970 年代頃より大腸菌や酵母などの単細胞生物において「相同組換え (homologous recombination: HR)」と呼ばれる、ゲノム上のターゲット部位に特定の配列を挿入

する技術が開発された。具体的には、改変したいターゲット部位の前後と同じ配列(相同アームと呼ばれる)を含む鋳型 DNA(ターゲッティングベクターと呼ばれる)を細胞内に導入すると、確率は低いが外来の鋳型 DNA 配列がゲノムターゲット部位に置き換わる現象が知られていた。この現象を利用して、相同アームの間に組み込みたい遺伝子配列と薬剤耐性遺伝子などを含む鋳型 DNA を導入し、薬剤で選択することにより相同組換えの起こった細胞のみが生き残るシステムが開発された。そして、1987 年にはマウス ES 細胞(embryonic stem cell: 胚性幹細胞)にて相同組換えを起こすことに成功し、さらにマウス ES 細胞からマウス個体を生み出すことも可能となり、マウス ES 細胞において相同組換え法を用いてターゲット遺伝子を破壊し、生まれてくるマウスにおいてどのような症状を生じるかを調べることで、遺伝子機能の解析と疾患研究が大いに進展した^{3,4)}。

しかし、マウス ES 細胞は、12~16 時間に 1 回細胞分裂する増殖能の旺盛な細胞である。増殖能が旺盛な細胞では、細胞周期における G1 期が短く、DNA を複製する S 期が相対的に長くなる。相同組換えは主に S 期で起こるため、S 期が長いマウス ES 細胞では相同組換えが起こりやすいが、細胞増殖が遅いヒト細胞においては相同組換えの効率が悪く、ヒト iPS/ES 細胞でも効率良くゲノム編集を行う技術の開発が望まれていた⁵⁾。

2. ゲノム編集技術の登場

近年開発されたゲノム編集技術を端的に表現すると、狙った特定のゲノム配列に DNA 二本鎖切断を起こし、細胞に内在する DNA 修復機構を誘導し利用することによって効率良くゲノム配列を改変する技術である(図 1)。

まず 1996 年に、DNA 配列を認識して結合する Zinc Finger ドメインに FokI とよばれる DNA 切断(ヌクレアーゼ)ドメ

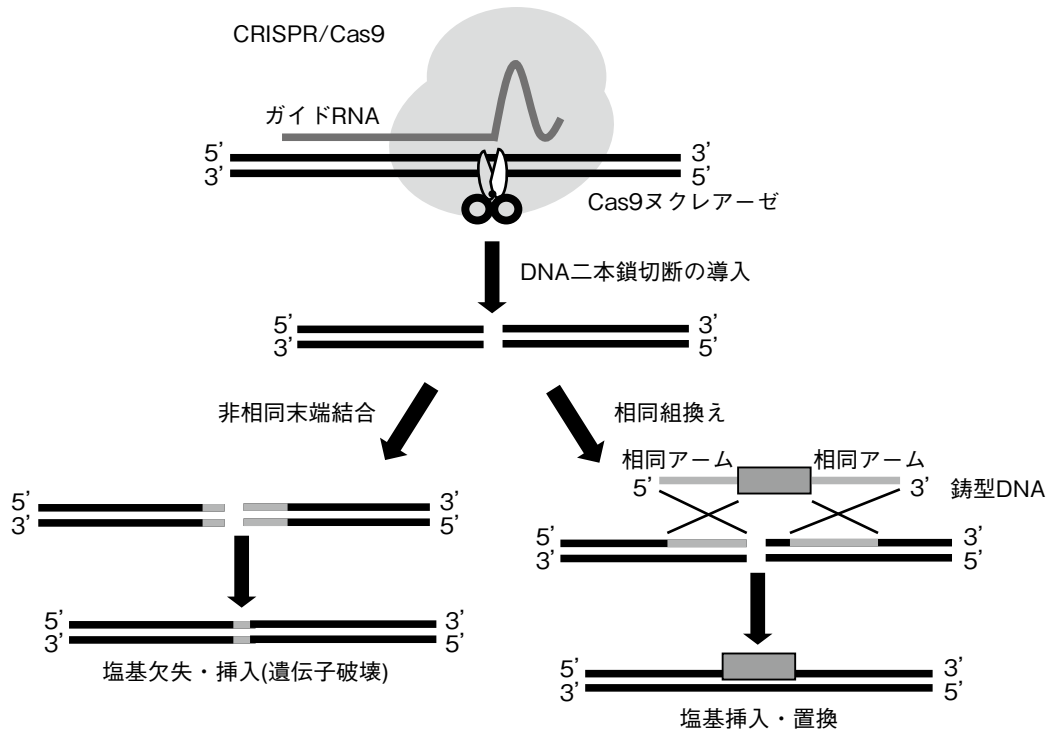


図1 CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集の概要

ガイド RNA が標的のゲノム配列に結合し、Cas9 ヌクレアーゼを誘導する。DNA 二本鎖切断が起こると、非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) または相同組換え (homologous recombination : HR) による遺伝子修復機構が誘導され、ゲノム配列の改変が可能となる。

インを融合し、DNA 配列を特定の位置で切断できる部位特異的ヌクレアーゼ蛋白質 Zinc Finger Nuclease (ZFN) が第 1 世代ゲノム編集ツールとして^{6,7)}、また、植物病原性細菌 *Xanthomonas* が有する TAL エフェクターと呼ばれる DNA 結合蛋白質に FokI ドメインを融合した TALEN (transcription activator-like effector nuclease) が第 2 世代のツールとして 2011 年に報告された⁸⁾。しかし、特に ZFN では切断部位の正確性や高額なライセンス料が必要であるため費用の点において、TALEN ではベクター構築にかかる技術や時間の点において課題が残されていた。

3. CRISPR/Cas9

そこで、ゲノム編集に革命的な進展をもたらしたのが、2013 年初頭の真正細菌および古細菌が持つ獲得免疫システムを利用した CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/Cas9 という第 3 世代のゲノム編集技術である^{9,10)}。これは、ガイド RNA と呼ばれる短鎖 RNA がターゲット配列に特異的に結合し、Cas9 と呼ばれるヌクレアーゼを誘導することで DNA を切断するシステムである。CRISPR/Cas9 がゲノム編集をより簡便にした理由として、ZFN や TALEN では配列特異的な人工ヌクレアーゼを設計

する必要などがあったのに対し、CRISPR/Cas9 では毎回共通の Cas9 ヌクレアーゼを使用できること、ガイド RNA も簡便に構築できること、そしてベクターを用いてガイド RNA と Cas9 を共発現させるだけでターゲット部位を容易に切断できることなどである。さらに、CRISPR/Cas9 を用いると複数遺伝子を同時に改変することができるため、現在、さまざまな分野でこの方法が取り入れられている。

4. 遺伝子改変

ゲノム上のターゲット配列を切断し、内在性の DNA 修復機構を誘導することでゲノム編集を行うが、誘導される DNA 修復機構は主に 2 種類あり、それによってゲノム編集の様式が異なる (図 1)。

最も主要な DNA 修復機構は、非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) という機構であり、切断された二本鎖 DNA をそのまま再結合するか、切断端から数塩基から十数塩基を削って再結合させることが多い。そのまま再結合した場合は、再度 CRISPR/Cas9 で切断されるが、塩基が削られた場合にはガイド RNA の認識配列がなくなるため再切断は起こらない。結果として、ゲノム配列上に数塩基から十数塩基の欠失を生じさせるため、遺伝子

機能を破壊したい場合などに利用される。

もう一方の DNA 修復機構は相同組換えであり、本来、損傷部位と相同な配列を鋳型として参照することで、損傷部位を元の配列に戻す機構であり、正確な修復が可能である。しかし、ゲノム内の相同配列がちょうど損傷部位の近傍に位置する確率は低く、大部分は NHEJ による塩基欠失が起こる。しかし、DNA 切断部位の近傍配列と相同なアームと薬剤耐性遺伝子を搭載した鋳型 DNA を細胞内に導入し、その薬剤の存在下で細胞を培養することによって、低い確率で相同組換えの起こった細胞だけを選択的に増殖させることが可能となる。このようにして、CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム上のターゲット配列を切断し、挿入したい配列を有する鋳型 DNA を供給することにより、ゲノム上の任意の場所にて外来配列の挿入や配列の入れ替えが可能となる。

ゲノム編集技術を用いた分化誘導法と再生医療の開発

iPS 細胞から特定の目的細胞種への分化誘導法を開発する際には、目的細胞種に特異的に発現しているマーカー遺伝子を指標とすることが多い。抗体染色を用いることが多いが、動作する抗体が存在しない場合に、そのマーカー遺伝子座に GFP (green fluorescent protein: 緑色蛍光蛋白質) などのレポーター遺伝子を導入したレポーター iPS 細胞株を樹立する。また、目的細胞種のマーカー遺伝子が核内転写因子や細胞質因子である場合、細胞を固定して抗体染色しなければ目的細胞が同定できない。この場合も、レポーター iPS 細胞株を作製すると目的細胞を生存させたままフローサイトメトリーによる単離を行い、詳しい遺伝子発現解析や移植実験に用いることが可能となる。また、目的遺伝子が細胞の機能性マーカーとなる場合には、薬剤の効果判定に用いることもできるため、治療薬開発にも応用されている。ゲノム編集技術によりヒト iPS 細胞内でレポーター遺伝子を相同組換えにて目的遺伝子座に導入することが容易となった。

ゲノム編集技術を用いた疾患モデル作製研究

従来の患者由来体細胞からの疾患特異的 iPS 細胞株の樹立に加えて、健康人由来の iPS 細胞株にゲノム編集技術を用いて遺伝子変異を導入することによって疾患特異的 iPS 細胞株を樹立することや、患者由来の疾患特異的 iPS 細胞株にゲノム編集技術を用いて遺伝子修復を比較的簡便に行

うことが可能となった(図 2)。これまで病態解析のために患者由来 iPS 細胞株と健康人由来 iPS 細胞株を比較することが行われたが、他人同士のゲノム配列は 100 万塩基近くも異なることが判明しており、このゲノム配列の違いにより実験データが修飾される危険性があった。しかし、ゲノム編集技術の登場により、背景のゲノム配列は同一であるが疾患遺伝子のみ変異が入っている iPS 細胞株と入っていない iPS 細胞株を比較することが可能となり、より正確な病態解析が可能となった。

腎疾患領域においては、Freedman らが健康ヒト ES 細胞株において常染色体優性多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease: ADPKD) の原因遺伝子である PKD1 または PKD2 を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトし、腎臓系譜に分化誘導することで、同疾患の主要な病態である腎嚢胞形成の培養皿上での再現を報告した^{11,12)}。さらに同グループは、糸球体ポドサイトに特異的に発現する Podocalyxin 遺伝子をノックアウトしたヒト ES 細胞株から腎組織を作製し、Podocalyxin が microvillus の形成と定着化に関与し、ポドサイトの成熟化に必須であることを明らかにした¹³⁾。

また、Kaku らは、胎生期腎臓に発現し、腎低異形成などの先天性腎尿路奇形と視神経形成異常を合併する遺伝性疾患である腎コロバーマ症候群の原因遺伝子として知られる PAX2 を、TALEN を用いてノックアウトしたヒト iPS 細胞株を樹立した¹⁴⁾。そして、ネフロン前駆細胞を経て腎組織に分化誘導する過程において、PAX2 がネフロン前駆細胞の間葉上皮転換 (mesenchymal-to-epithelial transition: MET) には必須ではないが、ボウマン嚢の壁側上皮細胞 (parietal epithelial cell: PEC) の形成には必須であることを明らかにした。

ゲノム編集技術を用いて腎疾患患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を修復した報告はいまだないが、近年、ヒト iPS/ES 細胞から腎系譜への分化誘導法開発が著しく進展しており、ゲノム編集技術との融合により、今後、腎疾患の病態解明と治療薬開発が進展することが期待される。

ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療

以前に、 α -synuclein 遺伝子の点突然変異が同定されている家族性パーキンソン病患者から樹立された iPS 細胞において ZFN を用いた相同組換えによって、変異を含む配列を変異のない正常型の配列と置換することが報告された¹⁵⁾。このゲノム編集により遺伝子修復された iPS 細胞株から作

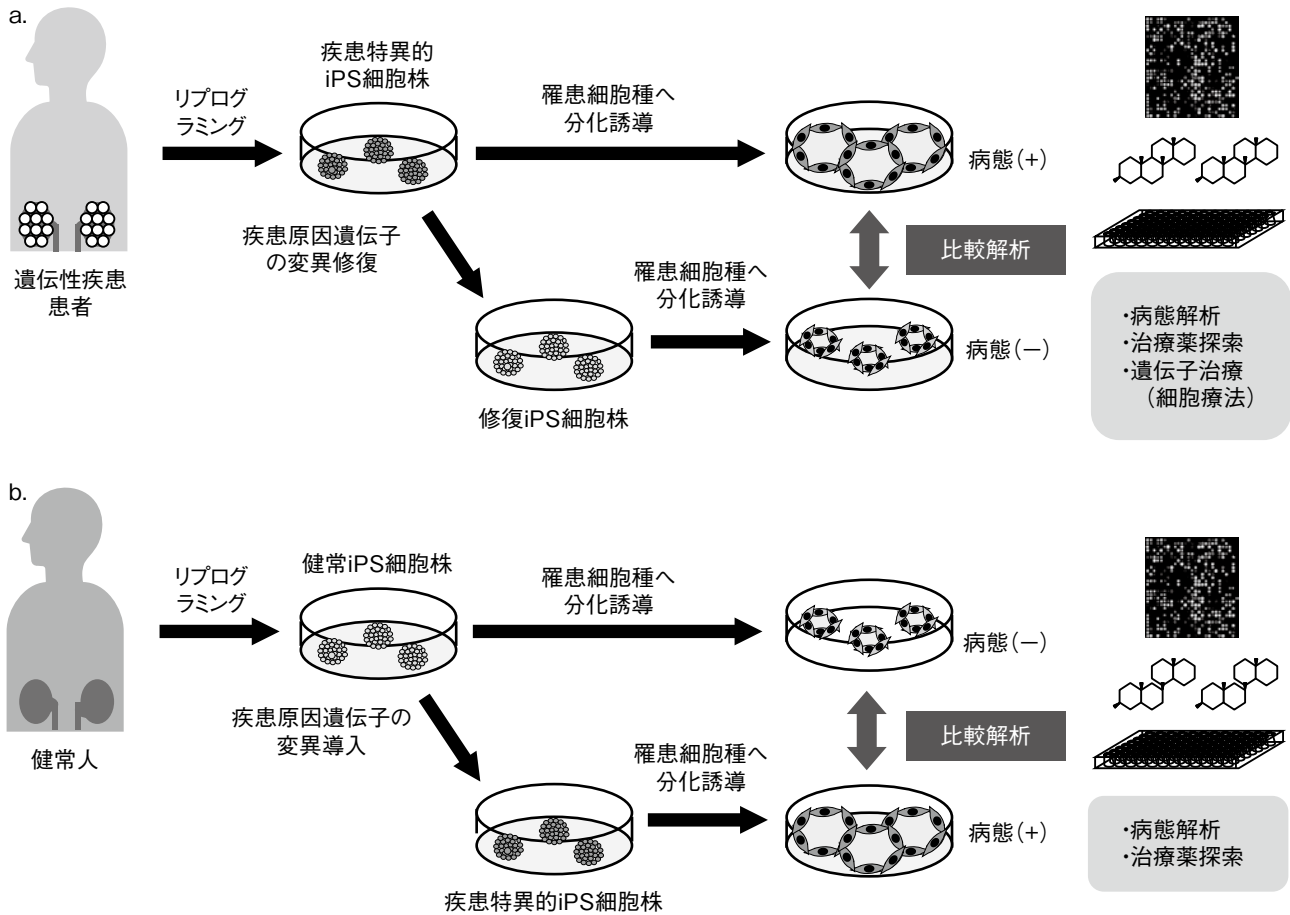


図2 ゲノム編集技術を用いた疾患モデル作製研究

- a: 遺伝性疾患の患者由来疾患特異的 iPS 細胞株において、ゲノム編集技術を用いて遺伝子修復 iPS 細胞株の樹立を行う。両株由来の罹患細胞種間での比較により病態解析や治療薬探索を行う。将来的には、修復 iPS 細胞株から分化誘導した細胞を移植する遺伝子治療 (細胞療法) も期待される。
- b: 健康人由来 iPS 細胞株へゲノム編集技術を用いて遺伝子変異を導入し、疾患特異的 iPS 細胞株の樹立を行う。両株由来の罹患細胞種間での比較により病態解析や治療薬探索を行う。

製されたドーパミン神経細胞を患者本人に移植することによりパーキンソン病が完治できる可能性がある。

同様に腎疾患領域においても、疾患特異的 iPS 細胞におけるゲノム編集と再生医療を組み合わせ、疾患を根治させる可能性がある。一例をあげると、ADPKD の患者由来 iPS 細胞においてゲノム編集技術を用いて原因遺伝子変異を修復し、その修復された iPS 細胞から腎組織や臓器が作製可能となれば、その再生腎臓の移植によって ADPKD の腎症状が完治することが考えられる。

今後の課題

本稿では、CRISPR/Cas9 を主としてゲノム編集技術を用いた新しい治療法開発に向けた研究についてまとめた

が、改善されるべき点や副作用の危険性もある。最も懸念されている点として、ガイド RNA が 20 塩基という短い鎖のため結合部位の特異性が低いことなどから、ガイド RNA とターゲット配列のミスマッチによりターゲット配列以外を切断してしまうオフターゲット問題があげられる。培養皿上で疾患モデルを作製し病態解析や創薬を行う研究に関しては、実験の精度が問題となるのみであるが、遺伝子治療のようにゲノム編集した細胞を体内に移植する場合には、オフターゲットによって変異が導入されることによるがん化や臓器の機能不全などの重篤な副作用が生じる危険性がある。今後、ガイド RNA や Cas9 をはじめとした改良により、ターゲット配列の特異性を高める技術の開発が必要である。

一方、ヒトのゲノムは 1 人につき 64 億個の塩基から構成

されており、細胞が1回複製するのみで5~10カ所の塩基に複製エラーが生じることが知られている。よって、ゲノム編集のオフターゲットにより生じた変異が細胞分裂の際に生じる自然発症変異かを区別することは困難である。また、ヒトゲノムの大部分の機能は未知であり、世界中のさまざまな人種2,500人のゲノム配列を調べたところ、64億塩基中約9,000万塩基は個々人で異なっていることも報告されており¹⁶⁾、どの配列が正常でどれが異常であるのかを判定することは難しい。よって、オフターゲットの危険性をどのように評価するのかは、今後十分に検討されなければならない。

おわりに

本稿では、近年のゲノム編集技術の進展についてiPS細胞との関連を中心に概説した。ゲノム編集を用いた研究はさまざまな分野において精力的に行われており、2015年には中国からヒト胚にゲノム編集を行ったとする報告¹⁷⁾までなされている。特に生殖医療を考えた場合、人為的に個体の能力を高める「エンハンスメント」に繋がる可能性や、オフターゲットによる副作用の危険性など倫理問題も多く、倫理面も十分に議論されながら、今後のゲノム編集研究がなされなければならない。

謝辞

筆者らの研究は、日本医療研究開発機構(AMED)の再生医療実現拠点ネットワークプログラム「技術開発個別課題」および難治性疾患実用化研究事業により助成を受けたものである。

利益相反自己申告: アステラス製薬(共同研究費)、大塚製薬(共同研究費)

文献

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861–872.
2. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007 ; 318 : 1917–1920.
3. Thomas KR, Capecocchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987 ; 51 : 503–512.
4. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987 ; 330 : 576–578.
5. Mae SI, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 1367.
6. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes : zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 1156–1160.
7. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005 ; 435 : 646–651.
8. Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2011 ; 29 : 143–148.
9. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013 ; 339 : 819–823.
10. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013 ; 339 : 823–826.
11. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, Fu H, Morizane R, Agrawal V, Saad AF, Li MK, Hughes MR, Werff RV, Peters DT, Lu J, Baccei A, Siedlecki AM, Valerius MT, Musunuru K, McNagny KM, Steinman TI, Zhou J, Lerou PH, Bonventre JV. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 8715.
12. Cruz NM, Song X, Czerniecki SM, Gulieva RE, Churchill AJ, Kim YK, Winston K, Tran LM, Diaz MA, Fu H, Finn LS, Pei Y, Himmelfarb J, Freedman BS. Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease. *Nat Mater* 2017 ; 16 : 1112–1119.
13. Kim YK, Refaeli I, Brooks CR, Jing P, Gulieva RE, Hughes MR, Cruz NM, Liu Y, Churchill AJ, Wang Y, Fu H, Pippin JW, Lin LY, Shankland SJ, Vogl AW, McNagny KM, Freedman BS. Gene-edited human kidney organoids reveal mechanisms of disease in podocyte development. *Stem Cells* 2017 ; 35 : 2366–2378.
14. Kaku Y, Taguchi A, Tanigawa S, Haque F, Sakuma T, Yamamoto T, Nishinakamura R. PAX2 is dispensable for *in vitro* nephron formation from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 4554.
15. Soldner F, Laganière J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, Khurana V, Golbe LI, Myers RH, Lindquist S,

- Zhang L, Guschin D, Fong LK, Vu BJ, Meng X, Urnov FD, Rebar EJ, Gregory PD, Zhang HS, Jaenisch R. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 2011 ; 146 : 318–331.
16. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015 ; 526 : 68–74.
17. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell* 2015 ; 6 : 363–372.