

特集：最新の腎臓領域の基礎研究

腎臓病研究に対するゲノム編集技術の応用

— CRISPR/Cas9 法の応用も含めて —

Application of genome editing technology including the CRISPR/Cas9 system to kidney disease research

辻本 啓 荒岡利和 長船健二

Hiraku TSUJIMOTO, Toshikazu ARAOKA, and Kenji OSAFUNE

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術の概要

ジンクフィンガーヌクレアーゼや TAL エフェクターヌクレアーゼ (transcription activator-like effector nuclease : TALEN) などが人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術として知られていたが、近年、ゲノム編集を時間的および技術的により容易にしたのが CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / Crispr associated protein 9) システムである。このシステムは CRISPR と呼ばれる遺伝子配列がバクテリオファージの感染を阻害し、Cas 蛋白質ファミリーがバクテリオファージの DNA を切断すると報告されていた、細菌のバクテリオファージ感染の防御機構の研究に由来する。2012 年になり、ガイド RNA (gRNA) と呼ばれる短鎖 RNA が標的となる遺伝子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 を切断することが明らかにされた¹⁾。さらに、標的となる DNA 配列と相補的に gRNA を設計することで、ヒト細胞中でも DNA を切断することが示され、以後急速に普及した^{2~4)}。最近では高速原子間力顕微鏡を用いることで Cas9 が DNA を切断する瞬間が撮影されるなど、更なる研究の進展が期待されている⁵⁾。

腎臓研究領域におけるゲノム編集技術の応用

iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell : 人工多能性幹細胞) のゲノム編集は活発に行われており、編集された iPS 細胞を腎臓系譜細胞に分化誘導し、ヒト腎臓の疾患や発生メカ

ニズムの解明のツールとする研究も盛んに行われている。Kaku らは、転写因子である Pax2 が胎生マウス腎臓の前駆細胞であるネフロン前駆細胞の間葉上皮転換および尿管芽の発生に必須であり、ヒトにおいても同遺伝子の変異が腎低形成をきたすことに着目し、TALEN を用いて PAX2 を欠失するヒト iPS 細胞株を樹立した。そして、同グループは PAX2 を欠失したヒト iPS 細胞を腎オルガノイドに分化誘導し解析することで、マウスと異なり、ヒトにおいては PAX2 の欠失でも正常なネフロン前駆細胞の間葉上皮転換が生じるが、糸球体上皮の形態形成に異常をきたすことを発見した⁶⁾。さらに、PAX2 を欠失したヒト iPS 細胞を尿管芽様の樹状構造へと分化誘導したところ、正常な樹状構造が形成されず、PAX2 が尿管芽の上皮化に必要なであることを明らかにした⁷⁾。

また Freedman らは、ポドサイトの細胞膜に存在する蛋白質であるポドカリキシンをノックアウトしたヒト iPS 細胞株を樹立し、腎オルガノイドに分化誘導後、詳細な観察を行うことにより、糸球体基底膜の微絨毛の正常な形成が失われ、ポドサイト間の構造を保つことができないことを報告した^{8,9)}。さらに、同グループはポドカリキシンのノックアウトマウスでも同様の所見を認め、尿の濾過ができなくなっていることを報告し、糸球体基底膜におけるポドカリキシンの重要性を明らかにした⁸⁾。ヒトの腎臓発生過程や生理機能に関しては不明な点も多いが、前述のようなヒト iPS 細胞由来の腎オルガノイドを用いた *in vitro* のアプローチでメカニズムを解明する研究にもゲノム編集技術は大いに役立っている。

多発性嚢胞腎は PKD1 (polycystic kidney disease type 1) または PKD2 (polycystic kidney disease type 2) の遺伝子変異に

よる機能喪失が原因とされている。FreedmanらはCRISPR/Cas9システムを用いてPKD1またはPKD2の遺伝子変異を有するヒトES細胞(embryonic stem cell: 胚性幹細胞)株やiPS細胞株を樹立し、腎オルガノイドに分化誘導することによって、培養皿上で腎嚢胞を再現した⁹⁾。さらに、さまざまな条件下で腎オルガノイドを培養し、腎嚢胞形成の初期に微小環境や細胞接着が重要な役割を果たすことを明らかにした¹⁰⁾。

このように、ヒトiPS細胞由来腎オルガノイドとゲノム編集技術を組み合わせることで、*in vitro*で疾患モデルを作製することが可能となり、今後、これらの疾患モデルを用いた病態解析や薬剤スクリーニングなどの応用研究が進むものと期待される。

遺伝子治療の課題

遺伝子治療の最終ゴールは、遺伝子異常を修復することで患者を救命することである。人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子編集ではないが、ラミニン332の遺伝子異常により発症し、40%以上が思春期までに死亡する重篤な先天性皮膚疾患である接合部型表皮水疱症において遺伝子治療が行われた¹¹⁾。具体的には、患者の皮膚細胞を、生体外でレトロウイルスを用いて遺伝子修復を行い、その表皮シートを皮膚移植することで、全身の87%の皮膚が遺伝子修復済み皮膚幹細胞由来のものに置換することができ、救命に成功したと報告された。また、血液腫瘍などの疾患において臨床での遺伝子治療にゲノム編集技術はすでに多く活用されている。CRISPR/Cas9システムを用いたものに限れば、初めてのヒト対象の遺伝子治療の臨床試験が、進行した肺がんに対して中国で進行中である(NCT02793856)。これは生体外でT細胞に遺伝子編集を行い、肺がんに対する免疫療法の効果を評価したものである。しかしながら生体内で遺伝子治療を行うためには、目的の細胞種に遺伝子導入を行える適切なベクターが存在するか否かが問題となる。生体内での遺伝子改変技術としてウイルスベクターは古くから用いられているが、この分野も発展が著しい。例えば、近年Cre recombination-based AAV targeted evolution (CREATE)と呼ばれる生体内のCreを発現する特定の細胞への感染効率を向上させるアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)の選択システムが報告された¹²⁾。腎臓などへの応用も可能と考えられるが、報告では実用例として、成体脳のニューロンおよびアストロサイトへの感染効率を40倍も向上させたAAVが作製された。

レトロウイルスやレンチウイルスなどを用いてゲノム編集を行う場合は、ウイルスゲノムがランダムもしくは不正確に目的細胞に挿入されてしまう可能性がある。また、ウイルスゲノムが目的細胞に挿入されないアデノウイルスやAAVを用いて、CRISPR/Cas9システムを目的細胞内に導入しても、オフターゲット効果と呼ばれる目的外の部位への意図しないゲノムの挿入や欠失変異が一定の割合で起こることが知られている。がん抑制遺伝子などに変異が入れば最悪の場合、腫瘍化する危険性があるが、オフターゲット効果の発生を予測することや、それによる結果を評価する方法はいまだ十分には開発されていない¹³⁾。また、目的細胞のすべてがゲノム編集できていない場合、ゲノム編集された細胞とゲノム編集されていない細胞がモザイクで存在する状態となる。この点も遺伝子治療を目指す場合、治療対象の疾患によっては大きな問題となる可能性がある。

臨床応用に向けて特定の細胞種だけに特異的にゲノム編集を行う技術も研究されている。遺伝子治療などを行うために、目的の細胞に特異的に感染するウイルスベクターを用いて遺伝子を導入するといった技術は古くから研究されていた。しかし前述したように、レトロウイルスやレンチウイルスはゲノムにランダムに組み込まれ、感染細胞が腫瘍化する危険性などの問題があった¹⁴⁾。そこで、細胞種によって異なる活性を有するマイクロRNAが存在することを利用し、マイクロRNAの活性を細胞の標識として活用したCas9システムの応用技術が開発された。これは、マイクロRNAの活性が高いとCas9の産生が抑制(オフ)、または、促進(オン)させるシステムで、細胞種が混在した状況において、特定の細胞種のみを特異的にゲノム編集可能にする報告されている¹⁵⁾。

また、これまでの細胞周期に依存した遺伝子組換え技術である相同組換え(homologous recombination: HR)では、非分裂細胞へのゲノム編集は困難であった。一方、DNA二重鎖の切断修復機構である非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)は、分裂を停止した細胞でも切断された末端を直接に結合しゲノム編集できることが知られていた。Suzukiらは、NHEJとCRISPR/Cas9システムを巧みに組み合わせることで、非分裂細胞のゲノムの標的部位に目的の配列をノックインすることを可能にする、相同配列を必要としない標的部位特異的な遺伝子ノックイン技術(homology-independent targeted integration: HITI)を開発した(図1)¹⁶⁾。さらに、同グループはこの技術を用いて網膜色素変性症モデルラットへの遺伝子治療に成功したと報告している。

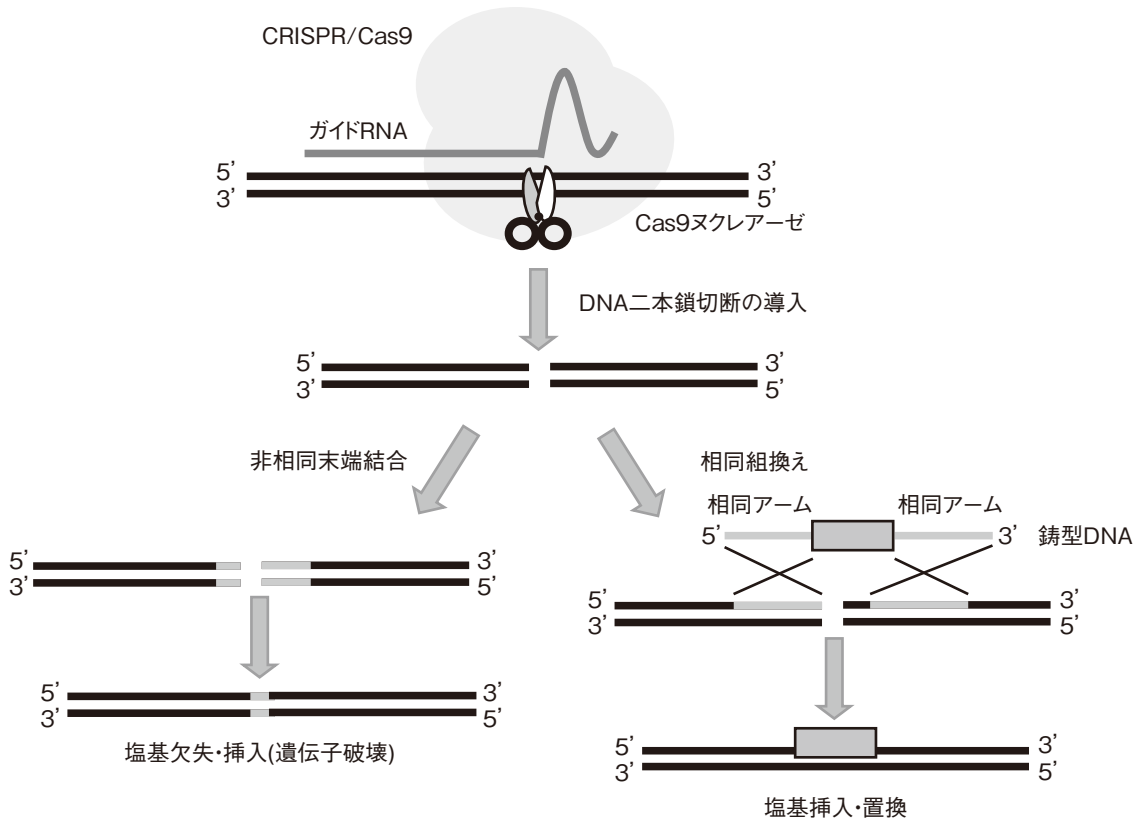


図1 DNA切断活性を有するCas9を用いたCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集

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、ゲノム配列の変更が可能となる。

ゲノム編集技術の改良

CRISPR/Cas9システムのオフターゲット効果の改善に関してはさまざまな研究がなされている。標的配列の選択法の工夫や、ダブルニッキング法、短いターゲットをgRNAに用いる方法などが考案されているが、DNA切断活性がないdCas9と呼ばれる変異Cas9を利用した研究も進展している(図2)。DNAを切断せず、1塩基を置換することで直接ゲノムを編集する技術である。塩基のC(シトシン)をT(チミン)に変換する活性を有するドメインをdCas9に連結することで、ターゲット配列近傍の塩基を変換することが可能となった。これらの1塩基編集法は従来の方法より効率的に1塩基の修正を行うことができ、想定外のDNA修飾を起こしにくく、また、ゲノム中のランダムな欠失や挿入が非常に少ないため現在注目されている。従来は、G-C塩基対からA-T塩基対への転位のみが可能であったが^{17~19)}、最近では新しいアデニン塩基エディターが開発され、A-T

塩基対からG-C塩基対への転位が可能となった²⁰⁾。既存の1塩基対変化の疾患は約半分がG-C塩基対からA-T塩基対への変異が関係しているといわれ、疾患研究や治療への応用が期待される。

エピゲノムの編集による遺伝子発現調整

塩基配列以外に遺伝子発現を調節する機構として、シトシンのメチル化などのエピゲノム修飾が知られている。ゲノムDNAの編集技術ではないが、DNAのメチル基を除去するTET1と呼ばれるドメインとdCas9を連結することで、塩基配列特異的な脱メチル化を介し遺伝子発現を上昇させることに成功したとの報告がある(図2)²¹⁾。また、dCas9に遺伝子発現を抑制するKRABドメインや遺伝子発現を活性化するVP64ドメインを連結することで、目的の遺伝子発現の抑制または活性化を行えるという画期的な報告もなされている²²⁾。腎臓研究領域に応用したものとしては、

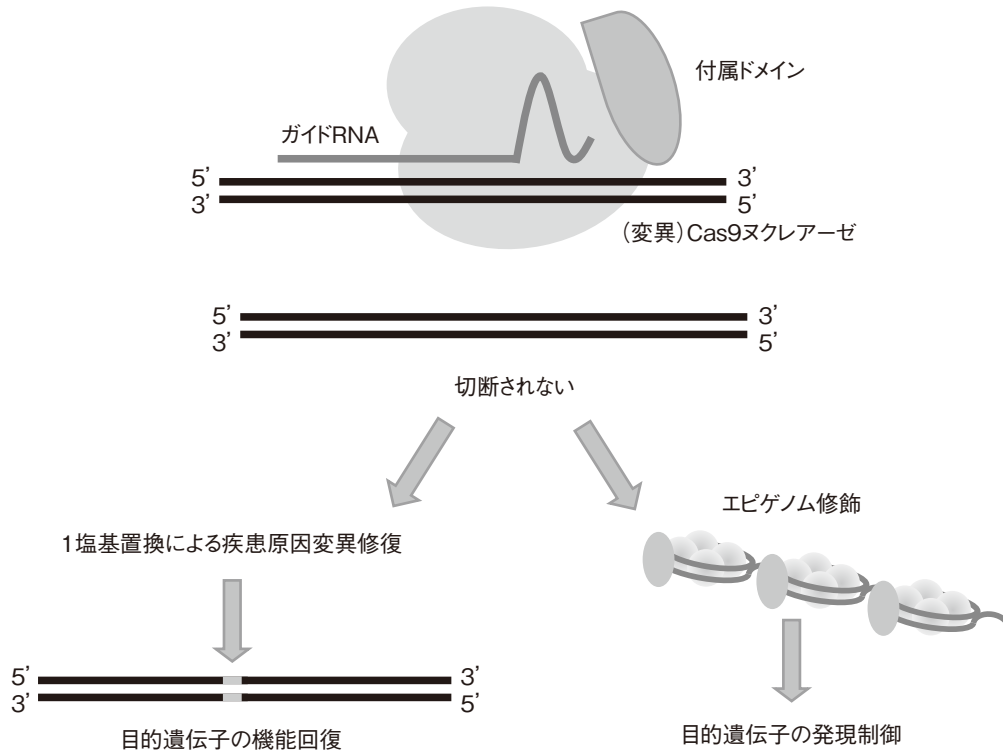


図2 Cas9やDNA切断活性がない変異Cas9を利用したゲノム編集技術や遺伝子発現調節技術
1塩基置換やメチル化修飾が可能な付属ドメインを(変異)Cas9ヌクレアーゼとともに利用することで、ガイドRNAによる目的遺伝子特異的な遺伝子修復やエピゲノム修飾が可能となる。

dCas9やCas9とMS2-p65-HSF1と呼ばれる転写活性複合体を認識するgRNAを用いたエピゲノムの修飾により、*in vivo*で目的遺伝子の転写活性化を行った報告がある²³⁾。同報告ではシスプラチン誘発性急性腎障害(acute kidney injury: AKI)モデルマウスに、遺伝子特異的なエピゲノム編集AAVを尾静脈から注入し、生体内で目的遺伝子のエピゲノム編集を行うことで、加齢やAKIで発現が低下するKlothoを158倍に、AKIにおいて腎保護作用があると報告のあるIL-10を2,553倍にそれぞれ発現を上昇させ、AKIに対する治療効果および生存期間の延長に成功した。

胚盤胞補完法への応用

目的臓器の形成に必須の遺伝子をノックアウトした宿主動物の受精卵胚盤胞にiPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞を注入すると、宿主動物の中で多能性幹細胞がその臓器に分化する(補完する)ことが報告されており、この仕組みを利用し、本来形成されない目的臓器を宿主動物の中で作製させる技術が胚盤胞補完法である。そして、腎

臓形成に必須の遺伝子である*Sall1*のノックアウトマウスの胚に野生型マウスES細胞を注入することで、ドナー由来の腎組織の作製に成功したとの報告がある^{24,25)}。この報告では、ターゲティングベクターを用いた相同組換えES細胞からノックアウトマウスを作製しているが²⁶⁾、CRISPR/Cas9システムの登場により、臓器形成に必須の遺伝子をノックアウトする過程が迅速化し²⁷⁾、胚盤胞補完法を用いた研究が加速すると考えられる。これらの研究は、最終的にはヒト臓器を他の動物に作らせることを目的としたキメラ動物を作製する研究への応用も考えられている²⁸⁾。近年、文部科学省内でもヒトの臓器を有する動物の作製を条件付きで認めるかどうか活発に議論がなされているが、ヒトのキメラ動物に関しては、日本においては研究者以外のコンセンサスが十分に得られていないのが現状であるため、慎重に研究内容を検討する必要がある²⁹⁾。

ヒト胚へのゲノム編集

本研究領域に関して、倫理的な議論と規制などの法整備

が世界的に進行中である一方で、ヒト胚へのゲノム編集に関してもすでに多くの報告がなされている。ゲノム変異を修正し治療につなげる方向性と、ヒト発生メカニズムを解明する方向性である³⁰⁾。

ヒト胚のゲノムの修正を目指す研究としては、安全性への懸念から多くの議論がなされている。主な懸念は、ゲノム編集した細胞が生殖細胞系譜へと伝わり、未来の人類が変わってしまうのではないかということである³¹⁾。特に、ヒト胚のゲノムを編集することで、親が望む知能指数や運動能力、寿命を持ったデザイナーベビーを産み出すビジネスへの傾倒を招きかねないとの懸念も根強い。

また、ヒト発生メカニズムの解明に関して、ヒト胚において *OCT4* のゲノム編集を行った報告がある。従来、Oct4 はマウスにおいて胚体外内胚葉と内部細胞塊の特定化に必要と考えられているものの^{32,33)}、ヒトにおいては十分に評価されていなかった。しかし、内部細胞塊由来の細胞株であるヒト ES 細胞に対して、CRISPR/Cas9 システムとテトラサイクリン発現誘導システムを組み合わせることで、時間的に高効率なノックダウンが可能となり、ヒトの発生における *OCT4* の重要性が明らかにされた³⁴⁾。しかし、ES 細胞以前の段階、すなわち、ヒト胚において内部細胞塊と胚体外内胚葉に分かれる段階や、その前の段階において *OCT4* がどのような役割を担っているかは不明であった。Fogarty らはヒト胚への *OCT4* のゲノム編集により胚盤胞の形成が正常に起こらないことを発見した。この知見は、ヒトにおいては、*OCT4* がマウスの発生過程より早期の段階で重要な役割を果たすことを示している³⁵⁾。ヒト初期発生学は他の動物の発生で得られた知見と多能性幹細胞を用いた研究の結果を基に考察されることが多いが、近年のヒト胚に対するゲノム編集技術の進歩が、ヒト初期発生学にとって大きな転換点となることは間違いない。

まとめと展望

本稿では、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集の概要と腎臓関連の研究・治療への応用についての知見を概説し、最近のゲノム編集に関連した話題を紹介した。腎臓の疾患、発生メカニズムに関する研究がさらに加速し、その知見や技術が一日も早く患者さんのもとに届くことを期待しつつ、結びの言葉としたい。

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. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012 ; 337(6096) : 816-821.
2. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013 ; 339(6121) : 823-826.
3. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013 ; 339(6121) : 819-823.
4. Hotta A. iPS 細胞の遺伝子変異をゲノム編集で修復する：疾患研究と遺伝子治療の最先端 (特集 iPS の社会的意義). *遺伝 生物の科学* 2017 ; 71(5) : 415-424.
5. Shibata M, Nishimasu H, Kodera N, Hirano S, Ando T, Uchihashi T, et al. Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nat Commun* 2017 ; 8(1) : 1430.
6. Kaku Y, Taguchi A, Tanigawa S, Haque F, Sakuma T, Yamamoto T, et al. PAX2 is dispensable for *in vitro* nephron formation from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2017 ; 7(1) : 4554.
7. Taguchi A, Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2017 ; 1-17.
8. Kim YK, Refaeli I, Brooks CR, Jing P, Gulieva RE, Hughes MR, et al. Gene-edited human kidney organoids reveal mechanisms of disease in podocyte development. *Stem Cells* 2017 ; 35(12) : 2366-2378.
9. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, Fu H, Morizane R, Agrawal V, et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 8715.
10. Cruz NM, Song X, Czerniecki SM, Gulieva RE, Churchill AJ, Kim YK, et al. Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease. *Nat Mater* 2017 ; 16(11) : 1112-1119.
11. Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 2017 ; 551(7680) : 327-332.
12. Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 2016 ; 34(2) : 204-209.
13. Abou-El-Enin M, Cathomen T, Ivics Z, June CH, Renner M, Schneider CK, et al. Human genome editing in the clinic : new challenges in regulatory benefit-risk assessment. *Cell Stem Cell* 2017 ; 21(4) : 427-430.
14. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003 ; 4(5) : 346-358.
15. Hirosawa M, Fujita Y, Parr CJC, Hayashi K, Kashida S, Hotta A, et al. Cell-type-specific genome editing with a microRNA-

- responsive CRISPR-Cas9 switch. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 (13) : e118.
16. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 2016 ; 540 (7631) : 144-119.
 17. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016 ; 533 (7603) : 420-424.
 18. Li G, Liu Y, Zeng Y, Li J, Wang L, Yang G, et al. Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos. *Protein Cell* 2017 ; 8 (10) : 776-779.
 19. Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell* 2017 ; 8 (11) : 811-822.
 20. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017 ; 551 (7681) : 1-27.
 21. Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, et al. Targeted DNA demethylation *in vivo* using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol* 2016 ; 34 (10) : 1060-1065.
 22. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell* 2014 ; 159 (3) : 647-661.
 23. Liao H-K, Hatanaka F, Araoka T, Reddy P, Wu M-Z, Sui Y, et al. *In vivo* target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation. *Cell* 2017 ; 1495-507.
 24. Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, Sato A, Copeland NG, et al. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 2001 ; 128 (16) : 3105-3115.
 25. Usui JI, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 2012 ; 180 (6) : 2417-2426.
 26. Takasato M, Osafune K, Matsumoto Y, Kataoka Y, Yoshida N, Meguro H, et al. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1-GFP knockin mice. *Mech Dev* 2004 ; 121 (6) : 547-557.
 27. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013 ; 153 (4) : 910-918.
 28. Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, Sugawara A, Gil MA, Yamauchi T, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell* 2017 ; 168 (3) : 473-486.e15.
 29. Inoue Y, Shineha R, Yashiro Y. Current public support for human-animal chimera research in Japan is limited, despite high levels of scientific approval. *Cell Stem Cell* 2016 ; 19 (2) : 152-153.
 30. Ruzo A, Brivanlou AH. At last : gene editing in human embryos to understand human development. *Cell Stem Cell* 2017 ; 21 (5) : 564-565.
 31. Pei D, Beier DW, Levy-lahad E, Marchant G, Rossant J, Izpisua Belmonte JC, et al. Human embryo editing : opportunities and importance of transnational cooperation. *Cell Stem Cell* 2017 ; 21 (4) : 423-426.
 32. Frum T, Halbisen MA, Wang C, Amiri H, Robson P, Ralston A. Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. *Dev Cell* 2013 ; 25 (6) : 610-622.
 33. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998 ; 95 (3) : 379-391.
 34. Bertero A, Pawlowski M, Ortmann D, Snijders K, Yiangou L, Cardoso de Brito M, et al. Optimized inducible shRNA and CRISPR/Cas9 platforms for *in vitro* studies of human development using hPSCs. *Development* 2016 ; 143 (23) : 4405-4418.
 35. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 2017 ; 550 (7674) : 67-73.