

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）活性調節型 CRISPR/Cas9 による完全遺伝子修復治療法の開発
（英語）Developing scarless gene repair therapy by activity-regulatable CRISPR/Cas9

研究開発実施期間：2018年10月15日～2021年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）川又 理樹
（英語）Masaki Kawamata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）九州大学・生体防御医学研究所・助教
（英語）Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Assistant professor

II 研究開発の概要

CRISPR/Cas9によるゲノム編集が2013年に初めて哺乳類細胞で確立されて以来、現在まで凄まじいスピードで技術改良がなされ、高い活性のもとで効率的に自在なゲノムの編集が行えるようになってきた。希少難病とされる多くの遺伝性疾患は1塩基のゲノム変異で発症するものが多く、未だ根本的な治療法がないものがほとんどである中で、CRISPR/Cas9はこれらの疾患を治療できる技術として期待されている。しかし、実際はこの病因1塩基のみをそのアレル特異的に、且つ、余計な塩基に対する変異誘導することなく精密に修復する「完全遺伝子修復」は技術的に極めて難易度が高く、現状のCRISPR/Cas9システムではほとんど実現することができない。この原因はCRISPR/Cas9活性が強過ぎるためであり、例えば正常な対立アレルにinsertionやdeletion(indel)変異を誘導したり数塩基程度の違いを許容したオフターゲット効果により修復した1塩基置換に再びindelを誘導してしまう(re-editing)ためである。他にも塩基修復のためのHDR(homology-directed repair)効率が低いことや細胞毒性が引き起こされることなど、様々なデメリットが過剰なCas9活性によって引き起こされることも大きな問題点として挙げられている。そこで本研究ではCRISPR/Cas9活性をあえて弱めることで上記の問題点を克服し、目的の病因1塩基のみを修復できる効率的な「完全遺伝子修復」の技術を開発することで、「不完全遺伝子修復」が起こしうる副作用などのリスクを回避すべく安全性を重視した遺伝子治療法の確立を目指した。

はじめに両アレルに対するCas9の活性(=indelの誘導効率)を赤と緑の蛍光によって1細胞レベルでリアルタイムに可視化できる新規Allele-specific Indel Monitor System(AIMS)を基に、簡便にCas9活性を抑制できるgRNAの修復法を開発した。gRNAの上流にcytosine残基[C]を伸張させた[C]gRNAは[C]の長さ依存的に活性を段階的に抑制することができる。[C]を付加しない[0C]gRNAはほぼ全て(99.4%)の細胞に対して両アレルにindelを誘導するのに対し、活性が落ちるごとに片側アレルへのindelが誘導される細胞クローンが得られた。このデータを基にCas9活性とアレル毎のindel誘導効率の関係を数学的に解き明かし、活性値からアレル毎のindel頻度を予測できる数式モデルを構築した。我々は更に活性低下がゲノム編集にどのような有用性をもたらすかを検証し、HDR効率の上昇、オフターゲットの抑制、1塩基レベルでの編集誘導、re-editing抑制、細胞毒

性抑制など様々なゲノム編集に重要な効果が得られることを明らかとした。これらが複合的に連動することで今まで困難とされていた片側アレルのみへの 1 塩基置換の組換えを効率的に誘導することが可能となり、実際にヘテロ型遺伝性疾患 Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) のモデル細胞をマウス ES 細胞で作製することに成功した。また、FOP 患者由来の疾患特異的ヒト iPS 細胞に対しては片アレルの病因 1 塩基変異に対して正常対立アレルを傷つけることなく正確に修復し治療モデルの確立にも成功した。このような完全遺伝子修復のクローンは通常の [0C]gRNA では全く得られないのに対し、Cas9 活性をおよそ半分以下まで低下させることで得ることができるが、重要な点としては活性を更に 10%程度にまで下げることで不完全修復クローンの割合を劇的に減少させられる点である。これは言い換えれば、活性を下げるほど余計なゲノム変異を誘導することなく遺伝子治療の際に安全性を高めることができるということである。我々は更に HDR 効率や 1 塩基オフターゲットに対する Cas9 活性などを考慮することで、1 塩基レベルの精密遺伝子修復効率も予測可能なシミュレーションモデルの構築にも成功した。これを用いれば片側病因アレルの完全遺伝子修復を実施するための最適な Cas9 活性を事前に予測できるようになるため、時間、コスト、労力を最小限に抑えたいうえで創薬開発を実施することが可能になる。

今回の研究で我々が開発した新規ゲノム編集プラットフォームの特徴は、①CRISPR/Cas9 に安全装置を搭載させた活性調節可能なシステム、②活性の選択により様々な異なる目的に最適化できるゲノム編集技術を可能にすることである。上記に示したような精密 1 塩基編集だけではなく、単純にゲノムを切断し高確率に遺伝子欠損や HDR を誘導したい場合でも、数個の [C] を付加するだけで改変効率を [0C] と同等かそれ以上に保ちつつオフターゲットや細胞死が強力に抑制できる。つまり、通常のゲノム編集時においても数個の [C] が安全装置として機能する (①)。一方、②に関してはゲノム編集を両アレルか片アレルか、治療効果を重視するか (不完全遺伝子修復を許容し、最速の治療効果を得る場合) 安全性を重視するか (治療の即効性よりもゲノムの傷を最小限にした完全遺伝子修復を目的とする場合) を高・中・低活性の [C]gRNA を使い分けることで最適条件のもとで編集を実施できる。

現在 CRISPR/Cas9 による疾患治療のための臨床試験は米国を中心に開始されているが、ほとんどが既存の [0C]gRNA によるものであり、副作用のリスクが今後起きてくる可能性は十分ある。我々のような安全性を考慮した活性調節機能はまだ臨床的な応用に用いられていない。活性調節は安全性以外にも様々なタイプの精密編集を可能にするためより多くの疾患を治療対象にできる。従って、本研究成果は今後発展する遺伝子治療の際の標準化技術になる可能性を秘めており、大きな社会貢献に繋がると言う点で大きな意義をもつ内容と言える。

Since genome editing with CRISPR/Cas9 was first established in mammalian cells in 2013, and it has become possible to edit genomes efficiently using improved CRISPR systems with enhanced activity. Many rare and intractable genetic diseases are caused by single nucleotide mutations, and CRISPR/Cas9 is expected to be a technology that can treat these diseases. In reality, however, precise gene repair of a disease-causing single nucleotide without any scar is technically difficult and almost impossible to be achieved by the current CRISPR/Cas9 system. The reason for this is that CRISPR/Cas9 activity is too strong, which induces insertions and deletions (indels) in the repaired allele (re-editing) due to off-target effects, as well as in a non-repaired normal allele. Other major problems include the low efficiency of homology-directed repair (HDR) and inducing cytotoxicity. In this study, we aimed to overcome such problems by decreasing the CRISPR/Cas9 activity, and to establish a gene therapy method that emphasizes safety and avoids risks of side effects that may be occurred by incomplete gene repair with genomic scars.

We have established a method to finetune CRISPR-Cas9 activity by extending cytosine [C] on the 5' gRNAs ([C]gRNA). We mathematically elucidated the relationship between Cas9 activity and indel induction efficiency for a pair of alleles and constructed a mathematical model that can predict the indel frequency for each allele from the Cas9 activity. Importantly, the reduction of Cas9 activity could overcome all the problems described above, and scarless base substitution could be introduced in the mouse and human cells efficiently. We have actually succeeded in generating a model of heterozygous genetic disease, Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP), in mouse ES cells and also repairing the disease-related mutation in the human iPS cells derived from FOP patients. We have also succeeded in constructing a simulation model that can predict the scarless gene repair at the single nucleotide levels. By using this model, we will be able to design the [C]gRNAs for the scarless editing when conducting drug development with minimal time, cost, and effort.

The features of the novel genome editing platform we developed in this study are (1) an activity-regulatable system with a safety device on CRISPR/Cas9 system, and (2) optimization for various types of editing by selecting activity grade. Clinical trials for the treatment of diseases with CRISPR/Cas9 are currently demonstrated mainly in the United States, but most of them are done with [0C]gRNAs. Thus, the risk of side effects due to the strong Cas9 activity may occur in the future. Such finetuning CRISPR system has not been utilized in clinical applications yet. In addition to safety, finetuning allows for various types of editing, leading to treatments for a greater number of diseases. Therefore, the [C]gRNA has the potential to become a standardized technology for gene therapy in the future as a new genome editing platform.