



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CRISPR/Cas9を活用したエピゲノム編集システムの開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	片山, 翔太
Description	配架番号 : 2369
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12990号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70265
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shota_Katayama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 片山翔太

学 位 論 文 題 名

CRISPR/Cas9 を活用したエピゲノム編集システムの開発
(Development of Epigenome Editing System using CRISPR/Cas9)

【背景と目的】 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR-associated protein9 (Cas9) はゲノム DNA 上の狙った領域を改変することができる最新のゲノム編集技術である。狙った領域を特異性高く、効率的に改変することができることから、医学生物学研究において広く使われている。CRISPR/Cas9 は guideRNA と Cas9 タンパク質の複合体である。guideRNA のデザインは簡便で、更にはコストが安い、誰にでも簡単に使えるツールである点から、世界中で様々な研究に使われている。これまでのゲノム編集は、相同組み換えによるもので、非常に確立が低く、1カ所のゲノム編集に年単位で時間を要するものであった。CRISPR/Cas9 の誕生により、1回の実験で、ゲノム編集された細胞株を得ることができ、時間・コスト・労力が大幅に削減された。Cas9 タンパク質の DNA 切断活性を欠損させた dead Cas9 (dCas9) が開発された。dCas9 に活性化型の転写因子である VP16・VP64・p65・Rtaなどを付加し、標的遺伝子の領域に送り込む手法（エピゲノム編集システム）が報告された。これにより、標的遺伝子の発現を一時的に ON にすることができることが示された。しかしながら、既存のエピゲノム編集システムはどれも転写活性化の効果は弱く、活性化の効果が一時的なものであり、更にはシステム構築に複数の転写因子を必要としておりターゲット以外の遺伝子の発現を変えてしまう可能性がある。これまでのところ、転写活性化の効果が強く、ターゲット遺伝子の領域のエピゲノムのみを書き換える CRISPR システムは確立されていない。強力なエピゲノム編集システムの開発は、現在治療が困難なエピゲノム異常による疾患の新たな治療法、医学生物学研究における有効なツールとなりうることが期待される。我々は、DNA メチル化に着目し、DNA メチル化プロモーター領域を非メチル化プロモーター領域に改変することにより、標的遺伝子での強力な転写活性化が起こせると考えた。また同時に、DNA メチル化状態を完全に書き換えた場合、その活性化状態は長期間維持されるものと考えた。

【方法・結果】 哺乳類の細胞において、プロモーター領域の DNA のメチル化は遺伝子発現をほぼ完全にゼロにする。これは細胞運命制御に関係する転写因子に多く見られる機構である。CRISPR/Cas9 を用いて標的遺伝子のメチル化プロモーター（Transcription Start

Site, TSS から上流 700bp) 領域を切断し、そこに短鎖相同末端結合 (Microhomology-Mediated End Joining, MMEJ) を利用して、20bp のマイクロホモロジーアームを付けた DNA フラグメント (非メチル化プロモーター領域・ルシフェラーゼレポーター・2A からなる) を挿入する。これによって、標的遺伝子のプロモーターのメチル化状態が非メチル化状態へと解除され、強力な転写活性化が誘導される。また、ルシフェラーゼレポーターによって、転写活性をモニターすることができる。標的遺伝子のメチル化プロモーター領域を非メチル化プロモーター領域に変えることによって、標的遺伝子の転写 (発現) を強力に誘導するシステム・技術体系の開発に世界に先駆けて成功した。神経細胞とオリゴデンドロサイトの発生・分化に関わる転写因子 *OLIG2* のプロモーター領域をモデル標的として、そのメチル化プロモーター領域を非メチル化プロモーター領域に変えた結果、HEK293T 細胞に *OLIG2* 発現を誘導することができた。更に、NTERA-2 細胞を用いた *OLIG2* プロモーター変換は高効率 (20%) に神経細胞分化を誘導した。驚くべきことに、このシステムで誘導された *OLIG2* の発現はヒト体細胞で 21 日間経っても高いままであった。メチル化酵素の発現量に依存するものと考えられるが、このシステム体系を利用することで標的遺伝子の長期間の転写活性化状態の維持が期待できる。更に、ヒト体細胞において *NANOG* の発現を強力に活性化することにも成功し、プロモーター領域のメチル化によって発現抑制を受けている遺伝子の発現を強力に活性化できることが示唆された。このように、我々は人為的に細胞運命転換を誘導する新しいシステムの開発に成功した。

【考察・結論】これまで報告がなされていたエピゲノム編集システムは、転写活性化の効果が弱く、多能性幹細胞から神経細胞への分化誘導効率が非常に低い (~8%) 状態であった。多能性幹細胞からの分化誘導には、分化誘導因子の強力な転写活性化が必要である。我々のシステムを多能性幹細胞へと用いることにより、神経細胞分化を高効率 (~20%) に誘導することができた。つまり、細胞運命転換を高効率に起こすことができる、強力なエピゲノム編集システムであることが示された。今回我々が開発したシステム体系は遺伝子治療・生命科学研究への応用が期待される。このシステム体系を、遺伝子発現異常を起こしている細胞・組織へと送り込むことにより、その部位の発現異常の改善・病態改善が期待できる。個体レベルでのエピゲノム編集法は現在報告がなく、我々のシステム体系をウイルスベクターやナノ粒子に搭載して送り込むことにより、実現するものと考えられる。ゲノム編集システムを搭載できるデリバリーシステム (ウイルスベクターやナノ粒子) の開発研究が世界的になされている現状にあり、実現可能なものと考えられる。生命科学研究への応用としては、人工遺伝子回路の作成・細胞工学への応用が期待される。現在、動的で複雑な遺伝子発現ネットワークを理解し、その情報をもとに再構成しようとする研究が行われている。人工遺伝子回路の作成は、より厳密な遺伝子発現制御システムの開発そのものであり、幹細胞から標的細胞へのより厳密な分化誘導法の開発につながる。以上述べてきたように、本研究成果は医療応用・生命科学研究への応用が期待されるものである。