

広島大学学位請求論文

大規模遺伝子領域を標的とした  
多重化 **CRISPR-Cas9** を用いた  
マイクロホモロジー媒介  
遺伝子置換に関する研究

(Study on microhomology-assisted gene  
replacement using multiplexed CRISPR-Cas9  
targeting large gene region)

2024年3月

松崎 周

## 目 次

### 1. 主論文

大規模遺伝子領域を標的とした多重化 CRISPR-Cas9 を用いたマイクロホモロジー  
一媒介遺伝子置換に関する研究

(Study on microhomology-assisted gene replacement using multiplexed CRISPR-Cas9  
targeting large gene region)

### 2. 参考論文

- 1) Matsuzaki S, Sakuma T, Yamamoto T. REMOVER-PITCh: microhomology-assisted  
long-range gene replacement with highly multiplexed CRISPR-Cas9. *In Vitro Cellular  
& Development Biology – Animals*, in press

# 主論文

大規模遺伝子領域を標的とした  
多重化 **CRISPR-Cas9** を用いた  
マイクロホモロジー媒介  
遺伝子置換に関する研究

(Study on microhomology-assisted gene  
replacement using multiplexed CRISPR-Cas9  
targeting large gene region)

松崎 周

**2023**

## 目次

概要	-6-
図	-9-
引用文献	-11-
<b>第1章</b>	
<b>マイクロホモロジーを介した大規模遺伝子置換システムの開発</b>	
	-15-
要約	-15-
緒言	-15-
結果	-18-
結論	-25-
材料&方法	-27-
図	-35-
引用文献	-54-
<b>第2章</b>	
<b>LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh による置換効率の向上</b>	
	-57-
要約	-57-
緒言	-57-
結果	-58-
結論	-60-
材料&方法	-62-
図	-68-
引用文献	-81-
総括	-82-
引用文献	-84-
謝辞	-85-

## 概要

ゲノム編集の登場は、生物学や生物工学、農業など多くの分野における技術革新を促進した。特に、生命科学の分野では、これまで対症療法しか存在しなかった遺伝子疾患において根本的な治療法としての可能性を示した。ゲノム編集は、人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子改変技術であり、従来の遺伝子組換えと比較して特異的かつ効率的に標的としたゲノム DNA を改変することができる (Sakuma and Woltjen. 2014)。人工ヌクレアーゼとして、ZFNs (zinc finger nucleases) (Kim et al. 1996; Bibikova et al. 2002) や TALENs (transcription activator-like effector nucleases) (Moscou and Adam. 2009; Miller et al. 2011)、CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins) (Jinek et al. 2012; Wiedenheft et al. 2012) が主に利用されており、これらの人工ヌクレアーゼが標的とする DNA を特異的に認識することで、標的部位に DNA 二本鎖切断 (Double Strand Break: DSB) を導入することができる。ZFN と TALEN は、それぞれ標的 DNA を認識するジンクフィンガーもしくは TALE ドメインと FokI ヌクレアーゼにより構成されており、FokI ヌクレアーゼが二量体を形成することで DSB が導入される。CRISPR-Cas9 システムは、single-guide RNA (sgRNA) と *Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 ヌクレアーゼを用いた RNA 誘導型のヌクレアーゼであり、sgRNA の相補的配列を介して標的部位に Cas9 ヌクレアーゼをリクルートし DSBs を導入する (Cong et al. 2013; Mali et al. 2013)。CRISPR-Cas9 システムによる標的認識は sgRNA の相補的配列に依存しているので、sgRNA の相補的配列を変えるだけで様々な配列を標的とすることができる。このようなデザインの柔軟性だけでなく、操作の簡便さ、切断効率の高さから、CRISPR-Cas9 はゲノム編集のために幅広く使用されている。実際に、CRISPR-Cas9 システム

は、多種多様な細胞あるいは生物種における遺伝子改変を可能にし、モデル作製や病原性変異修復といった疾患治療における強力なツールとなっている (Ding et al. 2014; Hsu et al. 2014; Li et al. 2013; Su et al. 2016; Yin et al. 2014; Wang et al. 2013)。

人工ヌクレアーゼにより導入された DSBs は、細胞内在 DSB 修復経路を介して修復される。修復の過程で DSB 部位に短い欠失や挿入などの変異 (indel) が入るとフレームシフト変異が生じ遺伝子機能が破壊される (gene knockout)。一方で、外来配列もしくは遺伝子カセットの存在下では、DSB 部位に外来の遺伝子を挿入することができる (gene knock-in)。遺伝子ノックインにおける DSB 修復経路には切断末端と外来配列を直接つなぎ合わせる非相同末端結合 (Non-homologous end joining: NHEJ) (Maresca et al. 2013; Suzuki et al. 2016; Danner et al. 2021) や相同配列を介して修復する相同組換え (Homologous recombination: HR) (Hockemeyer et al. 2009; Baker et al. 2017)、マイクロホモロジー媒介末端結合 (microhomology-mediated end joining: MMEJ) (Nakade et al. 2014; Sakuma et al. 2015; Sakuma et al. 2016; Nakamae et al. 2017)、一本鎖 DNA 標的修復 (single-strand template repair: SST-R) (Davis and Maizels. 2016; Kan et al. 2017) など複数の経路が利用されている (Fig.1)。これらの修復経路の選択は細胞種や生物種、細胞周期、クロマチン状態に依存しており (Ceccaldi et al. 2016; Clouaire and Legube. 2015)、NHEJ 修復は細胞周期を通して活性が高い一方で、修復過程で結合部位に変異が入りやすく正確性が低い (Beucher et al. 2009; Rothkamm et al. 2003)。対照的に、HR 修復は切断末端近傍の配列を相同配列として利用することで正確性の高いノックインが可能であるが、細胞周期の S 期後期から G2 期にしか活性がないためノックイン効率が細胞種や生物種で限定される。MMEJ 修復は、ドナーベクターから切り出した遺伝子カセットを 5-40 bp と短い相同配列を介してノックインする手法であり、G1 期から S 期初期の長い期間に活性化が認められる (Taleei

and Nikjoo. 2013)。それぞれの DSB 修復経路を利用した遺伝子ノックイン法として、これまでに HITI 法 (Suzuki et al. 2016) や PITCh システム (Nakade et al. 2014; Sakuma et al. 2016) が開発されている。PITCh システムは、MMEJ を介したノックイン法で、多くの細胞種および生物種において高効率なノックインが可能であること、また、HR 修復より正確なノックイン効率が高いことが培養細胞において報告されている (Nakade et al. 2014; Hisano et al. 2015; Aida et al. 2016)。このように多くのノックイン法の開発によりゲノム編集に対する選択肢の幅が広がり、基礎研究や遺伝子治療、細胞医療といった最先端医療への応用が期待されている。

ゲノム編集ツールを用いた遺伝子ノックイン法には、上記で述べた標的部位への遺伝子挿入法と、領域単位で塩基配列を置換する遺伝子置換法がある。遺伝子置換は、一般的に 2 つの sgRNA を用いてゲノム DNA 上の 2 カ所に DSBs を導入し、DSB 修復経路を介して目的配列に置換する方法であり、中規模から大規模な領域での遺伝子改変が可能となる (Fig.2) (Zheng et al. 2014; Danner et al. 2021)。そのため、この方法はプロモーターやエンハンサーといった非コード領域全長やクラスター遺伝子の置換による機能解析や疾患研究のためのヒト化モデルの作製、遺伝子疾患を含む治療への応用が期待されている。しかし、これまでの遺伝子置換の実施例としては、HR や NHEJ を用いたレポーター遺伝子の置換や一部のエクソン-イントロン領域の置換が報告されているが、置換領域は～60 kb にとどまっている (Zhang et al. 2015; Leidy-Davis et al. 2018; Katayama et al. 2019)。そこで本研究では、遺伝子置換技術の適応範囲の拡大および効率の改善のために新規遺伝子置換法 REMOVER-PITCh の開発について報告する。第 1 章では、dual-sgRNA を用いた CRISPR-Cas9 システムと PITCh システムを利用した遺伝子置換の検証を行い、検証結果に基づいて、より効率的に目的の遺伝子置換

を実現する REMOVER-PITCh の開発を行った。第 2 章では、大規模遺伝子領域における遺伝子置換のため修復機構である MMEJ の効率に着目し、LoAD システム (Nakade et al. 2018) による標的カセット置換の効率化を試みた。



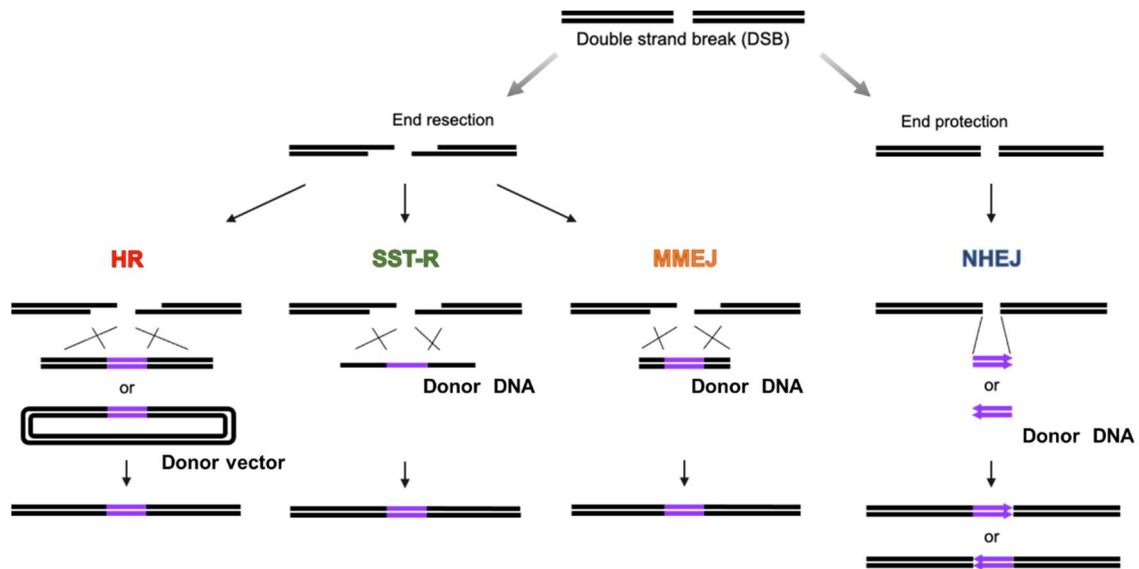


図 1. 遺伝子ノックインにおける DSB 修復経路

部位特異的ヌクレアーゼによりゲノム DNA 上に二本鎖切断 (Double Strand Break: DSB) が導入されると、DSB 修復経路が誘導される。DSB 修復経路には大きく 2 つの経路が使い分けられている。切断末端の削り込みが生じた場合、相同組換え修復 (HR) や一本鎖テンプレート修復 (SST-R)、マイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) といった相同配列を介した修復が誘導され、切断末端が保護された場合、末端同士を直接結合する非相同末端結合 (NHEJ) 修復が誘導される。これらの DSB 修復経路による修復が生じる際に、外来遺伝子配列が存在すると、DSB 部位へノックインが生じる。相同配列を介した修復機構では順方向にのみノックインされるが、NHEJ 修復では逆方向でのノックインも生じる。紫：外来遺伝子配列

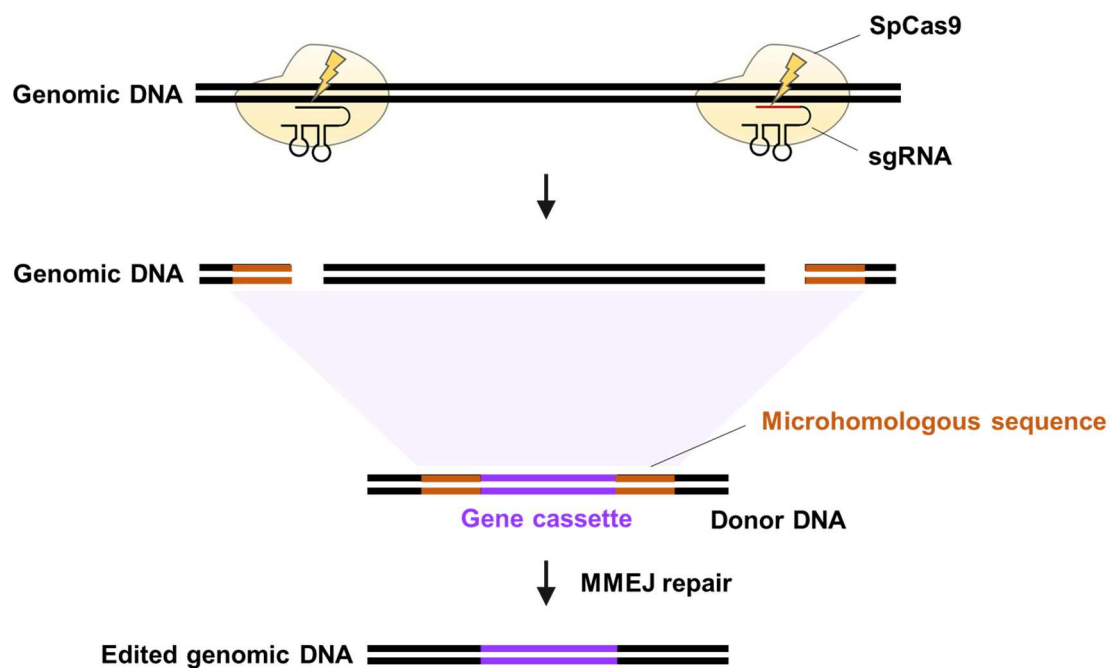


図 2. CRISPR-Cas9 system による MMEJ を介した遺伝子置換法

ゲノム編集ツールとして CRISPR-Cas9、DSB 修復機構として MMEJ を利用した PITCH システムを用いた遺伝子置換法の概略図。標的とするゲノム DNA 上に設計した 2 つの sgRNA を用いて 2 箇所に DSBs を導入する。切断末端の配列を相同配列として遺伝子カセットに付与したドナー DNA を用意することで、MMEJ 修復による目的カセットへの置換が誘導される。sgRNA の設計部位を変更することで置換する領域を調節できるため、柔軟かつ簡便に内在遺伝子領域を目的の配列に入れ替えることが可能である。

## 引用文献

Aida, T. et al. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17, 979 (2016).

Baker, O. et al. The contribution of homology arms to nuclease-assisted genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 45, 8105-8115 (2017).

Beucher, A. et al. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* 28, 3413-3427 (2009).

Bibikova, M. et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161, 1169-1175 (2002).

Ceccaldi, R. et al. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol.* 26, 1 (2016).

Clouaire, T et al. DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* 6, 2 (2015).

Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823 (2013).

Davis, L. et al. Two Distinct Pathways Support Gene Correction by Single-Stranded Donors at DNA Nicks. *Cell Rep.* 17, 1872-1881 (2016).

Danner, E. et al. A homology independent sequence replacement strategy in human cells using a CRISPR nuclease. *Open Biol.* 11, 200283 (2021).

Ding, Q. et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.* 115, 488-492 (2014).

Hisano, Y. et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci. Rep.* 5, 8841 (2015).

Hockemeyer, D. et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs

and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 27, 851-857 (2009).

Hsu, PD. et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278 (2014).

Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821 (2012).

Kan, Y. et al. Mechanisms of precise genome editing using oligonucleotide donors. *Genome Res.* 27, 1099-1111 (2017).

Katayama, S. et al. In vivo and in vitro knockout system labelled using fluorescent protein via microhomology-mediated end joining. *Life Sci. Alliance.* 3, e201900528 (2019).

Kim, YG. et al. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1156-1160 (1996).

Leidy-Davis, T. et al. Viable Mice with Extensive Gene Humanization (25-kbp) Created Using Embryonic Stem Cell/Blastocyst and CRISPR/Zygote Injection Approaches. *Sci. Rep.* 8, 15028 (2018).

Li, D. et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 681-683 (2013).

Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826 (2013).

Maresca, M. et al. Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe): custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining. *Genome Res.* 23, 539-46 (2013).

Miller, JC. et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 29, 143-150 (2011).

Moscou, MJ. et al. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501 (2009).

Nakade, S. et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat. Commun.* 5, 5560 (2014).

Nakade, S. et al. Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system. *Nat. Commun.* 9, 3270 (2018).

Nakamae, K. et al. Establishment of expanded and streamlined pipeline of PITCh knock-in - a web-based design tool for MMEJ-mediated gene knock-in, PITCh designer, and the variations of PITCh, PITCh-TG and PITCh-KIKO. *Bioengineered* 8, 302-308 (2017).

Rothkamm, K. et al. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 23, 5706-5715 (2003).

Sakuma, T. et al. Homologous recombination-independent large gene cassette knock-in in CHO cells using TALEN and MMEJ-directed donor plasmids. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23849-23866 (2015).

Sakuma, T. et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat. Protoc.* 11, 118-133 (2016).

Su, S. et al. CRISPR-Cas9-mediated disruption of PD-1 on human T cells for adoptive cellular therapies of EBV positive gastric cancer. *Oncoimmunology* 6, e1311485 (2017).

Suzuki, K. et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology independent targeted integration. *Nature* 540, 144-149 (2016).

Taleei, R. et al. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. *Mutat. Res.* 756, 206-212 (2013).

Yin, H. et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* 32, 551-553 (2014).

Wang, H. et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910-918 (2013).

Wiedenheft, B. et al. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482, 331-338 (2012).

Zheng, Q. et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques* 57, 115-124 (2014).

Zhang, L. et al. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 10, e0120396 (2015).

## 第 1 章

# マイクロホモロジーを介した大規模遺伝子置換システムの 開発

### 要約

遺伝子ノックイン技術は、標的とするゲノム DNA 部位へ外来遺伝子を挿入することにより細胞や生物に対して新たな機能を付与したり、疾患に寄与する病原性変異を除去したりすることを可能にし、疾患モデルの作製、遺伝子機能解析、遺伝子治療に欠かせない技術となった。しかし、現在のノックイン技術は標的部位へのカセット挿入や短い領域における配列置換が中心であり、大規模な領域を効率的に置換する技術はあまり報告がない。ここでは、MMEJ を利用した大規模遺伝子置換技術として開発に取り組んだ”PITCh-replacement”および”REMOVER-PITCh”の有用性について報告する。PITCh-replacement は、dual-sgRNAs による標的遺伝子領域の切断、REMOVER-PITCh は、multiplex-sgRNAs による標的遺伝子領域の多重切断に基づいた遺伝子置換法である。ムコ多糖症 VII 型の原因遺伝子である *GUSB* 遺伝子座を標的とすることにより、約 20 kb の領域に対して REMOVER-PITCh による標的カセット置換が可能であることを実証した。この結果から、私がデザインした REMOVER-PITCh は、大規模な領域での遺伝子置換法の選択肢の一つとしてモデル作製や遺伝子解析のための有望なツールとなることが期待される。

### 緒言

ゲノム編集技術の登場によりゲノム DNA 上の標的遺伝子に対して様々な改変することが可能になった。特に、CRISPR-Cas9 はその簡便さや効率の高さから代表的なゲノム編集ツールとして多くの応用技術の開発が進み、遺伝子機能解析などの基礎研究から遺伝子治療などの医療利用といった幅広い分野において利用されている。PITCh システムは、MMEJ を介した遺伝子ノックイン法であり、培養細胞だけでなく様々な生物種において高効率なノックインが可能であることが報告されている (Aida et al. 2016; Hisano et al. 2015; Nakade et al. 2014; Nakagawa et al. 2017; Nakamae et al. 2017; Sakuma et al. 2015; Sakuma et al. 2016)。また MMEJ 修復に利用される相同配列が 5~40 bp と短いことから約 1 kb の相同配列を必要とする HR と比べてドナーベクターの構築が簡便である。これらのことから、PITCh システムは、HR や NHEJ を介した遺伝子ノックイン法と並び有望な手法の一つとなっている。

遺伝子置換技術は、一般的に 2 つの sgRNA より誘導される DSBs を利用して標的ゲノム領域を目的の配列で置換する配列単位での遺伝子改変技術である (Danner et al. 2021; Zheng et al. 2014)。標的部位への外来配列の挿入による付加的な遺伝子改変技術である遺伝子挿入法とは異なり、中規模から大規模領域において内在配列と外来配列を入れ替えることが可能である。そのため、遺伝子機能解析や転写制御領域やシスエレメントなどの広範な非遺伝子機能解析、ヒト化マウスモデル、疾患モデルの作製、染色体異常のような大規模領域における疾患変異の修復など遺伝子挿入法では限界のある規模において有用な技術である。遺伝子置換法を用いたこれまでの報告では、約 25 kb のマウスゲノム DNA の HR を用いたヒトゲノム DNA への置き換えや、マウス受精卵における 65 kb の標的遺伝子領域のカセット置換を実証している (Leidy-Davis et al. 2018; Zhang et al. 2015)。しかしながら、HR は細胞種や動物種によっては効率が悪いこと、細胞



周期の一部でしか活性がないこと、使用するドナーベクターに約 1000 bp の大きな相同配列を必要とすることなど、操作面での自由度が低く、構築面で労力がかかることから、応用の幅が小さいと考えられる。また、ヒト細胞における 3 つの遺伝子座のエクソン領域において NHEJ を用いた mCherry レポーター置換も実証されている (Danner et al. 2021)。この報告では 16-54% の効率で 1.3 kb のレポーター置換に成功している。さらに、MMEJ を介した遺伝子置換もマウス受精卵や培養細胞において実施されており、一部のエクソン領域の改変に成功している (Katayama et al. 2019)。しかし、これらの報告は一部のエクソン領域における標的置換であり、高い効率での遺伝子置換に成功しているが小規模な領域に対する報告に限られる。このようにこれまでに各 DSB 修復経路を用いた遺伝子置換が実施されているが、培養細胞や実験動物における遺伝子置換法の知見は少なく、技術基盤も不十分であり、特に大規模領域における改変技術には改善の余地がある。それゆえに、より効率的かつ柔軟に標的領域を改変する方法を開発することはゲノム編集を利用する多くの基礎研究や遺伝子治療において大きな意義がある。

そこで本章では、大規模領域におけるマイクロホモロジーを介した遺伝子置換法を開発することを目的とし、CRISPR-Cas9 を用いてノックインクローンの作製を行った。まず、一般的な遺伝子置換法である dual sgRNA による CRISPR-Cas9 を用いたマイクロホモロジー媒介遺伝子置換法として PITCh-replacement システムの開発を試みた。さらに、PITCh-replacement システムによるノックインの結果に基づいて、より効率的に大規模領域におけるノックインを可能にする新規遺伝子置換法 REplacement with Multiplex OVERdigestion (REMOVED)-PITCh システムを開発し、ヒト培養細胞における有用性の検証を行った。

本研究の標的遺伝子としては、遺伝子疾患であるムコ多糖症 (MPS) の VII 型、

VI型の原因遺伝子である *GUSB* および *ARSB* を選定した。MPS は、グルコサミノグリカン (GAGs) 分解酵素の欠損もしくは活性低下により引き起こされるリソソーム蓄積症の1つであり、皮膚や骨、関節などの様々な組織に未分解の GAGs や中間代謝産物が蓄積することで、全身性かつ進行性の症状を呈する (Linker et al. 1955 ; Valayannopoulos et al. 2010)。GAGs は複数のリソソーム酵素により段階的に分解されるため、欠損する酵素によって 7 つのサブタイプに分類される。MPS VII 型は、 $\beta$ -D-グルクロニダーゼをコードする *GUSB* 遺伝子座、VI 型はアリルスルファターゼ *b* をコードする *ARSB* 遺伝子座に病原性変異が生じることで発症する (Tomanin et al. 2018 ; Tomatsu et al. 2009)。MPS の大きな特徴として変異のホットスポットがないことが挙げられる。これまでに VII 型では約 60 種類、VI 型では 150 種類以上の変異が同定され、軽症型から重症型まで様々な病態を示すことが報告されているが、遺伝子型と表現型の間には不明な点が多く、詳細な病態生理を理解するためには変異モデルが必要とされる。しかし、遺伝子挿入法により各変異を導入することは技術面、コスト面から現実的ではなく、遺伝子置換により正常遺伝子と変異を有する遺伝子カセットを置換する手法が有効であると考えられる。そこで本研究では、*GUSB* 遺伝子座の gene body (21,287 bp) および *ARSB* 遺伝子座の gene body (204,852 bp) を標的として遺伝子置換法の有用性を検証した。

## 結果

### PITCh-replacement による遺伝子置換戦略

本研究では、標的遺伝子の gene body を目的カセットで置換することにより、生体内のプロモーターを利用して導入遺伝子を発現させる戦略をとった (図 1-1)。まず、標的遺伝子の開始コドン下流および終止コドン上流に設計した

sgRNAs を用いて DSBs を導入する。同時に PITCh ドナーベクター上に設計した sgRNA を用いてベクターからカセットを切り出す。続いて、標的遺伝子上に露出した切断末端とカセット両端に付与した 40 bp のマイクロホモロジー配列を介して MMEJ 修復によりカセットが挿入される。MMEJ 修復によりカセットがシームレスに連結された場合、標的遺伝子のプロモーターにより導入遺伝子発現が誘導される。

### Cas9-sgRNA オールインワンベクターの構築

PITCh-replacement システム開発のために、まず、標的遺伝子およびドナーベクターを切断する Cas9-sgRNA 発現ベクターを構築した。本研究では、標的遺伝子座特異的 sgRNAs と PITCh-sgRNA、そして SpCas9 を発現するオールインワンベクターを採用した(図 1-2 a, b, d, e)。sgRNA の切断活性は、ゲノム PCR による標的領域の欠失体の増幅に基づいて評価した(図 1-2 c, f)。PCR の結果、*GUSB* 遺伝子座は sgRNA#1 と#4、*ARSB* 遺伝子座は sgRNA#1 と#3 の組み合わせで強い増幅を示したので、これらの sgRNA を有するオールインワンベクターを使用することとした。

### PITCh ドナーベクターの構築

次に、標的領域と置換するカセットを有する PITCh ドナーベクターを構築した(図 1-3 a, b)。PITCh ドナーベクターには、標的遺伝子の 5' CDS 側の切断部位下流の野生型 CDS 配列と選抜用のネオマイシン耐性遺伝子を T2A 配列で連結したカセット(CDS-T2A-*NeoR*)が含まれており、そのカセットの両側には標的遺伝子の切断末端と一致する 40 bp の相同配列を付与した。さらに、相同配列の外側に sgRNA 標的配列を入れており、切断されることでドナーベクターからカセ

ットが切り出される。また、カセットの CDS 上には内在遺伝子座を標的とする sgRNA の認識配列があり、ドナーベクターの切断を防ぐためにそれぞれの認識配列にサイレント変異を導入した(図 1-3 c)。

### ***GUSB* 遺伝子座を標的とした PITCh-replacement の検証**

構築したオールインワンベクターおよび PITCh ドナーベクターを用いて、*GUSB* 遺伝子座に対する標的カセット置換を試みた。HCT116 細胞株に各ベクターを共導入し、G418 による約 1 週間の薬剤選抜および限界希釈法によるシングルセルクローニングを行い、選抜細胞集団から 25 クローンを単離した。単離した 25 クローンにおいて、5'および 3'側の junction PCR の結果、クローン E7, F2 が両連結部の増幅を示しカセット置換アレルを有する可能性が示唆された(図 1-4 a, b)。しかしながら、カセット全長を増幅するプライマーを用いて out-out PCR を行った結果、想定より約 800 bp 短い増幅産物が確認され、標的配列と単一カセットの置換が認められなかった(図 1-4 c)。また、連結部のシーケンス解析の結果、両クローンともに 3'側は MMEJ により正確に連結していたが、5'側の切断部位に 1 塩基挿入が認められた(図 1-4 d)。まとめると、約 20 kb の *GUSB* 遺伝子座を標的とした PITCh-replacement を用いた遺伝子置換では、薬剤耐性を示すクローンを獲得することができたが、不完全な標的置換が優位に生じていることが示された。

### ***ARSB* 遺伝子座を標的とした PITCh-replacement の検証**

次に、より大規模な領域に対する遺伝子置換の可能性を検証するために、*ARSB* 遺伝子座を標的とした PITCh-replacement によるカセット置換を試みた。薬剤選抜後の細胞集団における junction PCR にて連結部の増幅を確認した後、シング

ルセルクローニングにより 27 クローンを単離した。しかし、単離した 27 クローンのうち 7 クローンで junction PCR による増幅が認められたものの、out-out PCR では増幅は認められなかった(図 1-5 a-c)。一方で、連結部のシーケンス解析の結果、全てのクローンの 5'および 3'側の連結部は MMEJ により正しく連結できていることが示された(図 1-5 d)。つまり、各連結部で修復されたカセットが断片配列を含んで NHEJ により結合した不完全な置換が生じている可能性が高く、獲得したクローンが偽陽性であったことが示唆された。おそらく MMEJ 修復と比較して NHEJ 修復の頻度および速度が優位であることや、内在遺伝子断片とカセット間の共通配列を介した複雑な修復が生じていることが起因していると考えられた。そこで、この仮説を検証するために、各エクソン上にプライマーを設計しゲノム PCR を行った(図 1-5 e, f)。まず、内在遺伝子上の 5'側切断部位の上流のプライマーとエクソン 3, 4, 5 上のプライマーを用いて PCR を行った結果、5'UTR からエクソン 4 までの増幅が確認された(図 1-5 e)。次に、内在遺伝子上の 3' UTR 上に設計したプライマーとエクソン 5, 6, 7 上のプライマーを用いて PCR を行った。その結果、カセット置換を示唆する増幅は認められず、一方で、非ノックインアレルのエクソン 7 から 3' UTR の増幅および一部のカセット断片(*ARSB* CDS exon8-T2A-*NeoR*)の挿入の可能性が示された(図 1-5 f)。これらの結果から、カセットとゲノム DNA のエクソン 4 とエクソン 8 の配列を介して意図しない HDR が生じている可能性が示唆された(図 1-5 g)。実際に、同様の現象が NHEJ と HDR を介したノックインを検証した以前の研究にて観察されている(Suzuki et al. 2019; Yoshimi et al. 2021)。以上の結果から、CRISPR-Cas9 による 2ヶ所の切断と PITCh システムを用いた PITCh-replacement 法では修復効率が低く、正確に置換されたクローンは樹立できなかつた。

## REMOVER-PITCh による遺伝子置換戦略

*GUSB* 遺伝子座および *ARSB* 遺伝子座を標的とした PITCh-replacement システムによる遺伝子置換では、切り出した遺伝子断片がカセット置換効率の低下に寄与している可能性が示唆された。そこで、遺伝子断片の影響を抑制し効率の高い遺伝子置換を実現するために、内在遺伝子を多重切断する新規遺伝子置換法 REMOVER-PITCh の開発を試みた(図 1-6)。REMOVER-PITCh は、標的遺伝子の CDS 上の sgRNAs に加えてイントロン上に設計した sgRNAs を用いて CRISPR-Cas9 により複数の DSBs を導入することで標的遺伝子を多重切断する手法である。切断後のカセット置換は PITCh-replacement と同様に PITCh システムにより行う。本研究では、初回検討として遺伝子長に応じて sgRNA の数を決定し、それぞれの sgRNA の間隔が同じ長さになるように *GUSB* 遺伝子座のイントロン上に 5 つの sgRNAs、*ARSB* 遺伝子座のイントロン上に 7 つの sgRNAs を設計した。

## Multiplex CRISPR ベクターの構築

まず、REMOVER-PITCh システムに使用する Multiplex CRISPR ベクターを構築した。各遺伝子座に対しそれぞれ 2 つの Multiplex CRISPR ベクターを構築し、*GUSB* 遺伝子座特異的 sgRNA を 4 つずつ、*ARSB* 遺伝子座特異的 sgRNA を 5 つずつ搭載した(図 1-7 a, b)。CDS 上の sgRNA は PITCh-replacement にて使用した sgRNA を採用したが、*GUSB* 遺伝子の開始コドン近傍の sgRNA については切断面に 1 塩基の挿入変異が入る可能性が高いため新たに設計した(Allen et al. 2018)。

## *GUSB* 遺伝子座を標的とした REMOVER-PITCh の検証

構築した CRISPR Multiplex ベクターおよび PITCh ドナーベクターを用いて、*GUSB* 遺伝子座に対する標的カセット置換を試みた。HCT116 細胞株に各ベクタ

一を共導入し、3日間培養後 G418 による薬剤選抜およびシングルセルクローニングにより 67 クローンを単離した。PITCh-replacement の結果から、Junction PCR によりクローンを絞る方法は偽陽性を拾う可能性が高いことが分かったため、まず out-out PCR で増幅するクローンを選別後、junction PCR による連結部の増幅を行った。67 クローンにおける out-out PCR の結果、4 クローンにてカセット置換の可能性を示す増幅産物が確認された(図 1-8 a)。さらに、これらの 4 クローンにおいて連結部の junction PCR およびシーケンス解析を行い、全てのクローンで両連結部が MMEJ により正しく連結していることが示された(図 1-8 b, c)。しかしながら、クローン E12 および g9 は、サンガーシーケンスの波形データから 3'連結部の下流で波形の重複が確認され、変異導入の可能性が示唆された(図 1-8 d)。最後に、標的領域に対して単一のカセットが正しく置換されていることを確認するために、より長い領域の増幅を long PCR により評価した(図 1-8 e)。その結果、すべてのクローンにおいて目的の増幅産物が認められた。これらの結果から、培養細胞において *GUSB* 遺伝子座に対する REMOVER-PITCh の有用性が実証され、約 20 kb の遺伝子領域において 6.0%の効率で MMEJ を介したカセット置換クローンの樹立を達成した。

### **ARSB 遺伝子座を標的とした REMOVER-PITCh の検証**

次に、より大規模な遺伝子領域に対する REMOVER-PITCh の有用性を検証するために、*ARSB* 遺伝子座の約 200 kb の遺伝子領域を標的にしたカセット置換を試みた。まず、構築した CRISPR Multiplex ベクターおよび PITCh ドナーベクターを HCT116 細胞株へ共導入し、薬剤選抜およびシングルセルクローニングにより 16 クローンを単離した。このうち、10 クローンにおいて junction PCR による連結部の増幅が認められたが、out-out PCR では目的の増幅が認められなかつ

た(図 1-9 a, b)。これらの結果から、*ARSB* 遺伝子座のような大規模領域の修復では、MMEJ によるカセット置換に比べてより高い頻度かつ修復速度が早い NHEJ 修復が優位な状況であり、不完全なノックインが誘導されている可能性が示唆された。

### 標的置換クローンの遺伝子型解析とオフターゲット解析

REMOVER-PITCh によるカセット置換クローンの遺伝子型を確認するため、イントロン上に設計したプライマーを用いて非ノックインアレル特異的な PCR 増幅を実施した(図 1-10 a)。*GUSB* 遺伝子座に対する 4 つのカセット置換クローンのうち、a12 は 5'側、H10 は 3'側の UTR-イントロン領域の増幅を示し、これらのクローンでは少なくとも片アレルにおいてカセット置換が生じていることが示唆された。さらに、これらの増幅産物の配列解析の結果、クローン a12 は 5'CDS 上の sgRNA 切断部位への変異導入はなく、未切断もしくは切断後正確に修復された可能性が示された(図 1-10 b)。一方で、クローン H10 は、3'CDS 上の sgRNA 切断部位へ 1 塩基挿入変異が認められた(図 1-10 c)。これらの結果から、クローン E12 と g9 は両アレルへのカセット置換によるホモ、クローン H10 と a12 はカセット置換と野生型または KO によるヘテロ型である可能性が示された。続いて、カセット置換クローンにおけるオフターゲット解析を実施した。Web ツールである COSMID を用いて上位 7 ヶ所のオフターゲット候補部位を選定し、各部位への変異導入の有無を Cel-I アッセイおよびシーケンス解析により確認した(図 1-11 a, b) (Cradick et al. 2014)。オフターゲット候補部位を含む領域の PCR 増幅産物を用いて GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit に従い変異導入を評価した結果、4 クローン全てにおいて変異は検出されなかった(図 1-11 a)。さらに、シーケンス解析においてもオフターゲット変異は認められず、



設計した sgRNA によるオフターゲット切断の可能性が低いことが示された(図 1-11 b)。

## 結論

遺伝子置換法は、標的とする DNA 領域を配列単位で目的配列に置換する遺伝子改変技術である。先行研究では、HR を利用した数十から数百 bp の遺伝子置換が報告されているが (Leidy-Davis et al. 2018; Zhang et al. 2015)、HR の修復効率やベクター構築の点から応用の幅が小さい。また、MMEJ を利用した報告もあるが、一部のエクソン領域の置換に限られており (Katayama et al. 2019)、改変の自由度は低い。そこで本研究では、MMEJ を介した遺伝子置換法の標的遺伝子サイズを拡大する新規遺伝子置換法を開発し、ヒト培養細胞において CRISPR-Cas9 および PITCh 法を用いて約 20 kb の領域へのカセット置換に成功した。

本研究では、変異モデルの作製に遺伝子置換法が有効な手段であると考えられるムコ多糖症 VII 型、VI 型の原因遺伝子 *GUSB* および *ARSB* を標的として遺伝子置換法の有用性を検証した。まず初めに、dual-sgRNA による CRISPR-Cas9 と PITCh 法を利用した PITCh-replacement システムを用いてカセット置換を試みたが、両遺伝子座において標的領域へのカセット置換は観察されず、ノックインクローンは樹立できなかつた。ジェノタイピングの結果、ほとんどのクローンにおいて複雑な修復による不完全なノックインが生じている可能性が示唆された。これは、遺伝子断片が修復に関与していること、NHEJ 修復が優先的に生じていることが原因であると考えられた。

そこで、イントロンに設計した multiplex-sgRNA にて標的遺伝子を多重切断することで遺伝子断片による置換効率の低下を軽減する新規遺伝子置換法 REMOVER-PITCh システムを開発した。このシステムの有用性を検証した結果、

*GUSB* 遺伝子座の約 20 kb の標的領域においてカセット置換を示すクローンの樹立に成功した。このことから大規模領域の遺伝子置換では、遺伝子断片が MMEJ を介したカセットノックインを妨げることが明らかになった。一方で、より規模の大きい *ARSB* 遺伝子座の約 200 kb においては、カセット置換を示すクローンの樹立には至らなかった。これは、切断後に露出した相同配列とドナーカセットの相同配列の距離が遠く、NHEJ が優位に生じたためと考えられた。

MMEJ を介した遺伝子置換法の先行研究では、多くが一部のエクソン領域に対する配列置換の報告である。本研究で開発した REMOVER-PITCh システムは、約 20 kb という大規模領域において意図した配列に置換できることを実証し、MMEJ を介した遺伝子置換法の改変範囲を拡大することに成功した。PITCh 法は、多くの細胞種や生物種に対する高効率なノックイン法であるため、REMOVER-PITCh を利用することで HR 修復効率の低い細胞種や動物種においても大規模改変を行うことができると考えられる。また、ベクター構築の簡便さから標的遺伝子を変異 CDS カセットで置換することにより、スループット性の高い変異モデルの作製が可能になると考えられる。しかしながら、一般的な技術として広く使用するためには、システムの安全性や置換効率などの知見の蓄積やそれに基づく改良、最適化が必要である。まず一番大きな課題として、複数の sgRNA を利用することによるオフターゲットの可能性が挙げられる。これまでの報告では、2 つの sgRNA による切断が欠失や逆位など染色体再配列を引き起こすこと (Shou et al. 2018)、遺伝子断片やカセット断片のランダムインテグレーションやオンターゲット部位の大規模な欠失が生じることが報告されている (Michael et al. 2018)。本研究では、個々の sgRNA のオフターゲット候補サイトに対して、オフターゲット切断による変異導入の可能性が限りなく低いことを確認しているが、この検証方法は限定的な解析であるため、重要なオフターゲット

トを見逃している可能性は高い。そのため、網羅的かつ高感度な解析を行い、改変部位だけでなく遺伝子全体としてオフターゲット変異を確認する必要がある。ただし、これまでに開発された GUIDE-seq、Digenome-seq などのオフターゲット検出法は、複数の sgRNA によるオフターゲット解析には適していないため、これらの解析を組み合わせることで検出精度を上げる必要がある (Wienert et al. 2019; Kim et al. 2015)。このように、REMOVER-PITCh システムの安全性に関する知見の獲得および安全性向上に向けた最適化を行うことで、より汎用的な技術になると考えられる。

## 材料&方法

### 細胞培養

HCT116 細胞株は、10 % fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)、1 % penicillin-streptomycin (Wako)、1% MEM non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-high glucose を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> incubator の中で行った。使用した細胞株は e-Myco Mycoplasma PCR Detection Kit (iNtRON Biotechnology)と short tandem repeat analysis (Takara)を用いてマイコプラズマが陰性であることを確認した。

### Cas9-sgRNA 発現プラスミド

Cas9 ヌクレアーゼおよび各遺伝子に対する複数の sgRNAs を発現するオールインワンベクターおよび Multiplex CRISPR ベクターは、論文を参考に the multiplex CRISPR/Cas9 assembly system Kit (#1000000055, Addgene)を用いて構築した (Sakuma et al. 2014)。まず、表 1 にリスト化した sgRNA 用のオリゴヌクレオチドをアニーリングし、Golden gate 法により px330A または px330S ベクター

に挿入した。続いて、全ての sgRNA を Golden Gate assembly を用いて一つのベクターへ挿入した。

表 1. ベクター構築に使用した sgRNA の配列

Gene	Site	Sequence (5' to 3')		
<i>GUSB</i>	exon1#1	Sense	caccggctgcgcgctggggctgca	
		Antisense	aaactgcagccccagcgcgcagcc	
	exon1#5	Sense	caccgttgttggggctgcgcgct	
		Antisense	aaacagcgcgcagccccacaacaac	
	exon12	Sense	caccgtgtgacttggtactgagtg	
		Antisense	aaaccactcagtagccaagtacac	
	intron4	Sense	caccgagattattgacagccgttgt	
		Antisense	aaacacaacggctgtcaataatctc	
	intron8	Sense	caccgtcattgctctgcttatccga	
		Antisense	aaactcggataggcagagcaatgac	
	intron9	Sense	caccggagaagcgtgccaccga	
		Antisense	aaactcgggtggcagcgttctcc	
	intron10	Sense	caccgctcactgtcgctttgatctc	
		Antisense	aaacgagatcaaagcgacagtgagc	
	intron11	Sense	caccggataatgccacctcctgt	
		Antisense	aaacacaaggaggtggcattatcc	
	<i>ARSB</i>	exon1	Sense	caccggcaagctcgccgcgccgcg
			Antisense	aaaccgcggcggcgagcttgcc
exon8		Sense	caccggtgtggggcccttgatgt	
		Antisense	aaacacatccaagggccccacacc	
intron1		Sense	caccgaagtaactctggtcctcaac	
		Antisense	aaacttgaggaccagagtacttc	
intron4_1		Sense	caccgatacatatcctcctcact	
		Antisense	aaacagtgaggaggatatatgtatc	
intron4_2		Sense	caccgtgggttcattacattgagag	
		Antisense	aaacctctcaatgtaatgaaccac	
intron5_1		Sense	caccgattaggaagttcggaat	
		Antisense	aaacattccgaactgcctaatagc	

	intron5_2	Sense	caccgaaggagtttcaccgggatag
		Antisense	aaacctatcccgggtaaactccttc
	intron6_1	Sense	caccgatccagggtaccgattggca
		Antisense	aaactgccaatcgggtaccctggatc
	intron6_2	Sense	caccgtgctgaatgaacagtacac
		Antisense	aaacgtgtactgttcattcagcac
PITCh-donor	PITCh-sgRNA	Sense	gtgcttcgatcgcgacgtttgg
		Antisense	ccaaacgatcgcgacgaagcac

### PITCh ドナーベクター

*GUSB* 遺伝子座および *ARSB* 遺伝子座の標的領域と置換するカセットを含む PITCh ドナーは、PCR および In-Fusion HD キットを用いて構築した。

### Cas9-sgRNA 発現ベクターの切断活性評価

構築したオールインワンベクターおよび Multiplex CRISPR ベクターは、HCT116 細胞株において欠失体の PCR 増幅により切断活性を確認した。それぞれの Cas9-sgRNA 発現ベクターを HCT116 細胞株に共導入し、48 時間培養後に細胞から抽出したゲノム DNA を用いて表 2 に示すプライマーにてゲノム PCR を行った。

### ノックイン細胞の作製

24 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  cells の HCT116 細胞株を播種した。24 時間培養後、*GUSB* もしくは *ARSB* 遺伝子座を標的とするオールインワンベクターまたは Multiplex CRISPR ベクターと PITCh ドナーベクターを lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションし、その翌日、6 ウェルプレートへ移した。トランスフェクション 3 日後、G418 (800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 含有培地に交換し薬剤選抜を開始した。G418 含有培地は毎日交換し、約 10 日間の選抜後、限界希釈

法によるシングルセルクローニングを行った。選抜後の細胞集団を 6 cells/mL に調整し、200  $\mu$ L ずつ各ウェルに添加した (1.2 cells/well)。添加した細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> incubator 内で培養し単一クローンを取得した。両アレルへのカセット置換はゲノム PCR およびシーケンス解析により判別した。

### ゲノム PCR

DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)を用いて選抜後細胞集団、クローンからゲノム DNA を精製した。構築した Cas9-sgRNA 発現ベクターによる切断活性評価では、DNAzol direct (MOR)を用いてライセートを作製した。ゲノム PCR は KOD Fx Neo (TOYOBO)を用いて行った。各配列を増幅するプライマーは表 2 に記載する。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離、EtBr 染色後、増幅バンドを UV トランスイルミネーターにて確認した。

表 2. ゲノム PCR に使用したプライマー

Cas9-sgRNA 発現ベクターの切断活性評価用プライマー

Gene locus	Region	Direction	Sequence (5' to 3')
<i>GUSB</i>	5'UTR - 3'UTR	F	aagatggcgcggatggcttcag
		F	gctgtggaagtcgccctgactcg
		R	gctgtggaagtcgccctgactcg
<i>ARSB</i>	5'UTR - 3'UTR	F	caagcgtcagctgagttccaagaag
		F	gcaaatttaattgccggggaagataac
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag

Junction PCR 用プライマー in PITCh replacement

Gene locus	Junction	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>GUSB</i>	5' junction	F	gcacctcccgcgcttttcttag	464
		R	cattcaccacacgatggcataggaat	

	3' junction	F	agaggaagtctgctaacatgcggtgac	946
		R	gctgtggaagtcgccctgactcg	
ARSB	5' junction	F	gcaaatttaattgccggggaagataac	686
		R	caggagttttcatccagaggaacacag	
	3' junction	F	agaggaagtctgctaacatgcggtgac	932
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

### Junction PCR 用プライマー in REMOVER-PITCh

Gene locus	Junction	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
GUSB	5' junction	F	gcacctcccgcgttttcttag	640
		R	cttgaggtgtcagtcaggtattggatg	
	3' junction	F	gttcttttgtaagaccgacctgtcc	909
		R	gccacttcatccaactctttattcc	
ARSB	5' junction	F	ggcagcccagttcctcattctatcag	465
		R	caggagttttcatccagaggaacacag	
	3' junction - 1	F	gttctgagataacctcatcagacc	1,169
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	
	3' junction - 2	F	gttcttttgtaagaccgacctgtcc	749
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

### long PCR 用プライマー

Gene locus	Junction	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
GUSB	5' long (out-in)	F	gcacctcccgcgttttcttag	2,328
		R	tcagtgacaacgtcgagcacagc	
	3' long (in-out)	F	ggccgctgtgggagtcagg	2,861
		R	gccacttcatccaactctttattcc	
ARSB	5' long (out-in)	F	ggcagcccagttcctcattctatcag	1,994
		R	tcagtgacaacgtcgagcacagc	
	5' long (out-exon3)	F	gcaaatttaattgccggggaagataac	914
		R-e3	tctgttgcaacttctcggccatc	
	5' long (out-exon4)	F	gcaaatttaattgccggggaagataac	1,145

	R-e4	tgcagtgacatttctactgcttcatcc	
5' long (out-exon5)	F	gcaaatttaattgccggggaagataac	1,421
	R-e5	gaagccatccagaggctttgtgc	
3' long (in-out)	F	ccgctaccagatccgtacaggtttacag	2,241
	R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	
3' long (exon5-out)	F-e5	cttcgaggaagaaaatggagcctgtg	1,607
	R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	
3' long (exon6-out)	F-e6	cagaattgagctgctgcataatattgacc	1,386
	R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	
3' long (exon7-out)	F-e7	atgacttcttctccagaatattcagccttaac	1,303
	R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

out-out PCR 用プライマー in PITCh-replacement

Gene locus	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp) (KI/ Chromosomally deleted allele)
<i>GUSB</i>	F	gcacctcccgcgcttttcttag	2,983 / 231
	R	cttgttctgctgctgtggaagtcg	
<i>ARSB</i>	F	caagcgtcagctgagttccaagaag	2,802 / 357
	R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

out-out PCR 用プライマー in REMOVER-PITCh

Gene locus	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp) (KI/ Chromosomally deleted allele)
<i>GUSB</i>	F	gcacctcccgcgcttttcttag	3,115 / 366
	R	gccacttcatgccaaacttttatttcc	
<i>ARSB</i>	F	ggcagcccagttcctcattctatcag	2,621 / 179
	R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

wild type allele 用プライマー

Gene locus	Region	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>GUSB</i>	5'UTR - intron1	F	gcacctcccgcgcttttcttag	1,290



		R_in	gccactttcatgccaactctttatttcc	
	intron11 - 3'UTR	F_in	gcacctccccgcgttttcttag	431
		R	gccactttcatgccaactctttatttcc	
ARSB	5'UTR - intron1	F	ggcagcccagttcctcattctatcag	695
		R_in	agcaccggcattcccataaac	
	intron7 - 3'UTR	F_in	agaagtcaagtctgagaagcatctagagacagc	513
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

### シーケンス解析

シーケンス解析は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies) に従い Seq Studio Genetic Analyzer (ABI)を用いて実施された。PCR 反応は、96 °C for 2 min → (96 °C for 10 s → 50 °C for 5 s → 60 °C for 4 min) × 25 のサイクル条件にてサーマルサイクラーを用いて行った。PCR 産物をエタノール沈殿法により精製後、Hidi-Formamide (Thermo Fisher Scientific)に溶解した。95°Cで2分間熱処理後、5分間氷上で急冷しシーケンス解析用サンプルとした。

### オフターゲット解析

COSMID 解析を用いて各 sgRNA につき7ヶ所のオフターゲット候補サイトを選定した。DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)を用いて標的置換クローンからゲノム DNA を精製し、Cel-I アッセイおよびシーケンス解析を行った。各候補サイトの PCR 増幅は、KOD One (Toyobo)または PrimeStar GXL (Takara)を用いて行った。それぞれのオフターゲット候補サイトへの変異導入は GeneArt Genomic Cleavage Detection kit (Life Technologies)を用いて確認した。Cel-I アッセイおよびシーケンス解析に使用したプライマーは表3に記載する。

表3. オフターゲット解析に使用したプライマー

Cel-I アッセイ用プライマー-

Gene	Locus	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>GUSB</i>	#1	F	ggttttgaagacttggttaggaataaaagattagcc	408
		R	tgtcagtgggtgtgcaatacaaatataacataagtc	
	#2	F	gagaagtgggagaatgagaggaaaagagaacatc	442
		R	tgccattaccatctttgagccctccag	
	#3	F	ctccatataatacacacacatgctcaccacacac	490
		R	attcaatcccatggcagcaaaatgct	
	#4	F	tctacctctctgtccttctgtgctctcc	473
		R	cacatcccctgaggtcttcaactcacc	
	#5	F	ctagtttagccaagaacagatcgacagaagc	419
		R	aaaggggaattcaggtacacagacacacacag	
	#6	F	ggcagccctagcttccaactgc	394
		R	gatgtattgggtctggttgggtgaaag	
	#7	F	cctgattcaactttacattccttccaccattatc	411
		R	ttattggccagaggaaatagcttctctaccctctac	

シーケンス解析用プライマー

Gene	Locus	Sequence (5' to 3')
<i>GUSB</i>	#1	ccaaacattaactaaagtgtacagaccttg
	#2	tgtgagctctgtgagggtagg
	#3	gtttaggagcaatgtggtgc
	#4	gcttgtcacacgtcctcaaac
	#5	ccatgcagaacctaaagacgatg
	#6	ctcaaactcgcgtctttgtctg
	#7	gattaatccacgctagcattcc

☒

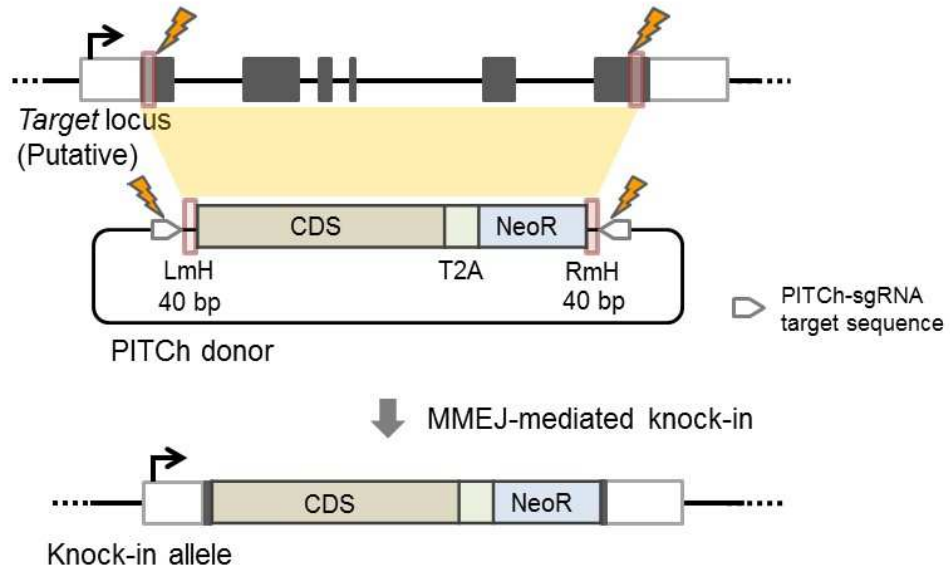


図 1-1 PITCh-replacement による遺伝子置換の概略図

PITCh システムを用いた標的遺伝子と目的カセットの置換方法を示す。CDS; coding sequence、T2A; 自己切断配列、*NeoR*; ネオマイシン耐性遺伝子、LmH; left microhomologous sequences、RmH; right microhomologous sequences。

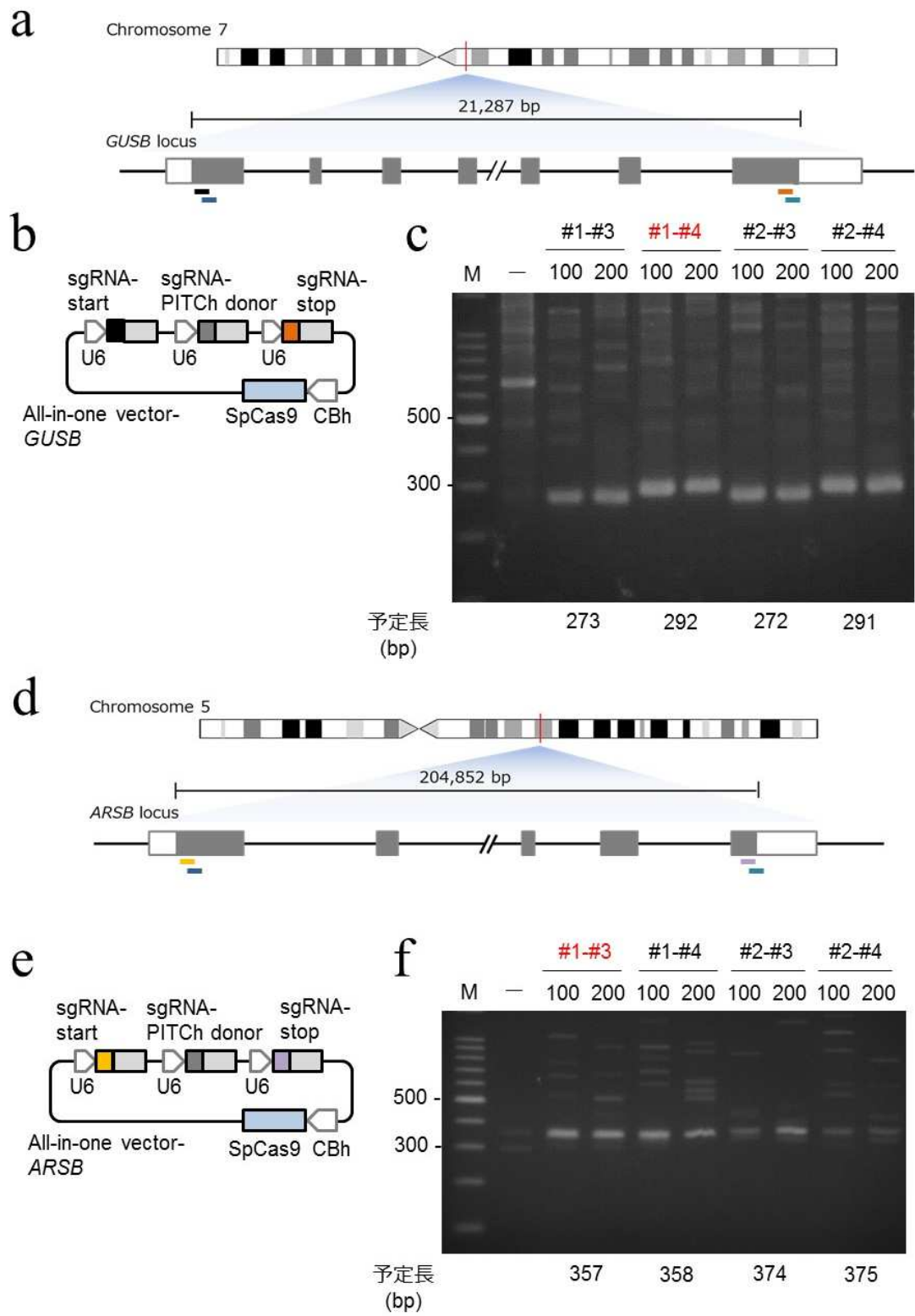


図 1-2 sgRNAs の設計と切断活性評価

*GUSB* 遺伝子座 (**a**)、*ARSB* 遺伝子座 (**d**) の模式図と sgRNAs の設計部位。*GUSB* 遺伝子座 (**b**)、*ARSB* 遺伝子座 (**e**) を標的とした SpCas9 および sgRNA 発現オールインワンベクター。**c, f** ゲノム PCR による切断活性評価。M; 100 bp ladder。泳動写真上部には使用した sgRNA (#) とプラスミド濃度 (ng) を示す。

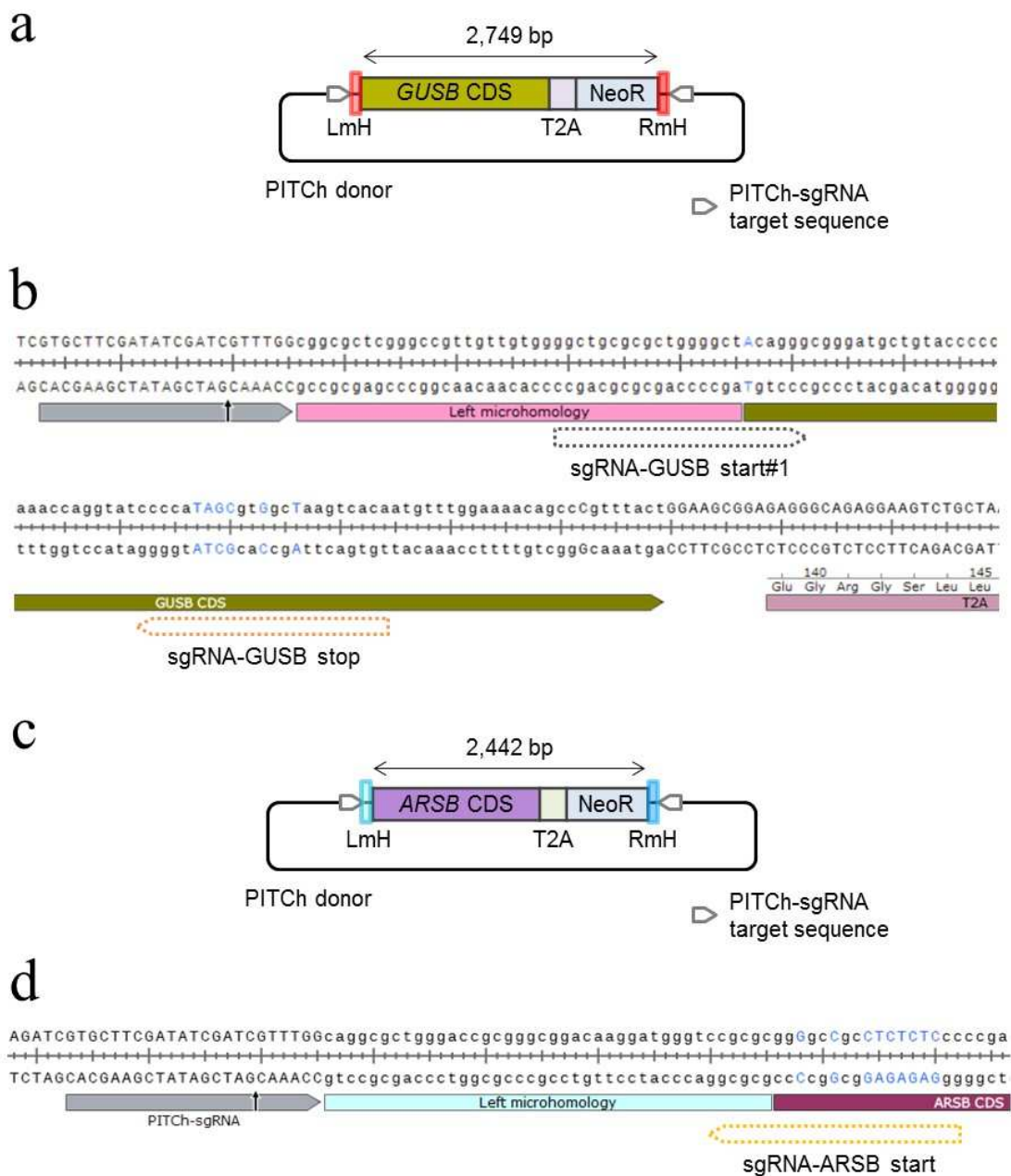


図 1-3 PITCh ドナーベクターの構築

**a** *GUSB* 遺伝子座に対するドナーベクター。CDS; coding sequence、T2A; 自己切断配列、*NeoR*; ネオマイシン耐性遺伝子、LmH; left microhomologous sequences、RmH; right microhomologous sequences。 **b** *GUSB* CDS 上の sgRNA 認識配列に導入

したサイレント変異(青字)。 **c** *ARSB* 遺伝子座に対するドナーベクター。 **d** *ARSB* CDS 上の sgRNA 認識配列に導入したサイレント変異(青字)。

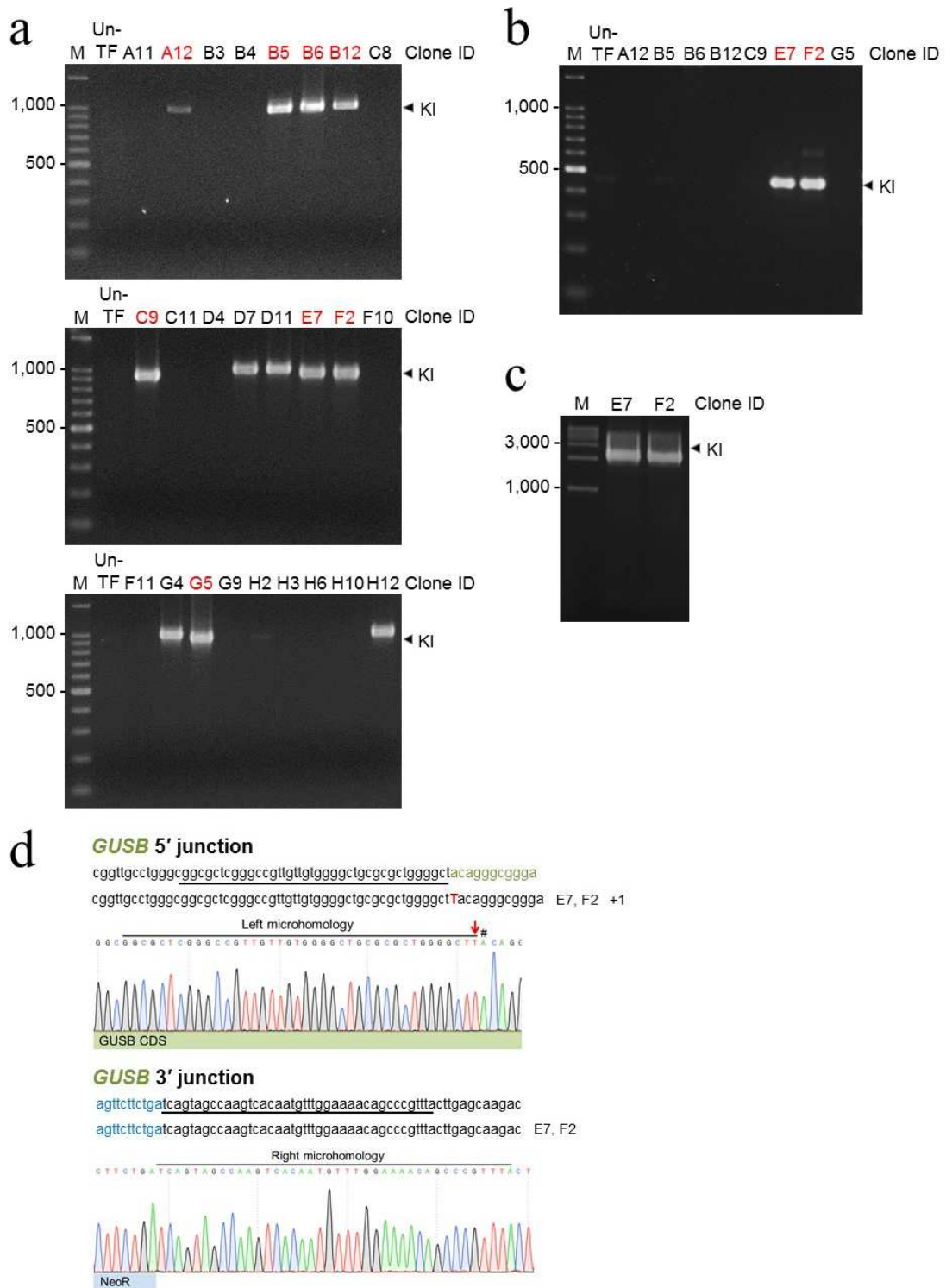
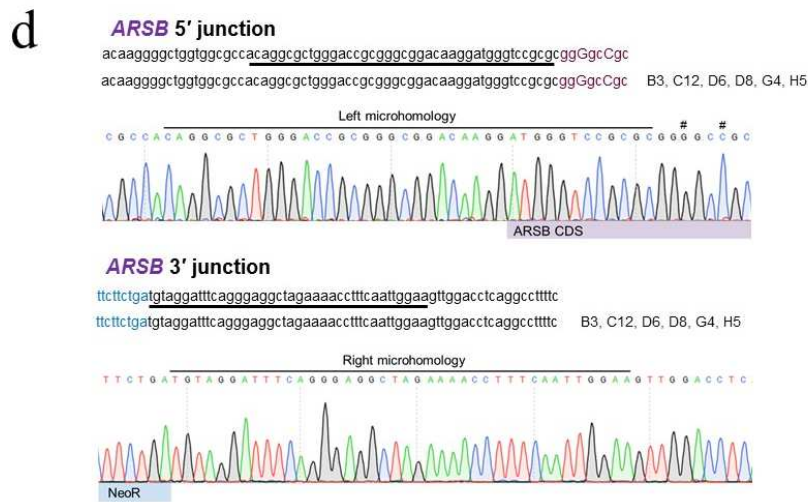
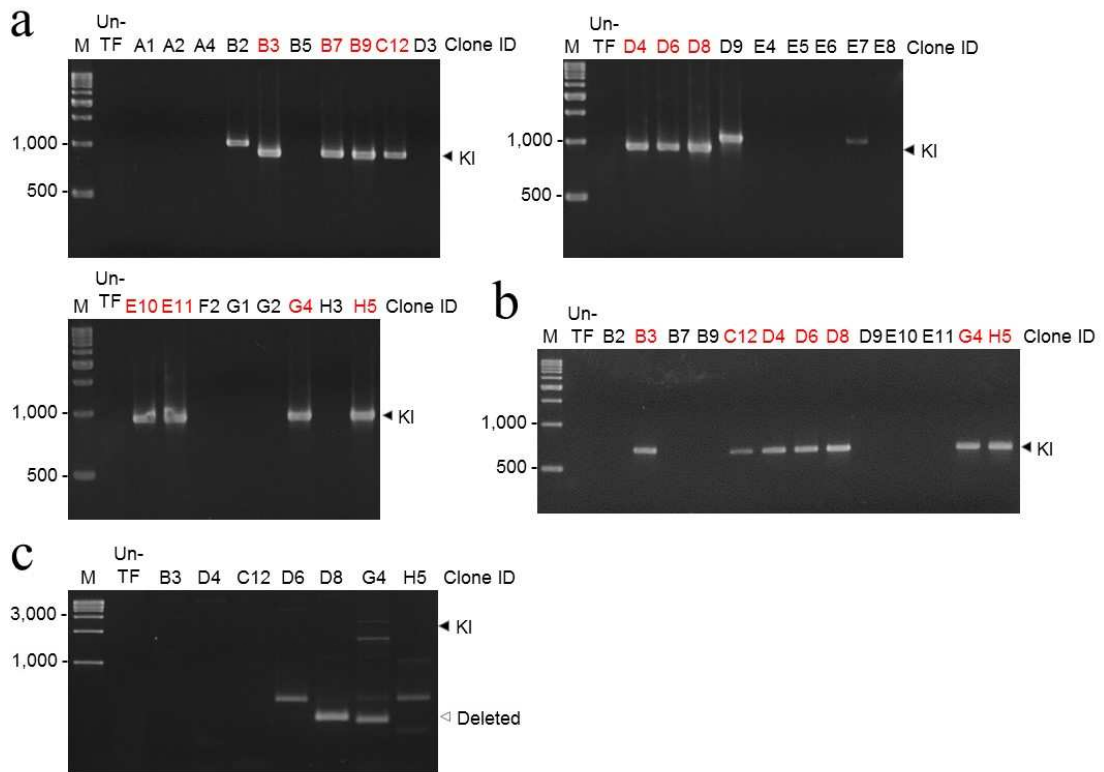


図 1-4 *GUSB* 遺伝子座を標的とした PITCh replacement の検証



単離クローンの junction PCR による 3' 連結部 (a)、5' 連結部 (b)、out-out PCR (c) によるノックインの確認。Un-TF; untransfected cells、KI; amplicon size from knock-in allele。M; 100 or 1000 bp ladder。d クローン E7 および F2 における連結部の増幅産物のシーケンス解析。上段; knock-in allele、下段; クローン。下線; 相同配列、緑字; *GUSB* CDS 配列、青字; *NeoR* 配列、赤文字および赤矢印; 挿入変異、#; サイレント変異。



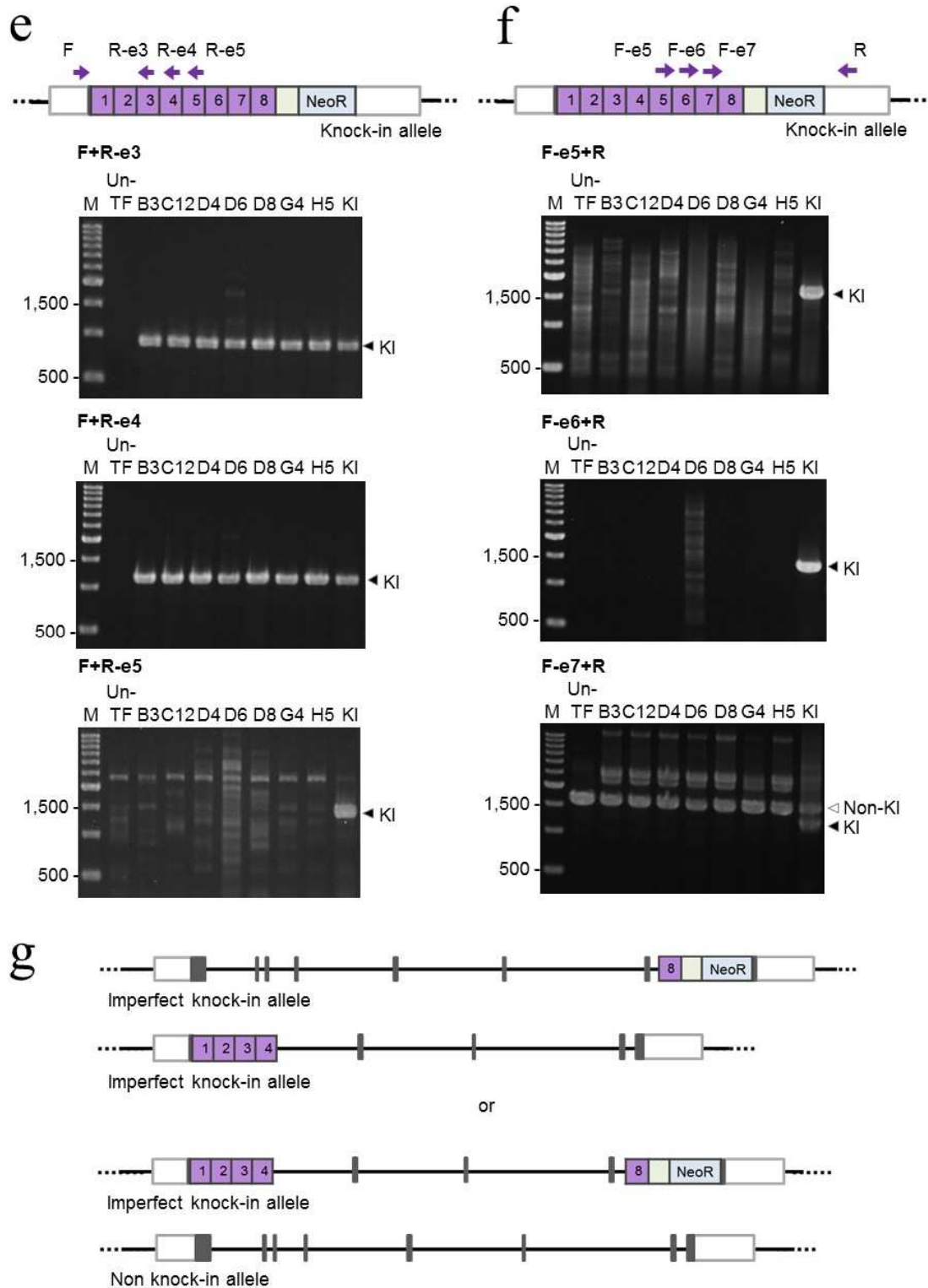


図 1-5 *ARSB* 遺伝子座を標的とした PITCH replacement の検証

単離クローンにおける 3'連結部 (**a**)、5'連結部 (**b**) の junction PCR、out-out PCR (**c**) によるノックインの確認。Un-TF; untransfected cells、KI; amplicon size in knock-in allele、Deleted; amplicon size in chromosomally deleted allele。M; 500 or 1000 bp ladder。

**d** 相同配列の増幅産物のシーケンス解析。上段; knock-in allele、下段; クローン、下線; 相同配列、紫字; *ARSB* CDS 配列、青字; *NeoR* 配列、#; サイレント変異。エクソン上に設計したプライマーを用いた PCR 増幅 (**e**, **f**)。泳動写真上部の KI は薬剤選抜後の細胞集団を示す。Non-KI; amplicon size in non-knock-in allele。 **g** 単離したクローンにおいて推測された 2 パターンのアレル型。

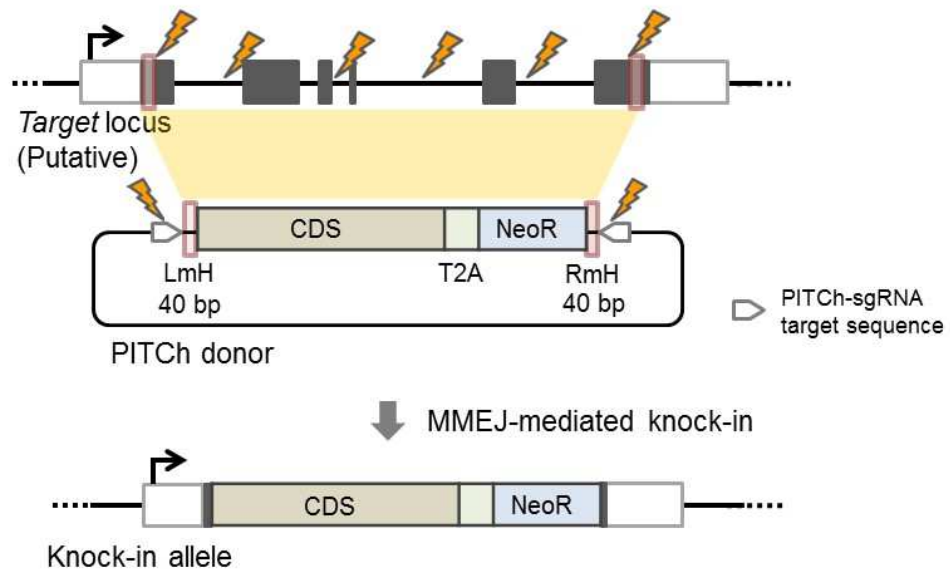
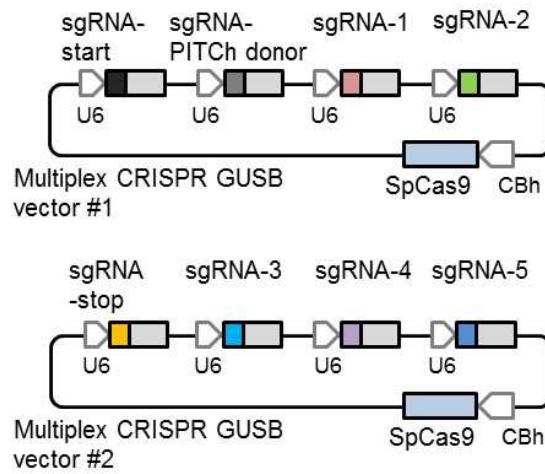


図 1-6 REMOVER-PITCh による遺伝子置換法

REMOVER-PITCh による遺伝子置換の概略図。CDS; coding sequence、T2A; 自己切断配列、*NeoR*; ネオマイシン耐性遺伝子、LmH; left microhomologous sequences、RmH; right microhomologous sequences。

a



b

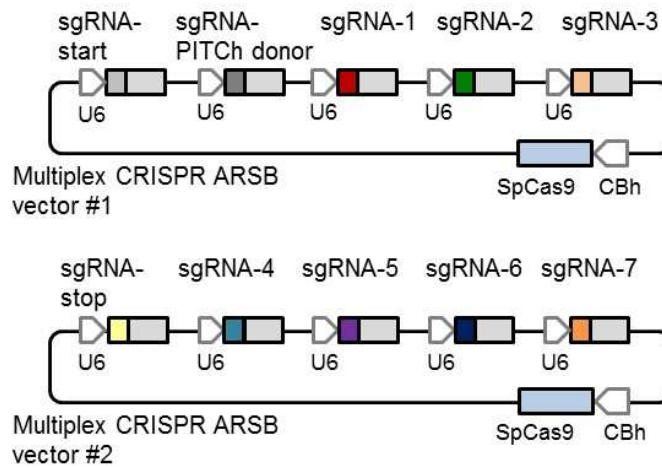
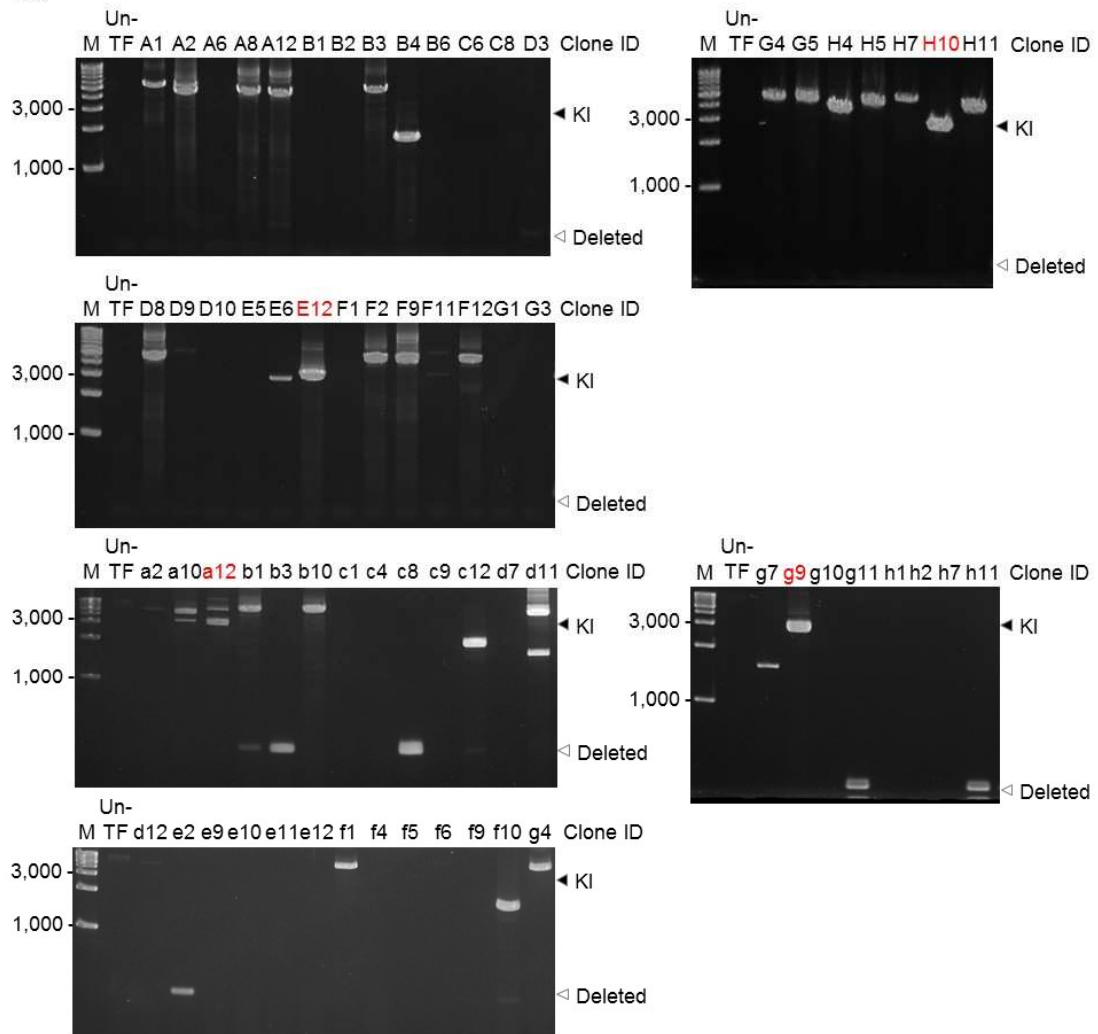


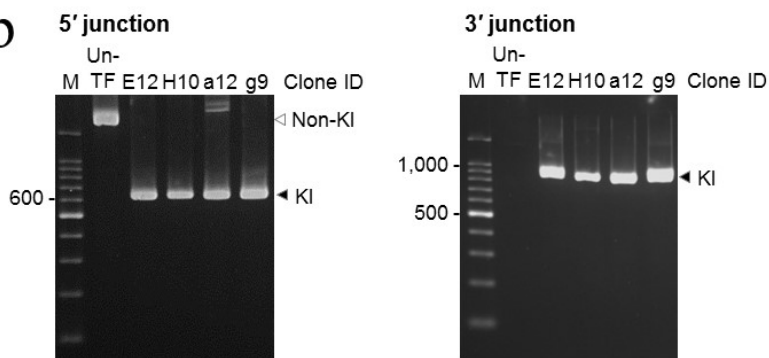
図 1-7 Multiplex CRISPR ベクターの構築

*GUSB* 遺伝子座(a)、*ARSB* 遺伝子座を(b)標的とした multiplex CRISPR ベクター。U6; ヒト U6 プロモーター、CBh; chicken beta-actin hybrid プロモーター。

**a**



**b**



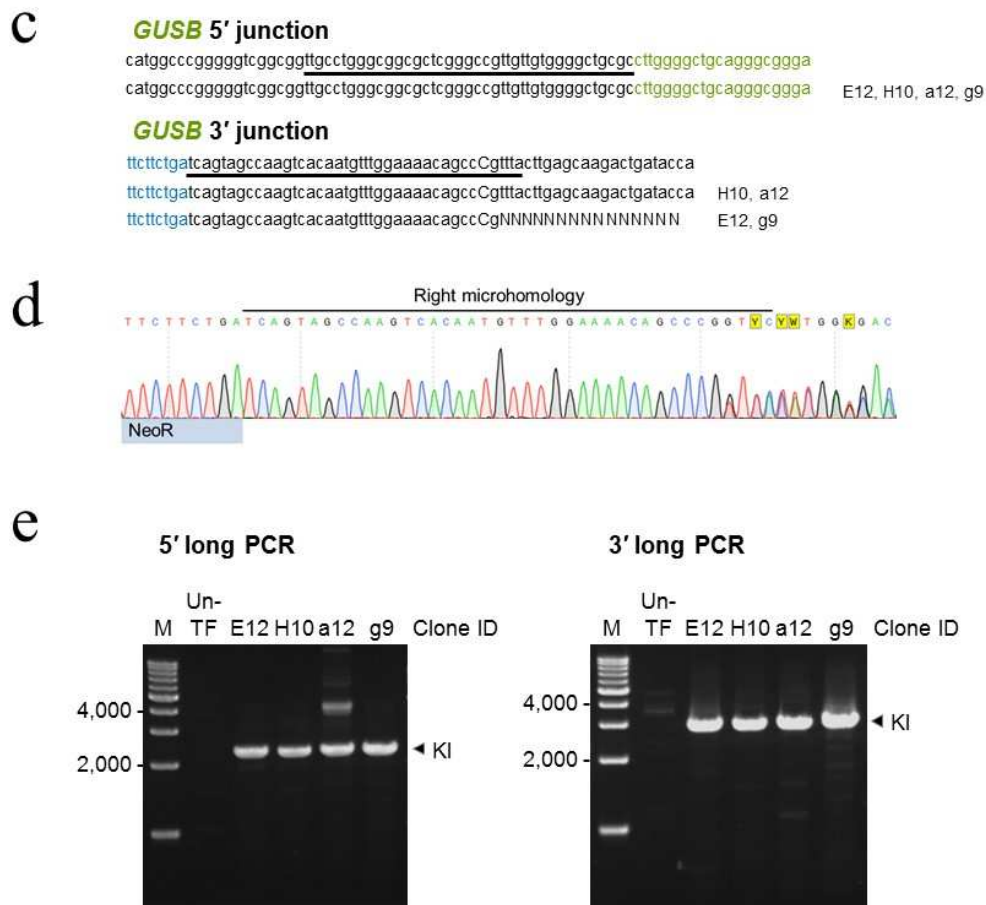


図 1-8 *GUSB* 遺伝子座を標的とした REMOVER-PITCh の有用性検証

単離クローンにおける out-out PCR (a) および junction PCR (b) によるノックインの確認。Un-TF; untransfected cells、KI; amplicon size in knock-in allele、Non-KI; amplicon size in non-knock-in allele。M; 100 or 1000 bp ladder。c 相同配列領域の増幅産物のシーケンス解析。上段; knock-in allele、下段; クローン。下線; 相同配列、緑字; *GUSB* CDS 配列、青字; *NeoR* 配列、N; 波形の重複。d E12 および g9 クローンの波形データ。e long PCR による単一カセット置換の確認。



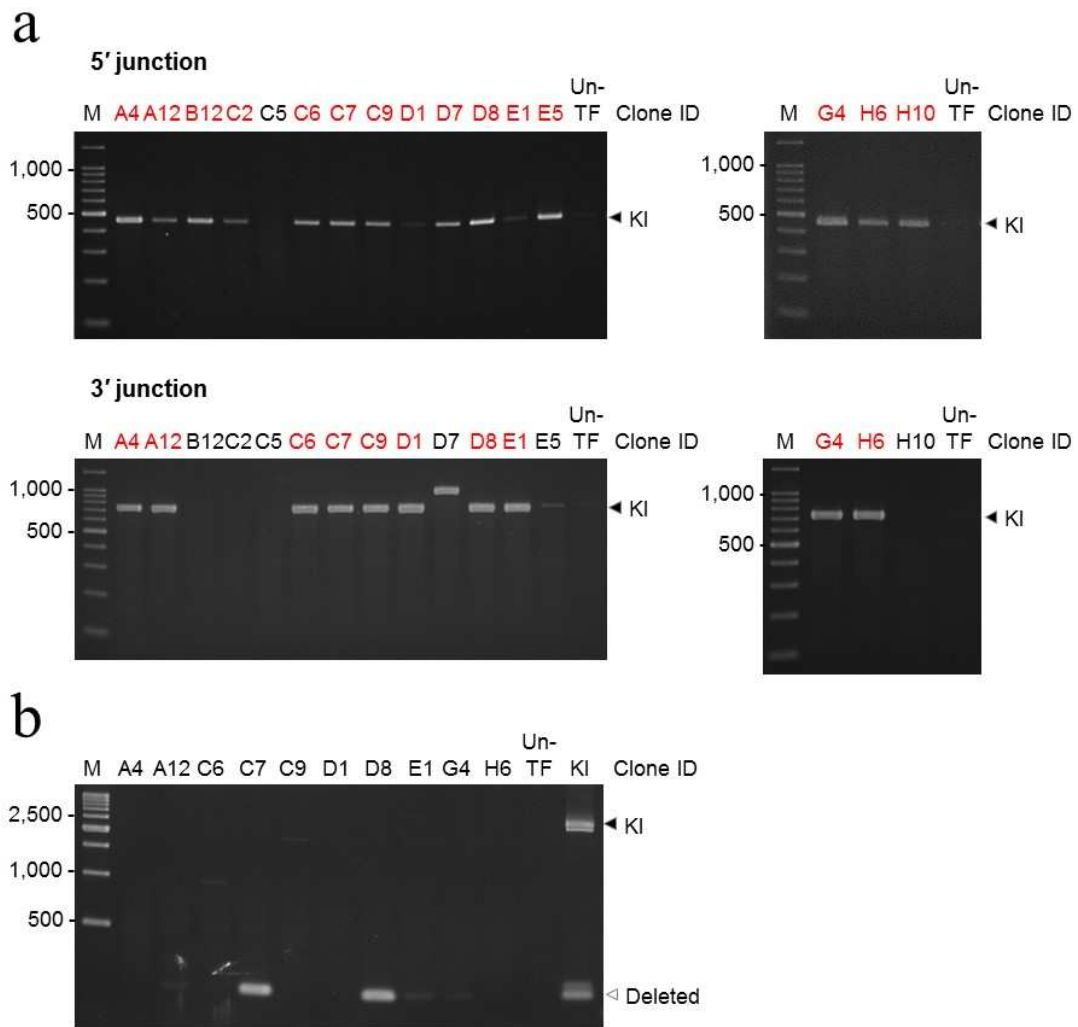


図 1-9 *ARSB* 遺伝子座を標的とした **REMOVER-PITCh** の有用性検証

単離クローンにおける junction PCR (a)、out-out PCR (b) によるノックインの確認。泳動写真上部の KI は薬剤選抜後の細胞集団を示す。Un-TF; untransfected cells、KI; amplicon size in knock-in allele、Deleted; amplicon size in chromosomally deleted allele。

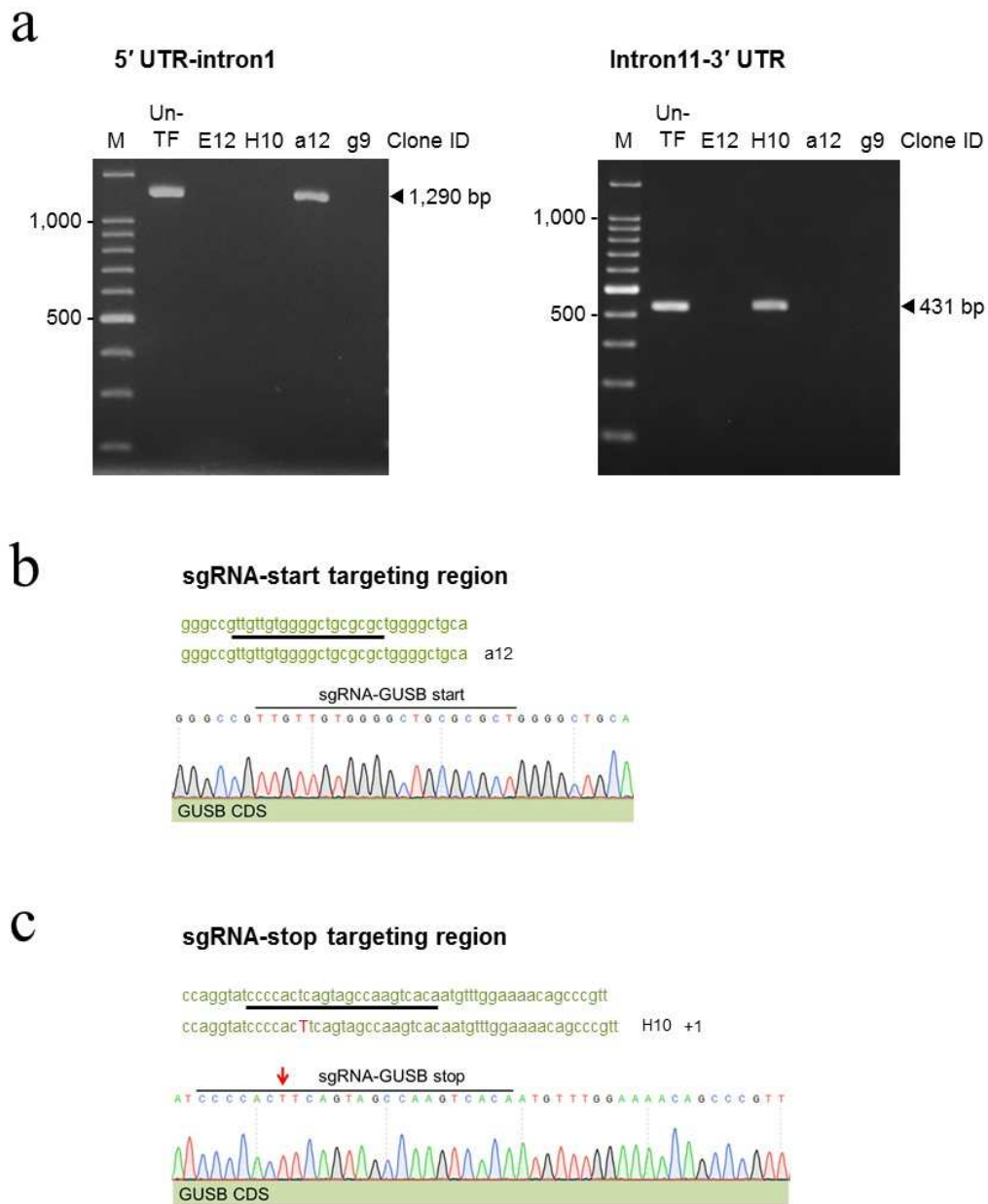
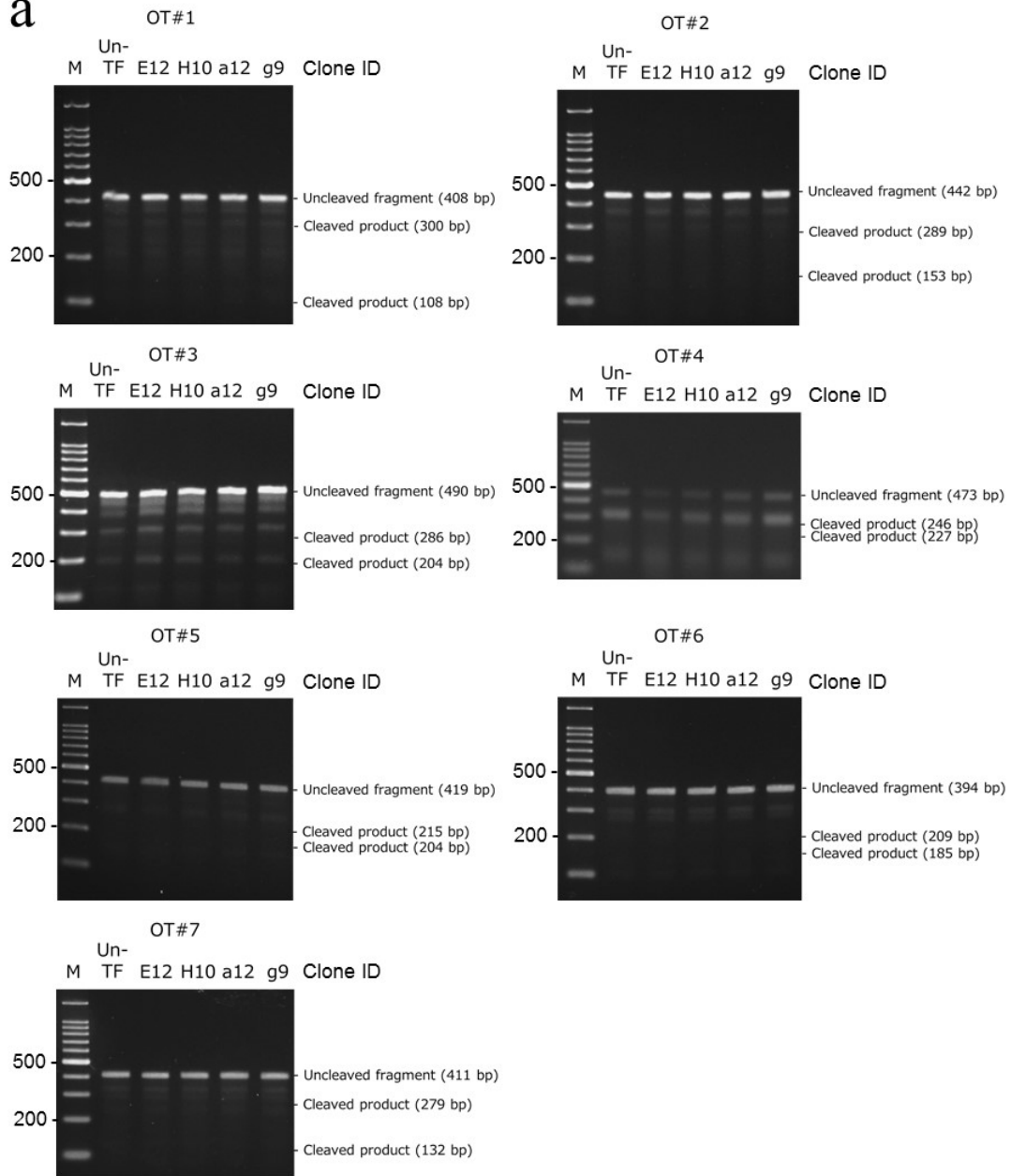


図 1-10 非ノックインアレルの PCR 増幅による遺伝子型の確認

**a**, 非ノックインアレルのゲノム PCR 解析。Un-TF; untransfected cells、M; 100 bp ladder。a12 クローン (**c**)、H10 クローン (**d**) の増幅産物のシーケンス解析および波形データ。上段; 野生型アレル、下段; クローン、緑字; *GUSB* CDS 配列、赤大文字および赤矢印; 挿入変異。

**a**





**図 1-11 *GUSB* 遺伝子座のノックインクローンにおけるオフターゲット解析**

*GUSB* 遺伝子座のノックインクローンにおけるオフターゲット変異の有無を Cel-I アッセイ (a) およびシーケンス解析 (b) により確認した。COSMID 解析でヒットした上位 7 ヶ所の候補部位 (OT#1~7) を検証した。Un-TF; untransfected cells, M; 100 bp ladder。

## 引用文献

Aida, T. et al. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17, 979 (2016).

Allen, F. et al. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat. Biotechnol.* 10, 1038 (2018).

Cradick, TJ. et al. COSMID: A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 3, e214 (2014).

Danner, E. et al. A homology independent sequence replacement strategy in human cells using a CRISPR nuclease. *Open Biol.* 11, 200283 (2021).

Hisano, Y. et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci. Rep.* 5, 8841 (2015).

Katayama, S. et al. In vivo and in vitro knockout system labelled using fluorescent protein via microhomology-mediated end joining. *Life Sci. Alliance* 3 (2019).

Kim, D. et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods* 12, 237-243 (2015).

Leidy-Davis, T. et al. Viable Mice with Extensive Gene Humanization (25-kbp) Created Using Embryonic Stem Cell/Blastocyst and CRISPR/Zygote Injection Approaches. *Sci. Rep.* 8, 15028 (2018).

Linker, A. et al. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. *J. Biol. Chem.* 213, 237-248 (1955).

Michael, K. et al. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* 36, 765-771 (2018).

Nakade, S. et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat. Commun.* 5, 5560 (2014).

Nakagawa, Y. et al. Culture time of vitrified/warmed zygotes before microinjection affects the production efficiency of CRISPR-Cas9-mediated knock-in mice. *Biol. Open.* 6, 706-713 (2017).

Nakamae, K. et al. Establishment of expanded and streamlined pipeline of PITCh knock-in - a web-based design tool for MMEJ-mediated gene knock-in, PITCh designer, and the variations of PITCh, PITCh-TG and PITCh-KIKO. *Bioengineered* 8, 302-308 (2017).

Sakuma, T. et al. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci. Rep.* 4, 5400 (2014).

Sakuma, T. et al. Homologous Recombination-Independent Large Gene Cassette Knock-in in CHO Cells Using TALEN and MMEJ-Directed Donor Plasmids. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23849-23866 (2015).

Sakuma, T. et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat. Protoc.* 11, 118-133 (2016).

Shou, J. et al. Precise and Predictable CRISPR Chromosomal Rearrangements Reveal Principles of Cas9-Mediated Nucleotide Insertion. *Mol. Cell* 71, 498-509. (2018)

Suzuki, K. et al. Precise in vivo genome editing via single homology arm donor mediated intron-targeting gene integration for genetic disease correction. *Cell Res.* 29, 804-819. (2019).

Tomanin, R. et al. Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI) and molecular analysis: Review and classification of published variants in the *ARSB* gene. *Hum. Mutat.* 39, 1788-1802 (2018).

Tomatsu, S. et al. Mutations and Polymorphisms in GUSB Gene in Mucopolysaccharidosis VII (Sly Syndrome). *Hum. Mutat.* 30, 511-519 (2009).

Valayannopoulos, V. et al. S. Mucopolysaccharidosis VI. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 5 (2010).

Wienert, B. et al. Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq. *Science* 364, 286-289 (2019).

Yoshimi, K. et al. Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats. *Hum. Genet.* 140, 277-287 (2021).

Zhang, L. et al. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 10, e0120396 (2015).

Zheng, Q. et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques* 57, 115-124 (2014).



## 第 2 章

### LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh による置換効率の向上

#### 要約

PITCh システムは、MMEJ を利用した簡便かつ高効率なノックイン手法である。MMEJ 修復は、HR とは異なり S/G2 期以外の全ての細胞周期で生じるためノックイン効率が高い。遺伝子置換法は、多くが HR 修復を利用しており、MMEJ 修復を利用した技術は少ない。第 1 章では、PITCh システムを利用した遺伝子置換法として REMOVER-PITCh の有用性を示した。しかしながら、標的遺伝子領域が大きい場合、置換効率が低く不正確なノックインの割合が高くなるため、標的遺伝子の長さに依存しない柔軟な手法にするためには置換効率の改善が必要であると考えられる。Local accumulation of DSB repair molecules (LoAD) システムは、DSBs 周辺に修復因子を集積させることで修復効率を高めるシステムである。本研究では、このシステムを REMOVER-PITCh に適用し、置換効率の向上を試みた。その結果、LoAD システムにより MMEJ 効率を改善することで、約 200 kb の大規模領域においても、標的置換クローンの樹立に成功した。

#### 緒言

第 1 章では、大規模遺伝子領域における遺伝子置換技術として REMOVER-PITCh システムの有用性を検証した。*GUSB* 遺伝子座の約 20 kb を標的とした目的のカセット置換を達成したが、一方で、*ARSB* 遺伝子座の約 200 kb では置換効率が低くクローンが樹立できなかった。REMOVED-PITCh システムは、標的遺伝子領域の多重切断およびドナーベクターからのカセットの切り出しが同時に生じた後に、露出した末端部分の相同配列を介して MMEJ 修復が生じる。細胞はゲノム DNA に DSBs が導入されると即座に修復機構が誘導されるため、標的遺伝子領域が大きい場合、標的遺伝子-カセット間での MMEJ 修復より修復速度

が速い NHEJ 修復が優先的に生じると考えられる。

これまでにゲノム編集によるノックイン効率を向上するために様々な方法が開発されている。例えば、高特異性 Cas9 や改変型 sgRNA などのゲノム編集ツールに着目した方法 (Fu et al. 2014 ; Schmid-Burgk et al. 2020) や、エンハンサーや阻害剤を用いて化学的因子により修復経路の効率にアプローチする方法が報告されている (Aida et al. 2016 ; Schimmel et al. 2023 ; Yeh et al. 2019)。Local accumulation of DSB repair molecules (LoAD) システムは、sgRNA のステムループに付与した MS2 配列と MS2 コートタンパク質 (MCP) を融合した修復関連因子を利用して DSBs 周辺に修復因子を集積させるシステムである (Anand et al. 2016 ; Nakade et al. 2018 ; Sfeir et al. 2015)。実際に、LoAD システムを用いて MMEJ エンハンサーである CtIP を切断部位に集積させることによって PITCh ノックイン効率が向上することが複数の細胞株および遺伝子座で実証されている。そこで第 2 章では、LoAD システムを REMOVER-PITCh に適用し、PITCh ノックイン効率を上げることで大規模遺伝子領域において REMOVER-PITCh による遺伝子置換ができるかどうか検証した。

## 結果

### LoAD システム用ベクターの構築

LoAD システムは、MS2-MCP 相互作用を利用して sgRNA のステムループに付与した MS2 配列に MCP 融合修復因子を集積することで修復効率を向上するシステムであり、MMEJ 修復関連因子 CtIP の LoADing により PITCh ノックイン効率が向上することが報告されている (Nakade et al. 2018)。このシステムを REMOVER-PITCh に利用するために、まず SpCas9 および sgRNA (MS2) を発現する multiplex CRISPR vector、MMEJ 修復関連因子である CtIP-MCP 発現ベクターを構築した。*GUSB* 遺伝子座、*ARSB* 遺伝子座ともに標的部位の切断には第 1 章で設計した sgRNA を使用し、カセット連結部の MMEJ 修復効率の向上のため、40 bp の相同配列が露出する部位の sgRNA に MS2 配列を付与した (図 2-1 a, b, 2-

2 a, b)。

### ***GUSB* 遺伝子座を標的とした標的カセット置換クローンの作製**

初めに、REMOVER-PITCh システムにてカセット置換が認められた *GUSB* 遺伝子座に対して LoAD システムの効果を検証した。2つの multiplex CRISPR ベクターと PITCh ドナー、MCP-CtIP ベクターを HCT116 細胞株に共導入し、3日間培養後 G418 による薬剤選抜およびシングルセルクローニングにより 28 クローンを単離した。これらのクローンにおいて Out-out PCR によりカセット置換を確認した結果、28 クローンのうち 2 クローンにおいて増幅が認められた (図 2-3 a)。さらに、5'および 3'連結部の junction PCR およびシーケンス解析の結果、カセット連結部は MMEJ により正確に置換されていることが示された (図 2-3 b, c)。加えて、long PCR によって遺伝子断片の挿入なく標的領域とカセットが置換されている可能性が高いことが示された (図 2-3 d)。これらの結果から、少なくとも一つのアレルにカセット置換を有するクローン (F2, G4) の樹立に成功し、LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh により 7.1%の置換効率でカセット置換が可能であることが示された。

### ***ARSB* 遺伝子座を標的とした標的カセット置換クローンの作製**

次に、REMOVER-PITCh システムではカセット置換が認められなかった *ARSB* 遺伝子座に対して LoAD システムを用いた標的遺伝子置換を実施した。*GUSB* 遺伝子座と同様に、構築した 2つの CRISPR Multiplex ベクターおよび PITCh ドナー、MCP-CtIP ベクターを共導入した HCT116 細胞株を薬剤選抜後、シングルセルクローニングによりクローンを単離した。Out-out PCR の結果、単離した 35 クローン中 3 クローンでカセット全長と予想されるバンドが検出された (図 2-4 a)。さらに、カセット連結部の PCR 増幅およびシーケンス解析の結果から、全てのクローンにおいて標的カセット置換が MMEJ 修復により正しく生じていることが認められた (図 2-4 b, c)。また、long PCR により切断断片やカセット断片の挿入がなく、目的カセットのみが置換されている可能性が高いことが示された (図

2-4 d)。結果として、*ARSB* 遺伝子座に CtIP を集積することにより、8.6%の置換効率にて少なくとも片アレルに目的カセットを有するクローン (E3, F12, H9) の樹立に成功した。

### 標的置換クロンの遺伝子型解析とオフターゲット解析

第 1 章と同様に、LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh により樹立したカセット置換クロンがホモ接合型かヘテロ接合型かどうかを非ノックインアレル領域の PCR 増幅により検証した。*GUSB* 遺伝子座を標的としたカセット置換クロンでは、F2 クロンの 5'側 CDS 領域の増幅を示し、シーケンス解析の結果、sgRNA 切断部位への 1 塩基挿入変異が認められた (図 2-5 a, b)。これらの結果から、クローン G4 は両アレルへのカセット置換によるホモ型、クローン F2 はカセット置換と KO アレルを有するヘテロ型である可能性が示された。*ARSB* 遺伝子座を標的としたカセット置換クロンでは、獲得した 3 クローン (E3, F12, H9) 全てにおいて 5'側、3'側 CDS 領域の増幅が認められた (図 2-5 c)。5'側については、E3 と F12 クロンの sgRNA 切断部位への 1 塩基挿入変異が、H9 クロンの 2 塩基欠失が認められた。3'側は、3 クローンともに sgRNA 切断部位の下流に T2A-*NeoR*-right microhomology のカセット断片の挿入が認められた (図 2-5 d)。これらの結果から、全てのクローンがカセット置換と不完全なノックインアレルを有するヘテロ型であることが示された。

続いて、カセット置換クロンにおけるオフターゲット解析を実施した。第 1 章と同様に、COSMID を用いてオフターゲット候補サイトの上位 7 ヶ所を選定し、変異導入の有無を Cel-I アッセイおよびシーケンス解析により確認した。結果、*GUSB* 遺伝子座 2 クローン、*ARSB* 遺伝子座 3 クローン全てにおいて変異は検出されなかった (図 2-6 a, b, 図 2-7 a, b)。

## 結論

第 2 章では、REMOVER-PITCh による標的遺伝子置換効率の向上のために LoAD システムの併用を試みた。結果として、MMEJ 修復関連因子 CtIP を DSB

近傍に集積することで、*GUSB* 遺伝子座において REMOVER-PITCh による置換効率のわずかな向上が認められた。REMOVER-PITCh ではノックインが認められなかった *ARSB* 遺伝子座の約 200 kb の標的領域では、LoAD システムを併用することでノックインクローンを樹立することに成功した。これは、CtIP を集積させることで相同配列を介した修復の際に必要な DNA 末端の削り込みが促進され、NHEJ による修復を抑制かつ MMEJ 修復精度を向上することができたためであると考えられる。しかしながら、大規模領域において両アレルに正確に遺伝子置換を行うためにはさらなる効率の向上が必要である。今回、非ノックインアレルの PCR 増幅によりほとんどのクローンが片アレルのノックインであることが示された。特に *ARSB* 遺伝子座のノックインクローンでは、5'連結部への indel、3'連結部へのカセット断片の挿入が認められ、NHEJ や HR による複雑な修復が生じている可能性が示唆された。修復機構に焦点を当てた効率向上の方法としては、NHEJ 阻害剤や Cas9 に CtIP を融合した Cas9-HE が報告されており (Charpentier et al. 2018; Denes et al. 2021)、これらを利用することでさらなる効率化が期待できる。一方で、阻害剤やシステムの併用といった付加的要因の検証だけでなく、システム自体の最適化も必要である。

本研究では、REMOVER-PITCh システムのモデル実験として WT Cas9 や遺伝子長に応じた特定の数の sgRNA を用いて標的遺伝子置換の可能性を検証した。今後は、このシステムを最適化することでより効率的な技術にすることができると考えている。例えば、高特異性・高活性 Cas9 や truncated gRNA を使用することでカセット置換効率をさらに向上することができ、かつ、オフターゲット切断のリスクを低減することができると考えられる (Fu et al. 2014; Schmid-Burgk et al. 2020)。また、MMEJ 修復に利用した相同配列の長さや sgRNA による切断数と置換効率の関係など明らかにすることも効率の向上に役立つと考えられる。

最後に、本研究では、LoAD システムを併用することでヒト培養細胞において REMOVER-PITCh による大規模領域の遺伝子置換に成功し、MMEJ による遺伝子置換を約 200 kb の領域まで拡大することができた。培養細胞の機能遺伝子において MMEJ による 200 kb の遺伝子置換を実証した報告はなく、遺伝子工学の

進展に役立つと考えられる。

## 材料&方法

### 細胞培養

HCT116 細胞株は、10 % fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)、1% penicillin-streptomycin (Wako)、1% MEM non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-high glucose を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> incubator の中で行った。使用した細胞株は e-Myco Mycoplasma PCR Detection Kit (iNtRON Biotechnology)と short tandem repeat analysis (Takara)を用いてマイコプラズマが陰性であることを確認した。

### プラスミド構築

Cas9ヌクレアーゼおよび複数の sgRNAs(MS2)を発現する Multiplex CRISPR ベクターは、Multiplex CRISPR/Cas9 Assembly System Kit (#1000000055, Addgene)を用いて構築した (Sakuma et al. 2014)。sgRNA scaffold への MS2 配列の付与のために、sgRNA(MS2) cloning backbone ベクター (Plasmid #61424, Addgene)の sgRNA 発現カセットを置換した px330A または px330S を用いた。sgRNA 用のオリゴヌクレオチドは、第 1 章の表 1 に記載している。CtIP エフェクターベクターおよび MCP 融合 CtIP ベクターは、以前構築された方法にて作製した (Nakade et al. 2018)。PITCh ドナーは第 1 章で作製したベクターを使用した。

### ノックイン細胞の作製

24 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  cells の HCT116 細胞株を播種した。24 時間培養後、*GUSB* もしくは *ARSB* 遺伝子座を標的とする Multiplex CRISPR (MS2)ベクターおよび PITCh ドナー、MCP-CtIP ベクターを lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific)を用いてトランスフェクションし、その翌日、6 ウェルプレートへ移した。トランスフェクション 3 日後、G418 (800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )含有培地に交換し薬剤選抜を開始した。G418 含有培地は毎日交換し、約 10 日間の選抜後、限界希釈法によ

るシングルセルクローニングを行った。選抜後の細胞集団を 6 cells/mL に調整し、200  $\mu$ L ずつ各ウェルに添加した (1.2 cells/well)。添加した細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> incubator 内で培養し単一クローンを取得した。両アレルへのカセット置換はゲノム PCR およびシーケンス解析により判別した。

### ゲノム PCR

DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)を用いて選抜後細胞集団、クローンからゲノム DNA を精製した。ゲノム PCR は KOD Fx Neo (TOYOBO)を用いて行った。各配列を増幅するプライマーは表 4 に記載する。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離、EtBr 染色後増幅バンドを UV トランスイルミネーターにて確認した。

表 4. ゲノム PCR に使用したプライマー

#### Junction PCR 用プライマー

Gene locus	Junction	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>GUSB</i>	5' junction	F	gcacctcccgcgcttttcttag	640
		R	cttgagagtgtcagtcaggtattggatg	
	3' junction	F	gttcttttgtcaagaccgacctgtcc	909
		R	gccacttcatgccaactctttatttcc	
<i>ARSB</i>	5' junction	F	ggcagcccagttctctattctatcag	465
		R	caggagttttcatccagaggaacacag	
	3' junction-1	F	gtttctgagataccctcatcagacc	1,169
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

#### long PCR 用プライマー

Gene locus	Junction	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>GUSB</i>	5' long (out-in)	F	gcacctcccgcgcttttcttag	2,328
		R	tcagtgacaacgtcgagcacagc	

	3' long (in-out)	F	ggccgctgtgggagtcagg	2,861
		R	gccacttcatgccaactctttattcc	
ARSB	5' long (out-in)	F	ggcagcccagttcctcattctatcag	1,994
		R	tcagtgacaacgtcgagcacagc	
	3' long (in-out)	F	ccgctaccagatccgtacaggttacag	2,241
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

#### out-out PCR 用プライマー

Gene locus	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp) (KI/Chromosomally deleted allele)
GUSB	F	gcacctcccgcgcttttcttag	3,115/366
	R	gccacttcatgccaactctttattcc	
ARSB	F	ggcagcccagttcctcattctatcag	2,621/179
	R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

#### wild type allele 用プライマー

Gene locus	Region	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
GUSB	5'UTR - intron1	F	gcacctcccgcgcttttcttag	1,290
		R_in	gccacttcatgccaactctttattcc	
	intron11 - 3'UTR	F_in	gcacctcccgcgcttttcttag	431
		R	gccacttcatgccaactctttattcc	
ARSB	5'UTR - intron1	F	ggcagcccagttcctcattctatcag	695
		R_in	agcaccggcattccataaac	
	intron7 - 3'UTR	F_in	agaagtcaagtctgagaagcatctagagacagc	513
		R	tgggataacaaatgagacaagagtcgtgag	

#### シーケンス解析

シーケンス解析は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies) に従い Seq Studio Genetic Analyzer (ABI)を用いて実施した。PCR 反応は、96 °C



for 2 min → (96 °C for 10 s → 50 °C for 5 s → 60 °C for 4 min) × 25 のサイクル条件にてサーマルサイクラーを用いて行った。PCR 産物をエタノール沈殿法により精製後、Hidi-Formamide (Thermo Fisher Scientific)に溶解した。95°Cで2分間熱処理後、5分間氷上で急冷しシーケンス解析用サンプルとした。

### オフターゲット解析

COSMID 解析を用いて各 sgRNA につき 7ヶ所のオフターゲット候補サイトを選定した。DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)を用いて標的置換クローンからゲノム DNA を精製し、Cel-I アッセイおよびシーケンス解析を行った。各候補サイトの PCR 増幅は、KOD One (Toyobo)または PrimeStar GXL (Takara)を用いて行った。それぞれのオフターゲット候補サイトへの変異導入は GeneArt Genomic Cleavage Detection kit (Life Technologies)を用いて確認した。Cel-I アッセイおよびシーケンス解析に使用したプライマーは表 5 に記載する。

表 5. オフターゲット解析に使用したプライマー

#### Cel-I アッセイ用プライマー

Gene	Locus	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>GUSB</i>	#1	F	ggttttgaagacttgtaggaataaaaagattagcc	408
		R	tgtcagtggtgtgcaatacaaatataacataagtc	
	#2	F	gagaagtgggagaatgagaggaaaagagaacatc	442
		R	tgtcattaccatctttgagccctccag	
	#3	F	ctccatatatacacacacacatgctcaccacacac	490
		R	atttcaatcccatggcagcaaaatgtc	
	#4	F	tctacctctctgctctgtctggtctctcc	473
		R	cacatcccctgaggtcttcaactcacc	
	#5	F	ctagtttttagccaagaacagatcgacagaagc	419

		R	aaaggaattcaggtacacagacacacag	
#6		F	ggcagccctagctccaactgc	394
		R	gatgtattgggtctggttggtggaag	
#7		F	cctgattcaactttacattcctccaccattatc	411
		R	ttattgccagaggaaatagcttctctacccttac	

Gene	Locus	Direction	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
ARSB	#1	F	gatagcaagcttaagtcacaaatacaaatatgagc	440
		R	ctttccctgagggctgaggtatctg	
	#2	F	ccgcagactcgagataaaggagaggag	450
		R	cacttctccttgccttctagtgtttcttc	
	#3	F	cccgagtggagagtggagacgaatc	308
		R	tcggcgctgctgctactgttgtc	
	#4	F	gtggcagagcctcagaatggaatc	454
		R	gcagtctacgttgtcaccagcagag	
	#5	F	tggttctgaagagtggggagtaaggag	478
		R	gactcccctatcagcttccacccttc	
	#6	F	tcccacccagacaacattttaagc	396
		R	gaggtacagacctgttgcctgctgaac	
	#7	F	accatgaggtaccccaactatcttggatctc	353
		R	gtttcagaatccctgggtactcctcatttc	

シーケンス解析用プライマー

Gene	Locus	Sequence (5' to 3')
GUSB	#1	ccaaacattaactaaagtgtacagaccttg
	#2	tgtgagctctgtgaggtagg
	#3	gtttaggagcaatgtggttc
	#4	gcttgtcacacgtcctcaaac
	#5	ccatgcagaacctaaagacgatg
	#6	ctcaaatctcgtctttgtctg
	#7	gattaatccacgctagcattcc

Gene	Locus	Sequence (5' to 3')
<i>ARSB</i>	#1	cttgctgcatagtctcaggtac
	#2	acctcttgatgcaacttcacg
	#3	ttccatgcaaaccacttag
	#4	gctggtggaaagagcagagtaag
	#5	ctgcttcttggttctgaagagtg
	#6	tccaactaggatctccagctac
	#7	gctgttgagtgaggatttctgag

図

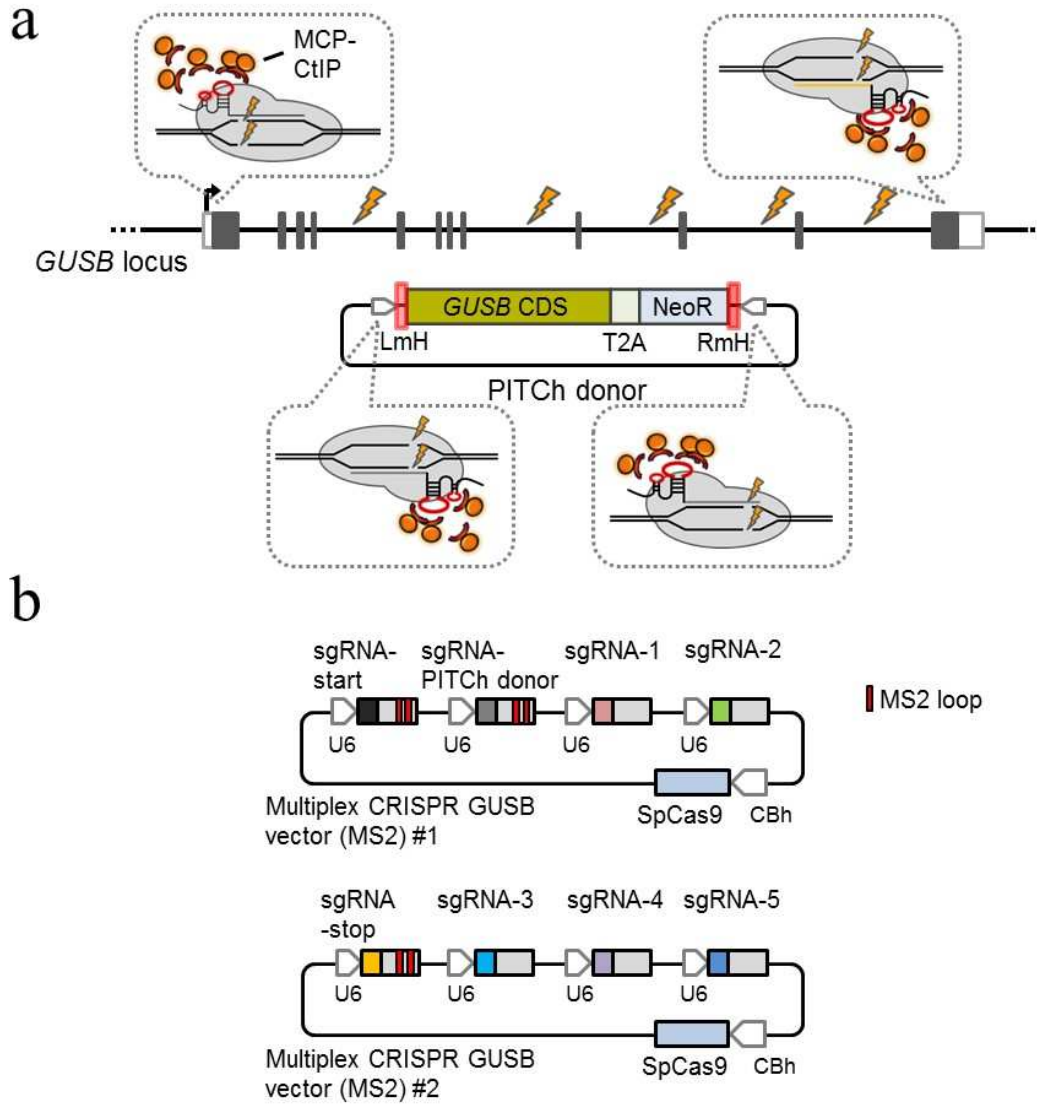


図 2-1 *GUSB* 遺伝子座に対する LoAD システムの併用

**a** *GUSB* 遺伝子座における LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh の概略図。

CDS; coding sequence、*NeoR*; ネオマイシン耐性遺伝子、LmH; left microhomologous sequence、RmH; right microhomologous sequence。 **b** Multiplex CRISPR ベクター (MS2) の模式図。 U6; ヒト U6 プロモーター、CBh; chicken beta-actin hybrid プロモーター、SpCas9; *Streptococcus pyogenes* Cas9。

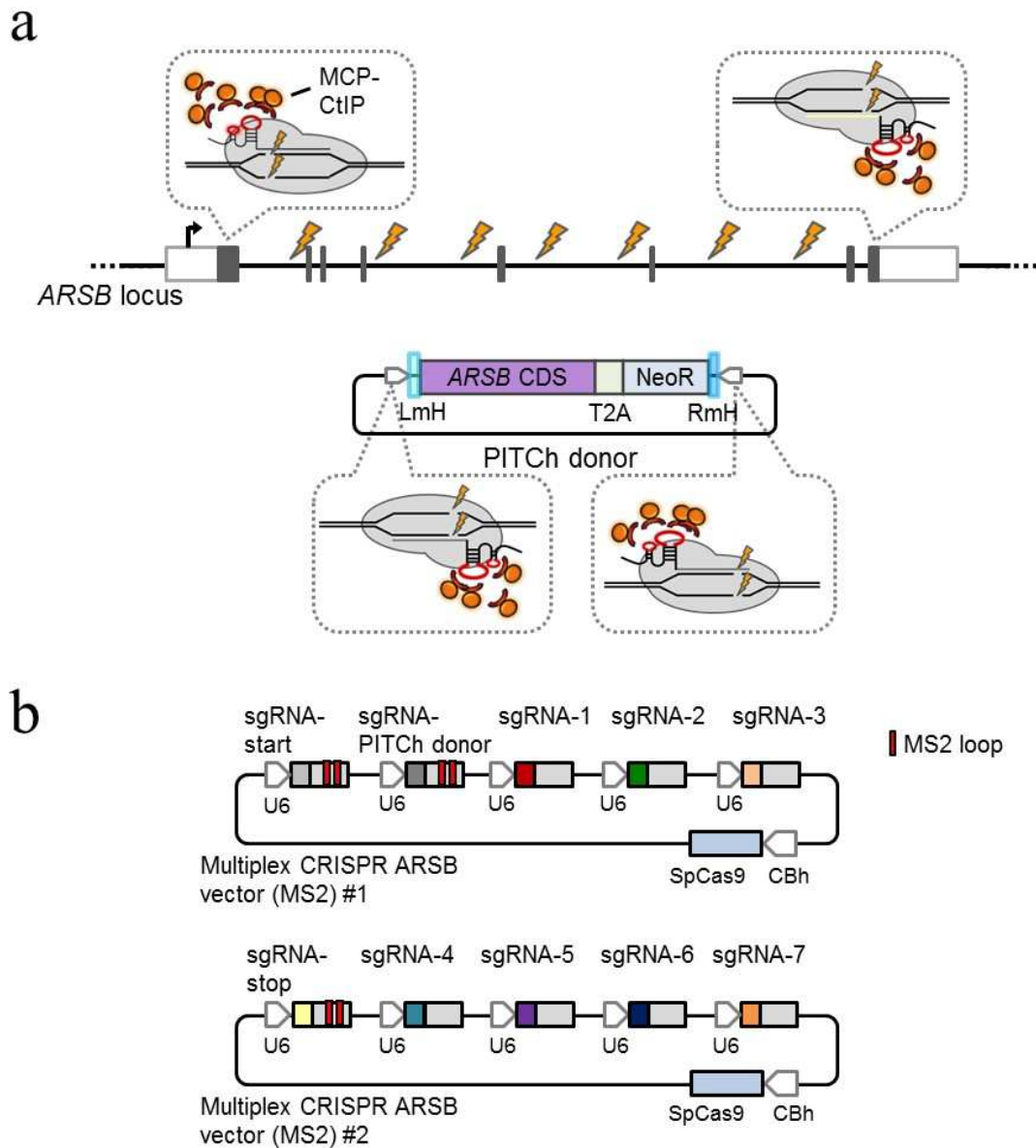


図 2-2 *ARSB* 遺伝子座に対する LoAD システムの併用

**a** *ARSB* 遺伝子座における LoAD システムを用いた REMOVER-PITCh の概略図。CDS; coding sequence、*NeoR*; ネオマイシン耐性遺伝子、LmH; left microhomologous sequence、RmH; right microhomologous sequence。 **b** Multiplex CRISPR ベクター (MS2) の模式図。U6; ヒト U6 プロモーター、CBh; chicken beta-actin hybrid プロモーター、SpCas9; *Streptococcus pyogenes* Cas9。

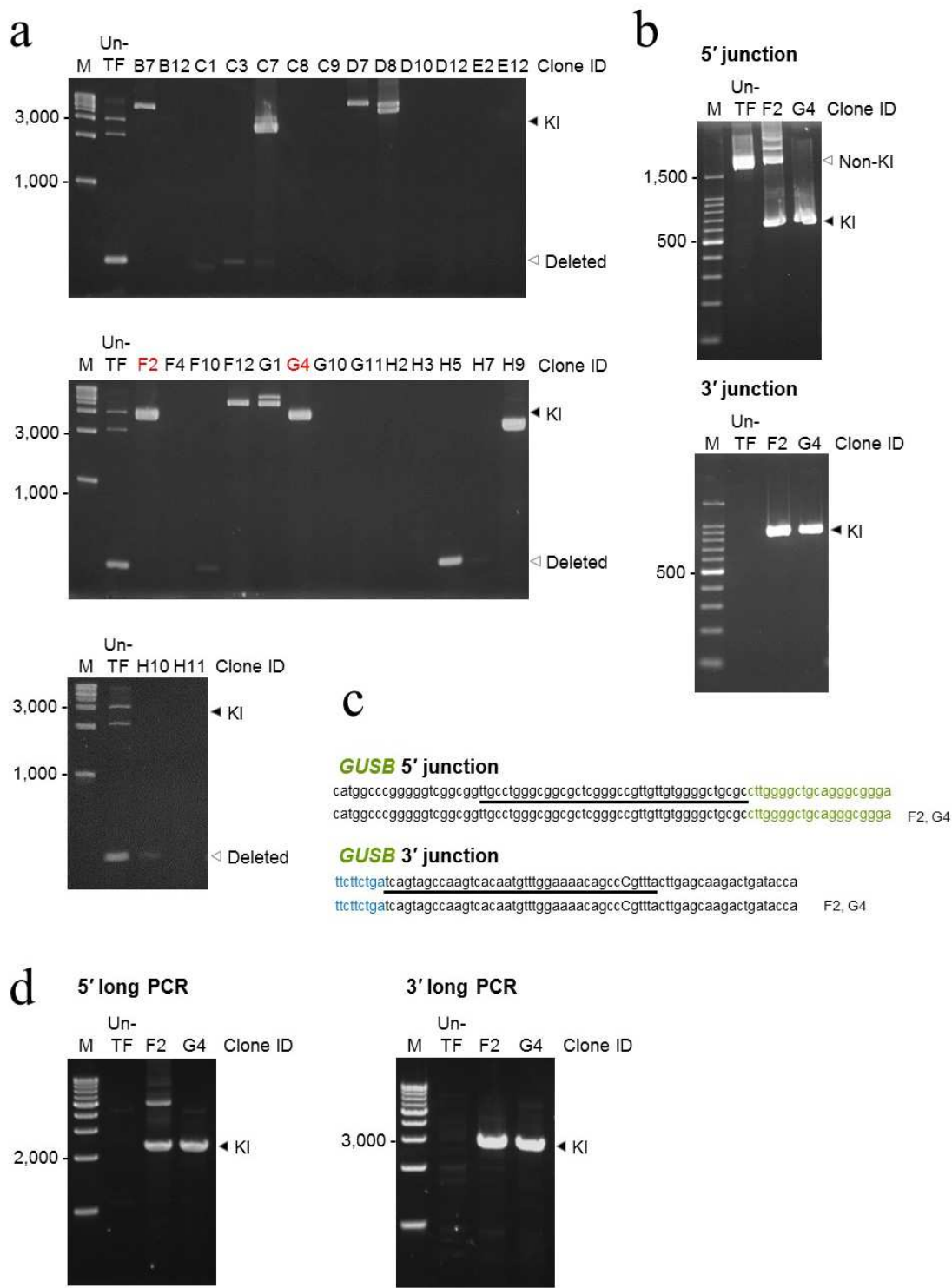
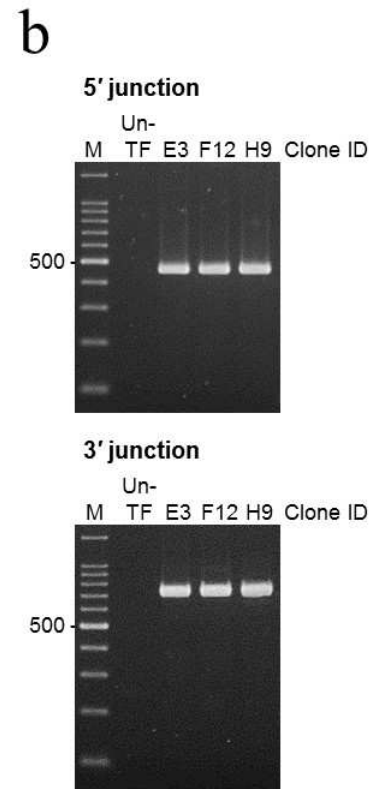
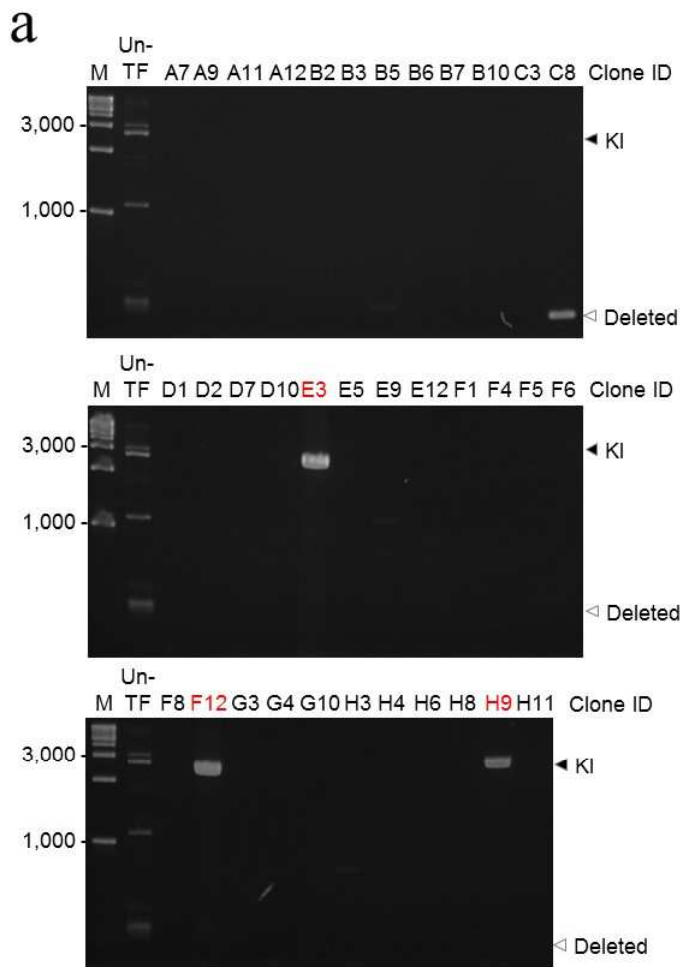


図 2-3 LoAD システムを用いた *GUSB* 遺伝子座を標的とした REMOVER-PITCh 単離クローンにおける out-out PCR (a)、junction PCR (b) によるノックインの確認。Un-TF; untransfected cells、KI; amplicon size in knock-in allele、Deleted; amplicon size

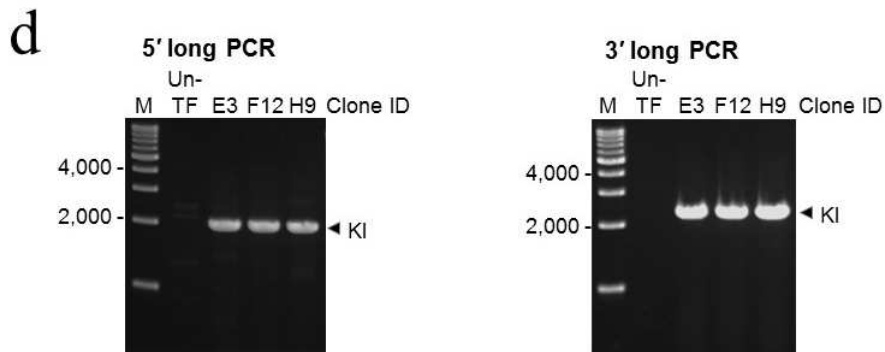
in chromosomally deleted allele、Non-KI; amplicon size in non-knock-in allele。 M; 100 or 1000 bp ladder。 **c** 相同配列領域の増幅産物のシーケンス解析。上段; knock-in allele、下段; クローン。下線; 相同配列、緑字; *GUSB* CDS 配列、青字; *NeoR* 配列。 **d** long PCR による単一カセット置換の確認。



**c**

**ARSB 5' junction**  
acaaggggctggtggcgccacagggcgtgggaccgctgggacagggcgggacaaagatgggtccgcgctctctctccccg  
acaaggggctggtggcgccacagggcgtgggaccgctgggacagggcgggacaaagatgggtccgcgctctctctccccg E3, F12, H9

**ARSB 3' junction**  
ttctctgatgtaggatttcagggaggctagaaaaccttcattggaagtggacctcagggcctttc  
ttctctgatgtaggatttcagggaggctagaaaaccttcattggaagtggacctcagggcctttc E3, F12, H9





**図 2-4 LoAD システムを用いた *ARSB* 遺伝子座を標的とした REMOVER-PITCh**  
単離クローンにおける out-out PCR (a)、junction PCR (b) によるノックインの確認。  
Un-TF; untransfected cells、KI; amplicon size in knock-in allele、Deleted; amplicon size  
in chromosomally deleted allele。 M; 100 or 1000 bp ladder。 c 相同配列領域の増幅  
産物のシーケンス解析。上段; knock-in allele、下段; クローン。下線; 相同配列、  
紫字; *ARSB* CDS 配列、青字; *NeoR* 配列。 d long PCR による単一カセット置換の  
確認。

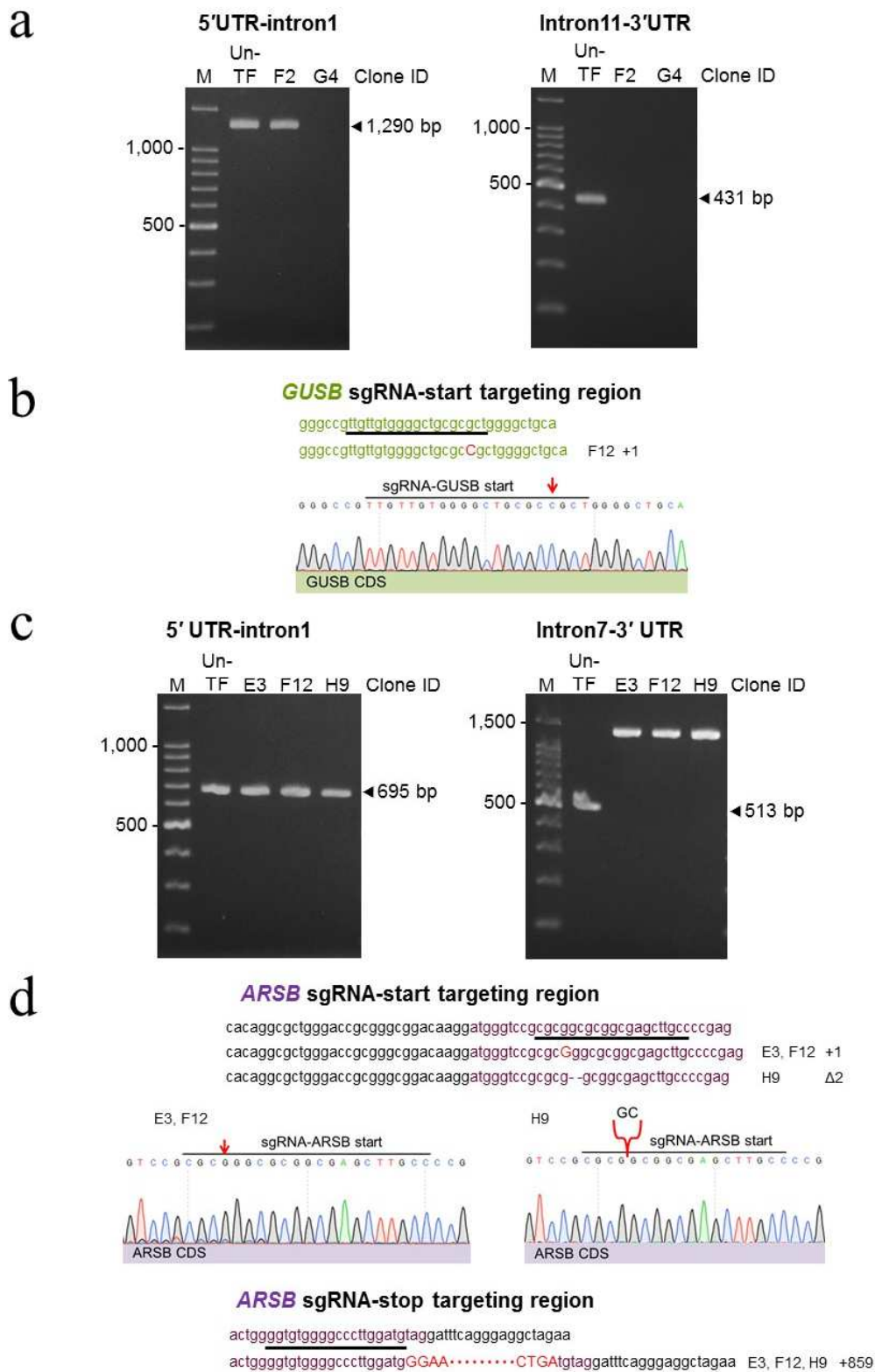
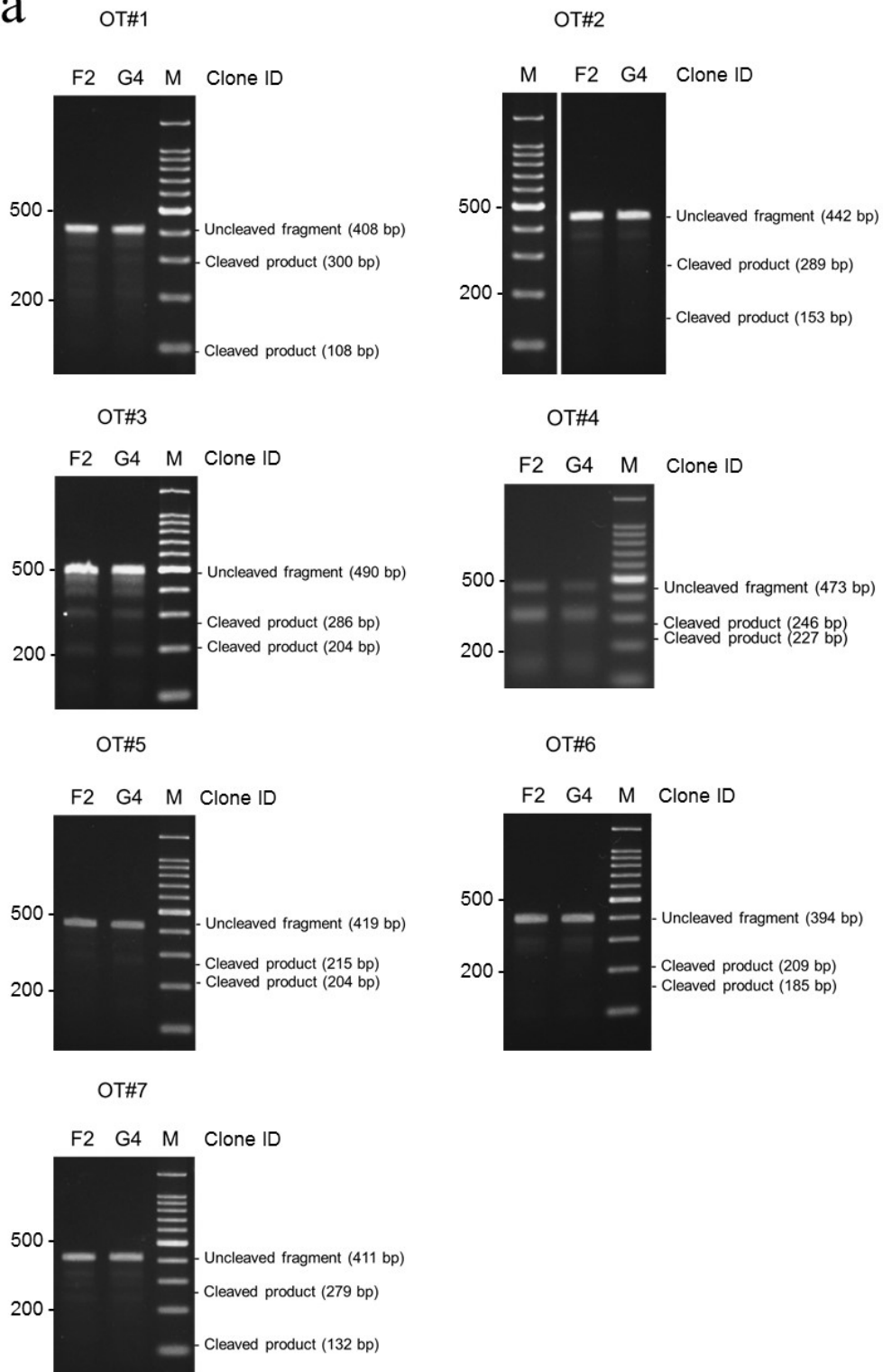


図 2-5 ノックインクローンの遺伝子型解析

**a** および **c** 非ノックインアレル特異的な PCR 増幅。Un-TF; untransfected cells、**M**; 100 bp ladder。 **b** *GUSB* 遺伝子座の F2 クローン の増幅産物のシーケンス解析。上段; 野生型アレル、下段; クローン、緑字; *GUSB* CDS 配列、赤大文字および赤矢印; 挿入変異。 **d** *ARSB* 遺伝子座の E3、F12、H9 クローン の増幅産物のシーケンス解析および波形データ。上段; 野生型アレル、下段; クローン、紫字; *ARSB* CDS 配列、赤大文字および赤矢印; 挿入変異。

**a**



b

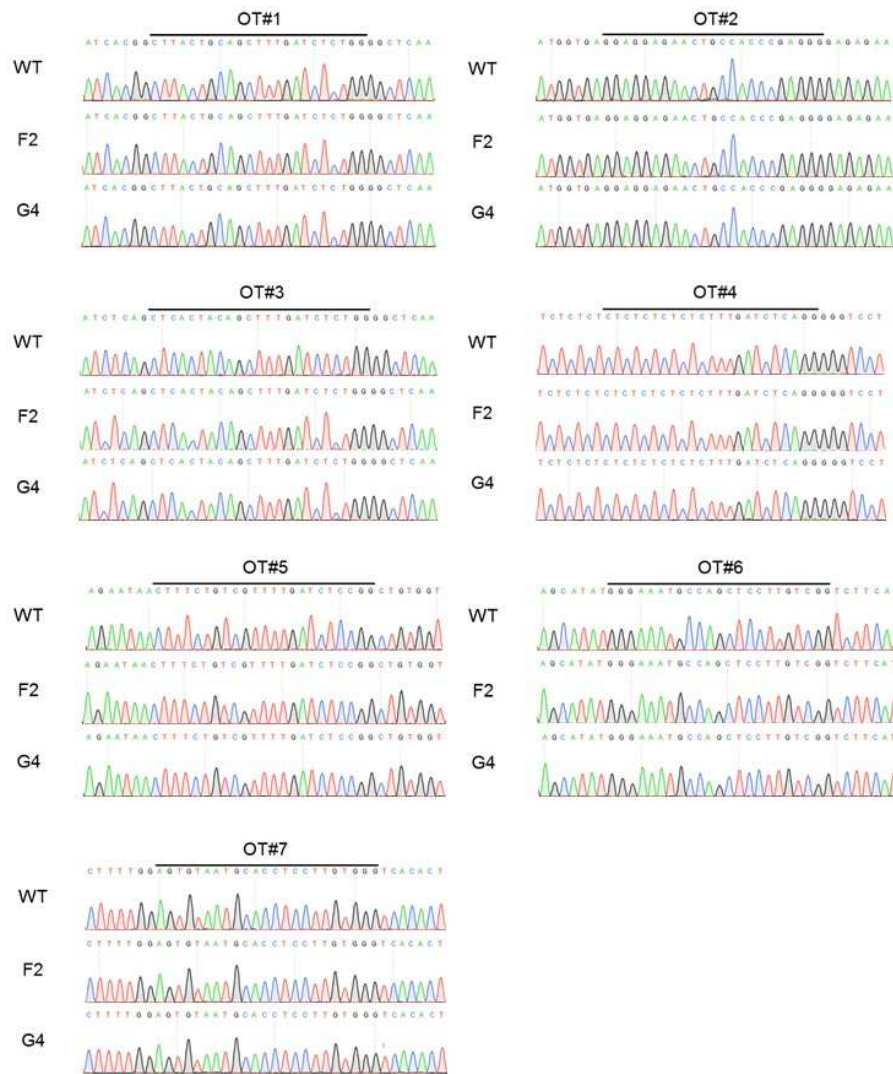
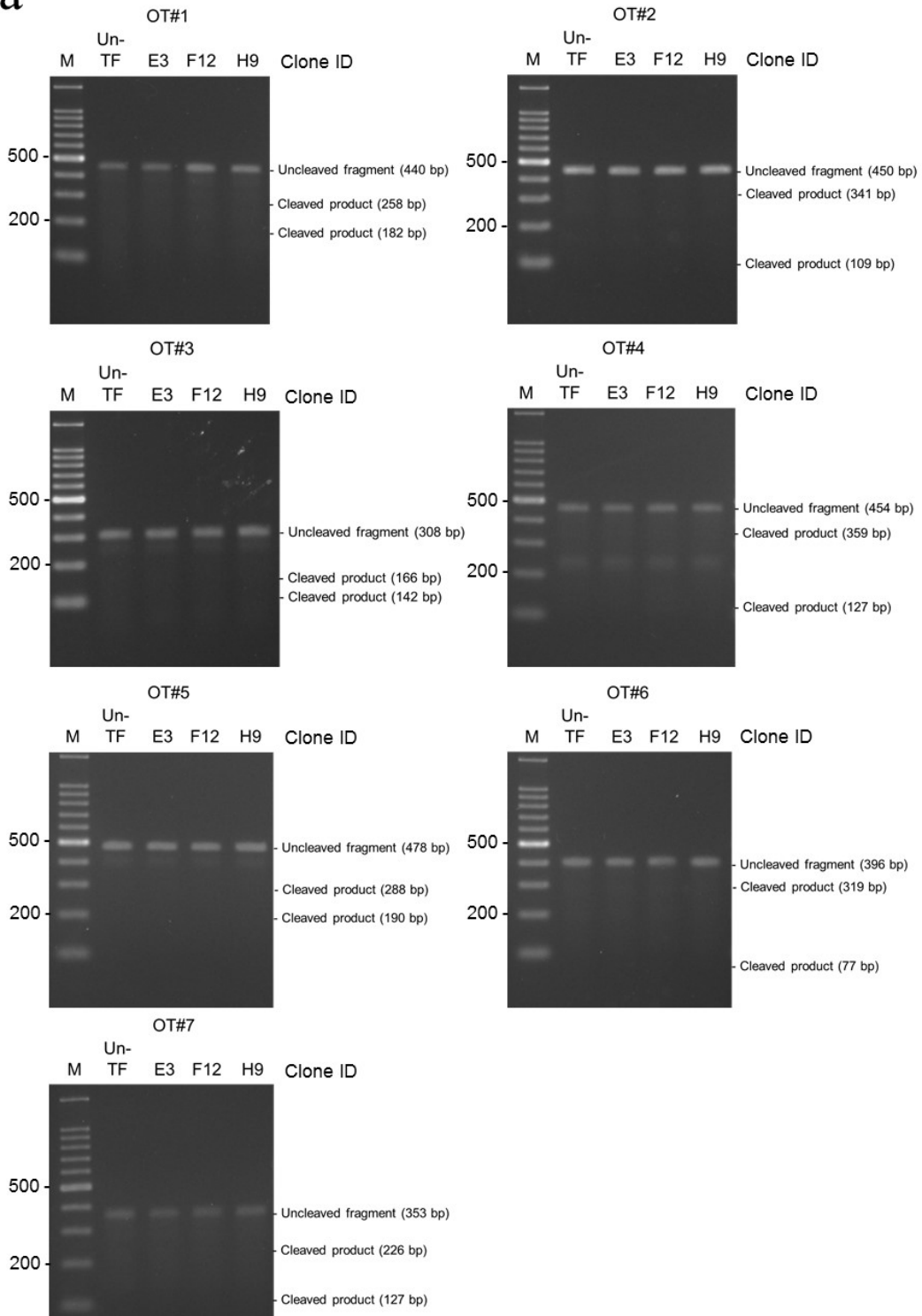


図 2-6 *GUSB* 遺伝子座のノックインクローンにおけるオフターゲット解析

*GUSB* 遺伝子座のノックインクローンにおけるオフターゲット変異の有無を Cel-I アッセイ (a) およびシーケンス解析 (b) により確認した。COSMID 解析でリストされた上位 7 ヶ所の候補部位 (OT#1~7) を検証した。Un-TF; untransfected cells, M; 100 bp ladder。

**a**



b

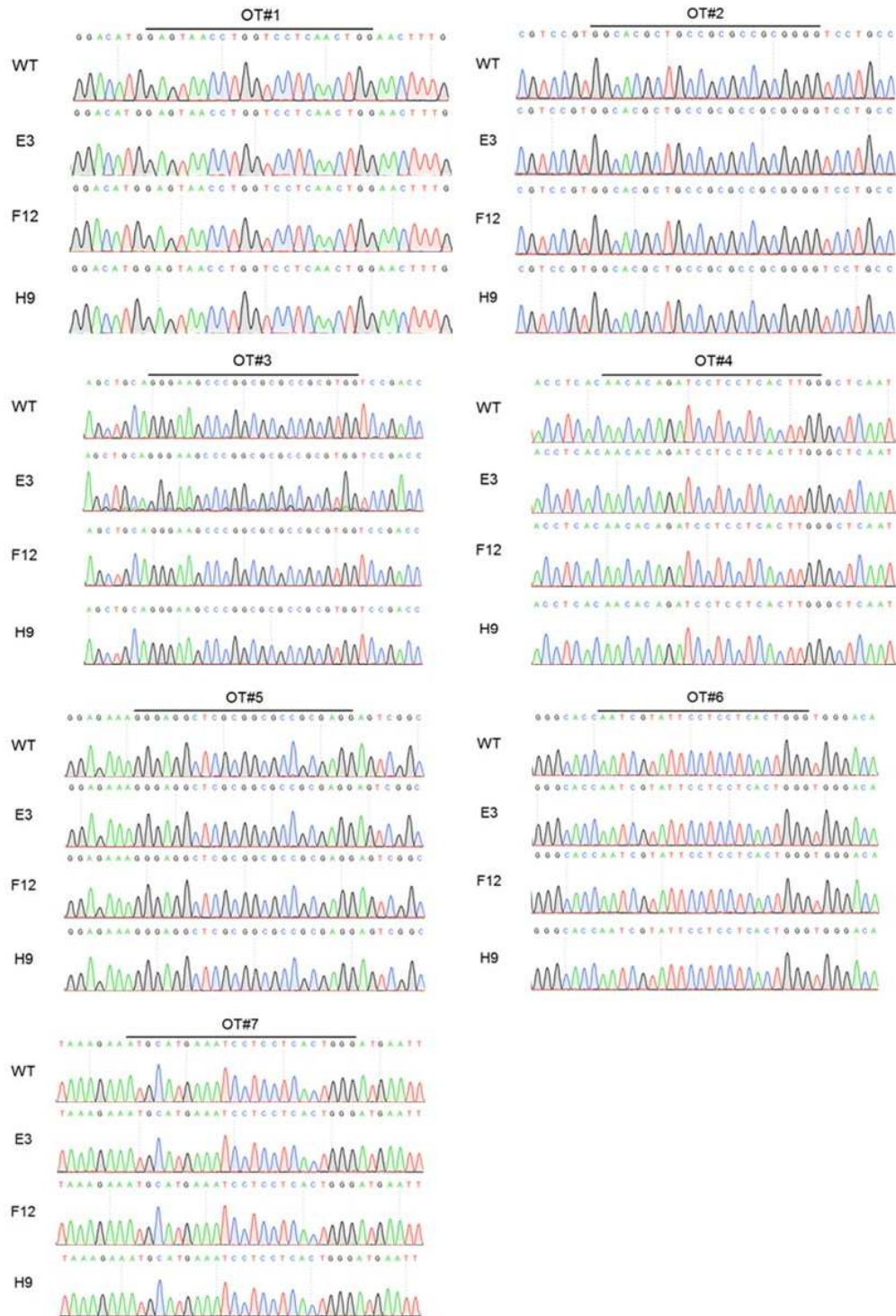


図 2-7 *ARSB* 遺伝子座のノックインクローンにおけるオフターゲット解析

*ARSB* 遺伝子座のノックインクローンにおけるオフターゲット変異の有無を ChIP アッセイ (a) およびシーケンス解析 (b) により確認した。COSMID 解析でリストされた上位 7 ヶ所の候補部位 (OT#1~7) を検証した。Un-TF; untransfected cells, M; 100 bp ladder。



## 引用文献

Aida, T. et al. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17, 979 (2016).

Anand, R. et al. Phosphorylated CtIP functions as a co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection. *Mol. Cell* 64, 940–950 (2016).

Charpentier, M. et al. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat. Commun.* 9, 1133 (2018).

Denes, CE. et al. Approaches to Enhance Precise CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8571 (2021).

Fu, Y. et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 32, 279-284 (2014).

Nakade, S. et al. Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system. *Nat. Commun.* 9, 3270 (2018).

Schimmel, J. et al. Modulating mutational outcomes and improving precise gene editing at CRISPR-Cas9-induced breaks by chemical inhibition of end-joining pathways. *Cell Rep.* 42, 112019 (2023).

Schmid-Burgk, JL. et al. Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. *Mol. Cell* 78, 794-800 (2020).

Sfeir, A. et al. Microhomology-mediated end joining: a back-up survival mechanism or dedicated pathway? *Trends Biochem. Sci.* 40, 701-714 (2015).

Yeh, CJ. et al. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nat. Cell Biol.* 21, 1468-1478 (2019).

## 総括

CRISPR-Cas9 の登場以降、ゲノム編集を用いた研究が急速に加速し、疾患メカニズムの解明や疾患モデルの作製、遺伝子疾患の治療など幅広い分野で必要不可欠な技術になっている (Ding et al. 2014; Hsu et al. 2014; Su et al. 2016; Yin et al. 2014; Wang et al. 2013)。遺伝子置換法は、一般的に 2 つの sgRNA を用いて標的ゲノム DNA 上の 2 カ所に DSBs を導入し、DSB 修復経路を介して切断領域と目的配列を置換する方法であり、大規模な領域での遺伝子改変が可能となる (Zheng et al. 2014; Danner et al. 2021)。しかしながら、大規模遺伝子領域における効率的な遺伝子置換法に関する報告は限られており、標的とする遺伝子サイズを拡大することは、遺伝子置換技術の基盤技術の拡充につながる。

そこで本研究では、標的遺伝子領域の CRISPR-Cas9 による多重切断および MMEJ 修復を利用したノックイン法である PITCh 法を用いた大規模領域の遺伝子置換法を開発し、REMOVER-PITCh と命名した。培養細胞において 20 kb および 200 kb の領域を標的とし、本システムの有効性を検証したところ、20 kb の領域で標的置換クロンの樹立に成功した。続いて、標的とする遺伝子領域の規模を拡大することを目的に、LoAD システムを利用した PITCh ノックイン効率の向上を試みた。その結果、LoAD システムを併用することにより、約 200 kb の大規模領域における標的置換クロンの樹立に成功した。

本研究では、開発した REMOVER-PITCh について、ヒト培養細胞における有用性を実証した。今後、本システムをより有用なものにするためには、安全性や置換効率の知見を獲得し、課題をクリアしていく必要がある。例えば、安全性面では、多重切断に伴いオフターゲット変異のリスクが高いことが挙げられる。高感度かつ包括的な検出法を組み合わせることで遺伝子全体のオフターゲットの有無を確認するだけでなく、多重切断による大規模遺伝子置換によりどのような編集

結果が得られるか明らかにすることが重要になる。効率面では、標的遺伝子を切断する sgRNA の数と置換効率の関係を明らかにし、置換効率がより高くなるようなシステムの最適化が必要になる。また、本研究では、1 種類のヒト培養細胞に対し 2 種類の遺伝子座を標的として有用性の検証を実施した。REMOVER-PITCh が応用可能な技術であることを示すためにも、複数の細胞種、複数の遺伝子座への有用性を検証する必要がある。

私が開発した遺伝子置換法は、遺伝子機能解析やヒト化マウスモデルの作製、疾患変異の除去や修復などのアプリケーションに利用することが可能になると考えられる。このシステムが遺伝子ノックインの選択肢の一つとして利用され、多くの研究に貢献することを期待している。

## 引用文献

Danner, E. et al. A homology independent sequence replacement strategy in human cells using a CRISPR nuclease. *Open Biol.* 11, 200283 (2021).

Ding, Q. et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.* 115, 488-492 (2014).

Hsu, PD. et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278 (2014).

Su, S. et al. CRISPR-Cas9-mediated disruption of PD-1 on human T cells for adoptive cellular therapies of EBV positive gastric cancer. *Oncoimmunology* 6, e1311485 (2017).

Yin, H. et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* 32, 551-553 (2014).

Wang, H. et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910-918 (2013).

Zheng, Q. et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques* 57, 115-124 (2014).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多岐に渡り親切かつ的確な御指導並びに御助言を賜りました広島大学大学院統合生命科学研究科教授 山本卓先生に深く感謝申し上げます。また、研究の遂行から論文の作成にわたり終始適切なお指導を賜りました広島大学大学院統合生命科学研究科教授 佐久間哲史先生に深謝致します。そして、論文審査の副査を御担当頂き、貴重なご助言を賜りました広島大学大学院統合生命科学研究科教授 坊農秀雅先生、坂本敦先生、同准教授 坂本尚昭先生に深く感謝致します。

本研究を通して遺伝子工学の基礎的な実験技術の習得における丁寧なお指導並びにご支援いただいた武永充正研究員、栗栖朋子研究員に感謝申し上げます。また、有益な議論とご助言をいただいた広島大学大学院統合生命科学研究科分子遺伝学研究室の皆様へ感謝致します。

本研究の遂行にあたり、このような最先端の技術に触れる研究出向の機会を与えてくださった湧永製薬株式会社 湧永寛仁社長、湧永寛信副社長、小高裕之研究総括、岡孝己顧問に厚く御礼申し上げます。そして、論文執筆の間、支えてくださった湧永製薬株式会社 創薬研究所の皆様へ御礼申し上げます。

最後に、ここに至るまでの間、精神的に支え続けてくれた家族に心より感謝します。

令和6年2月20日

松崎 周