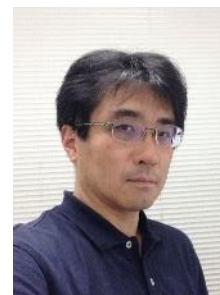


DNA を切らない安全な高効率ゲノム編集技術の開発

研究代表者

足立 典隆

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 教授



1. 研究の背景と達成目標

細胞内に導入したベクターDNA が染色体中のランダムな位置に組み込まれる反応を「ランダム挿入」と呼ぶ。この反応は任意の細胞において安定的な遺伝子発現を行う目的で日常的に使われているが、ゲノム編集（とりわけ相同組換えを介した「遺伝子ターゲティング」を利用した標的組込み）においてはその効率化を目指すうえで非常に大きな障害となっている。ヒト細胞におけるランダム挿入の分子機構は長らく不明であったが、最近我々は遂にその一端を明らかにした。すなわち、この反応は DNA ポリメラーゼ θ または DNA リガーゼ IV（非相同末端連結 NHEJ の必須因子）のいずれかに完全に依存しており、双方を同時に失った細胞ではランダム挿入が起こらなくなることを突き止めた（*Nat. Comm.*, 2017）。

昨今のゲノム編集技術の目覚ましい進展により生命科学の分野に革命がもたらされ、生きている細胞の遺伝子を人為的に切断し不活性化することが可能になった。しかし安全面の課題等は依然解消されておらず、新たなゲノム編集技術の開発が望まれている。そこで本研究では、安全に（DNA 切断を起こさずに）効率 100% で遺伝子ターゲティングを行うための手法を確立することを目標に掲げた。具体的には、DNA ポリメラーゼ θ および DNA リガーゼ IV の特異的阻害剤の探索・取得を通じて、ヒト細胞に導入したベクターDNA が狙った位置にだけ組み込まれる状況を人為的に作り出すためのシステムを開発することを目指した。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- DNA ポリメラーゼ θ を阻害する化合物を取得した。DNA ポリメラーゼ θ は NHEJ 非依存性ランダム挿入に必須であるため、その阻害剤はゲノム編集の新たな汎用基盤技術の確立に有用となる。また、将来的には相同組換え欠損がんの治療や免疫チェックポイント阻害剤との併用によるミスマッチ修復欠損がんの治療への応用が期待される。
- NHEJ を阻害する化合物を取得した。この化合物は既存の DNA リガーゼ IV 阻害剤よりもはるかに高い NHEJ 阻害活性を有していた。したがって、ゲノム編集の基盤技術としてだけでなく、電離放射線や DNA 傷害性抗がん剤の強力な増感剤としても有効活用できると期待される。
- ベクターDNA の染色体へのランダムな組込みを化合物処理によって抑制できることを実証した。これにより、CRISPR-Cas9 などの人工ヌクレアーゼに依らず（すなわち人為的な DNA 切断を起こさずに）遺伝子ターゲティング効率を上昇させることが可能であることが示された。高等動植物のゲノム編集への応用が期待される。

3. 研究成果

コンビナトリアル合成化合物ライブラリーを用いて細胞の表現型変化を指標としたアッセイによるスクリーニングを行った。その結果、DNA ポリメラーゼ θ を阻害する化合物および NHEJ を阻害する化合物をそれぞれ取得することに成功した。得られた DNA ポリメラーゼ θ 阻害剤は、NHEJ 非存

在下におけるランダム挿入の頻度を 10 倍以上低下させた ($2\mu\text{M}$, ベクター導入後 48h 処理)。また、相同組換え欠損細胞の増殖を強く阻害した。一方、NHEJ 阻害剤は、DNA ポリメラーゼ θ 非存在下におけるランダム挿入の頻度を約 1/15 にまで低下させた ($20\mu\text{M}$, ベクター導入後 48h 処理)。既存の DNA リガーゼ IV 阻害剤ではこのような効果は全くみられなかった ($100\mu\text{M}$ SCR7; *Cell*, 2012)。次に得られた化合物を併用して同様の実験を行ったところ、ヒト細胞 (DNA ポリメラーゼ θ も NHEJ も正常) におけるランダム挿入の頻度が約 1/3 にまで低下することがわかった。また、遺伝子ターゲティング (標的組込み) の効率が 2~3 倍に上昇することが確認された。以上の結果から、阻害剤の同時処理によりベクター-DNA のランダムな組込みを強く抑制できることが示された。

4. 今後の展開

本研究では、ヒト細胞に導入したベクター-DNA が常に狙った位置に組み込まれるシステムの構築を目指し、その目標の一部を達成することができた。ランダム挿入の完全抑制の実現は高等動植物における安全で効率的なゲノム編集技術の確立に直結するため、今後より強力な阻害剤を開発することが急務となる。一方、本研究を進める過程で、特殊なランダム挿入反応に寄与する第三の経路とその特徴を見いだすことができ、これをきっかけに新たながん診断・治療法の着想・開発に至った。この手法においても DNA ポリメラーゼ θ 阻害剤や NHEJ 阻害剤が有効となるため、本研究で取得した阻害剤はゲノム編集の新たな汎用基盤技術の確立のみならず、さまざまながんの治療・診断への幅広い波及効果が期待できる。

5. 発表実績

【招待講演】

- ・ Adachi, N.: “Role of human DNA polymerase θ at double-strand breaks”. The 5th DNA Polymerases Meeting (ライデン、オランダ), 2018 年 9 月.
- ・ 足立典隆: 「外来 DNA 組込みと二本鎖切断修復機構」. 東大医科学研究所セミナー 「ゲノム編集の基礎と応用」, 2019 年 10 月.
- ・ Adachi, N.: “Role of human DNA polymerase θ at double-strand breaks”. International Conference of Genetics Society of Korea (ソウル、韓国), 2019 年 11 月.
- ・ Adachi, N.: “Crosstalk between DSB repair pathways: role of human DNA polymerase θ at double-strand breaks”. IBS Center for Genomic Integrity, UNIST (ウルサン、韓国), 2019 年 11 月.

【総説】

- ・ 足立典隆: 「ベクター-DNA の非特異的な組込みを 100%抑制する」. アグリバイオ増刊号 2019 年 12 月.
- ・ 足立典隆: 「ランダム挿入反応の分子機構と完全阻害」. Precision Medicine 「ゲノム編集を用いた遺伝子治療」, 2020 年 5 月.

【特許】

- ・ 足立典隆: 特願 2020-023874 「核酸構築物、及び該核酸構築物を含むミスマッチ修復欠損がんの治療剤又は診断剤」, 2020 年 2 月.
- ・ 足立典隆: 特願 2020-023875 「相同組換え活性を測定可能な核酸構築物及びその利用」, 2020 年 2 月.