

TALENを用いたヒトiPS細胞における ゲノム編集

Genome Editing in Human iPS Cells by TALENs

李 紅梅, Knut Woltjen, 高橋和利, 山中伸弥, 堀田秋津

Hongmei Li, Knut Woltjen, Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka, Akitsu Hotta

人工ヌクレアーゼを用いることで複雑なゲノムを自在に編集することが可能となってきた。シャーレ上で多彩な細胞へと分化可能なiPS細胞のゲノム編集ができれば、遺伝子ノックアウトの解析やレポーター細胞株作製による効率的な分化・初期化誘導など、非常に有用な研究ツールとなりうる。また、遺伝性疾患の原因遺伝子を高効率で修復可能となれば、患者由来のiPS細胞を用いた遺伝子治療がより現実味を帯びてくる。本稿ではデュシャンヌ型筋ジストロフィー患者由来のiPS細胞におけるTALENを用いた遺伝子修復の取り組みを紹介する。



key words

iPS細胞, TALEN, 遺伝子改変

はじめに

胚性幹細胞ES細胞およびiPS細胞(induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞)は、共にほぼ無限に増殖する能力と、体を構成する様々な細胞へと分化する多能性を有している。特にiPS細胞は遺伝的変異を持つ患者から直接作製が可能であり、病態を示す細胞へと分化させることで病態解明や画期的な新薬の探索など、医学の発展に貢献する大きな可能性を秘めている¹⁾。しかしながら、iPS細胞はその由来細胞や樹立培養方法の違いに応じて、株ごとに性質が大きく異なることが明らかとなっている。したがって、ある遺伝性疾患を解析する場合、観察された実験結果が遺伝子異常によるものか、それともiPS細胞株間の個体差によるものなのかを厳密に区別する必要がある。そのため、変異のある遺伝子を遺伝子改変技術で正常な状態に戻し、遺伝子修復前の細胞と比較するアプローチが重要となる。マウスES細胞では、遺伝子工学的手法を用いた様々な相同組換え(homologous recombination; HR)法が確立されており、トランスジェニックマウスの作製などに広く使用されている。一方、ヒトES/iPS細胞は、単離すると細胞死が誘導されやすく、遺伝子導入が難しいといった技術的な問題と、HRがマウスES細胞ほど起こりにくいという生物学的な問題が障害となっていた。近年、ROCK(Rho-associated protein kinase)阻害剤Y-27632が細胞死抑制に有効であることが発見された。そしてHRが起こりにくいという問題に関しては、特定のゲノム部位にDNA損傷を誘導できる人工ヌクレアーゼの開発

により、ヒトiPS細胞でも効率良く遺伝子のノックアウト、ノックインや遺伝子置換などが可能となった。本稿はまずヒトES/iPS細胞におけるこれまでに報告されている主な遺伝子改変技術について概説する。そして近年開発された人工ヌクレアーゼの一種であるTALENの発現ベクターの構築、ヒトiPS細胞への導入方法および変異導入の解析方法について紹介する。

I ヒトES/iPS細胞におけるゲノム編集

これまでにヒトES/iPS細胞において、表1で示すように、相同配列アームを長くしたBACターゲティングベクターや、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを利用した方法、そして人工ヌクレアーゼを用いた様々な方法による遺伝子ターゲティングが報告されている^{2)~20)}。人工ヌクレアーゼの種類として主にZFN(zinc finger nuclease)やTALEN(transcription activator-like effectors) nuclease]があり、それぞれに特徴がある。ジンクフィンガーと呼ばれる3塩基DNA結合モチーフに、制限酵素Fok IのDNA切断ドメインを組み合わせて作製されるZFN¹³⁾と比較して、TALENは植物寄生細菌由来TALEのDNA結合RVD(repeat-variable di-residue)を利用しているため、1塩基を1ドメインで認識することができるので設計が容易であり、ターゲットサイトの自由度が高いといったメリットがある¹⁹⁾。

人工ヌクレアーゼを用いて最も簡便に誘導できるゲノム編集は遺伝子のノックアウトである。iPS細胞やその分化細胞

■表1 ヒトES/iPS細胞におけるゲノム編集例

| 相同組換え法 | 細胞 | ターゲット遺伝子 | 遺伝子改変目的 | 効率 | 文献 |
|------------------------------|--|--|---------|---------|-----|
| 1~10kb相同配列アーム ターゲティングベクター | hESC | <i>HPRT1</i> | 欠損 | 1.7% | 2) |
| | | <i>OCT3/4</i> | 挿入 | 27~40% | |
| | hESC | <i>ROSA26</i> | 挿入 | 2.3% | 3) |
| ヘルパー依存型 アデノウイルスベクター | hESC | <i>HPRT1</i> | 欠損 | 45% | 4) |
| | hiPSC | <i>LMNA</i> | 修復 | 46% | 5) |
| | hiPSC | <i>LRRK2</i> | 修復 | 10% | 6) |
| | hESC | | 挿入 | 17% | |
| | hiPSC | <i>HPRT1</i> | 欠損 | 3~12% | 7) |
| | | <i>KU80</i> | 欠損 | 55% | |
| | | <i>LIG1</i> | 欠損 | 10% | |
| | | <i>LIG3</i> | 欠損 | 19% | |
| <i>HB9</i> | | 挿入 | 5~7% | | |
| BAC ターゲティングベクター | hESC | <i>ATM</i> | 欠損 | 27% | 8) |
| | | <i>p53</i> | 欠損 | 22% | |
| | hiPSC | <i>OAT</i> | 修復 | 10% | 9) |
| | hiPSC | <i>OSR1</i> | 挿入 | 3% | 10) |
| Naive (マウスES様)状態に変換 | hiPSC | <i>HPRT1</i> | 欠損 | 1% | 11) |
| ZFN | hESC | <i>CCR5</i> | 挿入 | 28% | 12) |
| | hESC/iPSC | <i>AAVS1</i> | 挿入 | 33~61% | 13) |
| | hESC | <i>OCT3/4</i> | 挿入 | 50~100% | |
| | hESC/iPSC | <i>PITX3</i> | 欠損 | 8~11% | 14) |
| | hiPSC | <i>α-synuclein</i> | 修復 | 2.5% | |
| | hiPSC | <i>AAVS1</i> | 挿入 | 75% | |
| | hiPSC | <i>β-globin</i> | 修復 | 1.3% | |
| | hiPSC | <i>β-globin</i> | 修復 | 9.8% | |
| | hiPSC | <i>α-1 antitrypsin</i> | 修復 | 54% | |
| hiPSC | <i>α-1 antitrypsin</i> | 修復 | 54% | | |
| TALEN | hESC/iPSC | <i>AAVS1</i> | 挿入 | 50% | 19) |
| | | <i>OCT3/4</i> | 挿入 | 70~100% | |
| | hiPSC | <i>PITX3</i> | 欠損 | ~6% | |
| hiPSC | <i>α-1 antitrypsin</i> | 修復 | 25~33% | 20) | |

においてある遺伝子の機能を調べたい場合、人工ヌクレアーゼによってゲノム上に小さな欠損または挿入を導入することでアミノ酸の読み枠やスプライシングサイトを破壊し、ノックアウトを誘導することが可能である。次に人工ヌクレアーゼが威力を発揮する実験系としては、HR機構と組み合わせたノックインや遺伝子置換である。人工ヌクレアーゼでDNA損傷が誘導された部位に宿主細胞のDNA修復機構が活性化されることを利用し、相同鋳型とともに外来遺伝子やマーカーを導入することが可能である。iPS細胞の分化実験は詳細な培養の条件検討が必要であるが、このとき目的の分化細胞だけで発現する遺伝子の下流にGFPなどの蛍光マーカーをノックインすることができれば、飛躍的に条件検討の

手間が改善する。一方、iPS細胞だけで発現している遺伝子(*NANOG*, *OCT3/4*など)にGFPレポーターをノックインすれば、体細胞リプログラミング過程の効率化や条件検討も容易となる。さらに、遊佐氏の稿にある*piggyBac*トランスポゾン除去技術を組み合わせて用いる方法¹⁸⁾や、一本鎖オリゴDNA¹⁴⁾を用いることで、1塩基レベルでの変異導入も可能となってきている。

筆者らは、デュシャンヌ型筋ジストロフィー患者由来iPS細胞において変異型ジストロフィン遺伝子を機能修復するため、ジストロフィン遺伝子をターゲットとするTALENを構築し、その変異導入活性を様々な方法で評価した。

■表2 ヒトiPS細胞への遺伝子導入方法の比較

| 導入方法 | 手法 | DNAの導入効率 | 細胞毒性 | ランニングコスト |
|--------------------|------------------------------------|----------|---|----------|
| Lipofectamine 2000 | 接着細胞へのトランスフェクション | + |  | ¥ |
| FuGENE HD | 接着細胞へのトランスフェクション リバーストランスフェクション | + |  | ¥ |
| Neonシステム | エレクトロポレーション | ++ |  | ¥¥¥¥¥ |
| NEPA 21 | エレクトロポレーション | ++ |  | ¥¥ |

■表3 TALENによる変異導入の各種解析方法

| 解析方法 | 原理 | 利点 | 欠点 |
|------------------------|-----------------------------------|---|--|
| CELI アッセイ T7EI アッセイ | ヘテロ二本鎖特異的ヌクレアーゼによる変異部位切断 | 汎用性が高い | 変異導入効率が低いものは解析困難, DNA二次構造やSNPを持つ部位には 不向き |
| 制限酵素切断 アッセイ | 変異部位に存在する制限酵素の 感受性により確認 | 簡便 | 制限酵素サイトが必要, 制限酵素の切断活性に依存する |
| 大腸菌 クローニング | 変異導入部位をクローニングして サンガーシーケンスにより確認 | 技術的に簡便 変異導入配列がわかる | 大腸菌培養に時間がかかる, 多数サンプルの解析が手間 |
| 次世代 シーケンス | 変異導入部位にアダプターを 付加して大量配列解析 | 網羅的な解析が可能, バーコードを付加することにより 多数のサンプルを同時解析 | バイオインフォマティクスの知識が必要, シーケンスエラー, 専用機器が必要 |

II TALENの構築と細胞導入

1. TALENの構築

TALENの設計については佐久間氏らの稿を参照されたい。TALENの発現ベクターの構築はVoytasらの10モジュール法をもとに6モジュール法に改良された方法を用いている。TALENの構築は発現ベクター上で行うが、筆者らはヒトiPS細胞において強い転写活性を持つCAGプロモーターまたはEF1 α プロモーターを持つ発現ベクターに組み込んでいる。CMVのようなヒトiPS細胞でサイレンシングされるプロモーターは使用しない。

構築したTALENの活性評価はHEK293細胞を用いたSSA (single-strand annealing) アッセイで行う。このとき切断活性の高いTALENを得るために、複数のTALENセットを検討することを推奨する。SSAアッセイの結果から活性の高いTALENをヒトiPS細胞のターゲティングに用いる。

2. ヒトiPS細胞へのTALEN発現ベクターの導入

ヒトiPS細胞は、市販の細胞導入試薬も含めていくつかの方法で遺伝子導入が可能である。以下、筆者らが汎用している導入方法について概説する(表2)。

リポフェクション試薬Lipofectamine 2000 (Invitrogen) やFuGENE HD (Promega) を用いた方法では、細胞毒性は相対的に低いものの、導入効率は最大で40%程度である。エ

レクトロポレーション法ではピペットチップ型電極によるNeonシステムとキューベット型NEPA 21を用いているが、どちらも条件を整えば導入効率はおよそ70%にも達する(表2)。ただし、Neonシステムと比較して、NEPA 21を用いたほうが細胞の回復が早いため、筆者らは主にNEPA 21を用いてTALEN発現ベクターの導入を行っている。また、ヒトiPS細胞をシングルセル状態に懸濁する際にはY-27632(最終濃度10 μ M)を添加し、細胞死を抑制する。

III TALENによる 標的遺伝子への変異導入の解析方法





TALENにより標的遺伝子へ変異導入した細胞において、実際にゲノム上へ変異が導入されたかを解析するには様々な方法がある(表3)。

1. ミスマッチ認識ヌクレアーゼによる 変異導入効率の解析

DNAミスマッチ部分を特異的に認識して切断する酵素の特性を利用した解析方法である。具体的には、TALENターゲットサイトをPCRで増幅し、変性後に再アニールさせることで、変異のある配列と変異のない配列によってミスマッチ二本鎖が生じる。この部分をセロリ由来CELIエンドヌクレアーゼ(商品名Surveyor Nuclease)やT7エンドヌクレアーゼI (T7EI) によって切断する。

English Translation

Table 2. Comparison of transfection methods for human iPS cells

| Methods | Applications | DNA Transfection Efficiency | Cell Toxicity | Running Costs |
|--------------------|--|-----------------------------|---|---------------|
| Lipofectamine 2000 | Transfection into adherent cells | + |  | \$ |
| FuGENE HD | Transfection into adherent cells Reverse transfection | + |  | \$ |
| Neon | Electroporation | ++ |  | \$\$\$\$ |
| NEPA21 | Electroporation | ++ |  | \$\$ |

II 2.

“We are mainly using the NEPA21 for transfection of TALEN expression vectors, because the cell recovery with the NEPA21 is faster than Neon.”

Hongmei Li, Knut Woltjen, Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka, Akitsu Hotta
Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University
“Genome Editing in Human iPS Cells by TALENs”
Saiboh-Kohgaku Vol.32 No.5 2013

4. 次世代シーケンズによる変異導入の解析

もう1つ、筆者らがやっている変異導入パターンの解析方法は次世代シーケンサーを用いる方法である。近年、ベンチトップ型の小型次世代シーケンサーが登場し、利便性も著しく向上している。処理能力やエラー率の低さで定評のあるMiSeq (イルミナ社) の場合、1回のランに必要な費用はおよそ数十万円であるが、150bp (Ver.2では250bp) の配列をおよそ数百万リード解析することが可能である。また、バーコード配列をサンプルごとに付加することで、多数のサンプルを同時に解析することができ、変異導入部位を数千から数万リード解析したい場合におけるサンプルごとのシーケンズコストは、数千円程度となる。

筆者らは、TALENによる変異導入パターンをMiSeqで解析するために、2回のPCRによって、ブリッジPCR反応に必要なアダプター配列を付加している (図1B)。この解析結果から、数十bp程度までの挿入欠損に関して高感度かつ網羅的なデータを得ることができ、変異導入パターンの分布や変異導入効率の算出も可能である。ただし、莫大なデータの解析にはある程度のバイオインフォマティクスの知識が必要である点と、シーケンズエラーによるバックグラウンドが存在する点については注意が必要である。

以上紹介した解析方法の他にも、変異導入部位に結合するプライマーを設計してPCRを行う方法やサザンブロットニング法、HRMA (high-resolution melting analysis) と呼ばれるPCR産物のヘテロ二本鎖を検出する方法²¹⁾が挙げられる。遺伝子ノックインである程度の長さのDNA断片を挿入する場合やTALENにより数十bp以上の欠損が導入された場合には、単にPCR産物の増幅サイズの差で解析する方法も有効である。遺伝子改変部位と実験目的に応じた適切な解析方法を選択する必要がある。また、ヒトiPS細胞の培養にマウスフィーダー細胞を用いている場合、マウスのDNA配列がPCRで増幅されないようにすることが留意する点である。

IV TALENを用いたジストロフィン遺伝子のゲノム編集

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の機能的欠損によって起こる重度の遺伝性筋疾患である。筆者らはエクソン欠損によりフレームシフトが起こり、ジストロフィンタンパク質が途中から欠失しているDMD患者よりiPS細胞を樹立した。このDMD患者由来iPS (DMD-iPS) 細胞において、TALENを用いてさらなる

フレームシフトを誘導することにより、ジストロフィンタンパク質の機能を回復させることを目的として実験を行った。

SSAアッセイにより選出した高活性のTALENを用いて、DMD患者でジストロフィン遺伝子の欠損エクソンの直後に変異を導入した。また、TALEN切断部位に存在する制限酵素による切断解析を行い、約5~15%の変異導入効率を得ることができた。さらに、変異導入傾向を確認するため、次世代シーケンズ解析を行い、様々な長さの欠損および挿入が確認された (図1B)。最後に、TALEN導入後にサブクローニングを行ったところ、変異導入された中のいくつかのクローンにおいて、ジストロフィンタンパク質のフレームが回復していることを確認した。以上の結果より、特定のTALENを作用させるだけでフレームシフトによる遺伝子異常の回復ができることが示された。

V 目的以外の切断箇所の解析

TALENなどの人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集では、目的ではない部位へ予期せぬ切断が起こるリスクを常に考慮する必要がある。現在、目的部位以外に変異が導入されたかどうかを確認する方法は、主にゲノム上の類似ターゲットサイト解析、エクソームシーケンズ解析と全ゲノムシーケンズ解析の3種類が挙げられる。

まず、ゲノム上に存在するTALENの認識サイトと似たような配列領域をコンピュータ上で検索またはSELEX法^{13), 19)}により同定し、それらの領域をPCRで増幅して変異導入の有無を確認する方法が、非特異的な切断を評価するために用いられている²²⁾。この方法はTALEN結合配列と無関係な本来の目的ではない切断部位の有無を評価することはできないが、簡便な方法であるため最も広く用いられている。

次に、細胞の主な機能を担っているタンパク質のコーディング領域に変異が挿入されなければ、細胞への大きなダメージはないであろうという仮定から、エクソームシーケンズ解析も用いられている¹⁸⁾。しかし、それなりのコストがかかるうえ、エクソン領域の割合は全ゲノムの2%未満のため、他のイントロン領域や発現制御領域は解析できない。

3つ目は全ゲノムシーケンズ解析である。この方法はゲノム全体を網羅的に調べる非常にパワフルな手法であるが、1サンプル解析に100万円近くのコストがかかる。また、シーケンズエラーや各ゲノム領域でのカバー率 (depth of coverage) が一定しないなどの技術的な問題がある。その一

方で、培養細胞はもともと常にゲノム変異が起こりうる環境下にあるため、ゲノム配列上のすべての変異がTALENによって誘導されたのか、あるいは自然誘発の変異であるのかを区別して評価することが困難である。

その他、Gバンド染色やm-FISH法による染色体解析、抗体染色によるDNA損傷部位スポット数のカウント、CGHアレイによるCNV解析、挿入欠損型レンチウイルスを用いたDNA損傷部位のマッピング法²³⁾などが用いられている。目的部位以外への変異導入の重要性は、ゲノム編集を行った細胞の使用目的によっても変化する。単にある遺伝子のノックアウトを解析したい場合には、独立に変異を導入した株を数株同時に解析し、すべてにおいて同様の表現型が得られた場合は非特異的な切断箇所が結果に寄与する可能性はほとんどないと考えられる。一方、TALENを遺伝子治療に応用する場合には、がん抑制遺伝子が破壊されていないかなど、off-target切断のリスクを厳密に評価していく必要がある。

おわりに

iPS細胞研究が急速に進んでいる状況の中で、ヒトiPS細胞の遺伝子改変技術に対する需要も大きく高まっている。まずは基礎研究レベルで、レポーター細胞株の作製や*in vitro*疾患再現モデルにおける病態遺伝子の修復が進んでいくであろう。iPS細胞は患者本人から樹立可能であるため、細胞移植を行う際に拒絶反応を起こしにくいと考えられる。将来的にiPS細胞の遺伝子修復技術を応用すれば、遺伝子修復を施したiPS細胞を分化させ、患者へ移植する遺伝子治療へとつながっていくものと期待している。しかしながら、現状の

HR効率はまだ実用化レベルに達しているとは言えず、安全性や特許などの課題もあり、今後のさらなる改良が待たれる。最近では、ZFNやTALEN以外にも、細菌における核酸ベースの獲得免疫系を模倣したCRISPR/Casシステムが開発されており、さらに簡便なゲノム編集が可能となりつつある²⁴⁾。遺伝子改変技術の日進月歩によって、今後のiPS細胞研究がさらに加速されることを期待しつつ、結びの言葉としたい。

PROFILE 李紅梅

- 京都大学iPS細胞研究所 初期化機構研究部門
- E-mail : kaobai.li@cira.kyoto-u.ac.jp
- 趣味 : マラソンと登山

2008年名古屋工業大学生命・物質工学科卒業、2010年同学未来材料創成工学専攻修士課程修了。2011年京都大学大学院医学研究科博士課程に入学、2012年より学術振興会DC1特別研究員。

PROFILE Knut Woltjen

- 京都大学iPS細胞研究所

PROFILE 高橋和利

- 京都大学iPS細胞研究所 初期化機構研究部門 講師

PROFILE 山中伸弥

- 京都大学iPS細胞研究所 所長/教授

PROFILE 堀田秋津

- 京都大学iPS細胞研究所 初期化機構研究部門 特定拠点助教/京都大学iCeMS 特定拠点助教/JST さきがけ研究員
- E-mail : akitsu.hotta@cira.kyoto-u.ac.jp
- 趣味 : キーボード演奏、スキー、映画鑑賞

2006年に名古屋大学の生物機能工学専攻にて博士課程修了、工学博士。2006年から2010年までカナダのトロント小児病院発生・幹細胞部門にて博士研究員。2010年3月より現職。2010年10月よりJST さきがけ研究員も兼任。

文献

- 1) Yamanaka S; Cell (2009) 137: 13-17
- 2) Zwaka TP, et al; Nat Biotechnol (2003) 21: 319-321
- 3) Irion S, et al; Nat Biotechnol (2007) 25: 1477-1482
- 4) Suzuki K, et al; Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105: 13781-13786
- 5) Liu GH, et al; Cell Stem Cell (2011) 8: 688-694
- 6) Liu GH, et al; Nature (2012) 491: 603-607
- 7) Aizawa E, et al; Mol Ther (2013) 20: 424-431
- 8) Song H, et al; Cell Stem Cell (2010) 6: 80-89
- 9) Howden SE, et al; Proc Natl Acad Sci USA (2011) 108: 6537-6542
- 10) Mae S, et al; Nat Commun (2013) 4: 1367
- 11) Buecker C, et al; Cell Stem Cell (2010) 6: 535-546
- 12) Lombardo A, et al; Nat Biotechnol (2007) 25: 1298-1306
- 13) Hockemeyer D, et al; Nat Biotechnol (2009) 27: 851-857
- 14) Soldner F, et al; Cell (2011) 146: 318-331
- 15) Zou J, et al; Blood (2011) 117: 5561-5572
- 16) Zou J, et al; Blood (2011) 118: 4599-4608
- 17) Sebastiano V, et al; Stem Cells (2011) 29: 1717-1726
- 18) Yusa K, et al; Nature (2011) 478: 391-394
- 19) Hockemeyer D, et al; Nat Biotechnol (2011) 29: 731-734
- 20) Choi S, et al; Hepatology (2013) in press
- 21) Dahlem TJ, et al; PLoS Genet (2012) 8: e1002861
- 22) Watanabe T, et al; Nat Commun (2011) 3: 1017
- 23) Gabriel R, et al; Nat Biotechnol (2011) 29: 816-823
- 24) Mali P, et al; Science (2013) 339: 823-836