

博士論文

アルデヒド脱水素酵素の一遺伝子多型の改変による
代謝酵素活性制御法の開発

大野 元子

アルデヒド脱水素酵素の一遺伝子多型の改変による
代謝酵素活性制御法の開発

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

指導教員 小池和彦教授

大野 元子

目次	頁
1. 要旨	4
2. 序文	5
3. 方法	14
① 細胞	14
② 細胞からのゲノム DNA 抽出	14
③ 細胞の ALDH2 SNP genotyping の確認	15
④ 蛍光タンパク発現によるトランスフェクション効率、編集効率の確認	15
⑤ Western blotting 法によるタンパク発現確認	16
⑥ 各導入手法を用いた Cas9 発現効率の確認	17
⑦ AAVS1/ALDH2ドナーベクター、ALDH2 SNP 編集ドナーベクター、Cas9+gRNA 発現 ベクターの作成	17
⑧ AAVS1/ALDH2 および ALDH2 SNP の遺伝子編集	18
⑨ ALDH2 活性の測定	19
⑩ ALDH2 cDNA 定量 PCR による ALDH2 mRNA 発現測定	20
⑪ レンチウイルスによる Cas9 安定発現細胞株の作成	20
⑫ gRNA の設定と <i>in vitro</i> transcription	20
⑬ gRNA の <i>in vitro</i> 切断効率の確認	21

⑭ T7 エンドヌクレアーゼアッセイによる gRNA の切断効率確認	21
⑮ ssODN (single strand donor oligoDNA)を用いた編集	22
⑯ gRNA + ssODN 導入量と SCR7 の編集効率への影響の検討	23
⑰ 統計分析	24
⑱ プライマー、ssODN	25
⑲ gRNA 認識配列	26
4. 結果	27
① 細胞の ALDH2 SNP genotyping	27
② 各トランスフェクション試薬の導入効率比較	29
③ AAVS1/ALDH2 と ALDH2 SNP の編集	30
④ 遺伝子編集後の ALDH2 の発現確認と活性測定	36
⑤ Cas9 安定発現細胞株の樹立	41
⑥ <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> における gRNA の切断効率の比較	42
⑦ ssODN をドナーとした編集効率の検討	48
⑧ SCR7 添加と gRNA+ssODN 導入量の編集効率への影響の検討	51
5. 考察	53
6. 結語	58
7. 引用文献	59
8. 謝辞	75

1. 要旨

アルコール代謝酵素の一つ Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) は一塩基多型により活性が変化し、ヘテロ遺伝子型の人では低活性によるアセトアルデヒド濃度上昇のため発癌リスクが高くなる。本研究では、遺伝子編集手法による ALDH2 の活性回復を目指した検討を行った。

4 量体で機能する ALDH2 は変異型分子の混在で活性が低下するため、野生型 ALDH2 の過剰発現より一塩基多型改変の方が十分な機能回復が得られる可能性が予測され、実験的にも示唆された。しかし遺伝子編集の効率は低く、実用化には更なる条件の最適化が必要と思われた。

以上の検討は、新たな発癌予防法開発の基盤になると考えられた。

2. 序文

アルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenase、ALDH) はアルコール代謝に関わる酵素である。人体に摂取されたアルコールは肝臓において、アルコール脱水素酵素 (Alcohol dehydrogenase、ADH) によりアセトアルデヒドへ、さらに ALDH により酢酸へと代謝される[1]。ALDH は多くの生物に存在する酵素で、そのうちヒト肝細胞内でアルコール代謝に関与する酵素 ALDH2 は、ヒト第 12 染色体に遺伝子が存在し、転写・翻訳後はミトコンドリアに局在して機能する。翻訳直後の ALDH2 前駆体タンパクは 517 アミノ酸であるが、N 末端に 17 アミノ酸からなるミトコンドリア移行シグナルペプチドが存在し、ミトコンドリア移行後に切断されて 500 アミノ酸の成熟型になる。ALDH2 の基質であるエタノールの中間代謝産物アセトアルデヒドは反応性の高いカルボニル基を持ち、正電荷を帯びたカルボニル基の炭素原子が求核付加反応を受けやすく[2]、DNA 付加体を形成する結果 DNA 変異を引き起こし[3-5]、発癌のリスクとなる[1, 6-8]。

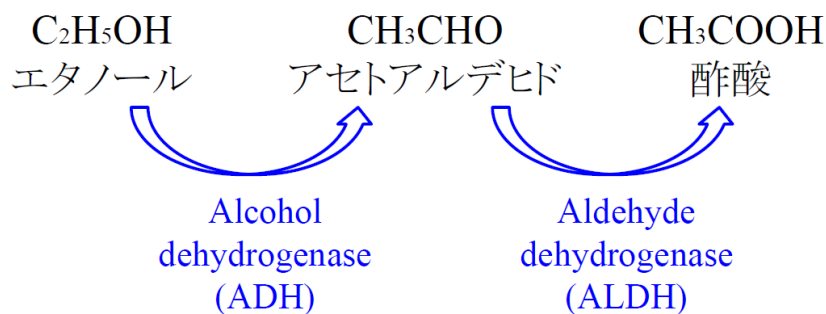


図1 アルコール代謝と酵素

ALDH2 の活性に影響を及ぼす一塩基多型 (single nucleotide polymorphism、SNP) として、487 番目 (前駆体においては 504 番目) のアミノ酸をグルタミン酸からリジンに変える変異 (E487K) が知られている (図 2)。JSNP データベース検索による ALDH2 遺伝子内 SNP は 19 か所あるが、このうち exon 内 SNP は 2 か所で、アミノ酸変異を伴いタンパク機能に影響する SNP はこの E487K のみである。

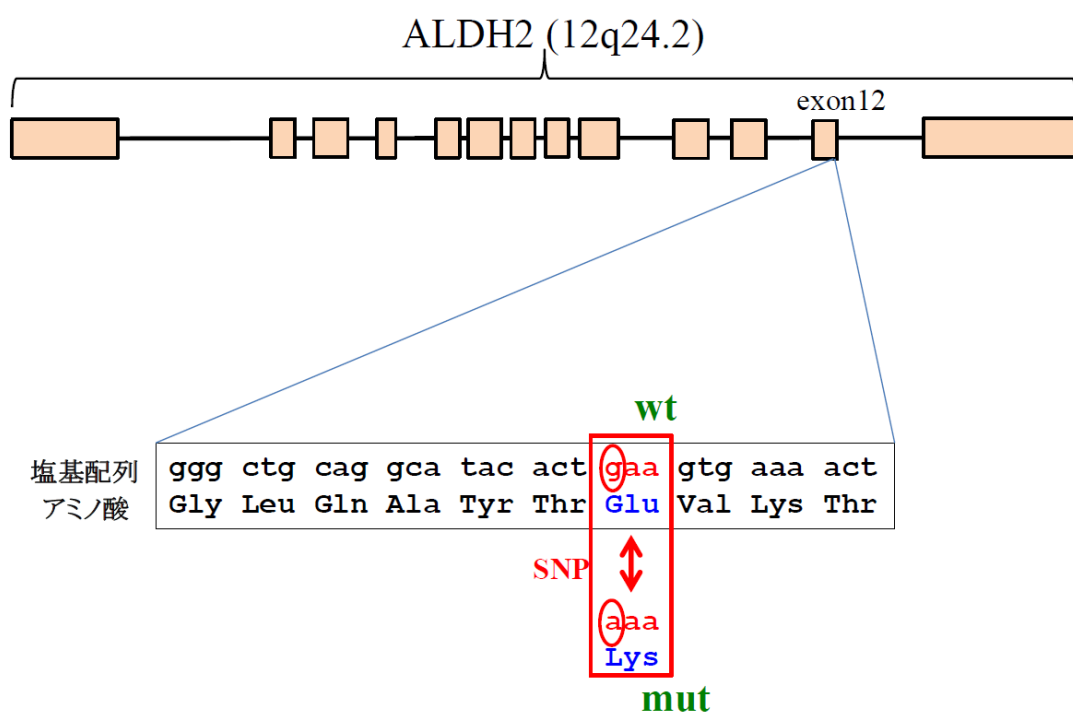


図 2 ALDH2 の SNP とアミノ酸変異

この SNP による 2 つの遺伝子型は、活性を持つ野生型 (wild type: wt) の ALDH2-1 と活性のない変異型 (mutant type: mut) の ALDH2-2 と呼ばれる。この SNP の変異型はアジア人に多く分布し、NCBI dbSNP による全体の頻度は 3.6% であるが、JSNP データベースによる日本人での頻度は約 30% である。日本人における各遺伝子型の割合は、

ALDH2-1/ALDH2-1 (wt/wt、野生型ホモ) が約 50%、ALDH2-1/ALDH2-2 (wt/mut、ヘテロ) が 30~40%、ALDH2-2/ALDH2-2 (mut/mut、変異型ホモ) が 10%である (図 3)。

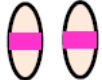
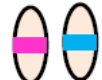
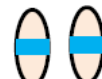
遺伝子型	染色体	日本人における割合
ALDH2*1/ALDH2*1 (wt/wt)		50%
ALDH2*1/ALDH2*2 (wt/mut)		30~40%
ALDH2*2/ALDH2*2 (mut/mut)		10%

図 3 ALDH2 の遺伝子型と日本人における割合

ALDH2 の 3 次元構造は4つの同じサブユニットによるホモ 4 量体酵素であるが、正確には 2 つのサブユニットが 2 量体を形成し、2 つの 2 量体同士が更に結合した形をとる。野生型 ALDH2 では、487 番目のアミノ酸 Glu⁴⁸⁷ は同じサブユニット分子の Arg²⁶⁴ および 2 量体を形成する隣接した分子の Arg⁴⁷⁵ と水素結合を形成する。変異型サブユニットは野生型とも変異型とも dimer を形成するが、変異した Lys⁴⁸⁷ は上述の分子内・分子間水素結合を形成できず、NAD⁺結合領域の変形により活性が低下する[9]。4 量体の各サブユニットが均等に活性に寄与するわけではなく、変異型サブユニットの活性低下作用が critical のため、その存在は大幅に活性を低下させる。野生型サブユニット (E) と変異型サブユニット (K) の 2 量体からなる 4 量体分子の構成は 6 種類あり得るが、変異型ホモ 4 量体 (K₄) のミカエリス定数 (Km) は野生型ホモ 4 量体 (E₄) に比較し 150~200 倍、酵素活性は 2.5%である

[10, 11]。ヘテロ 4 量体では変異型サブユニット 1 つ (E_3K_1) で酵素活性は 51.2%、変異型サブユニット 3 つ (E_1K_3) では変異型ホモ 4 量体 (K_4) と同じ 2.5%と推定されるが、ヘテロ 4 量体での全体の活性は 13%である[11]。

ヘテロ (wt/mut) の遺伝子型を持つ人はアルコール摂取は可能だが、ALDH2 活性が弱いため飲酒後に血液中や唾液中のアセトアルデヒド濃度が上昇し、アセトアルデヒドの高い反応性による DNA 損傷により発癌リスクが増加する[3-5]。食道癌、頭頸部癌、肝臓癌、大腸癌、乳癌など様々な臓器の癌との関連が知られているが、特に食道癌・頭頸部癌のリスクが高く、日本人におけるヘテロ遺伝子型の口腔癌・咽頭癌・下咽頭癌・喉頭癌の相対リスクは 11~13 倍[8]、食道癌ではヘテロ遺伝子型の少量飲酒での相対リスクが 1.8~3.9 倍、多量飲酒では 15~39 倍と、飲酒量に応じてリスクが上昇するという報告がある[12, 13]。さらに、心血管疾患[14-16]、高血圧[17]、糖尿病[18]、脂質異常[19]、脳血管疾患[20]など様々な疾患に関連があると報告されている。特に心血管疾患については、酸化ストレスによって生じたアルデヒドが虚血による心筋障害を増大させ[14, 21]、また狭心症治療薬のニトログリセリンの活性化に ALDH2 活性が必要なことから[22]、ALDH2 が飲酒と関連なく心筋保護作用を持つ可能性も示唆されている。従って、ALDH2 の活性改善は様々な疾患を予防し健康を増進する新たなインターベンションの手法となり得るかもしれない。

一方、近年遺伝子編集の手法が目覚ましく発達し、分子生物学の分野において一般的に応用されるようになってきた。遺伝子編集とは、ゲノムにおける任意のターゲット部位に対し DNA 二重鎖切断を人工的に導入し、DNA 修復機構を利用して遺伝子ノックアウトや

ノックインなどを起こすという手法である[23, 24]。レンチウイルスやレトロウイルスなどによる遺伝子導入では外来配列がゲノム内にランダムに組み込まれるのに対し、遺伝子編集では標的とする任意の配列を改変することが可能である。

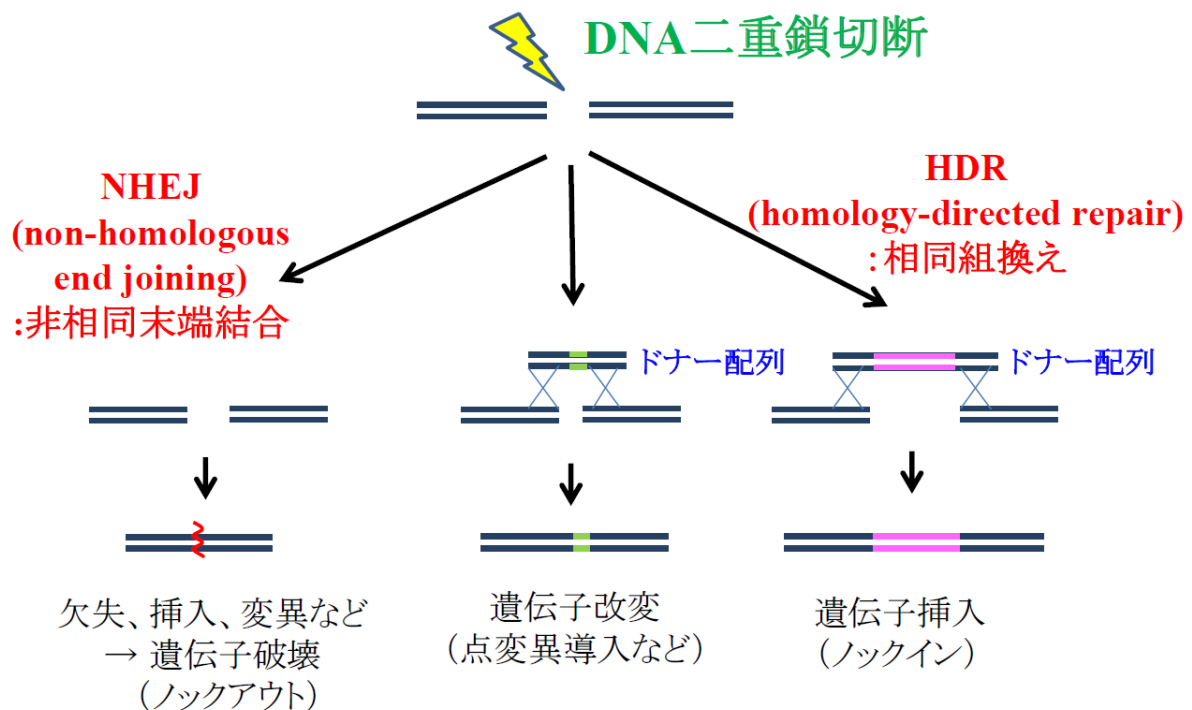


図4 DNA 二重鎖切断に伴う遺伝子修復機構

DNA 二重鎖切断の修復機構には、主に非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) と、相同組換え修復 (homology-directed repair: HDR) の二種類がある (図5)。NHEJは切断されたDNA末端をそのまま結合するもので、欠失や変異などを伴うことが多く、遺伝子破壊をもたらすのに対し、相同組換え修復は相同性のある配列 (ドナー配列) を鋳型として修復するもので、導入したいドナー配列を共に導入しておくことで、点

変異や遺伝子など目的の配列を挿入することができる。従って遺伝子編集においては、ノックアウトもしくはノックインのいずれの場合でも、編集したい任意の部位に DNA 二重鎖切断を入れることができるヌクレアーゼが必要となる。

従来の遺伝子編集手法である Zinc finger nuclease (ZFN) [25-28]や Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) [28-32]は共に Fok1 ヌクレアーゼドメインと DNA 認識部位からなる人工ヌクレアーゼで、ターゲット部位に対しヌクレアーゼが左右から特異的に結合し中央で Fok1 ドメインが 2 量体を作って DNA を切断する、というタイプのものであるが、一つのターゲットに対し配列特異的な二種のタンパクをカスタマイズする必要があり、簡便な方法であるとは言い難かった。一方、新しく登場した Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas system[33-37]は、元々細菌などの持つ外来 DNA に対する防御機構を応用したもので、現在 *Streptococcus pyogenes* の持つ Cas9 が研究用ツールとして実用化され、一般的に用いられるようになってきた。この手法では、ヌクレアーゼである Cas9 と、ターゲットに相補的に結合する短い一本鎖の single guideRNA (sgRNA または gRNA) が複合体を形成し、gRNA によってターゲット部位に Cas9 が誘導され DNA 二重鎖切断を起こす[38-40] (図 6)。ターゲットとなり得る条件としては PAM (proto-spacer adjacent motif) と呼ばれる NGG 配列の存在が必要であり、gRNAはこの NGG の上流 20 塩基と相補的な配列を持つように設計する。この条件を満たせば比較的フレキシブルにターゲットを設定することが可能であり、またターゲットに関わらずヌクレアーゼの Cas9 は共通で、gRNA をカスタマイズするだけで様々なターゲットを切断することができる

め、これまでの ZFN や TALEN よりも簡便な遺伝子編集ツールとして急速に広まり、より幅広いターゲットや目的に対し適用が試みられている。

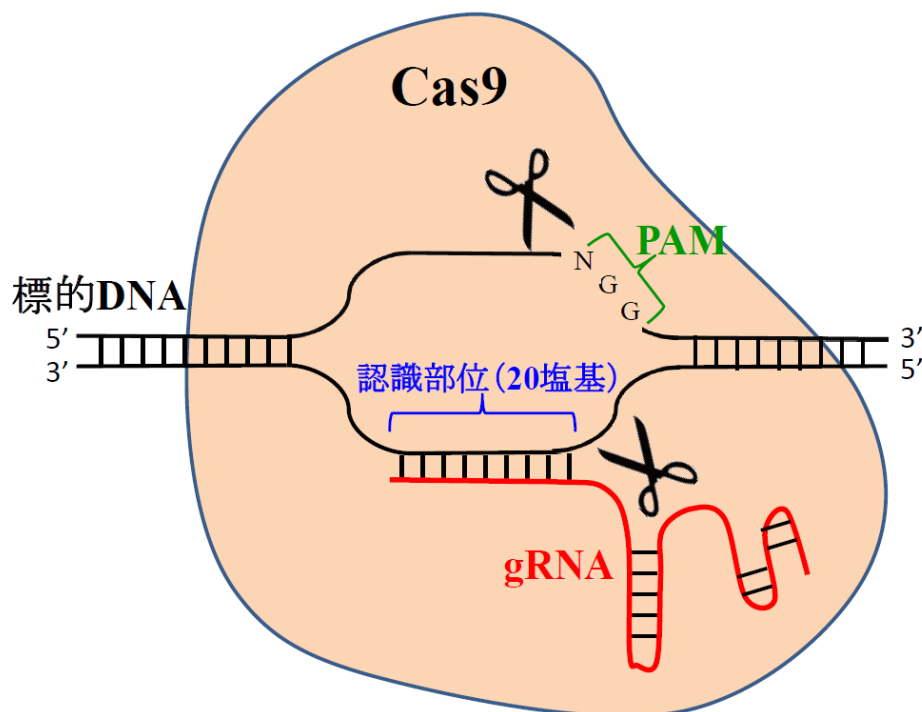


図 5 CRISPR/Cas system

Cas9 スクレアーゼと gRNA が複合体を形成し、gRNA が標的 DNA に相補的に結合して Cas9 を導く。標的部位は NGG の配列 (PAM : proto-spacer adjacent motif) を持つことが条件であり、NGG の上流で DNA2 重鎖切断が起こる。

レンチウイルスやレトロウイルスを用いた遺伝子編集による治療は、特に血液領域で進歩が目立ち、多くの血液疾患で既にヒトを対象にした臨床試験も行われている (表 1)。血液疾患では、患者由来の造血幹細胞を一旦取り出した後、体外で遺伝子操作を行い、得られた細胞を体内に戻すという *ex-vivo* editing の手法をとりやすく、新たな遺伝子の導入が有効な場合は効果的である。一方、機能喪失型変異でなく変異そのものが有害である場合、病因となる遺伝子自体を編集する必要がある。ZFN、TALEN、CRISPR といった遺伝子編集

技術はこうした特定のターゲットへの編集に対し応用が試みられているが、血液以外の領域では *ex-vivo editing* の技術が十分確立されていない面が多く、現在は体内で直接に編集を行う *in-vivo editing* についてのマウスレベルでの報告が徐々に出てきている (表 2)。しかし *in-vivo editing* のヒトへの臨床応用のためには、更に十分な編集効率の上昇・安全性の担保が必要と考えられる。

	標的	導入分子	viral vector	文献
SCID	造血幹細胞	ADA, IL-2R gamma chain	γ -RV	[41-43]
β -サラセミア	造血幹細胞	β -globin, cHS4 insulator	SIN LV	[44]
Fanconi 貧血	造血幹細胞	FANC-A	SIN LV	[45]
Wiscott-Aldrich 症候群	造血幹細胞	WASP	γ -RV	[46]
慢性肉芽腫症	造血幹細胞	gp91	γ -RV	[47]
白質ジストロフィー	造血幹細胞	ABCD1, ARSA	SIN LV	[48]

表1 ウイルスを用いたヒトへの遺伝子編集を用いた治療

レンチウイルス・レトロウイルスによる遺伝子編集を用いた治療で、現在ヒトへの臨床試験が進んでいるもの。すべて造血幹細胞が標的であり、いずれも *ex-vivo editing* による。

	標的細胞	標的分子	導入コンストラクト	標的生物	edit -ing	nuclease	編集 様式	文献
血液								
HIV 感染症	CD4 T 細胞	CCR5	adenoviral vector	human	ex	ZFN	NHEJ	[49, 50]
神経・筋								
Duchenne 型筋ジストロフィー	筋細胞	Dystrophin	AAV vector	mouse	in	CRISPR	NHEJ	[51-53]
肝臓								
α 1 アンチトリプシン欠損症	iPS 細胞	α 1-antitrypsin	plasmid	mouse	ex	ZFN	HDR	[54]
遺伝性高チロシン血症	肝細胞	Fah	plasmid	mouse	in	CRISPR	HDR	[55]
血友病 B	肝細胞	凝固因子 IX	AAV vector	mouse	in	ZFN	HDR	[56, 57]
慢性 B 型肝炎	肝細胞	HBV genome	plasmid	mouse	in	CRISPR	NHEJ	[58, 59]
						TALEN		[60]
その他								
嚢胞線維症	腸幹細胞	CFTR	plasmid	human organoid	ex	CRISPR	HDR	[61]
遺伝性白内障	受精卵	γ C-crystallin	Cas9 mRNA, ssODN	mouse	in	CRISPR	HDR	[62]

表2 遺伝子編集技術を用いた治療の試み

ZFN、TALEN、CRISPR といった遺伝子編集技術による報告。HIV 感染症に関してはヒトでの臨床試験が行われているが、その他は動物実験レベルのものが多い。

本論文では、日本人に多く分布する ALDH2 SNP の変異型が、癌を初めとした多くの疾患と関連することに着目し、遺伝子編集の手法を用いてヘテロ (wt/mut) から野生型ホモ (wt/wt) への SNP 改変によりタンパク機能を改善し、これらの疾患リスクを下げる可能性を探ることを目的とした。ここで、ALDH2 が 4 量体で機能するタンパクであることから、外来遺伝子の強制発現と ALDH2 SNP の直接編集を比較し、4 量体という特徴が編集の手法とタンパク機能改善にどのように影響するか、また臨床応用に向けて更に遺伝子編集の効率を上げるための様々な条件や手法について検討した。

3. 方法

① 細胞

ヒト腎臓上皮細胞の 293T 細胞は American type culture collection (ATCC) より購入し、10%胎児ウシ血清及び penicillin、streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) を用いて 37°C、5% CO₂ 環境下にて培養した。

ヒト肝細胞の JHH1 細胞、JHH2 細胞、JHH5 細胞、JHH6 細胞、JHH7 細胞は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、10%胎児ウシ血清および penicillin、streptomycin を添加した William's E 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 環境下にて培養した。

ヒト肝細胞の JHH4 細胞は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、10%胎児ウシ血清および penicillin、streptomycin を添加した MEM 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 環境下にて培養した。

ヒト肝細胞の Huh1 細胞、Huh7 細胞、Alexander 細胞は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより、ヒト肝細胞の Huh6 細胞は理化学研究所細胞材料開発室より購入し、10%胎児ウシ血清および penicillin、streptomycin を添加した D-MEM 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 環境下にて培養した。

② 細胞からのゲノム DNA 抽出

12well Plate に播種した細胞を 0.25%トリプシン処理にてはがし、約 4×10^5 個の細

胞を遠心してペレットにした後 PBS に懸濁し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて細胞 DNA を抽出した。得られた DNA は NanoDrop1000 (Scrum) により濃度を定量した。

③ 細胞の ALDH2 SNP genotyping の確認

各細胞の ALDH2 の SNP genotyping は、細胞から抽出した DNA を鋳型とし、SNP の wt または mut に対応した 2 種の Reverse (Rv) プライマーを用いて、それぞれ La Taq DNA Polymerase (TaKaRa Bio) で PCR を行うことにより確認した。プライマーと一致した SNP の存在に応じて 135 kb の断片が増幅されることから、得られた反応溶液を 2% agarose gel にて電気泳動し、DNA 断片の増幅の有無により SNP の遺伝子型を確認した。

TaqMan PCR による ALDH2 SNP genotyping では、TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific) の ALDH2 SNP に対応したプライマー及びプローブのセットと TaqMan® GTXpress™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用し、StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により増幅・測定を行い、DNA 断片の増幅曲線により SNP の遺伝子型を確認した。

④ 蛍光タンパク発現によるトランスフェクション効率、編集効率の確認

4 well スライドチャンバーに細胞を播種し、24 時間後に copGFP (Chlamyopsin Green Fluorescent Protein) 発現プラスミド pSIF1-H1-siLuc-copGFP (System Bioscience)

を Fu-GENE HD transfection reagent (Promega) または Lipofectamine 3000 Reagent (ThermoFisher Scientific) を用いて細胞に導入し、48 時間後に蛍光観察により各トランスフェクション試薬の導入効率を比較した。

ALDH2 の遺伝子編集後の GFP による編集効率確認では、編集後 7 日後に 4 well スライドチャンバーに細胞を播種し、編集後 10 日後に蛍光観察により効率を確認した。

細胞は 2% パラホルムアルデヒド (PFA) + 0.1% Triton-X にて室温で 15 分間固定、透過処理を行った後、1 × PBS で洗浄し VECTASHIELD HardSet Mounting Medium with DAPI (Vector) で封入して顕微鏡により観察を行った。

⑤ Western blotting 法によるタンパク発現確認

細胞に溶解用バッファー(50 mM Tris-HCl、1% Triton-X、5 mM EDTA、1 mM Na₃VO₄、50 mM NaF、Protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche)) を添加し、セルスクレイパーにより細胞溶解液を回収し、上清をサンプルとした。サンプルは熱変性後、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により泳動分離し、PVDF メンブレン (Amersham Bioscience) に転写した。メンブレンを Immunoshot reagent 1 (コスモバイオ) で希釈した一次抗体で 4°C 一晩反応後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 IgG 二次抗体と室温で 1 時間反応し洗浄した後、イムノスター®LD (Wako) で発色させ、LAS-3000 image analyzer (Fuji Photo Film Co.) で観察した。

一次抗体は、ALDH2 に対しウサギ抗 ALDH2 抗体 (HPA051065) (Atlas

Antibodies)、Cas9 に対しマウス抗 Cas9 抗体 [7A9-3A3] (ab191468) (abcam)、 β -actin に
対しマウス抗 beta-actin9 抗体 (clone AC-15) (Sigma Aldrich) を用いた。二次抗体は
ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey) 、ECL Mouse IgG, HRP-linked
whole Ab (from sheep) (GE Healthcare Life Science) を用いた。

⑥ 各導入手法を用いた Cas9 発現効率の確認

Cas9 を様々な手法により導入した後、Cas9 発現を Western blotting により確認した。
12 well plate に 293T・JHH7 細胞を播種し、各手法にて Cas9 を細胞に導入後、24、48、72
時間後に細胞を回収し、Western blotting 用サンプルとした。プラスミドによる導入では
PrecisionX Cas9 SmartNuclease System (System Bioscience) 内の Cas9 + gRNA 発現ベク
ターを、Fu-GENE HD transfection reagent (Promega) を用いて導入した。

⑦ AAVS1/ALDH2ドナーベクター、ALDH2 SNP 編集ドナーベクター、Cas9 + gRNA 発現 ベクターの作成

AAVS1 編集用の ALDH2 cDNA ドナーベクター作成のため、JHH5 細胞 (wt/wt)
より ISOGEN (Wako) を用いて RNA を抽出し、得られた RNA を SuperScript III (Thermo
Fisher Scientific) により逆転写し、野生型 ALDH2 cDNA を得た。この cDNA を AAVS1
Safe Harbor TALE-Nuclease Kit (System Bioscience) 内の pAAVS1 (Puro 耐性遺伝子 +
GFP 遺伝子あり) に組み込んで、AAVS1 編集用ドナーベクターを作成した。

ALDH2 SNP 編集用のドナーベクターは、ALDH2 遺伝子の野生型 SNP の両側約 800 bp からなる homology arm で薬剤選択マーカー (puro 耐性遺伝子、hTK) と GFP 遺伝子を挟み、PiggyPac transposase 処理にて不要な配列を除くことで ALDH2 の正常な配列が復帰されるように設計したドナーベクターを、System Bioscience 社に依頼して作成した。

Cas9 + gRNA 発現ベクターは、AAVS1/ALDH2 の編集には Cas9 および AAVS1 に対応した gRNA を共発現する Cas9 SmartNuclease AAVS1-gRNA Targeting Vector (System Bioscience) を用いた。ALDH2 SNP 編集には PrecisionX Cas9 SmartNuclease System (System Bioscience) を用いて、ALDH2 SNP 近傍を認識しかつドナーベクターを認識しないよう設定した gRNA 配列を Cas9 発現ベクターに組み込んで作成した。(ここで設定した gRNA 認識配列は⑬の intron-1 に相当する。)

⑧ AAVS1/ALDH2 および ALDH2 SNP の遺伝子編集

293T 細胞・JHH7 細胞を 12 well plate に播種し、24 時間後 50~70% confluent の細胞に対し、ドナーベクター及び Cas9 + gRNA 発現ベクターを Fu-GENE HD transfection reagent (Promega) または Lipofectamine 3000 Reagent (ThermoFisher Scientific) を用いて推奨プロトコールに従ってトランスフェクションした。

編集後の細胞を 10 cm dish に低密度で播種した後 5 日目以降に puromycin 2 μ g/ml にて編集が起こったと思われる細胞を選択し、コロニーを単離した。編集の確認は、

単離したコロニーの細胞より抽出した DNA を鋳型として、挿入された配列の両端 (5'側および 3'側) における gap をまたぐように設定した PCR プライマーセットにより PCR で増幅をみることで確認した。ALDH2 SNP の編集では、選択したコロニーの細胞に対し、PiggyBac transposase expression vector (System Bioscience) を Fu-GENE HD transfection reagent (Promega) を用いてトランスフェクションし、ALDH2 遺伝子内に組み込んだ薬剤選択マーカーなどの余計な配列 (GFP + puro + hTK) を除去した後、Ganciclovir 5 μ M にて negative selection を行い、ALDH2 遺伝子配列が編集され復帰したと思われる細胞を選択し、コロニーを単離した。

⑨ ALDH2 活性の測定

ALDH2 活性の測定には、ALDH2 Activity Assay Kit (Abcam) を用いた。10 cm dish に播種しほぼ 100% confluent にした細胞を 0.25%トリプシンにて処理し、細胞懸濁液を計数後、500 \times g で 10 分遠心して回収した細胞ペレットを PBS でリンスし、 2×10^7 個 / ml になるよう kit に付属の Extraction Buffer を加え、この上清を測定サンプルとした。ALDH2 が触媒する反応 $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+$ の反応産物 NADH が 450 nm の光を吸収することから、各細胞サンプルの 450 nm の吸光度 (OD_{450}) を Model 680 Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories) を用いて振盪しながら 1 分毎に 30 分計測し、吸光度の経時変化の傾き ($\text{OD}_{450}/\text{min}$) を ALDH2 活性とした。

⑩ ALDH2 cDNA 定量 PCR による ALDH2 mRNA 発現測定

6 well plate に播種し 100% confluent にした各細胞より NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL)を用いて RNA を抽出し、得られた RNA を SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) により逆転写し、cDNA ライブラリーを得た。これを template とし、ALDH2 の exon 内 primer (約 100 bp を増幅) と FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics) を用いて定量 PCR を行い、細胞内の ALDH2 mRNA 発現量を比較した。なお、コントロールとして GAPDH も共に増幅した。

⑪ レンチウイルスによる Cas9 安定発現細胞株の作成

Cas9 安定発現用レンチウイルスは、293T 細胞に Cas9 発現用レンチウイルスベクター CASLV100PA-1 (System Bioscience) 及び pPACKH1 Lentivector Packaging Kit (System Bioscience) を Effectene (QIAGEN) を用いてトランスフェクションし、細胞上清を回収して作成した。得られたレンチウイルス粒子を 293T、JHH7 細胞に 0.1% polybrene (Merck Millipore) と共に添加し、puromycin 2 μ g/ml にて選択し、Cas9 安定発現細胞株を得た。

⑫ gRNA の設定と *in vitro* transcription

ALDH2 SNP の近傍において、Cas9 のターゲットとなる PAM (NGG 配列) を exon 内で 2 か所、intron 内で 4 か所の計 6 か所設定し、それぞれの PAM に対応する gRNA を

Guide-it sgRNA *in vitro* transcription kit (Clontec laboratories) を用いて *in vitro* transcription により合成し、DNaseI処理、フェノール・クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿にて精製した。

⑬ gRNA の *in vitro* 切断効率の確認

In vitro において gRNA をターゲット DNA および Cas9 nuclease と反応させ、各 gRNA の切断効率を比較した。ターゲット DNA は、293T 細胞ゲノム DNA を鋳型として ALDH2 SNP を含む約 2 kb の断片 (SNP 近傍にて切断すると 1.4 kb + 0.6 kb となる) を PCR にて増幅し、QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) により精製した。得られたターゲット DNA と *in vitro* transcription で合成した gRNA に、Guide-it sgRNA Screening kit (Clontec laboratories) 内の Cas9 nuclease を添加して反応させた後、1.5% アガロースゲルにて電気泳動し切断断片を確認した。電気泳動結果を元に各バンド強度を ImageJ により定量解析し、未切断断片を a、切断された 2 断片を b および c として、切断断片の割合 (f_{cut}) を論文を参考に[63] 以下の式により求めた。

$$f_{cut} = (b+c) / (a+b+c)$$

⑭ T7 エンドヌクレアーゼアッセイによる gRNA の切断効率確認

DNA 二重鎖内の相補的結合のミスマッチを認識して切断する T7 エンドヌクレアーゼを用いたアッセイにより、各 gRNA による細胞への変異導入効率を確認した。12 well

plate に播種した 293T-Cas9 安定発現細胞株に gRNA 1 μ g を Lipofectamine MessengerMAX Reagent (ThermoFisher Scientific) を用いて導入し、編集 72 時間後の細胞より QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) にて細胞ゲノム DNA を抽出した。これを鋳型として、SNP を含む約 540 bp の配列 (SNP 近傍で切断すると 140 bp + 400 bp になる) を 2 段階 PCR にて増幅した。得られた断片を 95°C で 2 分熱し DNA を一本鎖に変性させた後、85°C → 30°C に 10 分間かけて徐々に冷却し再アニーリングさせ、編集により変異が入った部位での DNA 二重鎖のミスマッチを形成させた。得られたサンプルを T7 Endonuclease I (New England Biolabs) にて 20 分処理後、10% TBE アクリルアミドゲルにて電気泳動し、切断断片の濃度により各 gRNA の変異導入効率を比較した。電気泳動結果を元に各バンド強度を ImageJ により定量解析し、未切断断片 a、切断された 2 断片 b および c として切断断片の割合 (f_{cut})、及び f_{cut} より想定される変異導入の割合 (indel (%)) を論文を参考に[63]以下の式により求めた。

$$f_{cut} = (b+c) / (a+b+c)$$

$$\text{indel (\%)} = 100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{cut}})$$

⑮ ssODN (single strand donor oligoDNA) を用いた編集

編集効率の向上を図り、ssODN (single strand donor oligoDNA) [64]をドナーとして作成した。ssODN は中央部に ALDH2 の正常型 SNP を持ち、gRNA に対応して PAM 配列・gRNA 認識配列に変異が入りかつアミノ酸を変更しないように設計し、またこの左右に

相同組換えのための homology arm (90 base) をつけ、全長約 200 base とした。gRNA の exon1,2、または intron3,4 にそれぞれ対応した 2 種の ssODN を設計し、Integrated DNA Technologies 社に合成を依頼した。

Cas9 安定発現細胞である JHH7-Cas9 を 12 well plate に播種し、gRNA 0.5 μ g 及び ssODN 0.5 μ g を Lipofectamine 3000 によって導入した。編集 72 時間後の細胞より抽出した細胞 DNA を鋳型とし、編集後の変異を 3' 末端に配置した Forward (Fw) プライマーとその 400 bp 下流の Reverse (Rv) プライマーによる PCR を行い、電気泳動により増幅を確認した。電気泳動結果を元に増幅されたバンド強度を ImageJ により定量解析し、相対的な編集効率を求めた。

⑩ gRNA + ssODN 導入量と SCR7 の編集効率への影響の検討

NHEJ に関与する DNA ligaseIV の阻害剤 SCR7 は、NHEJ を抑制することで遺伝子編集における相同組換えの効率を上げることが報告されている[65]。従って、SCR7 の DNA 切断や編集への影響を確認するため、gRNA 及びドナーのトランスフェクション時に DMSO に溶解した SCR7 (Selleck Chemicals) を最終濃度 1 μ M にて細胞に添加し、添加しない場合と比較した。この際、gRNA と ssODN の導入量・導入比率の影響も共に調べるため、gRNA + ssODN の異なる導入量条件を 5 種設定し、negative control と合わせ 6 種の条件について、SCR7 1 μ M の添加・非添加それぞれで導入を行った。

Cas9 安定発現細胞である JHH7-Cas9 を 12 well plate に播種し、各導入条件で

gRNA 及び ssODN を Lipofectamine 3000 によって導入した。編集 72 時間後の細胞より抽出した細胞 DNA を鋳型とし、⑮と同様に編集後配列に特異的なプライマーによる PCR を行い、電気泳動により増幅を確認した。(コントロールとして、同じ位置に相当する編集前の配列のプライマーを用いた PCR も施行した。)電気泳動結果を元に増幅されたバンド強度を ImageJ により定量解析し、相対的な編集効率を求めた。

⑰ 統計分析

得られた数値は各群の平均値±標準誤差として示した。2 群間の比較検定には Student の t 検定を用いた。得られた p 値は 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

⑱ プライマー、ssODN

ALDH2 SNP genotyping PCR	Fw	5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3'
	Rv(wt)	5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTC-3'
	Rv(mut)	5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTT-3'
ALDH2 cDNA qPCR	Fw	5'-CCTTTGGTGGCTACAAGATGTC-3'
	Rv	5'-GCAGGTCCCACACTCACAG-3'
GAPDH cDNA qPCR	Fw	5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTG-3'
	Rv	5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGC-3'
ALDH2 SNP insert gap PCR	5'Fw	5'-CATATCACGAAGTCAAGAGTTTG-3'
	5'Rv	5'-CGTACGTCACAATATGATTATC-3'
	3'Fw	5'-CGTTCAGAGGAAAGCGATC-3'
	3'Rv	5'-GCTCCATTCCAACCTAATAG-3'
AAVS/ALDH2 insert gap PCR	5'Fw	5'-CCGGAACCTCGCCCTCTAAC-3'
	5'Rv	5'-CCCGTGAGTCAAACCGCTAT-3'
	3'Fw	5'-AGCTATCTGGTCTCCCTTCC-3'
	3'Rv	5'-GATGAGGAAGAGGAGAACAG-3'
T7 endonuclease assay 1 _{st} PCR	Fw	5'-CTCATACCAGTAATCCCAGTG-3'
	Rv	5'-GGTGATTCCAATCCTGGAAAG-3'
T7 endonuclease assay 2 _{nd} PCR	Fw	5'-CCAAGAGTGATTTCTGCAATC-3'
	Rv	5'-GCCTTGGCGTATAACGAAGC-3'
ssODN (exon1,2)	Fw	5'-GGTCAACTGCTATGATGTGTTTGGAGCCCAGT CACCCTTTGGTGGCTACAAGATGTCTGGGGAGTG GCCGGGAGTTGGGCGAGTACGGACTACAAGCTT AACTGAAGTGAAAACCTGTGAGTGTGGGACCTG CTGGGGGCTCAGGGCCTGTTGGGGCTTGAGGG TCTGCTGGTGGCTCGGAGCCTGCTGGGGGAT -3'
ssODN (intron3,4)	Fw	5'-TGTTTGGAGCCCAGTACCCTTTGGTGGCTAC AAGATGTCTGGGAGTGGCCGGGAGTTGGGCGA GTACGGGCTGCAGGCATACACTGAAGTGAAAAC TGTGAGTGTGGAAGCTTCTGGGGGCTCAGGGCC TGTTGGGGCTTGAGGGTCTGCTGGTGGCTCGGA GCCTGCTGGGGGATTGGGGTCTGTTGGGGGCT CGGGG-3'
SSODN insert PCR	Fw(NC)	5'-GAGTACGGGCTGCAGGCA-3'
	Fw(e2)	5'-CGAGTACGGACTACAAGCT-3'
	Fw(i3,i4)	5'-AACTGTGAGTGTGGAAGCTT-3'
	Rv	5'-TCCGAGCCACCAGCAGAC-3'

⑳ gRNA 認識配列

exon 1 (e-1)	5'-GTTGGGCGAGTACGGGCTGC-3'
exon 2 (e-2)	5'-GCCGGGAGTTGGGCGAGTAC-3'
intron 1 (i-1)	5'-ACTGTGAGTGTGGGACCTGC-3'
intron 2 (i-2)	5'-TAAAGTGAAAAGTGTGAGTG-3'
intron 3 (i-3)	5'-AAAGTGAAAAGTGTGAGTGT-3'
intron 4 (i-4)	5'-ACAGGCCCTGAGCCCCAGC-3'

4. 結果

① 細胞の ALDH2 SNP genotyping

まず最初に、各細胞における ALDH2 遺伝子の SNP genotyping を調べた。PCR 法では 293T、JHH5 細胞が wt プライマーでのみ増幅しており遺伝子型は wt/wt と考えられるのに対し、JHH7 細胞では wt 及び mut の 2 種のプライマーで共に増幅がみられ、遺伝子型は wt/mut と考えられた (図 6)。

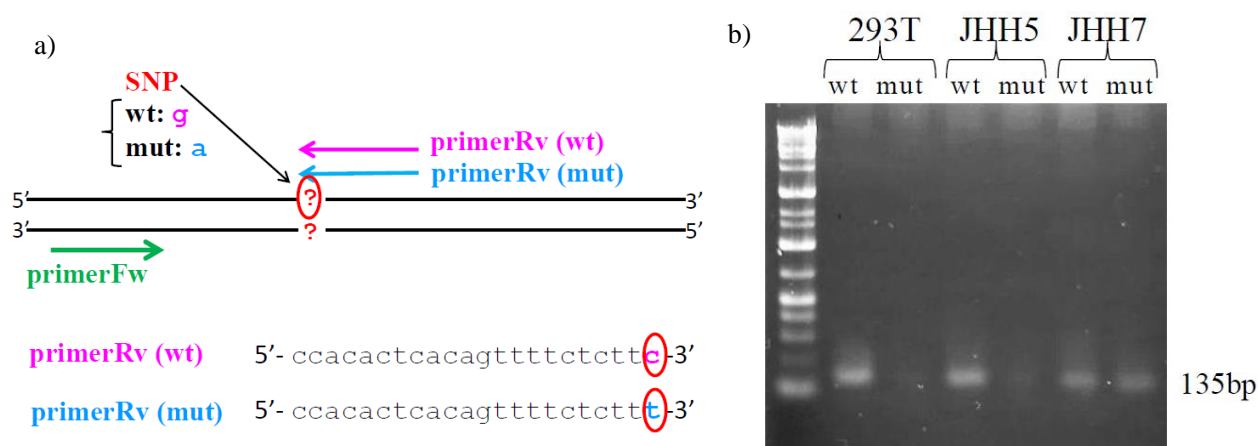
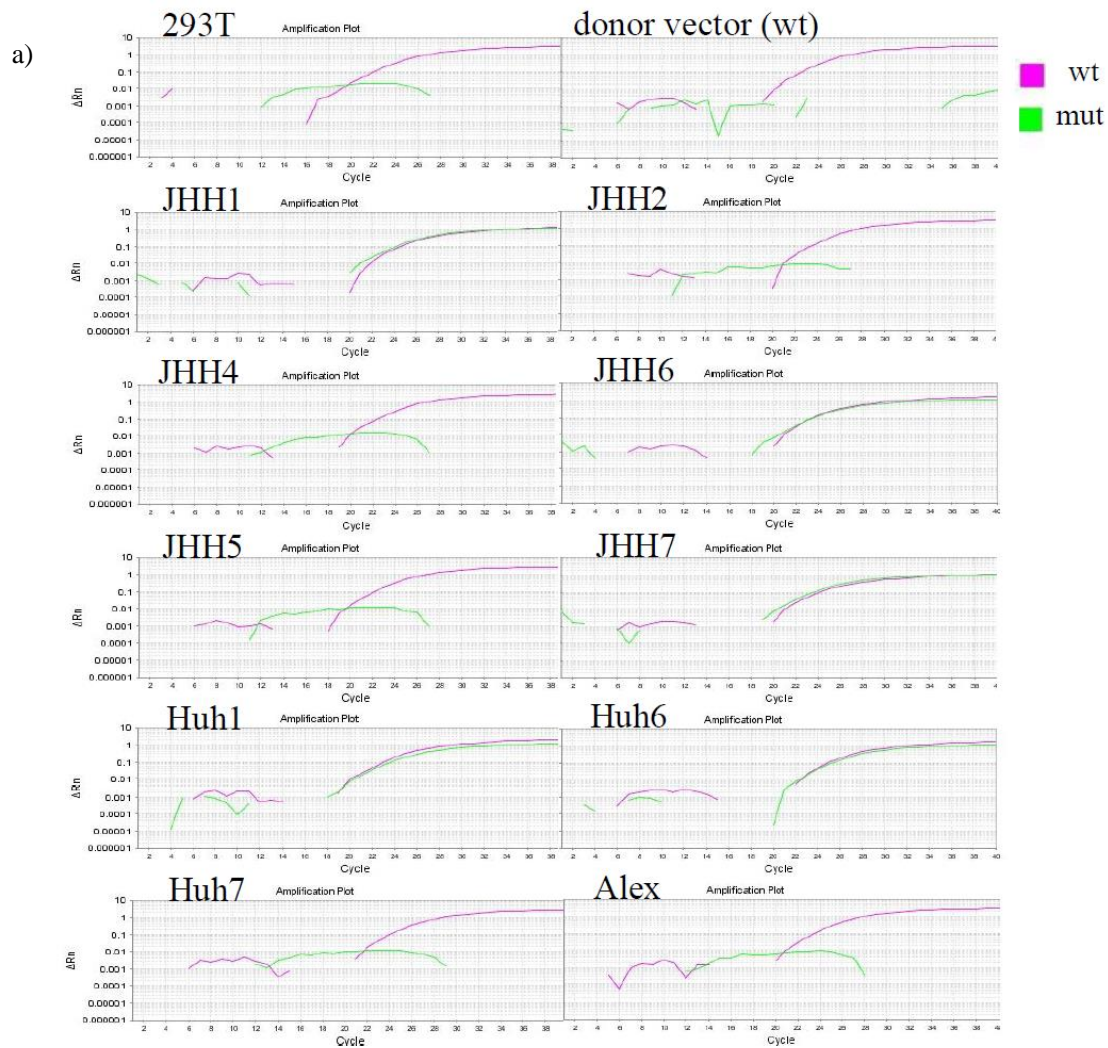


図 6 PCR 法による ALDH2 の SNP genotyping

- 各細胞から抽出した DNA を鋳型とし、SNP の wt と mut をそれぞれ 3' 末端に持つ 2 種の Rv プライマーを用いて PCR を行った。
- wt プライマーでのみ増幅した 293T・JHH5 は wt/wt、いずれのプライマーでも増幅した JHH7 は wt/mut と確認できた。

次に TaqMan PCR 法でその他の細胞についても解析したところ、wt の増幅のみ見られ野生型ホモ (wt/wt) と判明した細胞は 293T・JHH2・JHH4・JHH5・Huh7・Alex、wt・mut 共に増幅しヘテロ (wt/mut) と判明した細胞は JHH1・JHH6・JHH7・Huh1・Huh6 であった (図 7)。



b)

293T	wt/wt	JHH7	wt/mut
JHH1	wt/mut	Huh1	wt/mut
JHH2	wt/wt	Huh6	wt/mut
JHH4	wt/wt	Huh7	wt/wt
JHH6	wt/mut	Alex	wt/wt

図 7 TaqMan PCR 法による ALDH2 の SNP genotyping

a) wt および mut に特異的なプライマーを用いた TaqMan PCR の増幅曲線。

b) TaqMan PCR の結果より解析した各細胞の ALDH2 SNP genotyping。

さらに、細胞 DNA を鋳型としたシーケンス解析で SNP を確認した (図 8)。wt/wt の 293T 細胞では ALDH2 SNP に相当する塩基のシグナルが G のみであるのに対し、

wt/mut の JHH7 細胞では SNP 塩基において G 及び A のシグナルが混在しており、遺伝子型からは妥当な結果と考えられた。

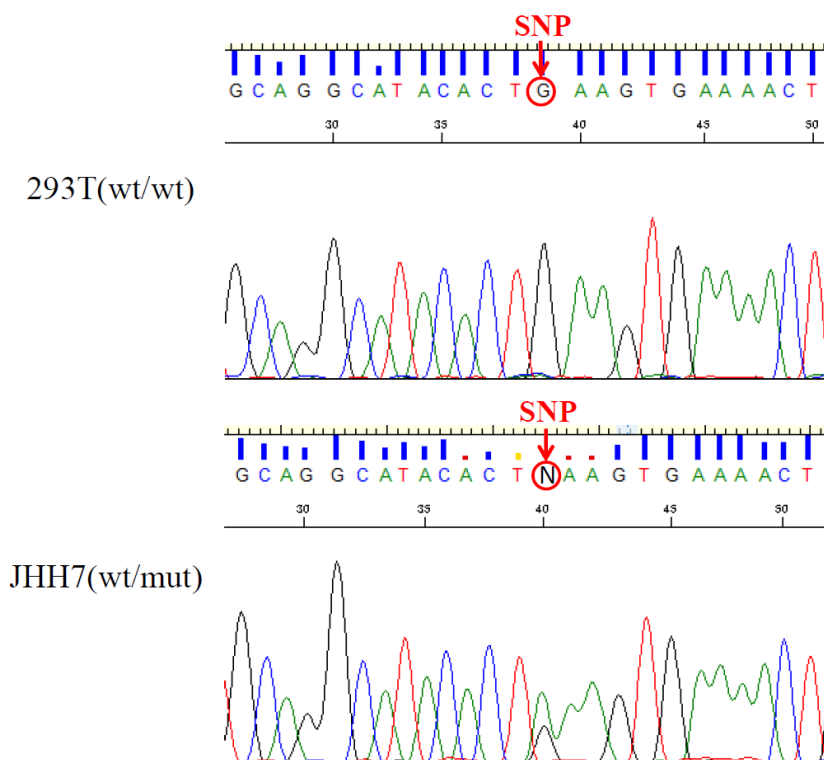


図 8 DNA シーケンス解析による ALDH2 の SNP genotyping

細胞ごとのゲノム DNA シーケンス解析により ALDH2 SNP の塩基が wt (G:グアニン) もしくは mut (A:アデニン) のいずれかを調べた。

従って、wt/mut の細胞を遺伝子編集によって wt/wt に改変することを目指して、今後の実験に日本人の肝細胞由来で wt/mut である JHH7 細胞を用いることとした。また wt/wt のコントロールとして、トランスフェクション効率の高い 293T 細胞、また JHH7 細胞と同じ日本人の肝細胞である JHH5 細胞を選択した。

② 各トランスフェクション試薬の導入効率比較

トランスフェクション試薬の遺伝子導入効率を確認するため、293T 細胞、JHH7 細

胞に FuGene HD、Lipofectamine 3000 を用いて copGFP 発現プラスミドをトランスフェクションし、72 時間後の copGFP の蛍光を顕微鏡にて観察した。いずれの試薬においても同程度の蛍光が観察され、293T 細胞の方が JHH7 細胞よりも導入効率が高い印象であった (図 9)。

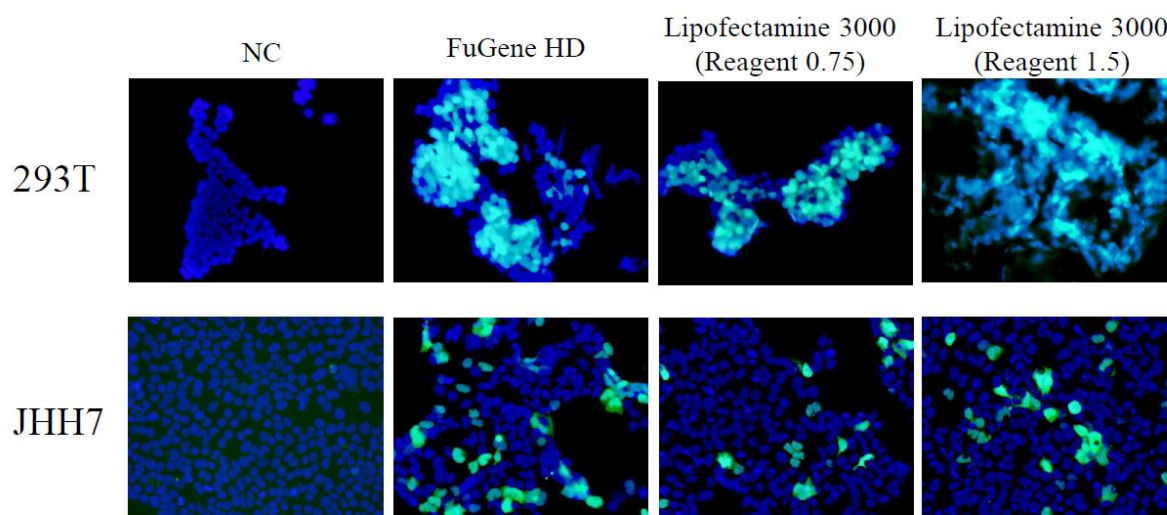


図 9 各トランスフェクション試薬の導入効率比較

copGFP 発現プラスミド (pSIF1-H1-siLuc-copGFP) を各トランスフェクション試薬を用いて細胞に導入し、蛍光観察により導入効率を比較した。(NC : negative control)

③ AAVS1/ALDH2 と ALDH2 SNP の編集

ヘテロ (wt/mut) の細胞である JHH7 に対し、SNP を mut→wt に編集し wt/wt とすることで ALDH2 の機能改善を試みることにした。なおヒト 19 番染色体上に存在する AAVS1 (*adeno-associated virus integration site 1*) は、adeno 関連ウイルス (*adeno-associated virus*) がヒト DNA に自らのゲノムを組み込む際のターゲット部位として知られているが[66, 67]、遺伝子を挿入すると安定した転写を得られ、かつ変異・挿入・欠失などでも有害な影響を及ぼさないことから、新たな遺伝子を安全に挿入することができ、遺伝子治療のターゲット領

域としてよく用いられる部位である。今回、この AAVS1 に ALDH2 cDNA (wt) を挿入することで、直接 ALDH2 SNP を編集した場合と比較することとした。そこで、図 10 のとおり、ALDH2 SNP 編集および AAVS1/ALDH2 編集のためのドナーベクターを作成した。

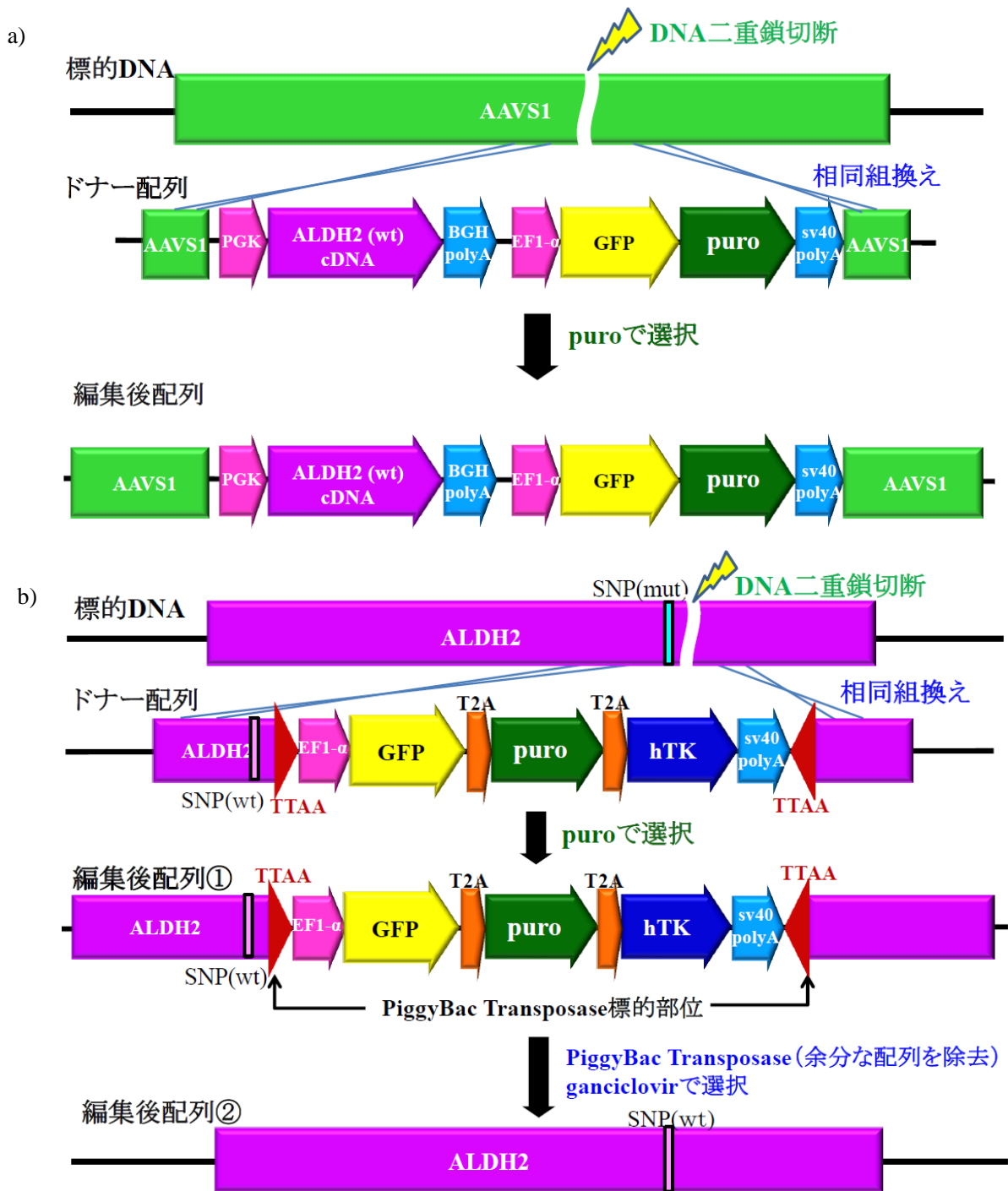


図 10 AAVS1/ALDH2 編集及び ALDH2 SNP 編集用ドナーベクターの設計

a) AAVS1 への ALDH (wt) cDNA 挿入

b) ALDH2 遺伝子に対する SNP (mut→wt) の編集。

(EF-1 α : elongation Factor 1 alpha promoter, PGK : phosphoglycerate kinase promoter, BGH-polyA : bovine growth hormone polyadenylation signal, sv40-polyA : sv40 polyadenylation signal, GFP : green fluorescent protein, puro : puromycin resistant gene, hTK : human thymidine kinase T2A : *Thosea asigna* (insect virus) ribosomal skip site)

AAVS1/ALDH2 編集ドナーベクターは、AAVS1 と相同な配列内に ALDH2 cDNA(wt)と編集確認のための GFP 遺伝子、薬剤選択のための puromycin 耐性遺伝子を組み込んだ。

ALDH2 SNP の編集では、SNP 編集と共に GFP 遺伝子、puromycin 耐性遺伝子、hTK 遺伝子などのマーカーを一旦 ALDH2 内に組み込み、編集後に puromycin によって選択し、PiggyBac Transposase によって余計な配列を除去することで ALDH2 の正常配列が復帰されるよう、余計な配列を PiggyBac Transposase 認識配列 (TTAA) で挟むように設計した。PiggyBac Transposase で余分な配列を除去できなかった細胞は ganciclovir による negative selection で除き、正しく編集された細胞を単離できるようにした。

これらのドナーベクターと共に、AAVS1 または ALDH2 SNP をターゲットとした Cas9+gRNA 発現ベクターを 293T 細胞・JHH7 細胞にトランスフェクションし 10 日後における蛍光観察を行った (図 11)。細胞に導入されたプラスミドの半減期は一般的に 50 分～5 時間程度で、ライソソームへの取り込みなどで消失する[68]。さらに核内に入ったプラスミドは細胞分裂による娘細胞への分配や分解によって徐々に失われるが[69, 70]、外来 DNA が不規則にゲノムに組み込まれることも知られている[71]。細胞に取り込まれた外来性のプラスミドの一般的タンパク発現のピークはおおむね 24～96 時間であり、トランスフェクション後 10 日時点の観察時にはプラスミド由来の一過性発現の影響は十分低下し、編集によってゲノムにドナーが組み込まれた状態を見ていると想定し、ドナー由来 GFP の蛍光観察によって、その確認を試みた。しかしその結果、ドナーベクターのみの導入でも蛍光が観察さ

れ、蛍光は必ずしも目的のターゲットで適切に編集されたことを反映していないと考えられた。Cas9 と gRNA が存在しなくとも、ドナーのみでも蛍光を発する細胞が認められたことは、ゲノムへのランダムな挿入が起こっている可能性が考えられた。

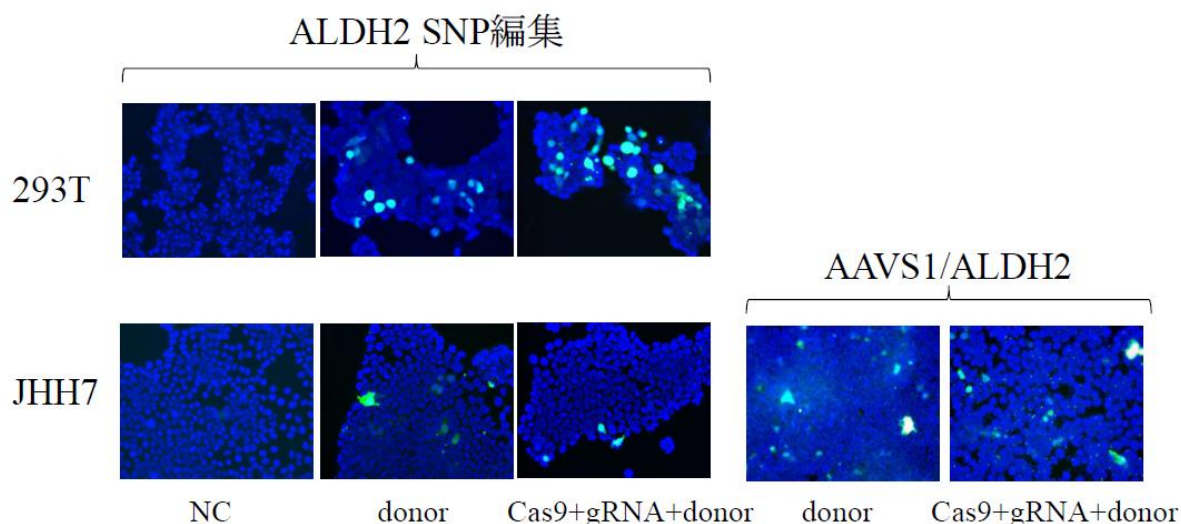


図 11 GFP 発現による遺伝子編集の確認

293T 細胞・JHH7 細胞に対し、ALDH2 SNP 編集もしくは AAVS1/ALDH2 編集用の Cas9+gRNA 発現 plasmid および donor plasmid を共導入、もしくは donor plasmid のみを導入し、GFP の蛍光観察によりドナー配列の導入を確認した。(NC : negative control)

次に JHH7 細胞に対し ALDH2 SNP 編集ドナー及び Cas9+gRNA を導入後、薬剤選択にて単離したコロニーに対し、TaqMan PCR による genotyping を行った (図 12)。mut の SNP が正しく編集された場合 mut の SNP は消失するため、wt のシグナルだけが増幅すると考えられるが、単離したコロニーの多くでは wt と mut の PCR 増幅曲線が約 1 サイクル分ずれていた。もしランダムな挿入によってドナー由来の wt の SNP が無関係な位置に入った場合、その細胞は wt の SNP を 2 つと mut の SNP を 1 つ持つことになる。PCR の 1 サイクルで目的の DNA 配列は 2 倍に増幅するため、シグナルの 1 サイクル分のずれは細

胞内のランダム挿入を示唆する可能性があると考えられた。

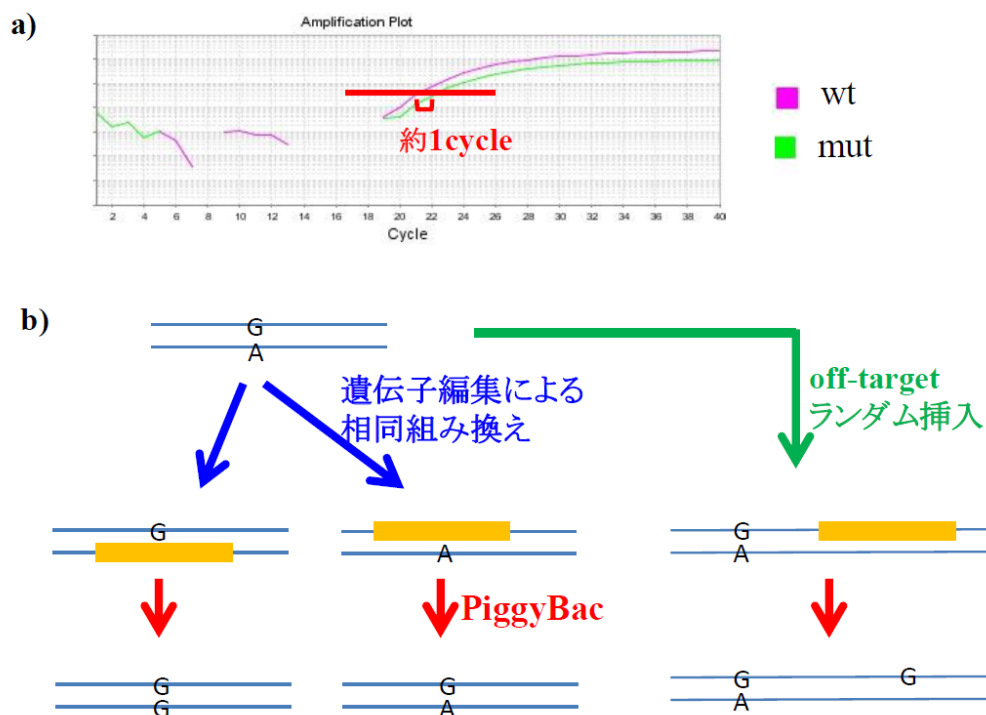


図 12 TaqManPCR 法による SNP のランダム挿入の予測

- a) JHH7 (wt/mut) へのランダム挿入によるコロニーの TaqMan PCR genotyping.
- b) 正しいターゲットでの遺伝子編集と、ランダム挿入において予測される SNP のパターン。

293T 細胞・JHH7 細胞の AAVS1/ALDH2 編集後または ALDH2 SNP 編集後に薬剤選択されたコロニーのうち正しく遺伝子編集されたものを選択するため、挿入された配列の両端 gap 部分における PCR により insert 確認を行った (図 13 a)。その結果、調べたコロニーのうち両端の PCR が共に増幅し、正しく編集が起こったと思われるコロニーの割合は図 13b のようになった。

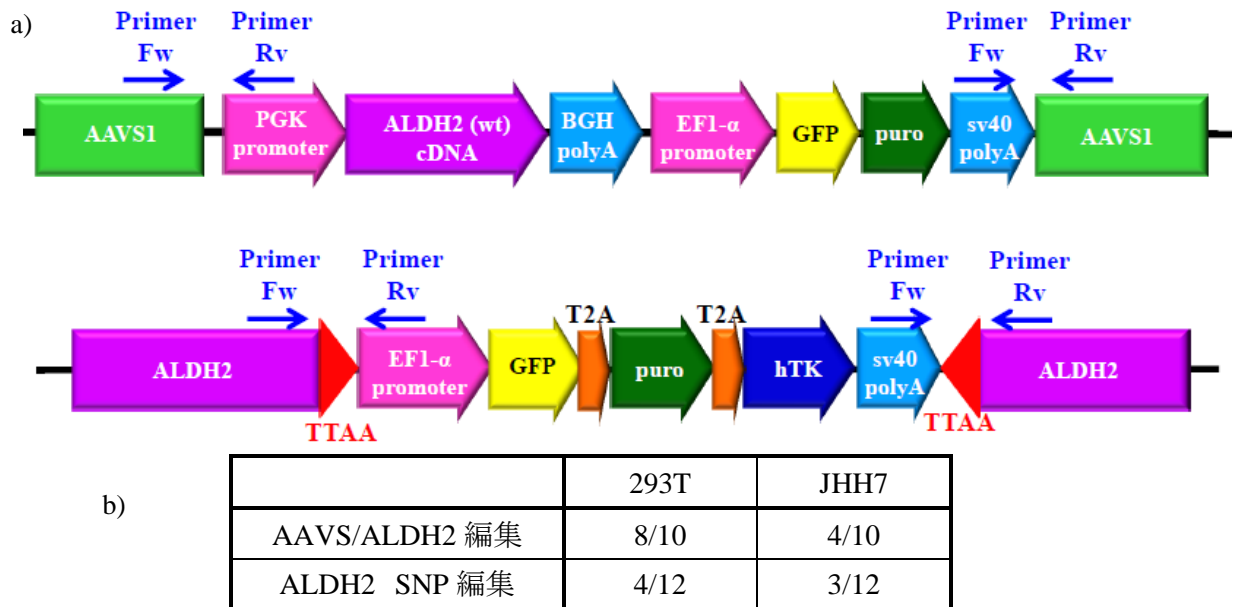


図 13 insert gap PCR による編集確認

- a) 挿入配列の両端 (3'側、5'側) において、それぞれ gap をまたぐように PCR プライマーのセットを設定した。PCR 増幅の有無により、正しい編集を確認した。
- b) 調べた編集後コロニーのうち、正しく編集されたコロニーの割合。

④ 遺伝子編集後の ALDH2 の発現確認と活性測定

293T 細胞・JHH7 細胞の AAVS1/ALDH2 編集後、薬剤選択により正しく編集されたと思われる細胞を単離した。ALDH2 SNP 編集については puromycin による選択、PiggyBac Transposase 導入及び ganciclovir での選択によって正しく ALDH2 の配列が復帰したと思われる細胞を単離した。編集前及び編集後の各細胞に対し、Western blotting により ALDH2 の発現を確認した (図 14)。その結果、腎臓上皮細胞である 293T 細胞では ALDH2 の発現がほとんどなく、ALDH2 の SNP 編集後も発現は認めないが、AAVS1 への ALDH2 組み込みでは ALDH2 の発現がみられた。一方、肝細胞である JHH7 では元々 ALDH2 発現があり、SNP 編集後も AAVS1 編集後も発現しているが AAVS1 編集後では

ALDH2 発現がやや上昇しているように見えた。なお、JHH7 では ALDH2 が 2 重のバンドとして見られたが、翻訳直後の ALDH2 前駆体は N 末端に 17 アミノ酸のミトコンドリア移行シグナルが存在し、ミトコンドリア移行後にこれらの移行シグナルが切断されることから、細胞溶解液を用いた Western blotting では、ALDH2 は本来 2 重のバンドとして見られ、上のバンドは細胞質内、下のバンドはミトコンドリアに移行した ALDH2 であることが報告されている[72]。JHH5 の ALDH2 のバンドは濃すぎるために 2 重バンドであるかどうか評価ができなかったが、JHH7 の AAVS1 編集による過剰発現でも、ALDH2 遺伝子編集後も上のバンドが目立っていた。これは編集後のミトコンドリアへの移行効率の変化によって細胞質に停滞しているものを観察しているのか、翻訳後修飾の変化による分子量変化によるものかは現時点では不明であり、今後検討が必要と考えられた。

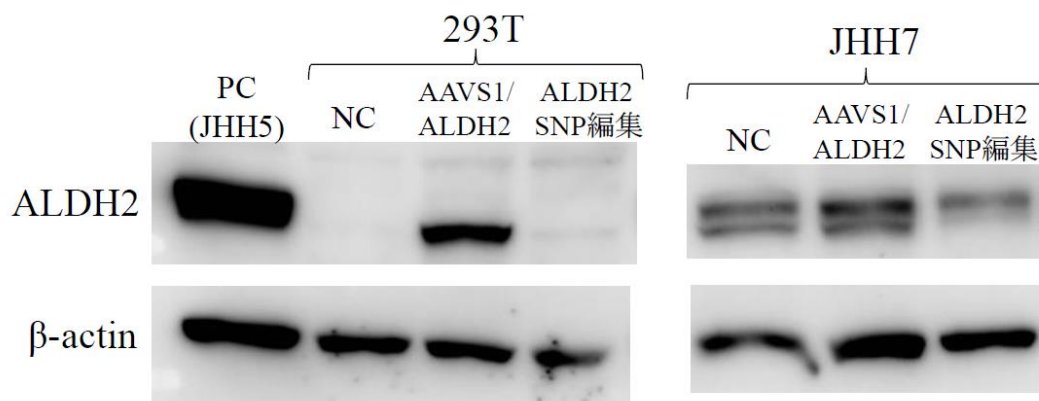


図 14 編集後細胞の ALDH2 発現確認

AAVS1/ALDH2 及び ALDH2 SNP 編集後の細胞に対し、ALDH2 発現を Western blotting にて確認した。(PC : positive control、NC : negative control)

次に ALDH2 の編集前後の酵素活性を測定し比較した (図 15)。ALDH2 の反応産物 NADH の 450 nm の吸光度 (OD₄₅₀) を測定し、その経時変化の傾きを ALDH2 活性とした。編集前の 293T 細胞、JHH5 細胞、JHH7 細胞の活性測定では、293T では wt/wt で

あるがそもそも ALDH2 発現がほとんどないため活性が低く、wt/wt で ALDH2 発現もある JHH5 は高活性、wt/mut である JHH7 は低活性を示した (図 15 a)。ALDH2 cDNA の定量 PCR による mRNA 発現の比較では、JHH5・JHH7 では ALDH2 発現が多く、293T では発現はごくわずかであった (図 15 b)。293T はヒト腎臓上皮細胞であるが、ALDH2 は腎臓や肺などでも発現しており[73]、Western blotting で検出にくい程のわずかな発現でも wt/wt であるために JHH7 より活性はやや高くなることが推測された。

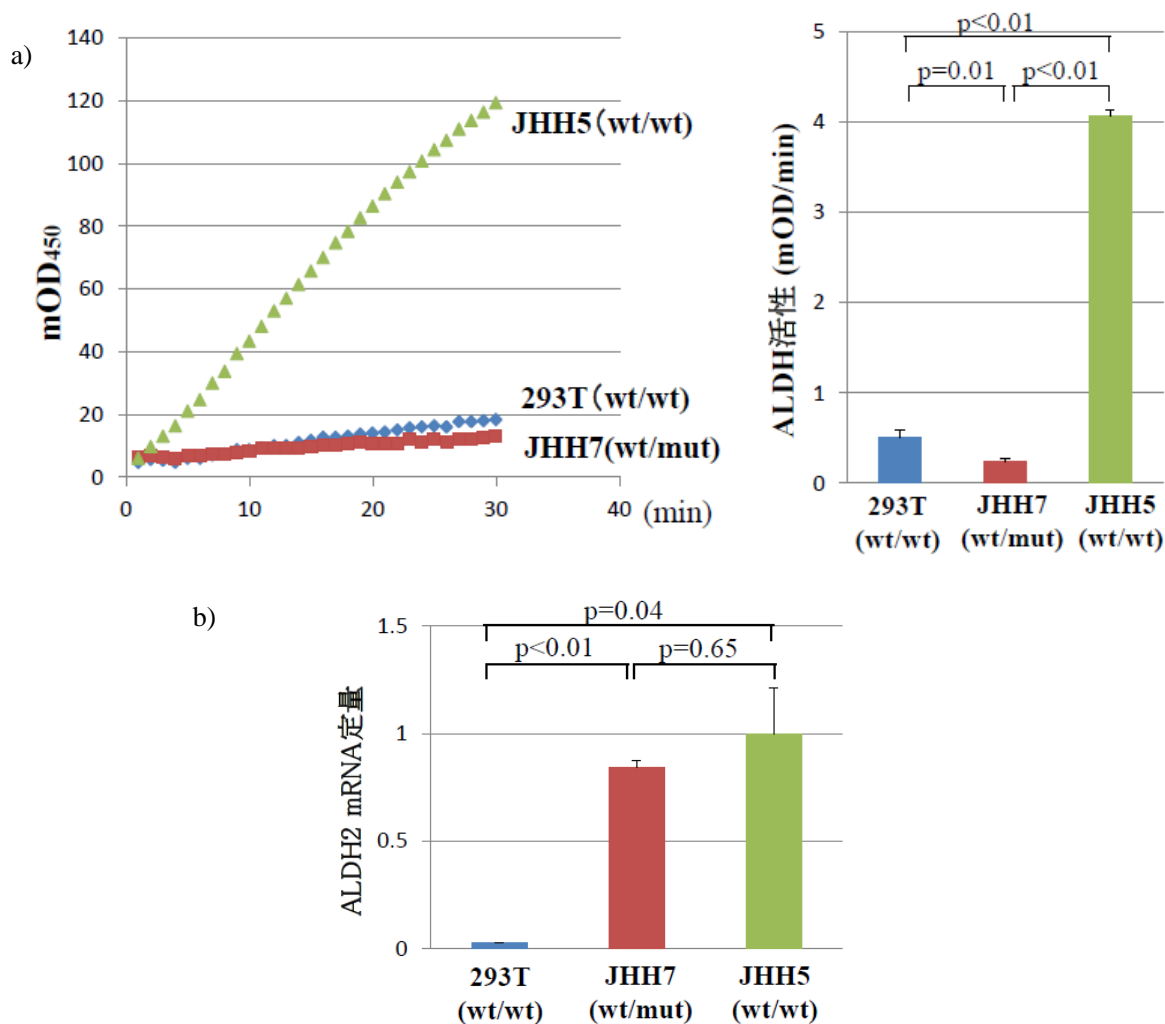


図 15 ALDH2 活性測定および ALDH2 mRNA 定量(編集前)

- a) 編集前の各細胞の ALDH2 活性。反応産物 NADH の吸光度 (OD₄₅₀) の経時変化の傾きを ALDH2 活性として求めた。(n=3)
- b) 編集前の各細胞の ALDH2 cDNA 定量 PCR により、mRNA の発現を調べた。(n=3)

次に編集後の細胞における ALDH2 活性を調べた。薬剤選択したコロニーを単離せず全体の細胞集団としての活性を見ると活性変化はほとんど見られず、正しく編集されたものの割合が低いことが考えられた (データ非掲載)。そこで単離したコロニーについて活性測定したところ、ALDH2 発現がない 293T では ALDH2 SNP 編集でも活性は上昇しないが、AAVS1 への ALDH2 遺伝子挿入で著明な活性上昇がみられた。一方元々発現があり wt/mut である JHH7 では、AAVS1 への ALDH2 挿入および ALDH2 SNP 編集で共に活性が軽度上昇し、編集前よりも有意な上昇であった。また有意差はなかったものの、ALDH2 SNP の直接編集ではやや高い活性が得られた (図 16)。

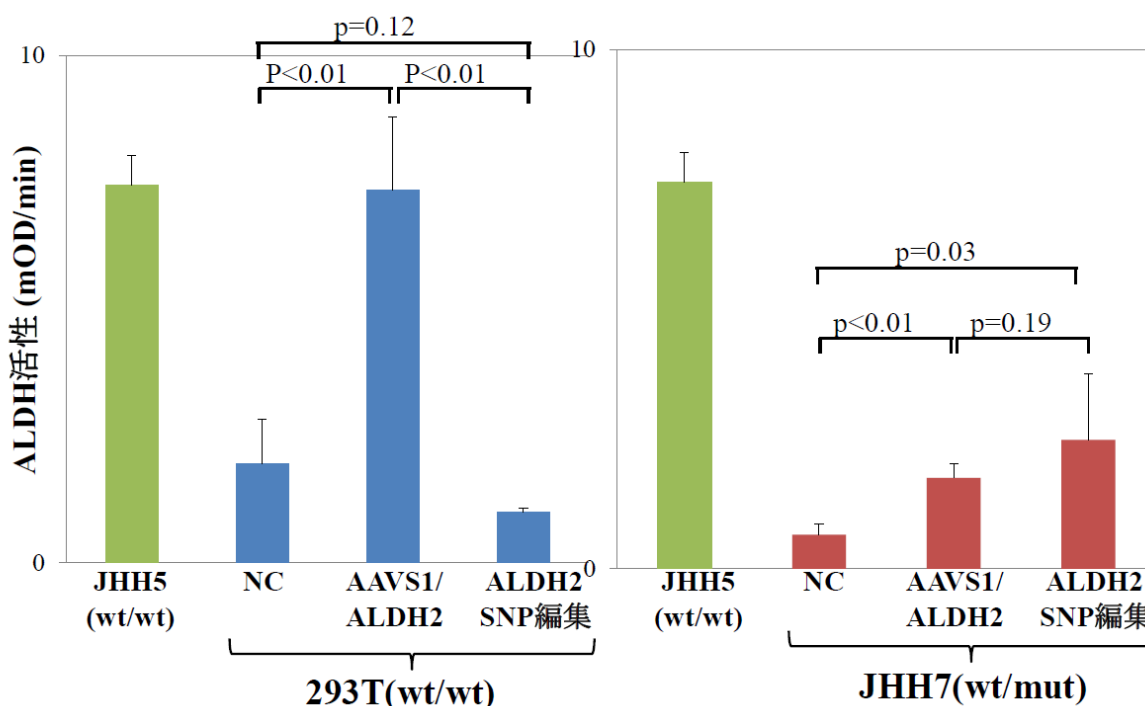


図 16 編集前後の ALDH2 活性測定

AAVS1/ALDH2 及び ALDH2 SNP 編集後の ALDH2 活性。(NC : negative control) (n=3)

ALDH2 はサブユニットが 4 量体を形成した酵素であり、変異型サブユニットが混在すると低活性となる。従って、元々 ALDH2 発現のわずかな細胞では正常型の強制発現により高い活性を得られるが、JHH7 のような ALDH2 発現があり wt/mut の細胞の活性を上昇させる場合、別の部位に正常型 ALDH2 を新たに組み込んでも、内在性の変異型が混じることにより活性上昇しにくく、ALDH2 遺伝子の SNP を直接編集した方がより活性上昇効率が良いのではないかと予測された。但し、SNP 編集においてはどちらの相同染色体が編集されるかで編集後の遺伝子型は 1/2 の確率で野生型ホモかもしくはヘテロのままであり、活性が改善する細胞は編集された全体の 1/2 であり、従って全体の活性を得るには全体の編集効率を高くする必要がある。また、外来性の強制発現と内因性の発現はプロモーターが異なり発現量も同じではないため単純な比較はできないと考えられ、より厳密には発現量も含めた今後の検討が必要である。

今回、ALDH2 SNP 編集ではもっと高い活性上昇を期待したが、実際は AAVS1 編集に比較して明らかな有意性を証明できなかった。ALDH SNP 編集後の細胞のシーケンス確認では SNP 部分で野生型 (G) と変異型 (A) のシグナルが混在しており、2 段階の薬剤選択の過程で単離が不十分だったことによると考えられる (図 17)。

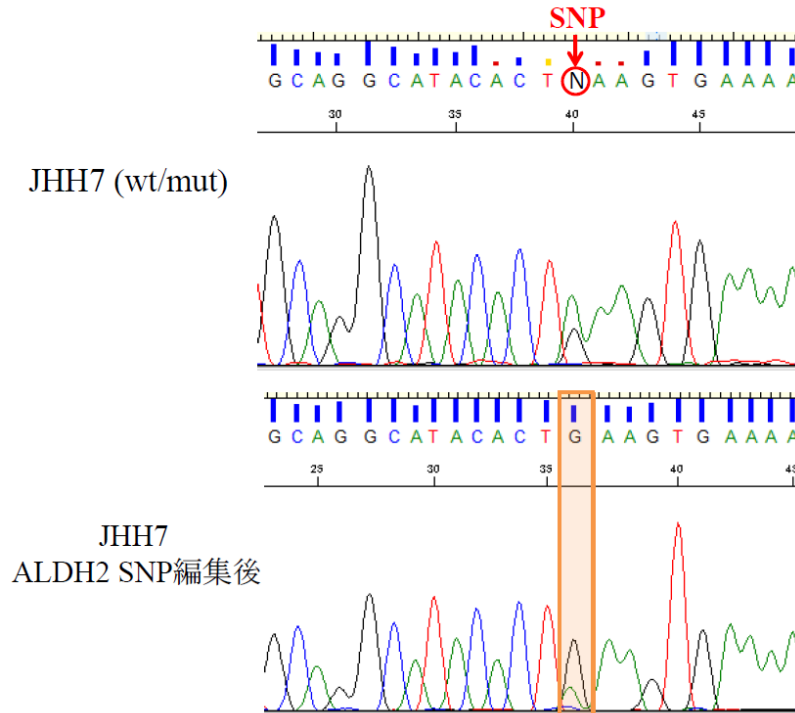


図 17 ALDH2 SNP 編集後の SNP 部分のシーケンス確認

SNP 部分で野生型 (G) と変異型 (A) のシグナル混在を認めた。

以上より、細胞の発現様式や目的タンパクの特徴によって、遺伝子編集で得られる結果が異なることが分かった。しかし、編集後細胞の薬剤選択・コロニー単離によって活性変化を確認できるものの、細胞集団全体における活性変化はほとんどないことから、更に編集効率を上げる工夫が必要であると考えられた。

⑤ Cas9 安定発現細胞株の樹立

プラスミドを用いた遺伝子編集では細胞全体に対する編集効率が低くランダム編集が多いことから、以後正しい編集効率を上げるための検討を行った。確実な Cas9 発現を得るためにレンチウイルスによる Cas9 安定発現細胞株を作成した (図 18)。

レンチウイルスで Cas9 遺伝子をゲノムに組み込んだ Cas9 安定発現細胞株では確実な Cas9 発現が得られ、Cas9 の導入発現効率を検討する必要がなくなるため、以後の実験では Cas9 安定発現細胞株を用いることとした。

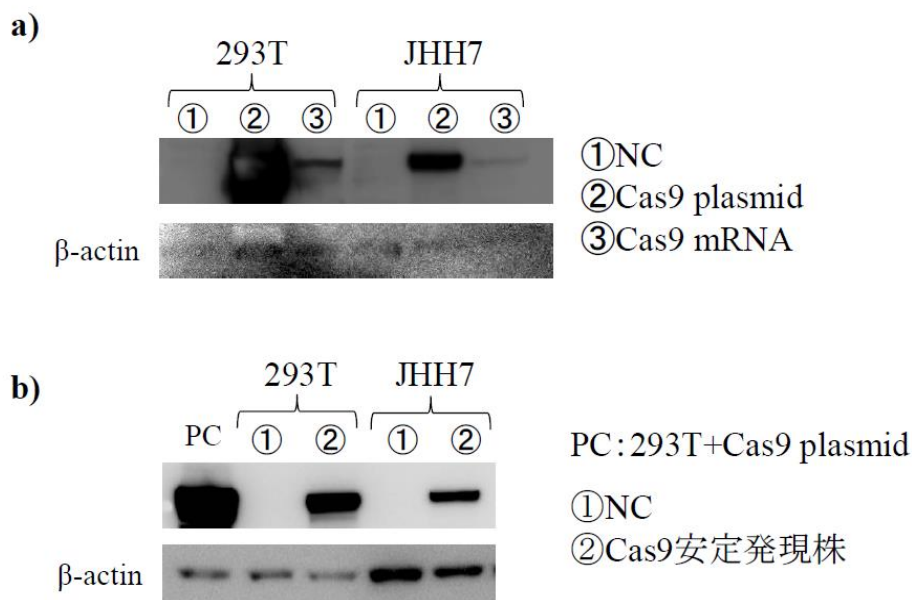


図 18 Cas9 安定発現株の Cas9 発現確認

レンチウイルスを用いて Cas9 安定発現株を作成し、薬剤選択の後に Western blotting にて Cas9 の発現を確認した。(NC : negative control)

⑥ *in vitro*、*in vivo* における gRNA の切断効率の比較

CRISPR による遺伝子編集ではターゲット部位の設定によっても切断効率が変わることが知られており、従って ALDH2 SNP の近傍において切断のターゲットに必要な PAM (NGG 配列) の候補を exon 部分において 2 か所、intoron において 4 か所の計 6 か所設定し、切断効率を比較した (図 19)。

(なお、これまでの実験で使用した Cas9 + gRNA 発現プラスミドの PAM は i1 に相当する。)

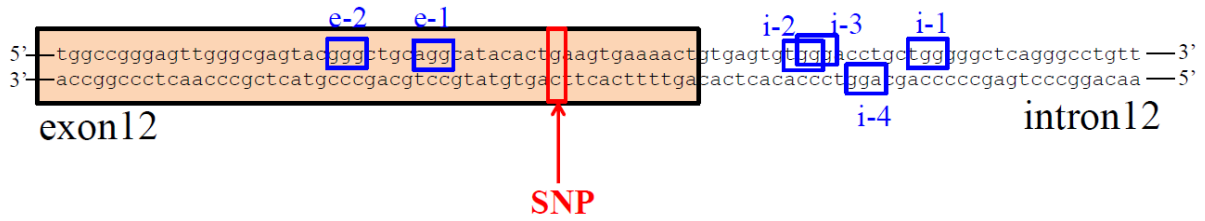


図 19 ALDH2 SNP 近傍での PAM の設定

ALDH2 SNP 近傍において、DNA 二重鎖切断のターゲットとなる PAM (NGG 配列) を exon 部分で 2 か所 (e1~2)、intron 部分で 4 か所 (i1~4) の計 6 か所設定した。

これらの 6 か所の PAM に対応した 6 種の gRNA を *in vitro* transcription によりそれぞれ合成し、293T 由来 DNA を鋳型として PCR で増幅した ALDH2 SNP を含む 2 kb の DNA 断片をターゲットとして、*in vitro* で Cas9 タンパクと反応させた。ターゲット断片は ALDH2 SNP 近傍において切断が起こった場合 1.4 kb と 0.6 kb に分かれるよう設定してある。それぞれの反応産物の電気泳動結果より各バンド強度を ImageJ を用いて定量解析し、未切断断片を a、切断された 2 断片を b 及び c として、切断断片の割合 ($f_{cut} = (b+c) / (a+b+c)$) を求めた (図 20)。その結果、gRNA(e1)ではやや切断が悪かったものの、その他 5 種 gRNA では良好な切断がみられた。

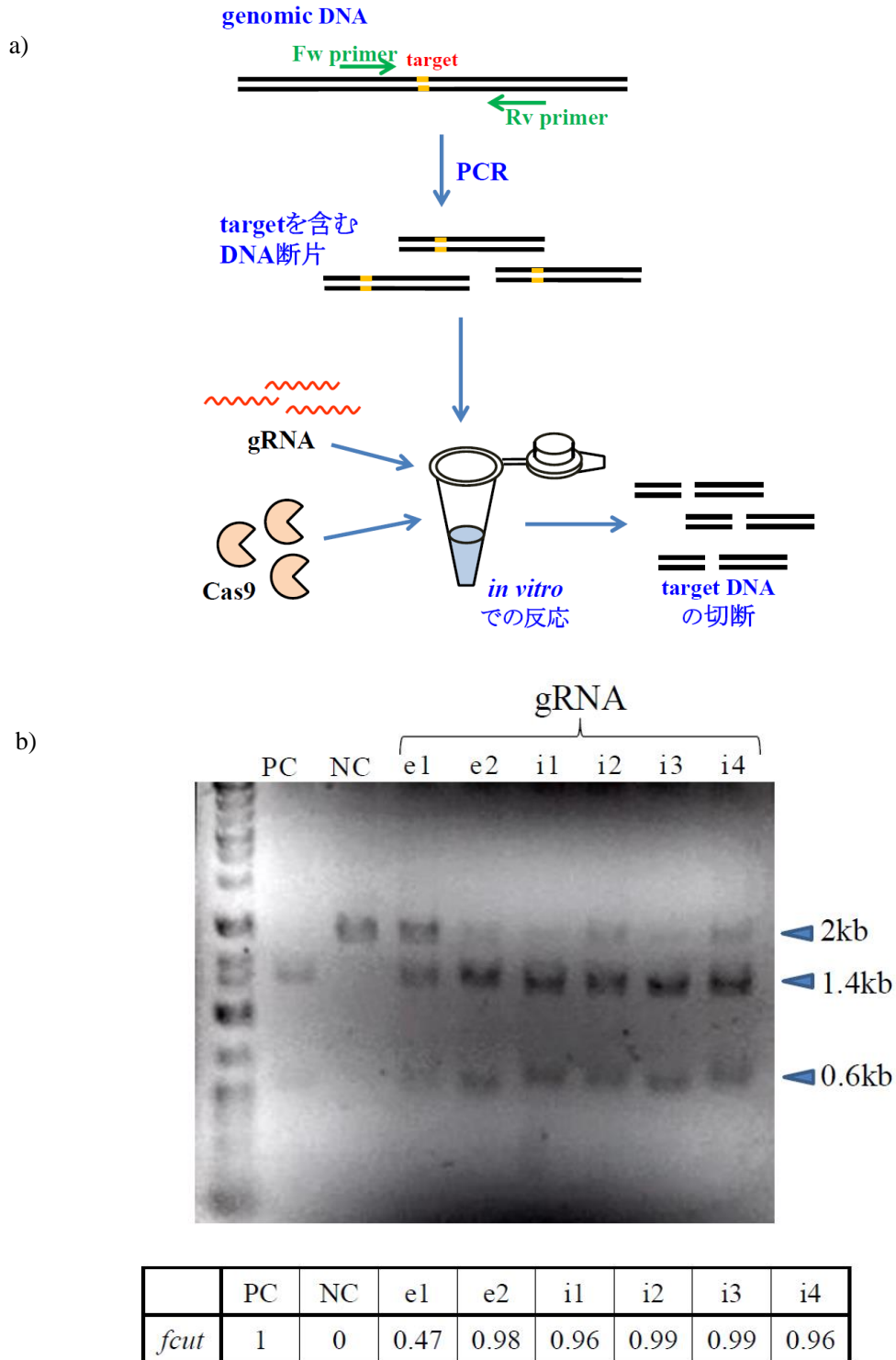


図 20 *in vitro* における gRNA の切断効率確認

- a) ALDH2 のターゲットを含む全長 2 kb の PCR 産物を、*in vitro* 合成した各 PAM に対応する 6 種の gRNA 及び Cas9 nuclease と *in vitro* で反応させた。
- b) 電気泳動結果よりバンド強度を定量し、各 gRNA の切断効率 (f_{cut}) を求めた。
(PC: kit に付属の既知な DNA 2kb を Cas9+gRNA で切断した 1.4 + 0.6kb DNA 断片、
NC: PCR によって増幅した 2kb ターゲット DNA 断片)

gRNA の効率には PAM 配列の密度・GC の割合、遺伝子における exon 内・intron 内などの配置、クロマチン構造の accessibility など様々な要因が効率に影響すると考えられており[74-78]、*in vivo* では細胞内環境の複雑な要因が影響して効率に変化する可能性が考えられた。そこで 6 種の gRNA の *in vivo* での切断効率を、T7 エンドヌクレアーゼアッセイにより調べた。これは、T7 エンドヌクレアーゼが DNA 二重鎖内のミスマッチを切断することを利用して変異を検出する手法である (図 21) [79]。

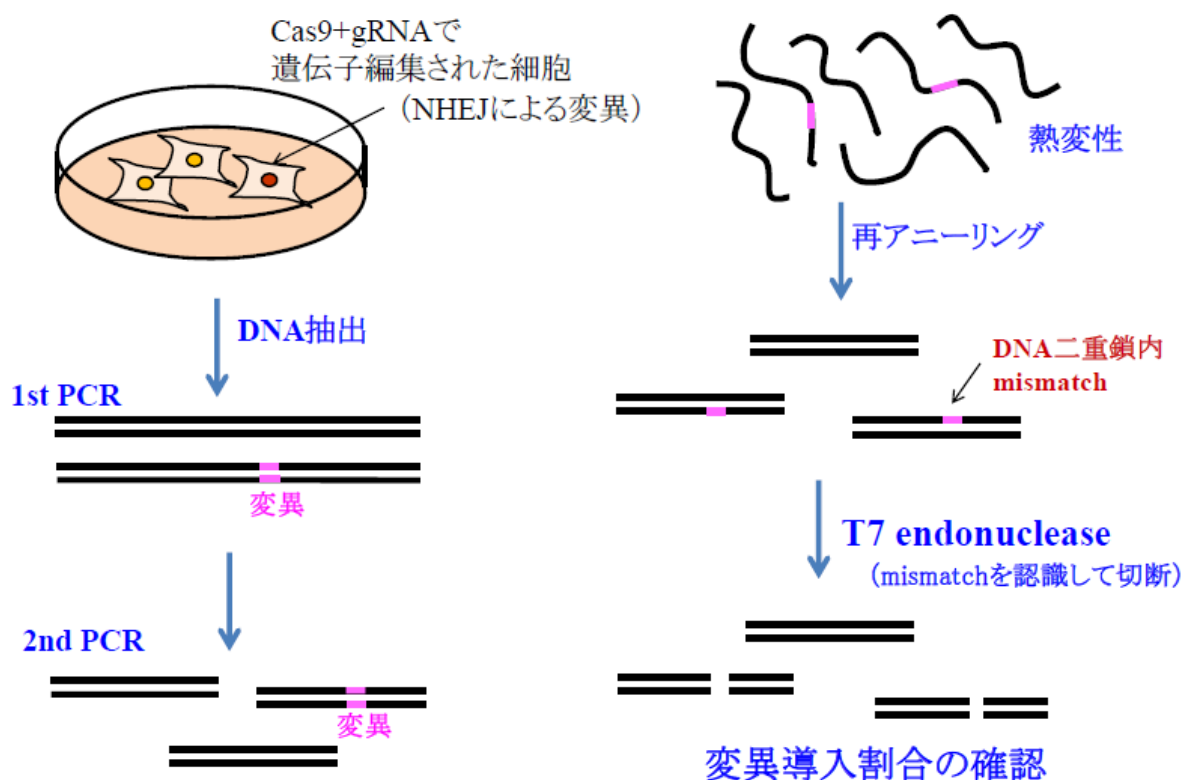
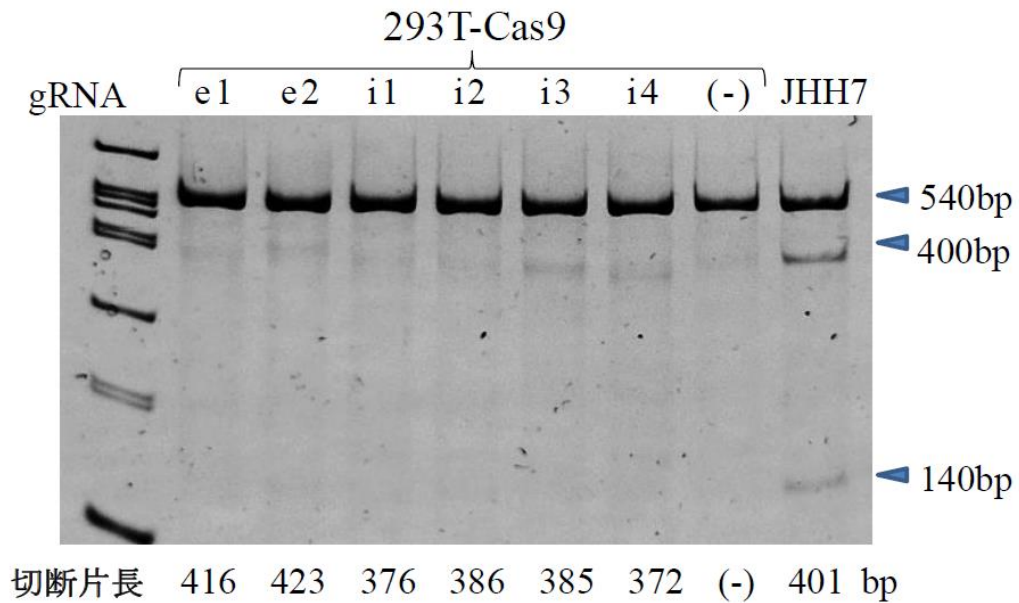


図 21 T7 エンドヌクレアーゼアッセイ

遺伝子編集を施した細胞集団よりゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として、ターゲット含む領域を 2 段階 PCR により増幅した。PCR 産物の DNA 断片を熱変性→再アニーリングし、T7 エンドヌクレアーゼで DNA 二重鎖内の mismatch を切断することで、変異を検出した。

本法では、変異を含む部位を PCR で増幅し、熱変性→再アニーリングの過程でミスマッチを形成した二重鎖 DNA を T7 エンドヌクレアーゼで切断することで、切断断片の濃度により細胞集団における変異の割合が分かる。Cas9 と gRNA によって二重鎖切断された DNA はドナーなしでは主に NHEJ の機構により変異を伴って修復されるため、この変異の割合によって細胞内での gRNA の切断効率を見ることとした。

293T 由来 Cas9 安定発現細胞株 (293T-Cas9) に 6 種の gRNA を導入し、72 時間後の細胞から抽出した DNA を鋳型として、ALDH2 SNP を含む約 540bp を PCR で増幅し、T7 ヌクレアーゼアッセイを行った (図 22)。なお、JHH7 は wt/mut であり SNP 部分で必ずミスマッチが形成されるため、これをコントロールとして用いた。電気泳動結果よりバンド強度を ImageJ を用いて定量解析し、未切断断片 a、切断された 2 断片 b 及び c から、切断断片の割合 ($f_{cut} = (b+c)/(a+b+c)$)、また理論上の NHEJ による変異導入の割合 ($indel (\%) = 100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{cut}})$) [63] を求めた (図 23)。なお、切断によって生じる DNA 断片のうち長いもののサイズを共に示した。



	e1	e2	i1	i2	i3	i4	NC	JHH7
<i>f_{cut}</i>	0.042	0.073	0.062	0.062	0.077	0.088	0.053	0.221
indel(%)	2.1	3.7	3.2	3.2	3.9	4.5	2.7	11.7

図 22 T7 エンドヌクレアーゼアッセイによる細胞内での各 gRNA 切断効率

293T-Cas9 に対し 6 種の gRNA をそれぞれ導入後、ALDH2 ターゲットを含む 540bp に対し、T7 エンドヌクレアーゼアッセイにより切断効率 (DNA 二重鎖切断後の NHEJ による変異導入率) を比較した。

(f_{cut} :DNA 切断断片の割合、indel(%) :変異導入の割合)

Cas9 による切断部位は PAM の 3 塩基上流で起こり、NHEJ による修復のされ方で欠失や挿入などの変化も起こり得るが、T7 エンドヌクレアーゼの切断が同部位で起こると想定した場合の切断断片のうち、長い方のサイズを下に示した。切断断片のバンドは 400bp 前後にみられるが、最大と最少のものでは 40bp の差があり、移動度の違いがサイズの差を反映していると考えられるが、厳密には細かく設定したサイズ既知の DNA マーカーと共に泳動し評価する必要がある。

6 種の gRNA のうち e2、i3、i4 において比較的切断断片の割合が多く、つまり DNA

二重鎖切断後の変異の割合が多いと考えられた。*in vitro* での検討ではいずれの gRNA でも良く切断がみられていたが、細胞内での実際の切断効率は必ずしも *in vitro* での結果と一致しないことが分かった。従って、比較的切断効率の良いと思われる 3 つの gRNA (e2、i3、i4) を今後用いることとした。

⑦ ssODN をドナーとした編集効率の検討

次に、ドナーによる相同組換えの効率向上について検討した。プラスミドでのドナー配列導入では薬剤選択のための遺伝子導入などが可能である一方、約 500~1000bp の homology arm が必要とされるため全体のサイズも大きくなり、導入効率の低下が起こりやすい[80]。一方、一本鎖の短い DNA である ssODN (single strand donor oligoDNA) [63, 64]を用いる方法では、homology arm は 40~90 base 程度、全長 200 base 程度と非常に短いため人工合成も可能で、導入効率改善にも有用であるが[64]、導入できる変異は 10 塩基程度であり薬剤選択マーカーなどを挿入することはできず、編集されたものを選択して単離する目的には不適である。薬剤選択などの人工的な段階を経ない臨床応用を目指すのであれば、編集効率を考慮すると ssODN の方がドナーに適していると考えられる。

従って、選択した 3 種の gRNA (e2、i3、i4) それぞれに対応した ssODN を人工合成にて作成した (図 25)。(i3、i4 に対応した ssODN は共通である。)これらの ssODN は、ALDH2 の正常型 SNP を導入し、かつ PAM・gRNA 認識配列への変異導入を起こして編集後は再切断されないよう、そして exon 部分においてはアミノ酸が変化しないように設計し

た。(なお今回は行っていないが、PCR 増幅断片の切断により編集を検出する目的で制限酵素 HindIII の認識部位も導入してある。) 編集の有無の確認は、編集後変異に特異的な配列を 3' 末端に設定した Fw プライマーを用いて、PCR により検出した。

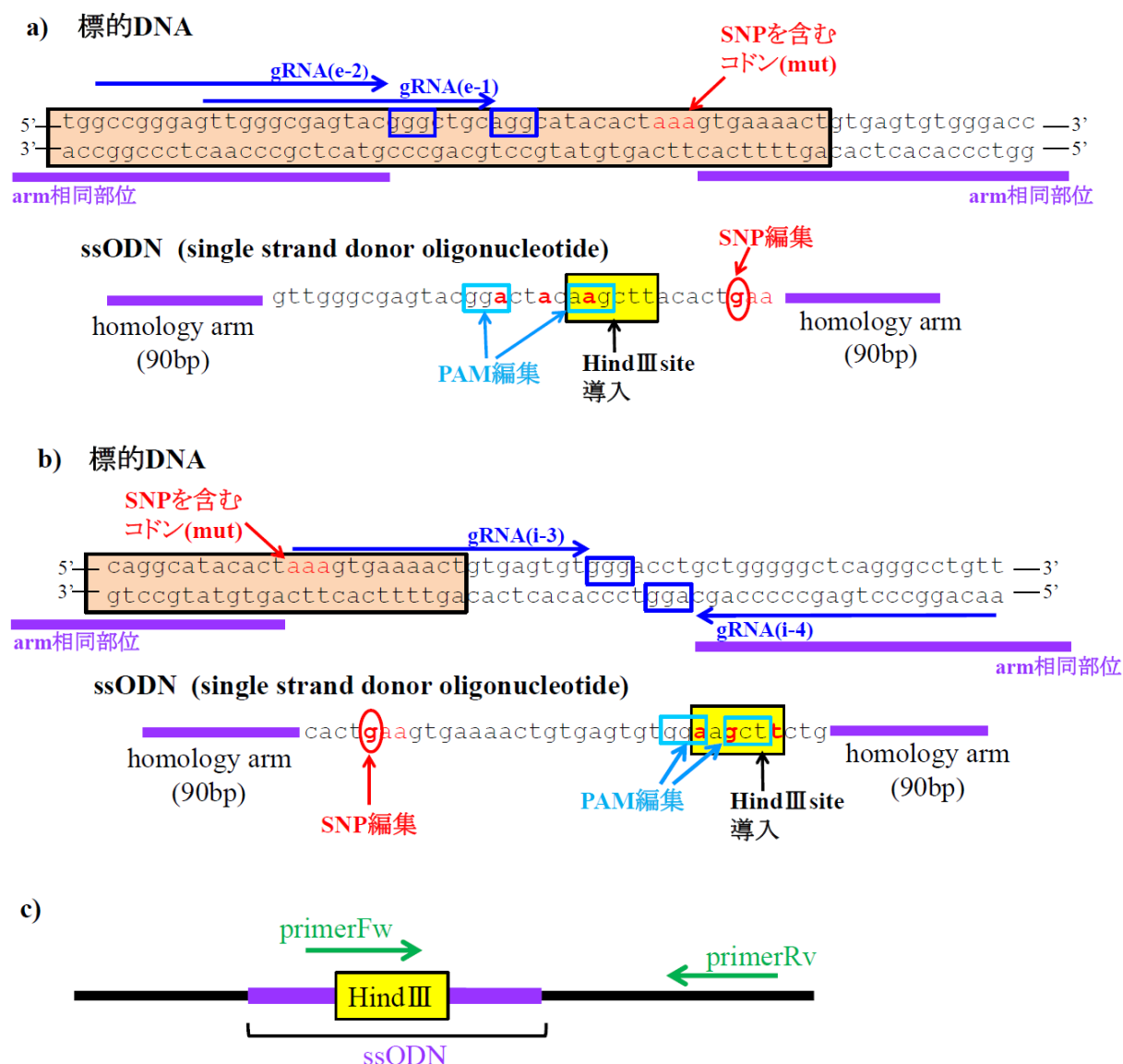
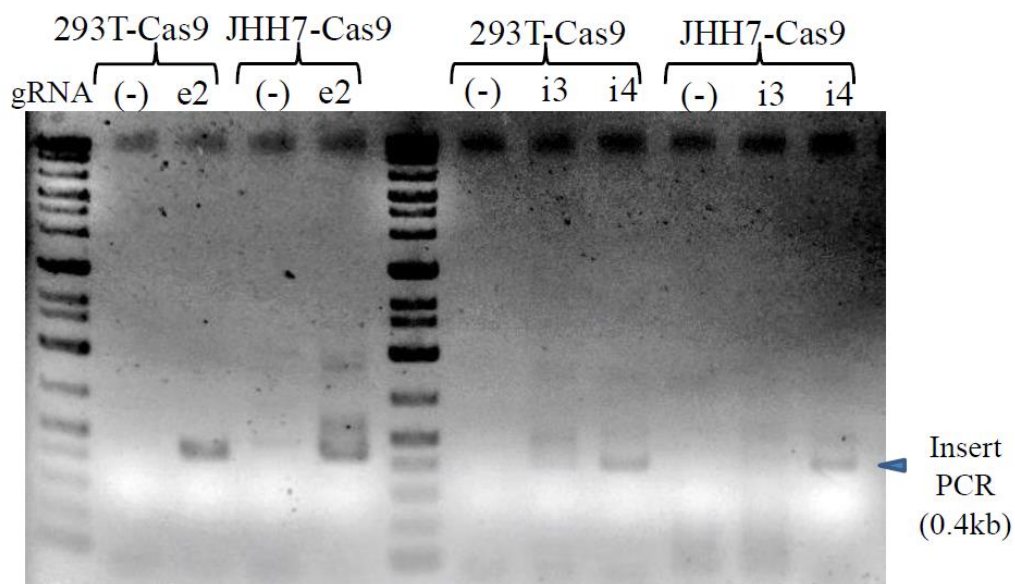


図 23 ssODN を用いた SNP 編集

- エクソン内をターゲットとした gRNA (e1,e2) に対し、アミノ酸変更を伴わずに PAM (NGG 配列) が変更されるよう ssODN の配列を決定した。
- イントロン内をターゲットとした gRNA (i3,4) に対し、PAM (NGG 配列) が変更されるよう ssODN の配列を決定した。
- 編集によって変更された塩基が 3' 末端に相当するように Fw プライマーを設定し、PCR の増幅によって編集の有無を確認した。

Cas9 安定発現細胞株 293T-Cas9 および JHH7-Cas9 に対し、3 種の gRNA とそれぞれに対応した ssODN を導入し、72 時間後に細胞 DNA を回収した。これを鋳型として、編集後配列に対応したプライマーによる PCR を行い、電気泳動の結果より増幅 DNA 量を定量した (図 24)。293T-Cas9 に gRNA(e2) を導入した時のバンド強度を 1 としてそれぞれの相対量を求め、編集効率を比較した。この結果、gRNA の e2 と i4 では増幅がみられ目的の編集が起こっているのに対し、i3 では増幅が悪く、編集効率が低いと考えられた。



	293T-Cas9		JHH7-Cas9		293T-Cas9			JHH7-Cas9		
	NC	e2	NC	e2	NC	i3	i4	NC	i3	i4
バンド強度	0	1	0	0.61	0	0.01	0.15	0	0	0.10

図 24 各 gRNA を用いた編集効率の検討

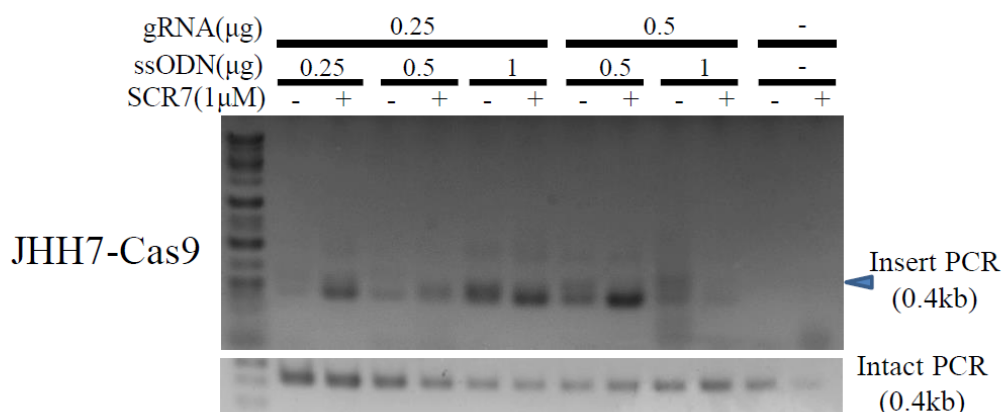
Cas9 安定発現細胞株に対し、gRNA (e2, i3, i4) および対応する ssODN を導入し、編集後配列に特異的な PCR により編集の有無を確認した。293T-Cas9 に gRNA(e2) を導入した時のバンド強度を 1 とした相対量を比較した。

Cas9 切断効率の良い gRNA を選択しても、ドナーを用いた相同組換えによる最終的な編集効率には差を認め、相同組み換えの効率もターゲットにより変化する可能性が示唆された。この結果より、以後の実験には相同組換え効率の良い gRNA (e2、i4)を採用することとした。

⑧ SCR7 添加と gRNA+ssODN 導入量の編集効率への影響の検討

DNA 二重鎖切断の二つの修復機構のうち、NHEJ に関わる遺伝子の RNAi やインヒビターなどによって NHEJ を抑制することで、相同組換えによる編集の効率が上がるという報告がある[65, 81, 82]。この効果を期待して、NHEJ に関与する DNA ligaseIV のインヒビターである SCR7 の編集効率への影響を調べた。同時に、gRNA と ssODN の導入量、導入比の編集への影響も検討した。

JHH7-Cas9 細胞に対し、gRNA (e2) と ssODN の導入量を 6 段階設定し、さらにそれぞれ SCR7 添加・非添加の 12 条件について、導入 72 時間後に細胞 DNA を回収した。これを鋳型として編集後配列に対応したプライマーによる PCR を行い、電気泳動の結果より各バンド強度を定量した (図 25)。gRNA 0.25 μ g + ssODN 0.25 μ g、SCR (+) での増幅 DNA 量を 1 としてそれぞれの相対量を求め、編集効率を比較した。なお PCR のコントロールとして、編集前配列に対応したプライマーによる PCR 産物も泳動した。



gRNA	0.25						0.5				-	
ssODN	0.25		0.5		1		0.5		1		-	
SCR7	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
バンド強度	0.03	1	0.12	0.42	1.42	1.83	0.73	2.48	0.03	0.01	0	0

図 25 gRNA・ssODN 導入量、SCR7 添加有無による編集効率の検討

JHH7-Cas9 に対し、SCR 添加・非添加それぞれの条件で gRNA(e2)+ssODN を導入し、編集後配列に特異的な PCR により編集の有無を確認した。

gRNA 0.25 μ g + ssODN 0.25 μ g、SCR (+) でのバンド強度を 1 とした相対量を比較した。編集前配列に対応した Fw プライマーを用いた増幅断片をコントロールとした。

JHH7-Cas9 では増幅がみられたいずれの条件でも SCR7(+) の方が比較的増幅が良く、gRNA 0.5 μ g + ssODN 0.5 μ g、SCR7(+) の条件が最も良いという結果であった。導入量が多ければ必ずしも効率が良いわけではなく、今回の検討では最大量の条件 (gRNA 0.5 μ g + ssODN 1 μ g) ではかえって導入が少なかった。核酸量に比例してトランスフェクション試薬も増量するためその毒性の影響や、細胞によってトランスフェクションの許容導入量が異なる可能性が考えられ、導入量や導入方法を含めた十分な条件検討が必要な可能性がある。

5. 考察

CRISPR の登場でより簡便に遺伝子編集が可能になり、今後この技術を用いた遺伝子治療の分野は更に研究が進むと考えられる。但し、現時点では編集効率が必ずしも高くはないため、全ての体細胞を改変することが必要な遺伝子の場合、多くは受精卵や幹細胞に対して遺伝子編集を行い正しく編集されたものを選択するという手法を取らざるを得ない。一方、全ての細胞でなくとも一部の細胞が改変されれば全体としての機能を回復し得る遺伝子、例えば酵素タンパクなどの遺伝子であれば、編集効率が高くなくとも治療的に応用できる可能性がある。

今回、本研究では遺伝子編集のターゲットとして活性に SNP が関与する酵素である ALDH2 を選択したが、サブユニットが 4 量体を作って機能するタンパクであり、変異型分子の混在が大幅に活性を低下させるという特徴があった。本研究では ALDH2 遺伝子 SNP の直接編集、ALDH2 cDNA 挿入による強制発現の 2 種類の遺伝子編集を行った。その結果、発現がわずかな腎上皮細胞の 293T 細胞では新たな遺伝子挿入は有効であるが、元々 wt/mut で発現のある肝細胞の JHH7 細胞では内在性の変異型分子が活性に影響するため、遺伝子の直接編集により変異型を野生型に変えることが有効である可能性が示唆された。但し、強制発現と内因性の発現が発現量も異なること、ターゲットにより編集効率も同じではないため単純な比較はできないと考えられる。薬剤選択後コロニーの insert PCR の結果では、AAVS1 は ALDH2 SNP よりもターゲットとして編集効率自体が良いと考えられ、また相

同組み換えによる遺伝子のノックインよりも NHEJ による遺伝子ノックアウトの方が簡便であることから、内在性 ALDH2 遺伝子をノックアウトした上で AAVS1 に cDNA を挿入するという方法も有効かもしれない。目的とする遺伝子の発現形態やタンパクの特性、またターゲットの編集効率などを考慮し、手法を検討・選択するべきであると考えられた。

今回のプラスミドを用いたリポフェクションによる導入の検討では、薬剤マーカーによる選択および insert PCR で目的配列の挿入を確認した細胞でも全てが十分な活性を呈するわけではなく、正しく編集されたものを DNA 配列、タンパク発現などで吟味して、ようやくある程度の活性の改善を確認できるという状態であり、全体に対し目的の機能改善が得られた割合が非常に低かったことが分かる。一旦体外で細胞に編集を施し、目的の細胞を選択の後に体内に戻すという *ex-vivo editing* の手法であれば、効率の悪さや編集による有害な変異などのリスクの問題は解消できるかもしれない。一方、体内で直接細胞を編集する *in-vivo editing* の方法は、手法としては簡便であるが、十分な活性を得るには全体の編集効率を相対上げることが必要と考えられること、有害な変異のリスクが存在することが問題となる。現在血液領域では既に *ex-vivo editing* の手法が確立しているが、その他の臓器についてマウスレベルで行われている遺伝子編集は主に *in-vivo editing* の研究が多い。臨床応用も可能な *in vivo editing* の手法を発達させるには、編集効率および臓器特異性を上げ、リスクを減らすための検討が必須である。

必要なコンストラクトの細胞への導入手段としては、リポフェクションやエレクトロポレーション、ウイルスなどが考えられるが、生体にとって安全で実用化可能であり、かつ細胞の

種類に応じてより効率の高い有用なキャリアを更に検討する必要がある。肝細胞に対する、B 型肝炎ウイルスのエンベロープタンパクを利用した drug delivery system である BNC (Bionanocapsule) [83, 84] は、肝炎ウイルスが肝細胞に感染する機序を利用して肝細胞特異的な導入が可能であり、かつ肝細胞に対する導入効率は約 60~100%と非常に高く[83]、DNA やタンパクなど様々な物質が導入可能である。以前自身が報告した研究でも、高率に microRNA を肝細胞に導入することができた[85]。BNC の臓器特異性と導入効率の高さは CRISPR のキャリアとしても有効性が期待され、今後応用を試みたい。

DNA 二重鎖切断を入れるターゲット部位の選択としては、編集したい配列の近傍で PAM (NGG 配列) の条件を満たす部位が候補となる。しかし、gRNA における 20 塩基のターゲット認識配列のうち、5 塩基以下の mismatch では切断が起こり得る[86-88]。このターゲット以外の無関係な部位で二重鎖切断が起こってしまう現象を off-target 効果といい、host 細胞にとって有害な影響を及ぼし得るため、これを最低限に抑えるために gRNA の 20 塩基のターゲット認識配列はなるべく特異的な配列に設定すべきである。配列特異性の点では exon 内配列の方が良いと考えられるが、exon を切断した場合に正しく相同組み換えが起きず NHEJ により変異が入って修復される可能性があり、exon の変異はアミノ酸変異を起こしてタンパク機能を消失させるリスクが高い。intron 内では特異性が低く、off-target が増えることが予想される。更に off-target を減らす工夫として、DNA 二重鎖切断ではなく一重鎖切断により nick を入れるタイプの Cas9 変異体 (D10A) を用いて、二重鎖のそれぞれの若干ずらした位置に nick を入れることで二重鎖を切断するという方法も考案されている[89]。この方法

では、2種類の gRNA の組み合わせによって切断するためより特異性はより高くなると考えられるが、2種の gRNA を設定し導入する必要があること、また二重鎖切断よりも全体の効率は低下することがデメリットとなる。また、無関係な部位に nick が入った場合に却ってランダムな組み込みが上がるのかどうかは検討が必要である。

なお、gRNA の設定自体による編集効率の違いについては、PAM 配列の密度・GC の割合、遺伝子における exon 内・intron 内などの配置、クロマチン構造の accessibility など、様々な要因が効率に影響すると考えられているが[74-78]、現在のところ明らかな指針はなく、実際試してみないとそのターゲットにおける効率は不明である。細胞内の条件が大きく関わるため、*in vitro* での gRNA 効率の検討は実際の細胞内での効率を反映せず、従って複数のターゲット候補を使って *in vivo* での検討を行う必要があると思われる。

本研究の最終目標は ALDH2 の遺伝子編集により酵素活性を改善させることで、ALDH2 の変異型 SNP が関与する発癌を始めとした様々な疾患リスクを下げることであり、今後マウスなどを用いた *in vivo* の実験に発展させることが必要である。現在報告されている ALDH2 改変マウスモデルには ALDH2 ノックアウトマウス、ALDH2-2 強制発現マウス、ALDH2-2 ノックインマウスなどがある[21]。ALDH2 ノックアウトマウスは ALDH2 の欠如による病態を知るには有効であるが、ヒトではヘテロ遺伝子型でも低活性の ALDH2 を発現しているため、厳密にはヒト体内の動態とは異なる。ALDH2-2 強制発現マウスでは内因性の野生型 ALDH2 を大きく上回る発現量で変異型 ALDH2 (ALDH2-2) を強制発現させたもので、変異型が内因性 ALDH2 と結合して低活性となるためヒト変異型ホモのモデルとなっている。

ALDH2-2 ノックインマウスは ALDH2 遺伝子の 1 つの allele を変異型で置換したもので、報告は少ないが、よりヘテロ遺伝子型のヒトの体内の動態に近い可能性がある。ALDH2 ノックアウトマウスにおいて、アルコール投与により食道扁平上皮細胞内でアセトアルデヒドによる DNA damage の増加が報告されているため[90]、ALDH2-2 ノックインマウスで同様の表現型が起きれば、それをモデル動物として本研究から得られる遺伝子編集手法の効果を *in vivo* で検証できると思われる。

ヒトを対象とした ALDH2 活性改善のための臨床応用可能なインターベンション開発に向けては、特異性・安全性が担保されなければならない。今後高い編集効率を得ることと共に、標的細胞への特異性や生体への安全性について、より検討を進めていく必要がある。本研究における遺伝子編集の効率を上げるための様々な条件や手法の検討は、ALDH2 のみならずその他のタンパクの遺伝子編集についても役立てられるかもしれない。

6. 結語

アルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenase: ALDH) 遺伝子の一塩基多型を遺伝子編集で改変することよりある程度のタンパク機能改善が得られた。ヘテロ遺伝子型集団における発癌などの疾患リスク低下を目指した応用に向けて、さらに検討を進めていきたい。

7. 引用文献

1. Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, Latino-Martel P. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *Lancet Oncol.* 10(2): 173-80. 2009.
2. LoPachin RM, Gavin T. Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective. *Chem Res Toxicol.* 27(7): 1081-91. 2014.
3. Matsuda T, Yabushita H, Kanaly RA, Shibutani S, Yokoyama A. Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chem Res Toxicol.* 19(10): 1374-8. 2006.
4. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 7(8): 599-612. 2007.
5. Brooks PJ, Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen.* 55(2): 77-91. 2014.
6. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk. *Int J Cancer.* 121(8): 1643-58. 2007.
7. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol.* 32(5): 945-73. 2008.
8. Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Yokoyama T, Okuyama K, Takahashi H, Hasegawa Y, Higuchi S, Maruyama K, Shirakura K, Ishii H. Alcohol-related cancers

and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis*. 19(8): 1383-7. 1998.

9. Larson HN, Weiner H, Hurley TD. Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "Asian" variant. *J Biol Chem*. 280(34): 30550-6. 2005.
10. Farres J, Wang X, Takahashi K, Cunningham SJ, Wang TT, Weiner H. Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem*. 269(19): 13854-60. 1994.
11. Wang X, Sheikh S, Saigal D, Robinson L, Weiner H. Heterotetramers of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase expressed in *Escherichia coli*. A model to study the heterotetramers expected to be found in Oriental people. *J Biol Chem*. 271(49): 31172-8. 1996.
12. Yokoyama A, Kato H, Yokoyama T, Tsujinaka T, Muto M, Omori T, Haneda T, Kumagai Y, Igaki H, Yokoyama M, Watanabe H, Fukuda H, Yoshimizu H. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and glutathione S-transferase M1 and drinking, smoking, and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 23(11): 1851-9. 2002.
13. Yokoyama A, Kato H, Yokoyama T, Igaki H, Tsujinaka T, Muto M, Omori T,

- Kumagai Y, Yokoyama M, Watanabe H. Esophageal squamous cell carcinoma and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes in Japanese females. *Alcohol Clin Exp Res.* 30(3): 491-500. 2006.
14. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 321(5895): 1493-5. 2008.
15. Han H, Wang H, Yin Z, Jiang H, Fang M, Han J. Association of genetic polymorphisms in ADH and ALDH2 with risk of coronary artery disease and myocardial infarction: a meta-analysis. *Gene.* 526(2): 134-41. 2013.
16. Gu JY, Li LW. ALDH2 Glu504Lys polymorphism and susceptibility to coronary artery disease and myocardial infarction in East Asians: a meta-analysis. *Arch Med Res.* 45(1): 76-83. 2014.
17. Jia K, Wang H, Dong P. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism is associated with hypertension risk in Asians: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 8(7): 10767-72. 2015.
18. Xu F, Chen Y, Lv R, Zhang H, Tian H, Bian Y, Feng J, Sun Y, Li R, Wang R, Zhang Y. ALDH2 genetic polymorphism and the risk of type II diabetes mellitus in CAD patients. *Hypertens Res.* 33(1): 49-55. 2010.
19. Yokoyama A, Yokoyama T, Matsui T, Mizukami T, Kimura M, Matsushita S,

- Higuchi S, Maruyama K. Alcohol Dehydrogenase-1B (rs1229984) and Aldehyde Dehydrogenase-2 (rs671) Genotypes Are Strong Determinants of the Serum Triglyceride and Cholesterol Levels of Japanese Alcoholic Men. *PLoS One*. 10(8): e0133460. 2015.
20. Nagasawa H, Wada M, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Daimon M, Adachi M, Hosoya T, Emi M, Muramatsu M, Kato T. A polymorphism of the aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for multiple lacunar infarcts in Japanese men: the Takahata Study. *Eur J Neurol*. 14(4): 428-34. 2007.
21. Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev*. 94(1): 1-34. 2014.
22. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(12): 8306-11. 2002.
23. Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet*. 12(5): 301-15. 2011.
24. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*. 11(9): 636-46. 2010.
25. Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*. 300(5620): 763. 2003.
26. Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour

- CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 25(7): 778-85. 2007.
27. Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder ML, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau DM, Stupar RM, Giraldez AJ, Voytas DF, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods.* 8(1): 67-9. 2011.
28. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng X, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Meyer BJ. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science.* 333(6040): 307. 2011.
29. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 326(5959): 1509-12. 2009.
30. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 326(5959): 1501. 2009.
31. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases.

- Genetics. 186(2): 757-61. 2010.
32. Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol.* 29(2): 149-53. 2011.
 33. Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol.* 64: 475-93. 2010.
 34. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 327(5962): 167-70. 2010.
 35. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 9(6): 467-77. 2011.
 36. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339(6121): 819-23. 2013.
 37. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339(6121): 823-6. 2013.
 38. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadan AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system

- cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 468(7320): 67-71. 2010.
39. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 816-21. 2012.
40. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(39): E2579-86. 2012.
41. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, Scaramuzza S, Andolfi G, Mirolò M, Brigida I, Tabucchi A, Carlucci F, Eibl M, Aker M, Slavin S, Al-Mousa H, Al Ghonaium A, Ferster A, Duppenhaler A, Notarangelo L, Wintergerst U, Buckley RH, Bregni M, Markt S, Valsecchi MG, Rossi P, Ciceri F, Miniero R, Bordignon C, Roncarolo MG. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med*. 360(5): 447-58. 2009.
42. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, Martinache C, Rieux-Laucat F, Latour S, Belohradsky BH, Leiva L, Sorensen R, Debre M, Casanova JL, Blanche S, Durandy A, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 363(4): 355-64. 2010.
43. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. 20 years of gene therapy for

SCID. *Nat Immunol.* 11(6): 457-60. 2010.

44. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, Down J, Denaro M, Brady T, Westerman K, Cavallesco R, Gillet-Legrand B, Caccavelli L, Sgarra R, Maouche-Chretien L, Bernaudin F, Girot R, Dorazio R, Mulder GJ, Polack A, Bank A, Soulier J, Larghero J, Kabbara N, Dalle B, Gourmel B, Socie G, Chretien S, Cartier N, Aubourg P, Fischer A, Cornetta K, Galacteros F, Beuzard Y, Gluckman E, Bushman F, Hacein-Bey-Abina S, Leboulch P. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature.* 467(7313): 318-22. 2010.
45. Jacome A, Navarro S, Rio P, Yanez RM, Gonzalez-Murillo A, Lozano ML, Lamana ML, Sevilla J, Olive T, Diaz-Heredia C, Badell I, Estella J, Madero L, Guenechea G, Casado J, Segovia JC, Bueren JA. Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol Ther.* 17(6): 1083-92. 2009.
46. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Diez IA, Dewey RA, Bohm M, Nowrouzi A, Ball CR, Glimm H, Naundorf S, Kuhlcke K, Blasczyk R, Kondratenko I, Marodi L, Orange JS, von Kalle C, Klein C. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med.* 363(20): 1918-27. 2010.
47. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, Schmidt M,

- Kramer A, Schwable J, Glimm H, Koehl U, Preiss C, Ball C, Martin H, Gohring G, Schwarzwaelder K, Hofmann WK, Karakaya K, Tchatchou S, Yang R, Reinecke P, Kuhlcke K, Schlegelberger B, Thrasher AJ, Hoelzer D, Seger R, von Kalle C, Grez M. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med.* 16(2): 198-204. 2010.
48. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Bougneres P, Schmidt M, Kalle CV, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol.* 507: 187-98. 2012.
49. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 26(7): 808-16. 2008.
50. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, June CH. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 370(10): 901-10. 2014.

51. Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JK, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenberghe LH, Church GM, Wagers AJ. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2015.
52. Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, Bhattacharyya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. 2015.
53. Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Rivera RM, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2015.
54. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordonez A, Hannan NR, Rouhani FJ, Darche S, Alexander G, Marciniak SJ, Fusaki N, Hasegawa M, Holmes MC, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, Vallier L. Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 478(7369): 391-4. 2011.
55. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a

- disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol.* 32(6): 551-3. 2014.
56. Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L, Murphy SL, Finn JD, Khazi FR, Zhou S, Paschon DE, Rebar EJ, Bushman FD, Gregory PD, Holmes MC, High KA. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature.* 475(7355): 217-21. 2011.
57. Anguela XM, Sharma R, Doyon Y, Miller JC, Li H, Haurigot V, Rohde ME, Wong SY, Davidson RJ, Zhou S, Gregory PD, Holmes MC, High KA. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood.* 122(19): 3283-7. 2013.
58. Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, Lin YY, Wang HY, Wang CC, Shen YC, Wu FY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids.* 3: e186. 2014.
59. Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, Schwartz RE, Michailidis E, Bhatta A, Scott DA, Zhang F, Rice CM, Bhatia SN. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep.* 5: 10833. 2015.
60. Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbuthnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription

- activator-like effector nucleases. *Mol Ther.* 21(10): 1889-97. 2013.
61. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EE, Beekman JM, Clevers H. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 13(6): 653-8. 2013.
62. Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 13(6): 659-62. 2013.
63. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 8(11): 2281-308. 2013.
64. Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, Collingwood TN, Frodin M, Davis GD. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods.* 8(9): 753-5. 2011.
65. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol.* 33(5): 538-42. 2015.
66. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(6): 2211-5. 1990.

67. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo j.* 10(12): 3941-50. 1991.
68. Vaughan EE, DeGiulio JV, Dean DA. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Curr Gene Ther.* 6(6): 671-81. 2006.
69. Gasiorowski JZ, Dean DA. Postmitotic nuclear retention of episomal plasmids is altered by DNA labeling and detection methods. *Mol Ther.* 12(3): 460-7. 2005.
70. Martin T, Wysocki B, Wysocki T, Pannier A. Identifying Intracellular pDNA Losses From a Model of Nonviral Gene Delivery. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2015.
71. Wurtele H, Little KC, Chartrand P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther.* 10(21): 1791-9. 2003.
72. Yoon M, Madden MC, Barton HA. Developmental expression of aldehyde dehydrogenase in rat: a comparison of liver and lung development. *Toxicol Sci.* 89(2): 386-98. 2006.
73. Stewart MJ, Malek K, Crabb DW. Distribution of messenger RNAs for aldehyde dehydrogenase 1, aldehyde dehydrogenase 2, and aldehyde dehydrogenase 5 in human tissues. *J Investig Med.* 44(2): 42-6. 1996.
74. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert

- BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 343(6166): 84-7. 2014.
75. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*. 343(6166): 80-4. 2014.
76. Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, Cheng AW, Trevino AE, Konermann S, Chen S, Jaenisch R, Zhang F, Sharp PA. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 32(7): 670-6. 2014.
77. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet*. 16(5): 299-311. 2015.
78. Malina A, Cameron CJ, Robert F, Blanchette M, Dostie J, Pelletier J. PAM multiplicity marks genomic target sites as inhibitory to CRISPR-Cas9 editing. *Nat Commun*. 6: 10124. 2015.
79. Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnol*. 14: 69. 2014.
80. Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 11(11): 5586-91. 1991.
81. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kuhn R. Increasing

- the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 33(5): 543-8. 2015.
82. Yu C, Liu Y, Ma T, Liu K, Xu S, Zhang Y, Liu H, La Russa M, Xie M, Ding S, Qi LS. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 16(2): 142-7. 2015.
83. Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MK, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol.* 21(8): 885-90. 2003.
84. Yu D, Amano C, Fukuda T, Yamada T, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada H, Tada H, Seno M. The specific delivery of proteins to human liver cells by engineered bio-nanocapsules. *Febs j.* 272(14): 3651-60. 2005.
85. Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget.* 5(14): 5581-90. 2014.
86. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 31(9): 822-6. 2013.
87. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ,

- Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 31(9): 827-32. 2013.
88. Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 31(9): 839-43. 2013.
89. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 154(6): 1380-9. 2013.
90. Amanuma Y, Ohashi S, Itatani Y, Tsurumaki M, Matsuda S, Kikuchi O, Nakai Y, Miyamoto S, Oyama T, Kawamoto T, Whelan KA, Nakagawa H, Chiba T, Matsuda T, Muto M. Protective role of ALDH2 against acetaldehyde-derived DNA damage in oesophageal squamous epithelium. *Sci Rep.* 5: 14142. 2015.

8. 謝辞

本論文の作成にあたり懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりましては以下の先生方に特に多大なるご協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学消化器内科

大塚基之先生、岸川孝弘先生、吉川剛史先生、高田朱弥先生

その他、様々な点で御協力いただきました東京大学消化器内科の先生方に感謝申し上げます。