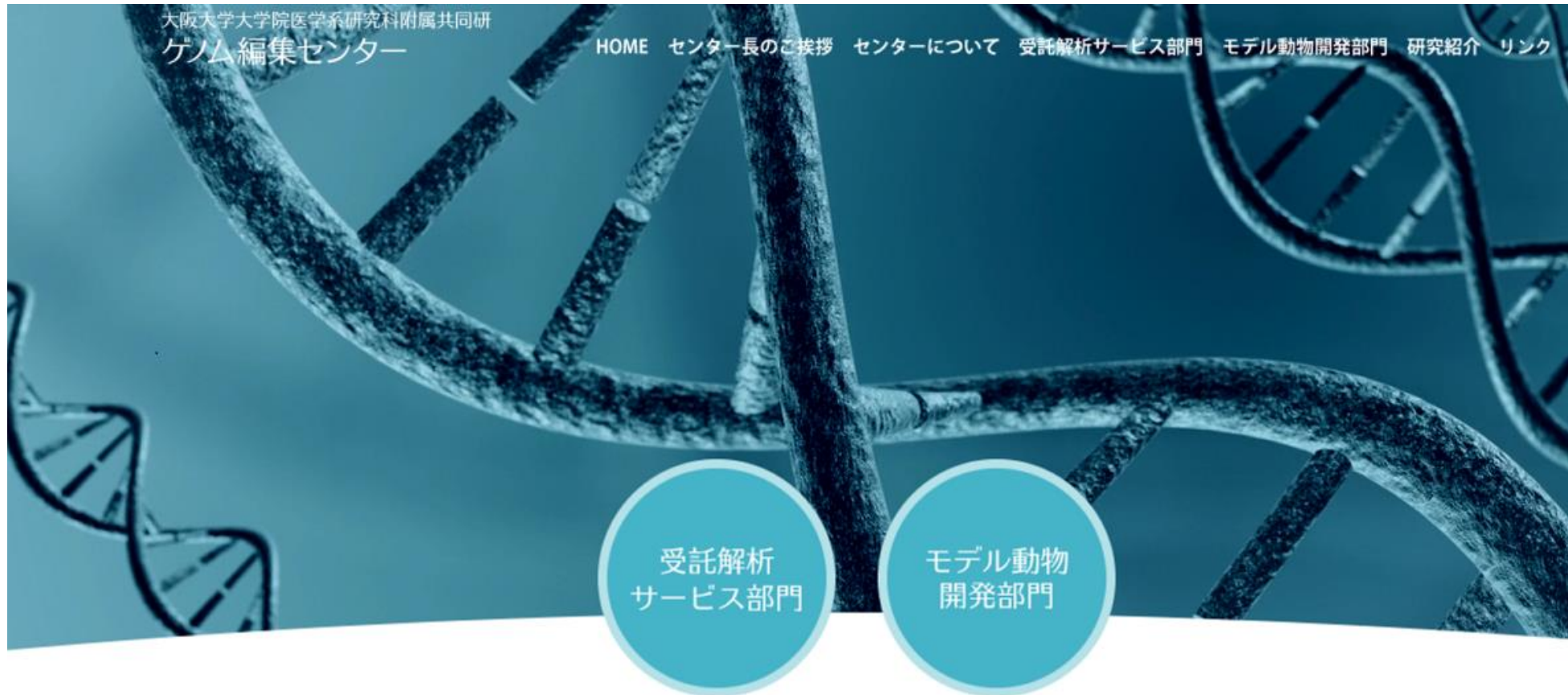


令和8年度 修士・博士課程機器セミナー

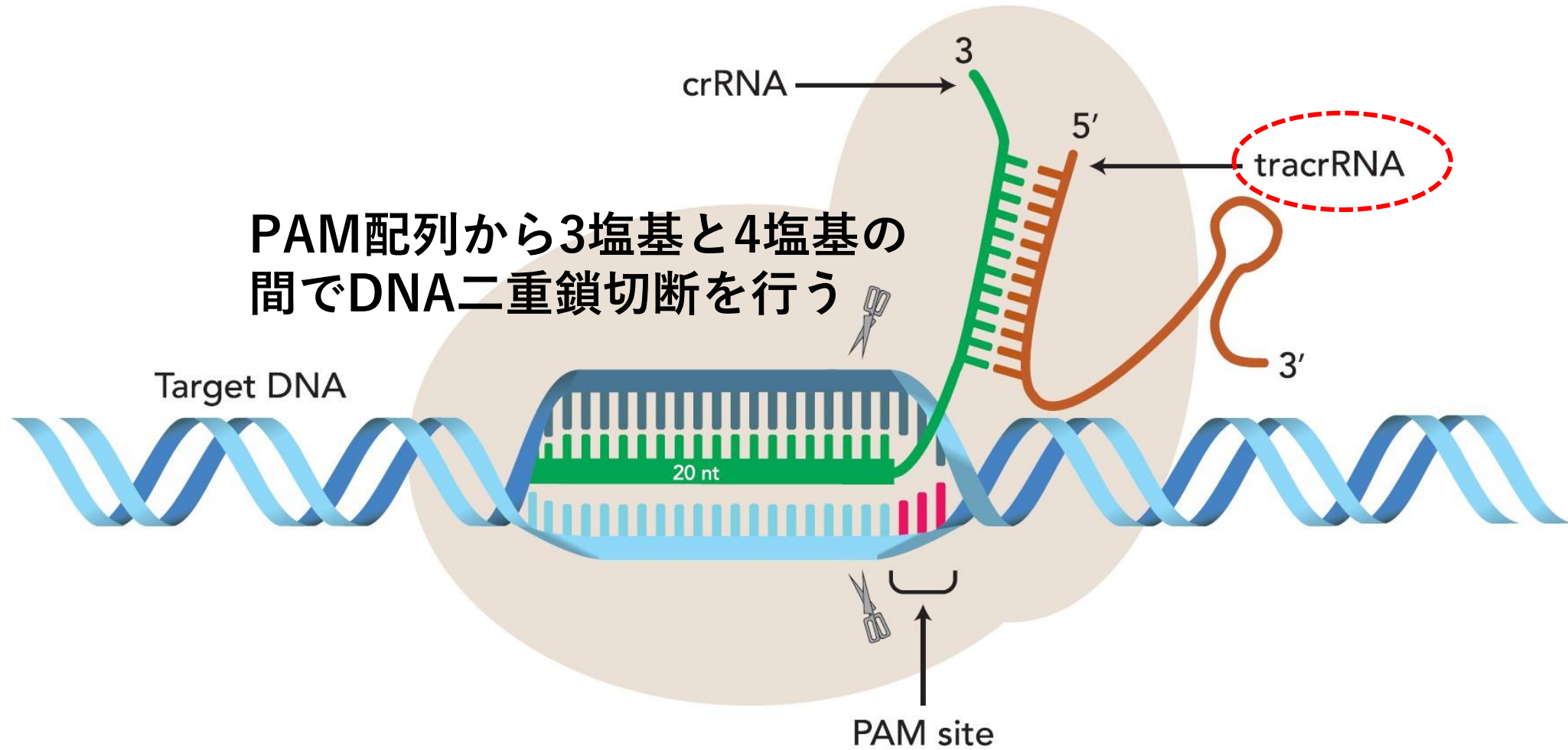
ゲノム編集 = 開発の歴史から医療応用まで

=
共同研究実習センター・ゲノム編集センター

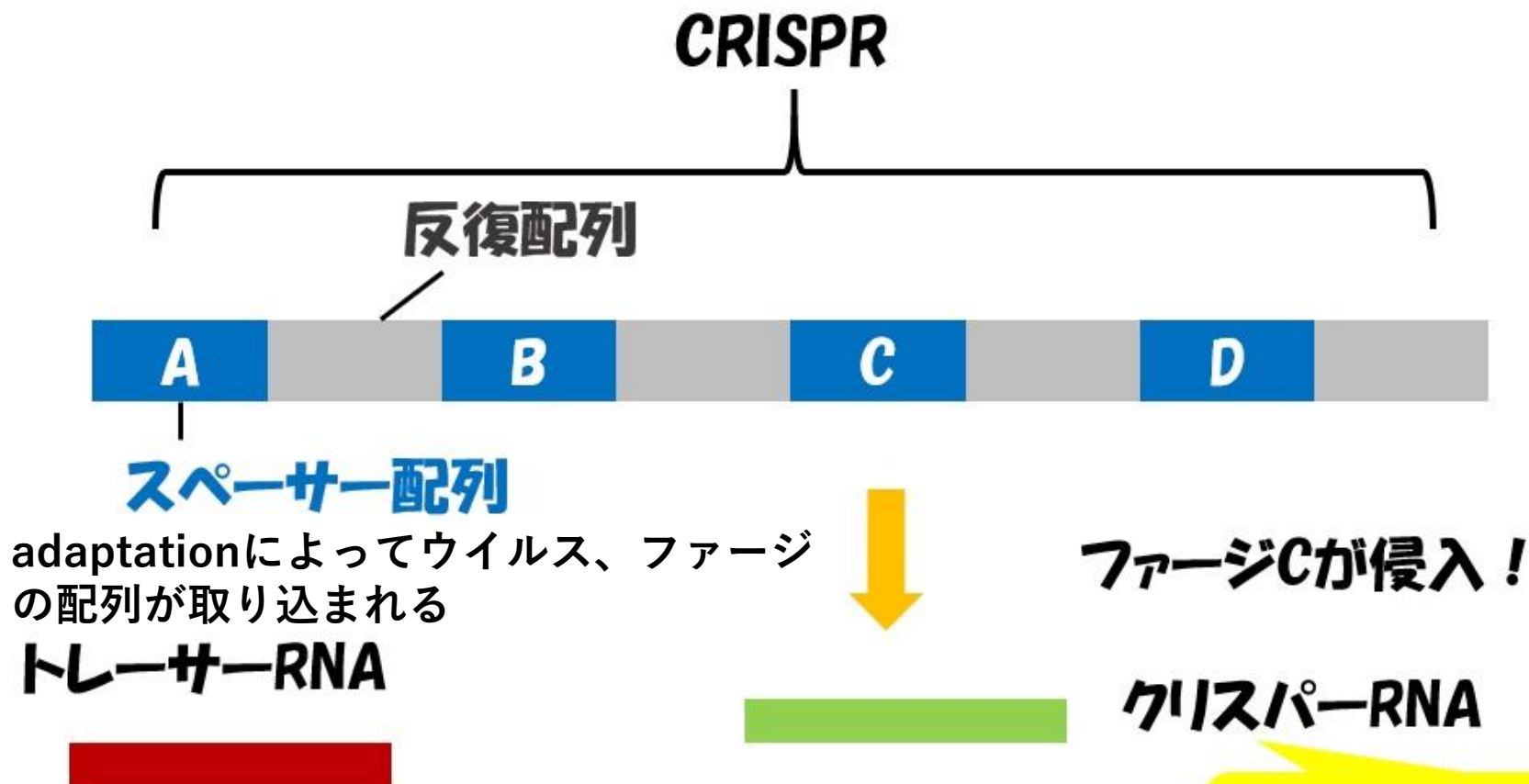
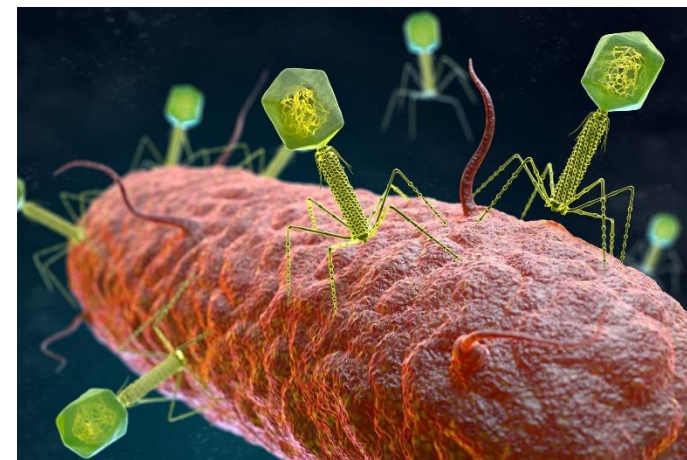
吉村 康秀



CRISPR-Cas9によるDNA二重鎖切断

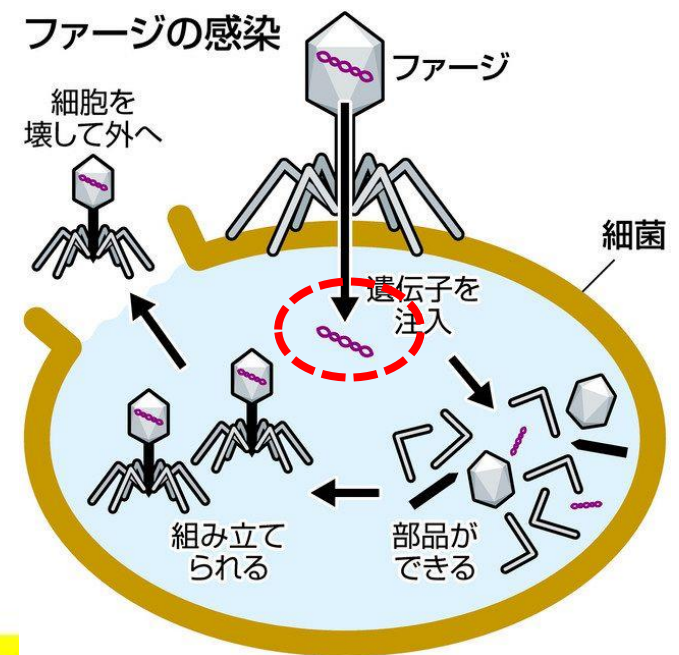


CRISPR-Cas9は細菌の免疫システム



ファージCが侵入!

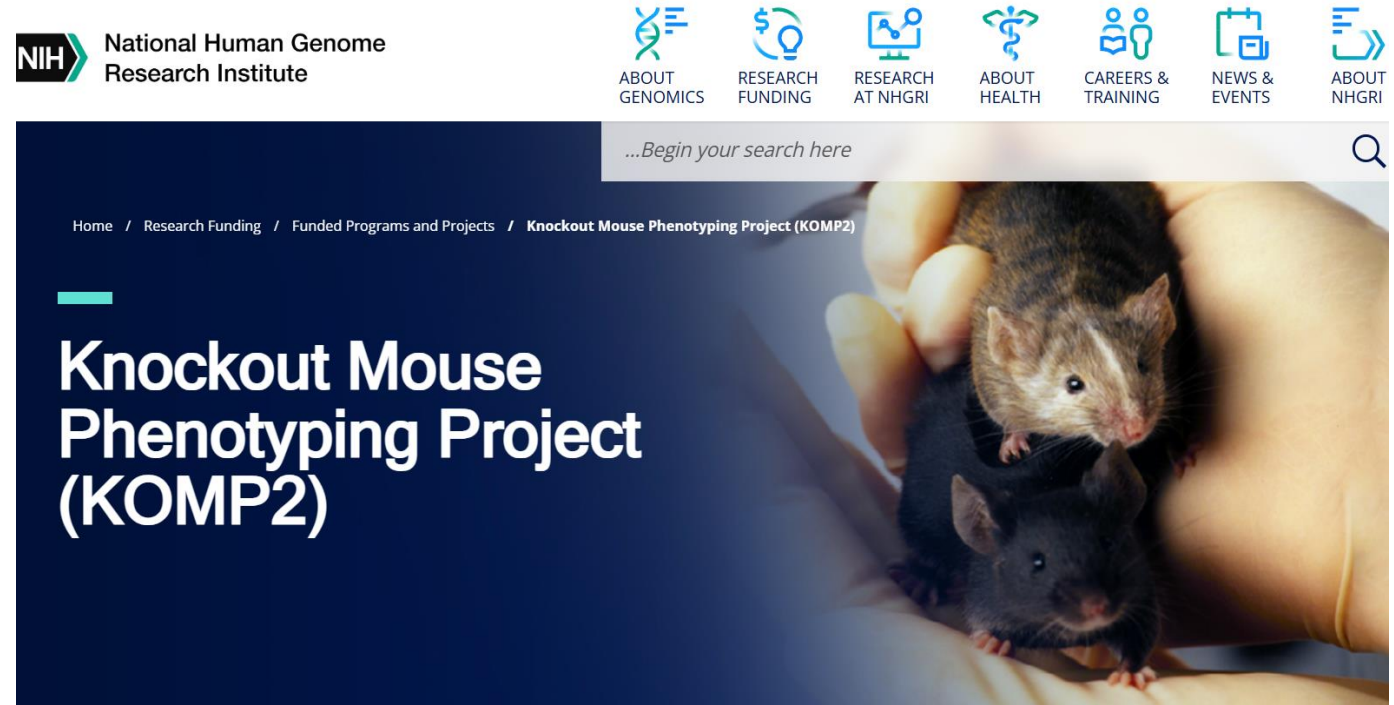
ファージCとペアになる配列を持つ



遺伝子改変マウスの現状

Knockout Mouse Phenotyping Project (KOMP2) : NIH

- ・ 現在存在するノックアウト系統は約13,000（9,700をKOMP2が作製

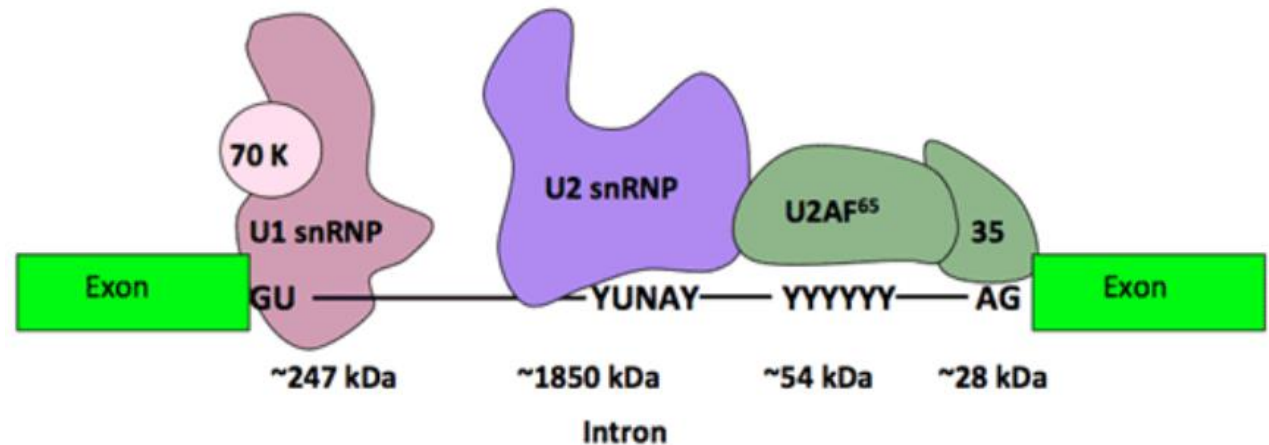
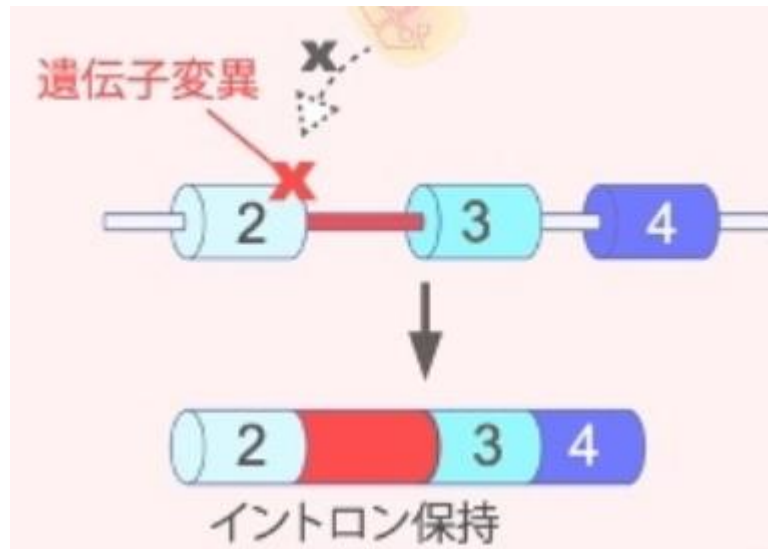


International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC)

- ・ KOMP2と共同で既に、5,500系統の表現型解析を行い、少なくとも1,200系統の表現型解析を予定

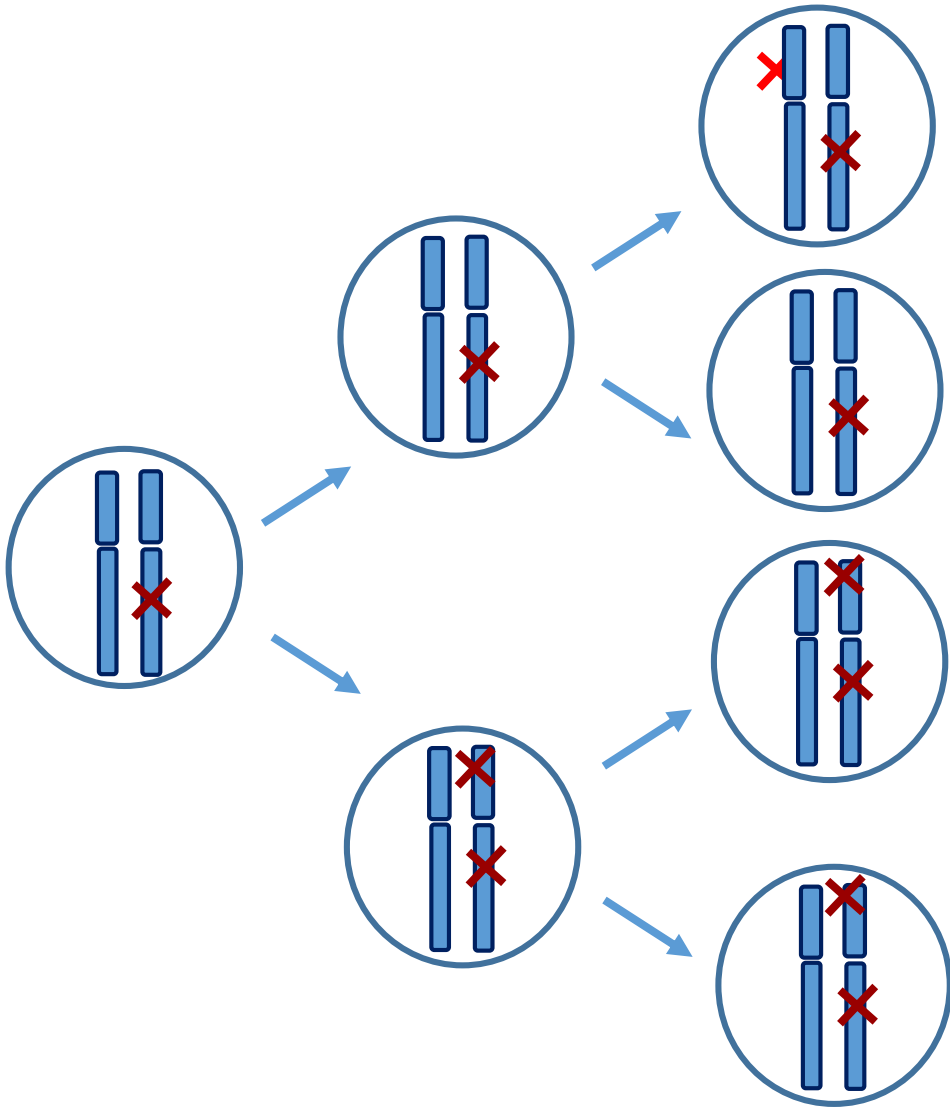
時代はノックアウトからノックインへ

医学部内の受託の傾向として、近年はヒトで見つかったバリエーションの導入や、バリエーションの存在するアレルのタグによる認識の相談が急増している。



技術的な詳細は4月21日の共同研テクニカルセミナーで！

ES細胞と比較しての弱点があるのはキメラ



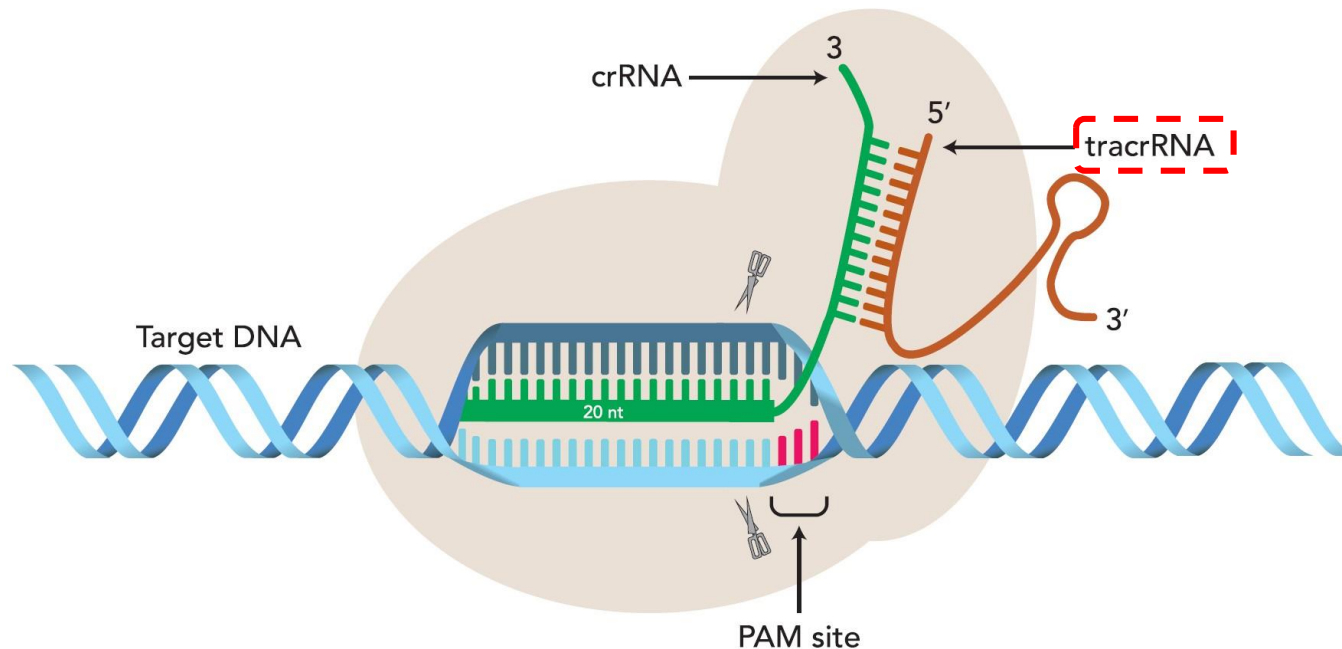
- 2細胞期で初めてゲノム編集が生じる事もある
- 上記も含めて、オフターゲットはゲノム編集の大きな課題（後述）
- マウスの場合は、複数の子供をタイピングする必要がある

共同研でのゲノム編集サポート事業（細胞編）

人工型：全てのcomponentがパッケージされたプラスミドを使用する
→ 20塩基のオリゴDNAをプラスミドに導入するだけ

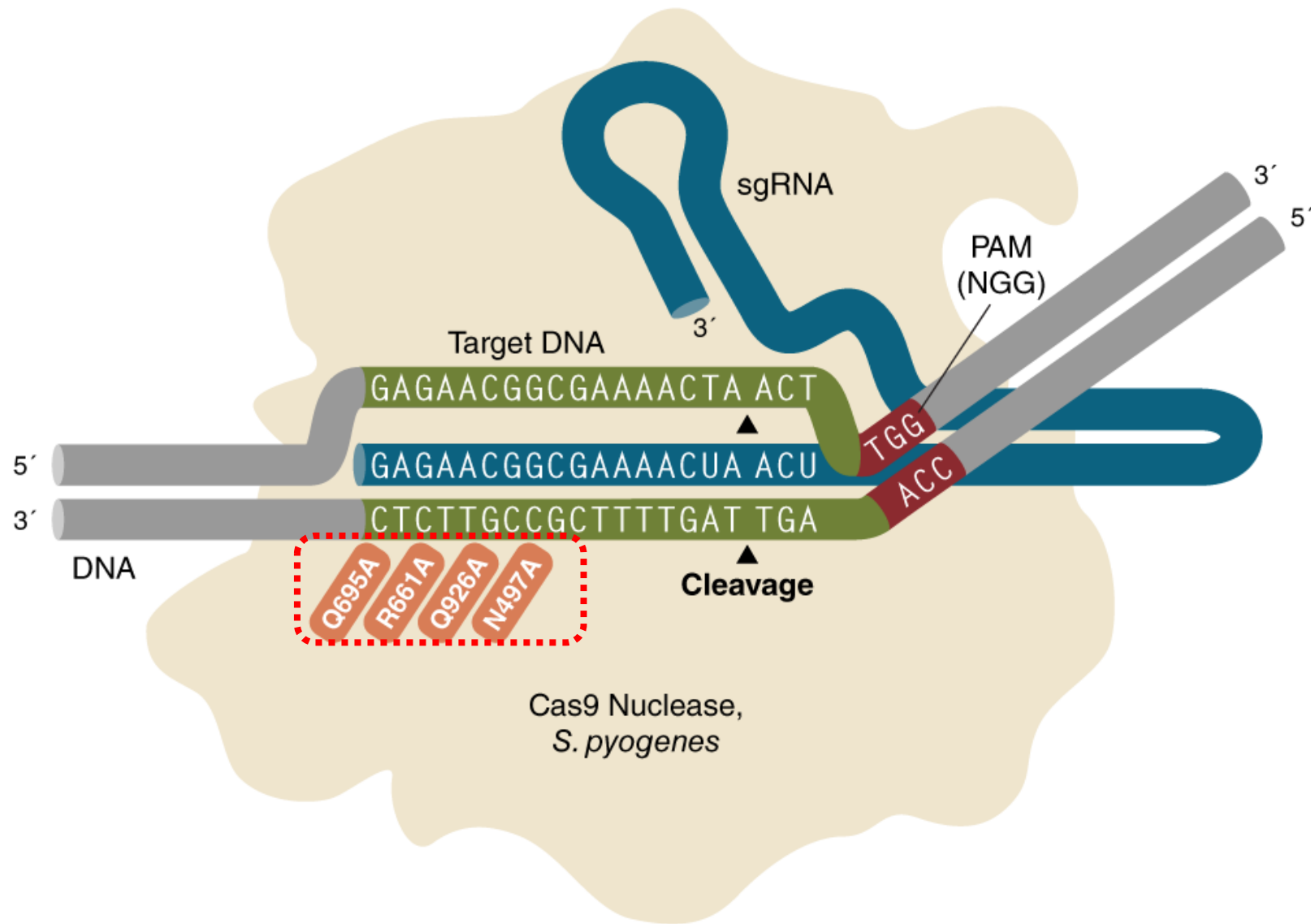
自然型：Cas9タンパク、tracrRNA、guideRNAのcomponentを事前に調整する
手間はかかるが大した手間ではありません（後述）。

→ 共同研を通じて購入すると初回35%、その後も15%オフで購入できます。



図：IDT社 HPより

オフターゲットの低減策としてのHiFi Cas9





ゲノム編集サポート事業

ゲノム編集センターでは大阪大学におけるゲノム編集研究をサポートいたします。
IDT、Thermo Fisher Scientificと提携し、技術的支援と製造試薬の特別価格での提供をおこないます。

※IDT製品価格改定に関するご案内（IDT社）※

2023年7月1日(土)から、価格改定を実施させていただきます事、ご案内させていただきます。

2015年からゲノム編集センターサポートプログラムに参加させて頂き、過去数回オフィシャルな価格改定の際も、プログラム開始時の価格を根拠としてご購入させて頂いておりました。しかしながら、昨今の原材料高騰やコストアップなどの影響もあり、サポートプログラムの価格設定も改訂させて頂く事となりました。

価格改定に伴いご購入と並び、変更にご利用頂ける事も変わりますので、引き続き変更願っておりますようお願い申し上げます。旧価格での発注は6月いっぱいとなりますので、この時期のまとめ買いなどもご検討ください。

主な製品

| 製品名 | 旧価格 | 現価格 | 共同研利用者価格 |
|---|---------|---------|----------|
| Akt-R® CRISPR-Cas9 crRNA, 2 nmol | ¥9,300 | ¥10,800 | ¥9,630 |
| Akt-R® CRISPR crRNA, 5 nmol | ¥11,000 | ¥12,300 | ¥11,969 |
| Akt-R® CRISPR-Cas9 sgRNA, 2 nmol | ¥21,600 | ¥24,000 | ¥21,420 |
| Akt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3, 100 µg | ¥21,400 | ¥26,350 | ¥23,518 |
| Akt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3, 100 µg | ¥28,000 | ¥32,030 | ¥28,587 |

注文はこちら

共同研へのお問い合わせ

order@ctrilab.med.osaka-u.ac.jp

製品に関するお問い合わせ

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ゲノム編集技術・製品に関するお問い合わせは
jotech@thermofisher.comまでお送りください。

IDT
ANALYTICAL TECHNOLOGIES

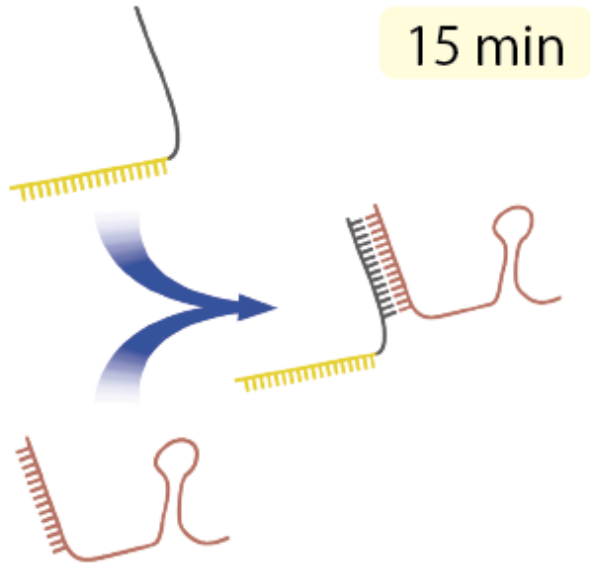
件名に「阪大共同研サポート事業/ご所属/お名前」
をご記入頂き、カスタマーケア担当
japan-custcare@idtdna.comまでお送りください。

和研実株式会社

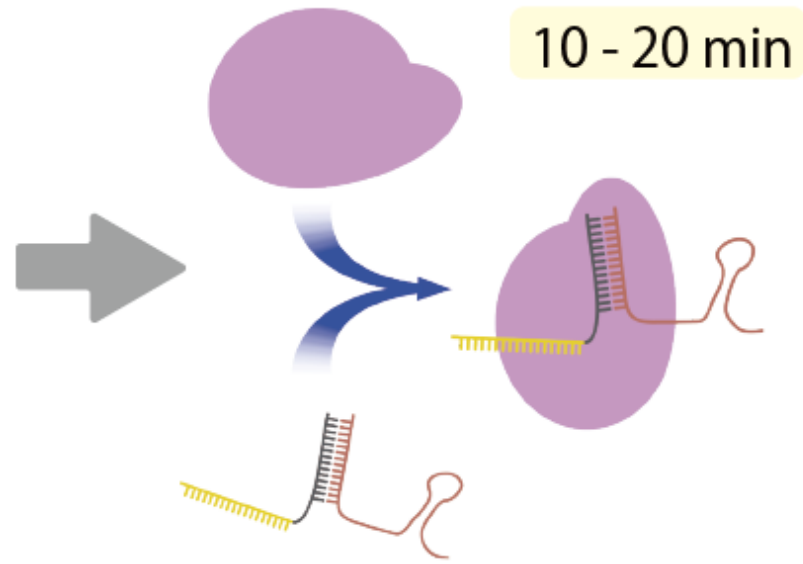
osaka@wakenyaku.co.jp

意外と簡単なゲノム編集手順

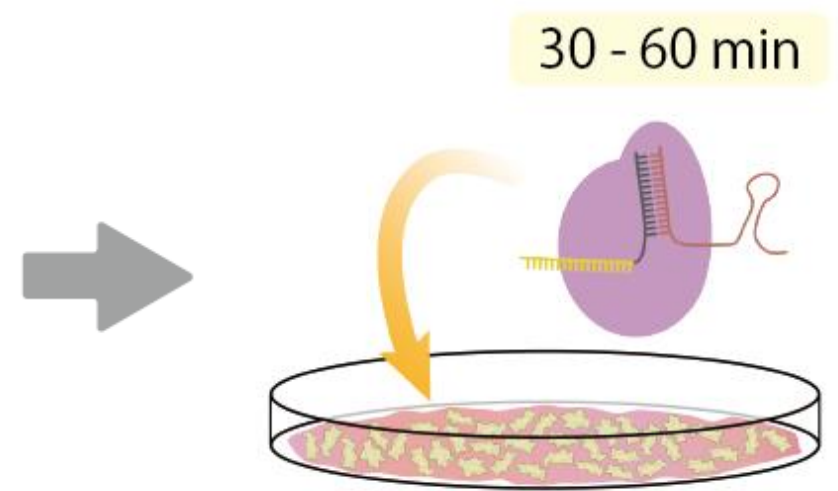
STEP1 Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex の作製



STEP2 RNP complex の作製



STEP3 RNP complex の導入



図：IDT社 HPより

siRNAやshRNAの導入でうまくいっていないという相談が多く、実際は当該細胞への導入効率のチェックから始める例が殆ど。この場合、GFPを付加したCas9タンパクを使用する。

図：IDT社 HPより

ゲノム編集で用いられる共同研の設備

エレクトロポレーター



ネッパジーン
(D91-02A)



LONZA
(D91-09)

無料貸し出し

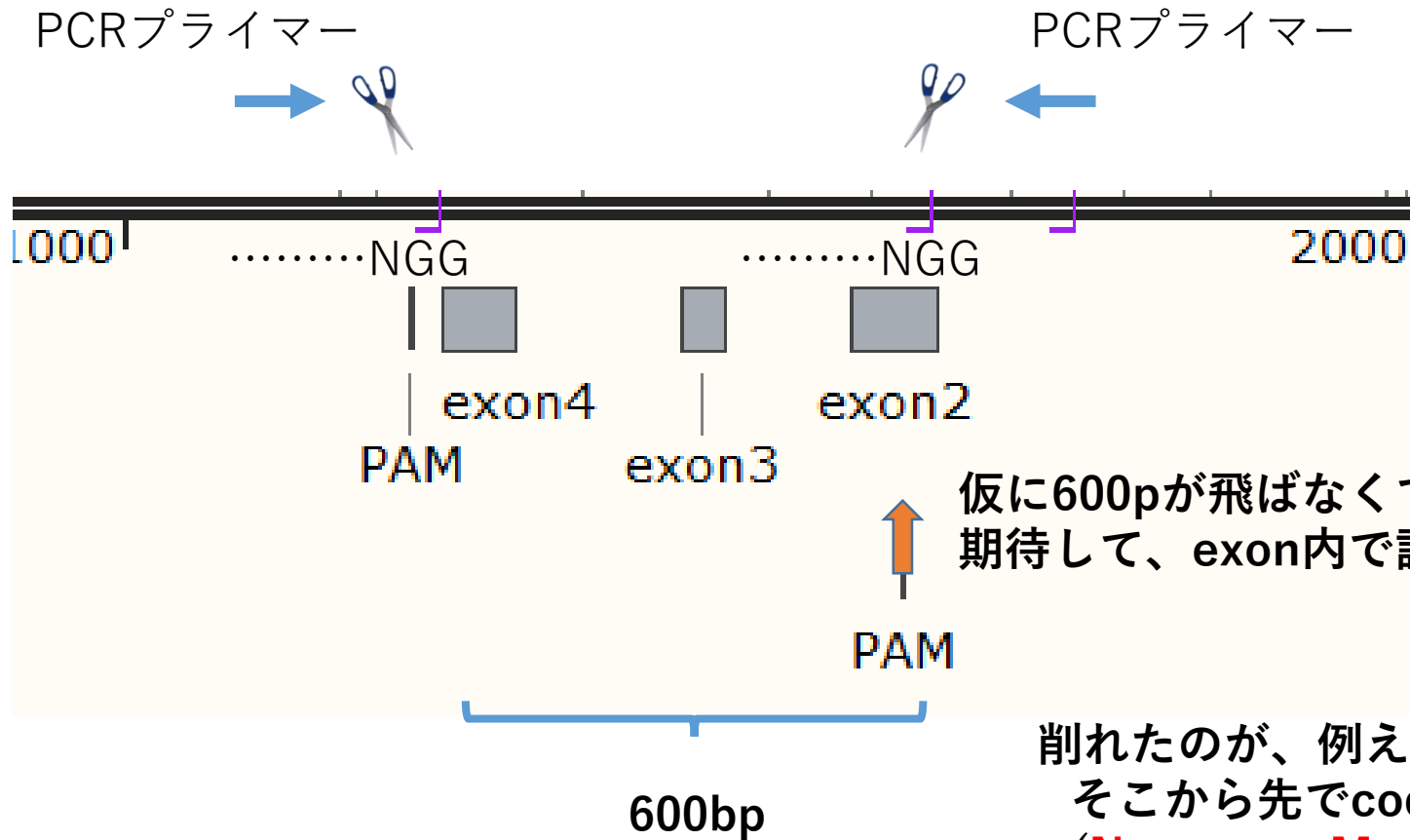
ゲノム編集検定



MuutINA

有償受託(100円/サンプル)

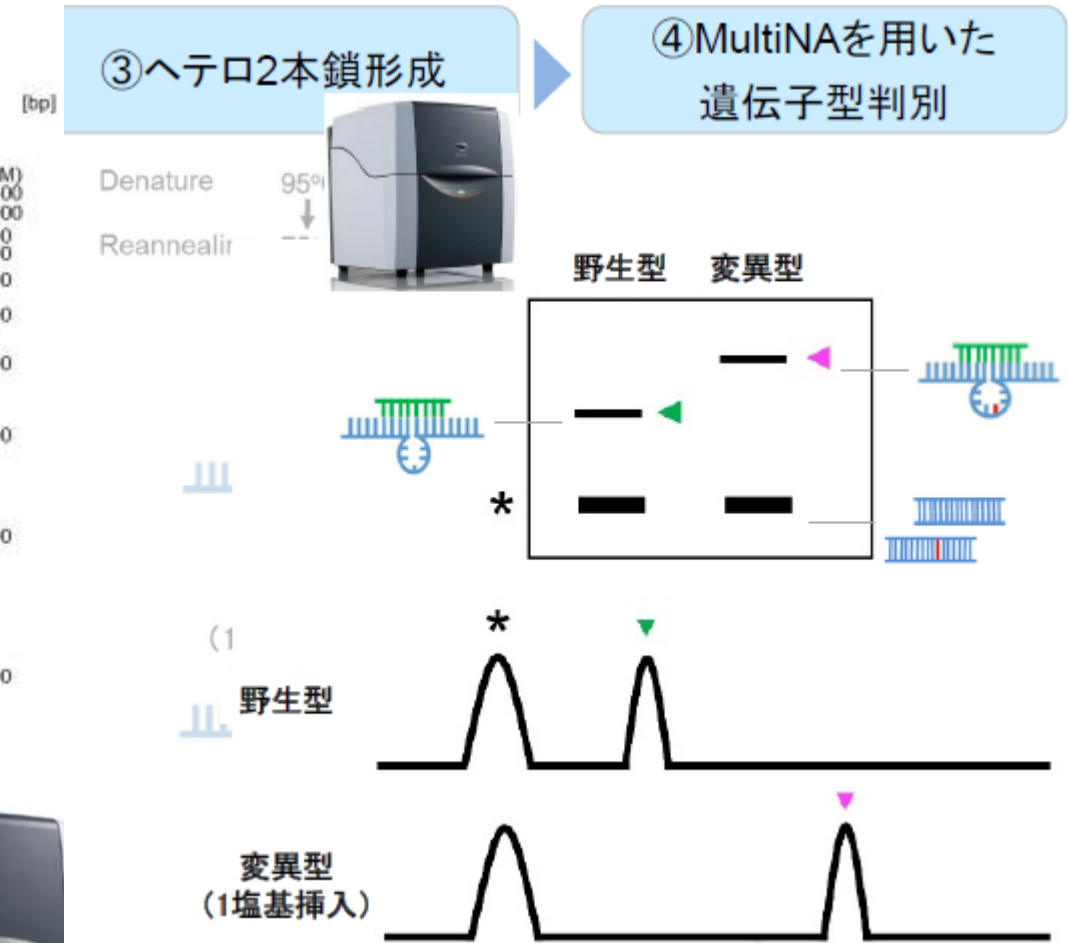
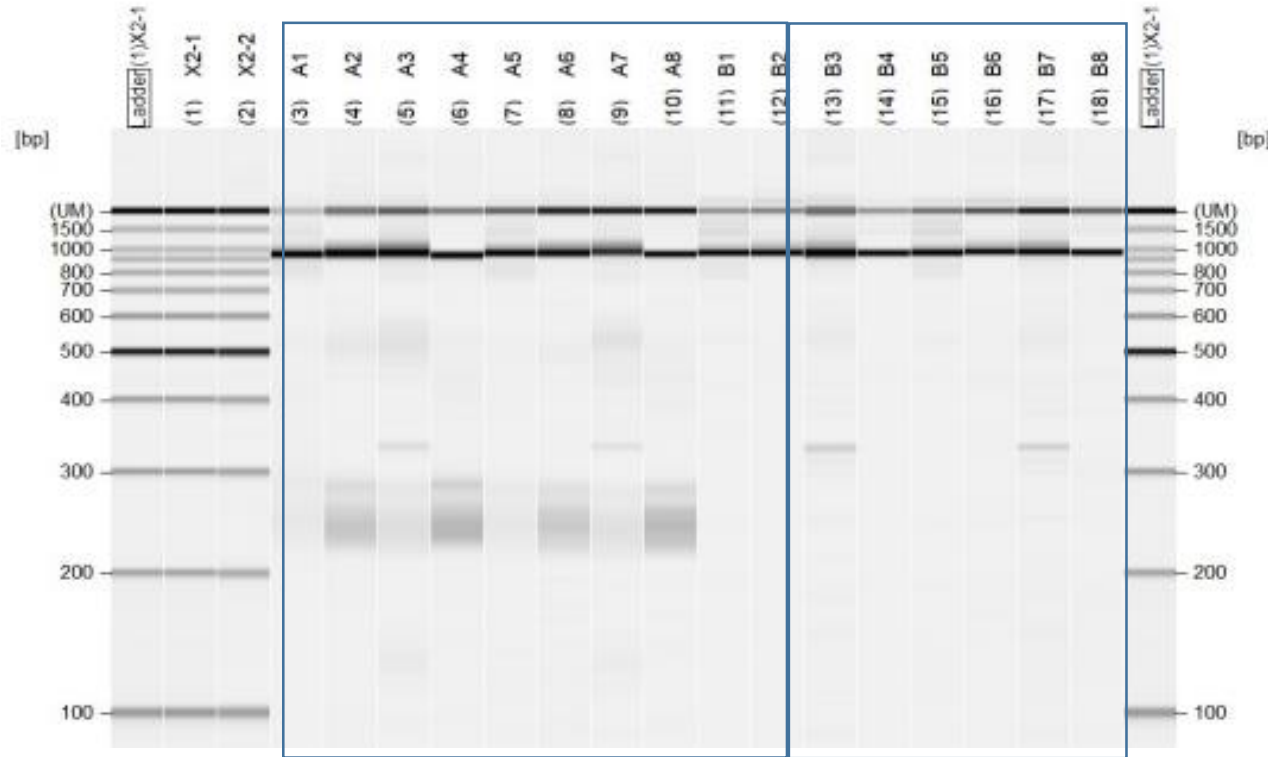
ノックアウトの実例（最近の依頼例）



仮に600bpが飛ばなくても、deletionが起きる事を期待して、exon内で設計

削れたのが、例えば17bpなど3の倍数でなければ、そこから先でcodingがstopする可能性が高い
(**Nonsense Mediated Decay**が期待され、ノックアウトと同等の効果が期待される)

MultiNAやPCRによるジェノタイピング



MultiNAによる受託解析サービス
(100円/1サンプル)も受け付けて
います！



大まかなCRISPR-Casシステムの分類

Cas9のように単一の因子で機能する
(クラス2)

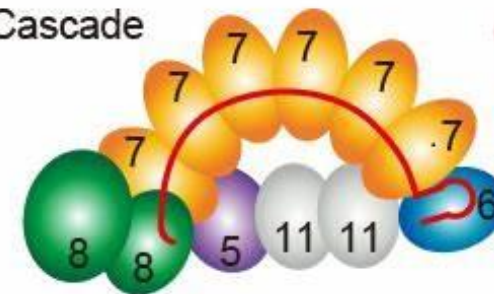
Cas9

Cas12a …PAM配列としてTTTNを認識

Cas13 …RNAを標的として切断

Cas3のように複数の因子で機能する
(クラス1)

Cascade

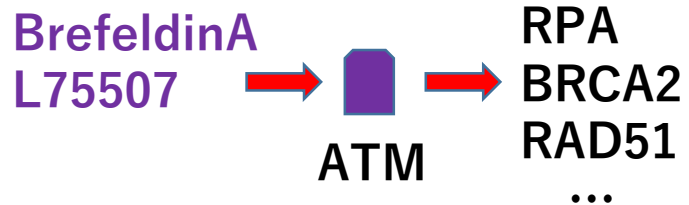
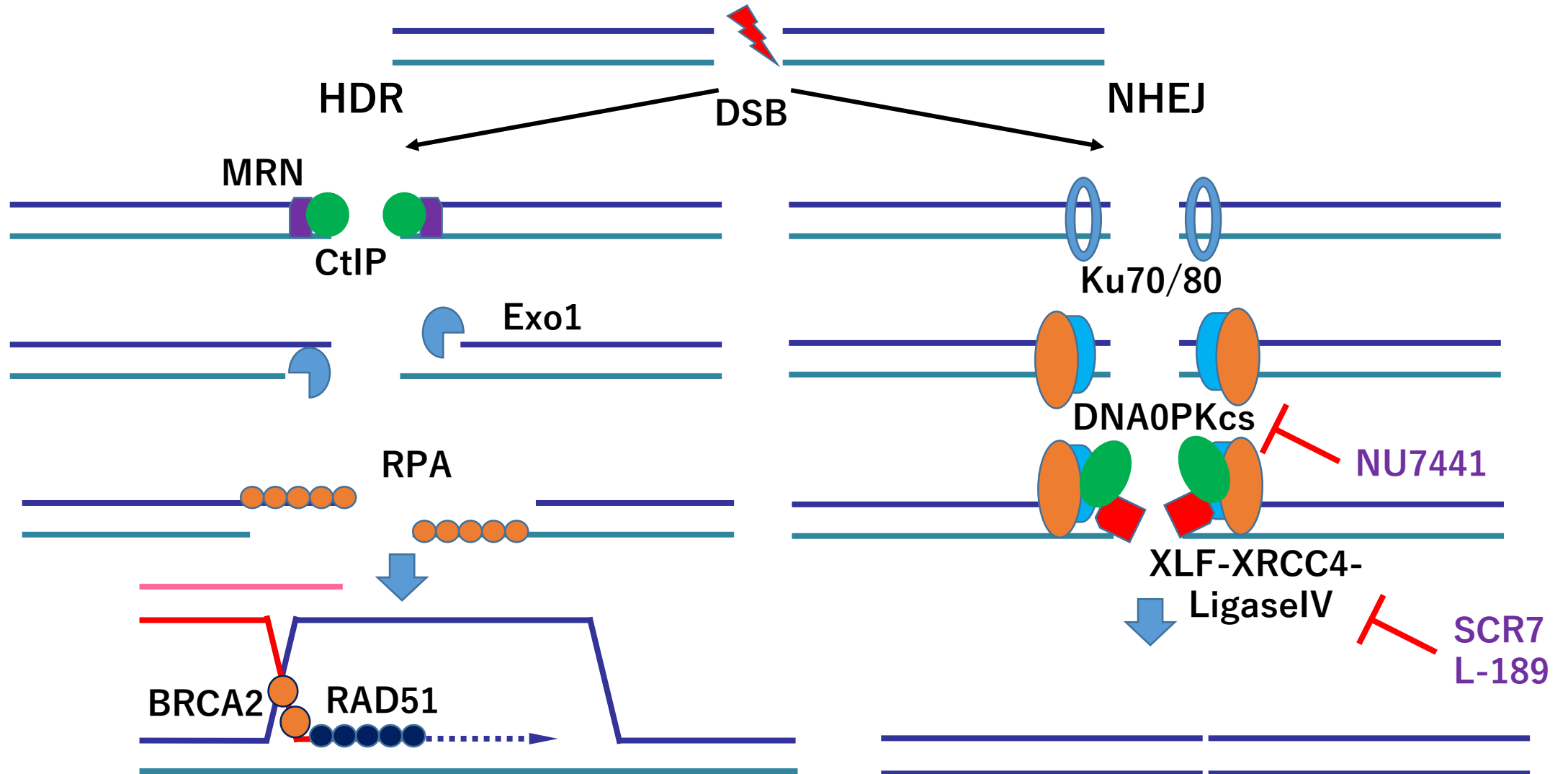


crRNA
(ガイドRNA)

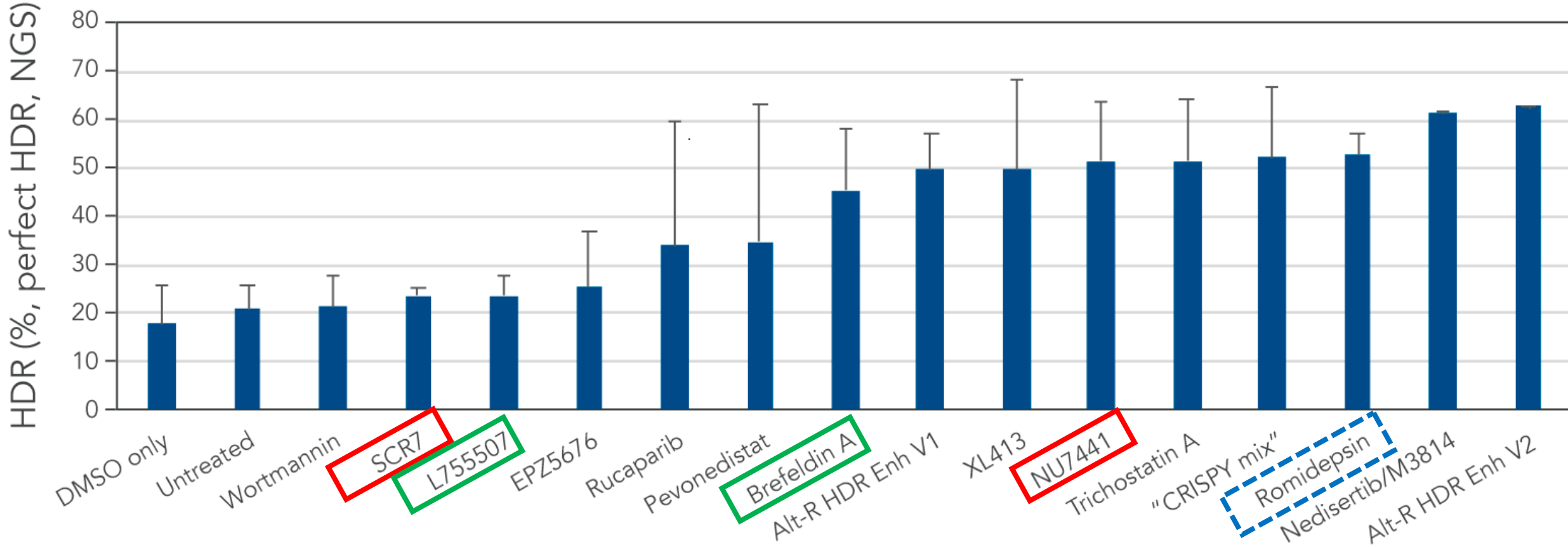
ニッポンジーンHPより

医療用に、もっと低分子量のものが他の生物種（カビ、アメーバなど）から開発されようとしている(Fanzor)。

DNA二重鎖切断の修復



相同組換え（HDR）のエンハンサー、非相同組換え（MHEJ）のインヒビターを用いると、ノックインの効率が劇的に上がる



ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

図：IDT社 HPより

Animals 2024, 14(5), 719

iPS細胞の方がfibroblastよりはHDRが起きやすい



Regenerative Therapy

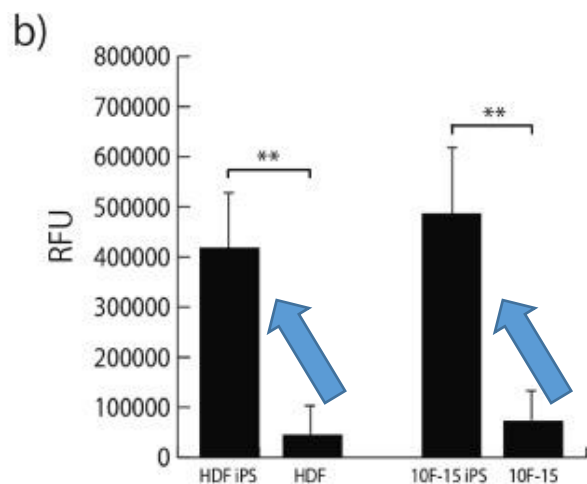
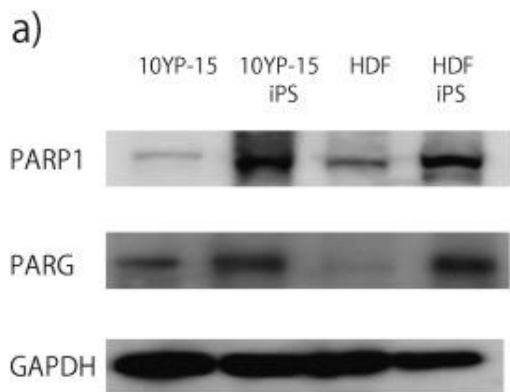
Volume 11, 1 December 2019, Pages 101-105



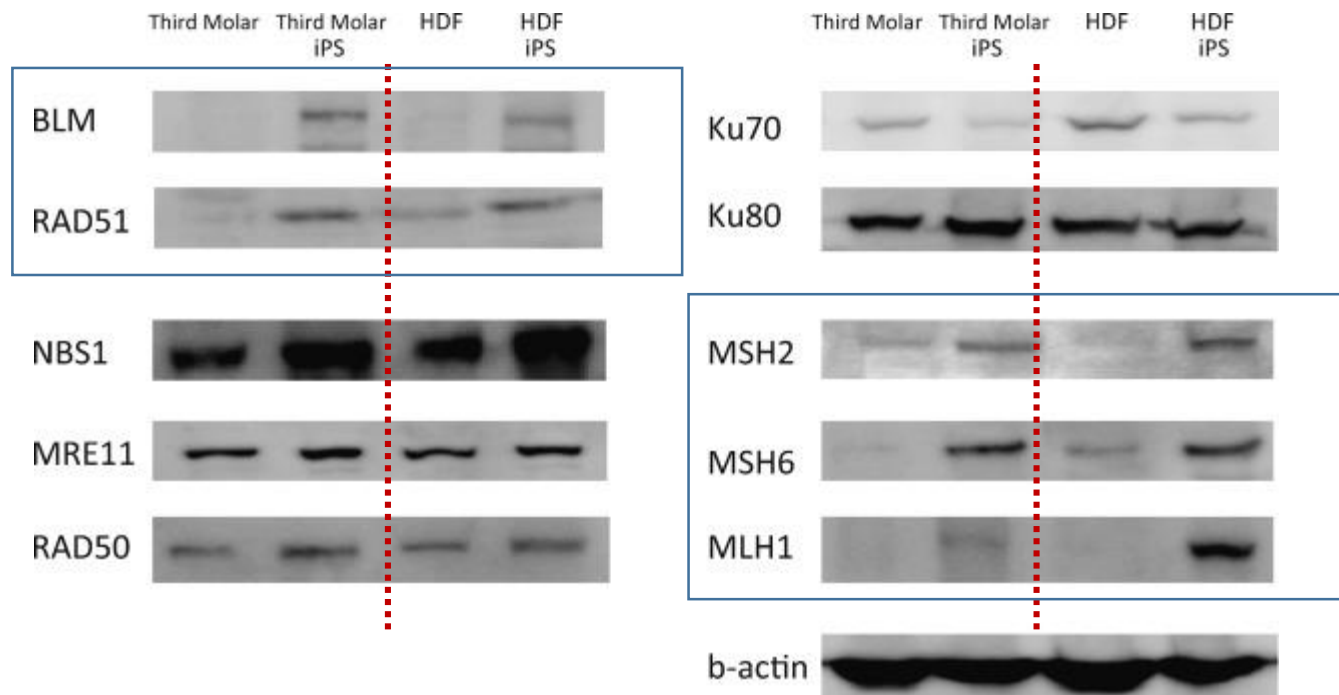
Original Article

Increased error-free DNA repair gene expression through reprogramming in human iPS cells ☆,

Yasuhide Yoshimura *✉



間葉系幹細胞 線維芽細胞 間葉系幹細胞 線維芽細胞



CRISPOR crRNA 設計ツール (Free)

Gene Models: **Do not show** Update

Variant database: **1000 Genomes 05-2013** Min. frequency: **0.0** Update [Missing a variant database? We can add it.](#)

Position 0 10 20 30 40 50 60 70

Sequence CACAGTGCAGCGGCGAGGTGAGCGCGGGCGGGGCGGGCCCTGAGTCCCTGTGAGCGGAGAATCTGAGTGTG

---CGG ---CGG CCT--- CCT---
---CGG ---CGG
---GGG ---GGG
---GGG ---GGG

Download for: [SerialCloner \(free\)](#) - [ApE \(free\)](#) - [GenomeCompiler](#) - [Benchling](#) - [SnapGene](#) - [Geneious](#) - [Vector NTI](#) - [LaserGene](#) - [Genbank](#) - [FASTA](#)

Predicted guide sequences for PAMs

Ranked by default from highest to lowest specificity score (Hsu et al., [Nat Biot 2013](#)). Click on a column title to rank by a score.
If you use this website, please cite our [paper in NAR 2018](#). Too much information? Look at the [CRISPOR manual](#).

Download as Excel tables: [Guides](#) / [Guides, all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)

| Position/ Strand | Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A- | MIT Specificity Score | CFD Spec. score | Predicted Efficiency | | | Outcome | | Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM | Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chr6_ssto_hap7 only |
|---------------------|--|-----------------------------|-----------------------|----------------------|-------------|-----------------|--------------|--------|---|---|
| | | | | Doench '16 | Mor.-Mateos | Doench-RuleSet3 | Out-of-Frame | Lindel | | |
| 47 / rev | ACTCAGATTCTCCGCTCACA GGG Enzymes: <i>HinfI</i> , <i>BslFI</i> , <i>Bsll</i> Cloning / PCR primers | 75 | 88 | 63 | 28 | 17 | 68 | 77 | 0-0-10-10-81 0-0-0-1-0 101 off-targets | 2:intron:DRB4 2:intron:DRB4 2:intron:HLA-DRB4 show all... |
| 48 / rev | CACTCAGATTCTCCGCTCAC AGG Enzymes: <i>AccBSI</i> , <i>HinfI</i> , <i>BslFI</i> , <i>Bsll</i> | 83 | 88 | 51 | 39 | -53 | 64 | 80 | 0-0-6-9-105 0-0-0-0-2 | 3:intron:DRB4 3:intron:DRB4 3:intron:HLA-DRB4 |

IT Specificity Score
(MIT specificity score)

CFD specificity score
(Cutting Frequency Determination)

chr6_ssto_hap7 only

ソフトウェアも、どんどん進化！

ゲノム編集技術の医療への応用

ZFN : HIV治療

主導企業 : Sangamo Therapeutics

患者T細胞 → CCR5 knockout → 体内へ戻す

TALEN, ZFN : 鎌状赤血球症

- βグロビン遺伝子 (HBB) の異常を修復
- 造血幹細胞を体外で編集 → 自家移植
- 実用化が進行中 (FDA承認例あり)

TALEN : HLA改変による拒絶回避

TALENを使う理由 :

- ✓ 高精度
- ✓ 大型欠失が少ない
- ✓ HDR効率安定

臨床グレードiPS細胞の編集では今もTALEN採用例が多い