2.4.4 ゲノム編集・エピゲノム編集

(1) 研究開発領域の定義

ゲノム編集 (Genome Editing) は、微生物から動物、植物まで技術の適用生物種が広いこと、様々な遺伝子改変が可能であることから次世代のバイオテクノロジーと位置づけられている。近年 DNA 切断による編集のみならず、DNA 修飾タンパク質などの機能ドメインの導入による配列特異的な修飾や標識など新たな技術開発も進展している。特に、DNA やヒストンの修飾酵素のドメインを連結することによって特異的にエピゲノム情報を改変する技術としてエピゲノム編集 (Epigenome Editing) が注目されている。

(2) キーワード

ゲノム編集ツール、ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、塩基編集、RNA 編集、エピゲノム編集、微生物菌株育種、品種改良、疾患モデル、ゲノム編集治療、CRISPR 診断

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ゲノム編集は、人工の DNA 切断酵素 (ゲノム編集ツール) を用いて標的遺伝子に塩基配列特異的な DNA 二本鎖切断 (Double-Strand Break : DSB) を誘導し、その修復過程を利用して正確に遺伝子を改変する技術である。ゲノム編集の新たな手法を開発した、ドイツと米国の研究者 2 人が 2020 年のノーベル化学賞に選ばれている。

ゲノムは個々の生物がその DNA 上に有する遺伝情報の総体である。ゲノムを自在に改変することが可能になれば、理論上では設計通りの遺伝情報を有する生物を得られることになる。ゲノム編集は、これまで一部のモデル生物に限られた標的遺伝子の改変を全ての生物種を対象として可能にする技術である。実際、簡便なゲノム編集ツールである CRISPR-Cas9 システム (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-CRISPR associated protein 9) が開発された 2012 年以降、様々な生物を対象として遺伝子改変を行うことが現実となった。ゲノム編集では、挿入・欠失変異導入により遺伝子機能を欠損させる遺伝子ノックアウト、外来 DNA を挿入する遺伝子ノックインや、染色体レベルの改変 (大きな欠失、逆位や転座) も可能である。ゲノム編集を用いた遺伝子改変の成功例は微生物から動物・植物まで様々な生物種を対象として世界中から報告されており、生命現象の解明を目的とした基礎研究から応用研究まで幅広い展開が期待されている。応用研究としては、機能性物質を効率的に産生する微生物 (微細藻類など) の育種や農水畜産物の品種改良への適用が進んでいる。また医学分野では、iPS 細胞や免疫 T 細胞等を用いた細胞療法、デリバリー技術を伴う遺伝性疾患の治療などへの応用が始まっている。

DNA を切断する技術に加えて、ゲノム編集の基盤となる DNA 塩基配列の特異的な認識・結合システムを活用した技術開発も盛んである。例えば、DNA 切断ドメインの代わりに様々な機能ドメインを連結した新たな人工因子の作製が進められている。特に、狙った遺伝子座でのエピゲノム (DNA やヒストンのメチル化やアセチル化修飾) の改変、DNA 標識などへの利用が精力的に行われている。また、CRISPR ライブラリーを用いた機能因子のスクリーニング法は、未知の因子の探索に利用される優れた技術であり、疾患関連因子の同定や遺伝子の転写調節領域の探索などの分野で成果が挙げられている。

【研究開発の動向】

ゲノム編集ツールとしては、DNAに特異的に結合するZinc-finger ドメインまたはTranscription activator-like effector タンパク質由来のドメインを制限酵素 *FokI* のDNA切断ドメインと連結させたキメラタンパク質としてZFN (Zinc finger nuclease)、TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) が開発された。TALENの開発によってオフターゲット (目的以外のDNAの切断) の問題は大きく改善されたが、標的塩基配列ごとにタンパク質の作製が必要なうえ、作製方法が多段階で複雑であった。2012年に新しいゲノム編集ツールとしてCRISPR-Cas9が報告され、世界中でゲノム編集技術の利用が一気に広がった¹⁾。ZFNやTALENがDNA認識ドメインとしてDNA結合タンパク質を用いたのに対し、CRISPR-Cas9は短鎖RNA (gRNA) をガイドとしてDNA配列を認識するため、gRNAとCas9タンパク質を導入するだけでゲノム配列を改変することができるようになり、その簡便さと効率の高さから多くの研究者に衝撃を与え、汎用的なゲノム編集ツールとなった。

CRISPR-Cas9では標的配列にPAM (Protospacer adjacent motif) とよばれる認識配列が必要であり、これが標的配列を選択する制限となっていた。そのため国内外の研究者が、CRISPRの立体構造情報をもとにしたアミノ酸改変によって、PAM配列の特異性を変化させた変異体や結合特異性を上昇させたCas9変異体の開発を競って進めた。また、新しいCasタンパク質の探索も精力的に進められており、Cas12 (Cpf1) はPAMの特異性が異なることに加え、分子量が小さいことから遺伝子治療用のベクターに搭載しやすいゲノム編集ツールとして注目されている²⁾。Cas12によるDNA二重鎖切断は、Cas9のようなblunt endではなくsticky endになるため、ドナーDNAの挿入を一方向に限定できるという特徴を持つ。さらに小型のCas14やCasX、CasΦなどが米国ブロード研究所とカリフォルニア大学バークレー校によって報告されており、CRISPRΦは最もコンパクトなCasタンパク質として期待されている³⁾。また、オフターゲット問題を改善するものとして、切断特異性を高めたCRISPR-Cas9 (HiFi-Cas9) が発表されている⁴⁾。

国内では東京大学の濡木らによって開発されたSpCas9-NGでは、これまでのSpCas9のPAM (5'-NGG-3') が5'-NG-3'に改良され、標的配列の制限がほぼなくなった⁵⁾。また、東京大学の真下らからCRISPR-Cas3による国産のゲノム編集ツールが報告された⁶⁾。CRISPR-Cas3は、DNA認識配列が27bpと長い (CRISPR-Cas9は20bp)、切断の特異性が高いと同時にDNAを大きく削ることも長けており、大規模ゲノム欠失を起こす、安全性が高いゲノム編集ツールとして期待されている。

これらゲノム編集ツールは、基本的に二本鎖切断DSBに依存しており、非相同末端修復によるノックアウト、相同組換え修復によるノックインが可能ではあるが、その効率や割合を予測・制御することは困難である。そこでDNA切断活性を失活させたdCas9 (あるいはnCas9) を利用して一塩基置換酵素と結合させることにより、ゲノムを切らずに一塩基置換するBase editor (米国)⁷⁾、Target-AID (日本)⁸⁾ が開発された。

さらにnCas9と逆転写酵素を組み合わせ、gRNAにコードされた鋳型配列 (数十塩基程度) を直接ゲノムに書き込むプライム編集が報告された⁹⁾。CRISPRシステムを伴うトランスポゼースCASTとdCas12、あるいはクラス1のCascadeと協働させることで、欠失変異の起こらない長鎖DNAノックインも報告されている^{10), 11)}。これらゲノム編集技術はDSBを伴わないより安全かつより正確な技術として、特に遺伝子治療などへの利用が期待されている。

エピゲノムは、DNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御によって、様々な生命現象に関与する重要なシステムである。ゲノム編集は塩基配列を書き換える不可逆的な改変だが、可逆的に遺伝子の発現だけを制御するエピゲノム編集の技術開発が急速に進められている。dCas9に転写活性化因子VP64や抑制因子KRABなどを融合して、標的遺伝子の転写量を制御するCRISPR activation (活性化) やCRISPR

interference (抑制) が報告されている^{12), 13)}。最近では内在性の転写制御因子を dCas9 へ集積、転用する方法も開発されている¹⁴⁾。また、dCas9 に DNA メチル化やヒストン修飾を制御する酵素を連結して、標的遺伝子の発現を制御する技術も開発されている¹⁵⁾。転写活性化をより効果的にする方法として、複数の因子を集積する SAM システムや SunTag システム、VPR システムがあり、人工因子を集積することによって数十倍から数百倍の効率化を実現している。さらに、SAM と SunTag を組み合わせた TREE システムにより複数種類の因子を集積することも可能となっている。

CRISPR-Cas13 は、一本鎖 RNA に配列特異的に結合して、切断する。この性質を利用して、ヒト細胞で標的遺伝子の mRNA をノックダウンできる¹⁶⁾。さらに、ヌクレアーゼ活性を欠失した dCas13 と RNA 変換酵素 ADAR を融合させることで、RNA 一塩基置換 REPAIR が報告された¹⁷⁾。さらに内在性の RNA 変換酵素を標的 RNA に誘導する、RNA オフターゲット編集がほとんどない究極の RNA 編集も発表されている¹⁸⁾。RNA 編集はゲノム編集に比べて効果が一過性である。

動物を対象にしたゲノム編集には体外 (ex vivo) 法と体内 (in vivo) 法がある。例えば、ヒトの造血幹細胞またはリンパ球が標的の場合、細胞を体外に取り出して編集する体外法を適用できる。一方、神経細胞、肝細胞、骨格筋を標的にしてゲノム編集する場合は体内法が適する。ゲノム編集ツールの導入は、体外法ではエレクトロポレーション法によってヌクレアーゼタンパク質を導入し、体内法では AAV ベクターを用いてヌクレアーゼ遺伝子を導入するのが主流である¹⁹⁾。疾患モデル動物の治療などにおいて、ヌクレアーゼのデリバリーを遺伝子でなくタンパク質 (具体的には、Cas9 タンパク質と gRNA の複合体) の形で行うことが近年注目を集めている。動物体内で異種タンパク質 Cas9 が発現し続けると、Cas9 に対する免疫反応が惹起され、その発現細胞は免疫拒絶されることが想定され、標的以外の DNA を切断するオフターゲットのリスクが高まるかもしれない。各種導入法による Cas9 の細胞内残存時間を比べると「AAV>mRNA>タンパク質」となる。Cas9 の発現をなるべく短期間で済ませるという観点からはタンパク質の形での導入が最もよいといえる。タンパク質導入法としてはエレクトロポレーションが一般的であるが、最近、レンチウイルスベクター外殻を使ってヌクレアーゼタンパク質を運ぶベクターが開発された²⁰⁾。

植物においては (作物の品種改良等)、アグロバクテリウムを用いた遺伝子組換え技術によって、一旦ヌクレアーゼ遺伝子をゲノム DNA 中に挿入するのが一般的であるが、発現カセットを除くためには戻し交雑が必要となり煩雑である。そのため、ヌクレアーゼタンパク質をプロトプラスト (細胞壁を除いたもの) に導入する方法によって、遺伝子組換え体を経ることなく新品種を作出する方法が開発されている²¹⁾。

ヌクレアーゼによる DNA 切断部位に遺伝子を導入する遺伝子ノックイン技術としては、広島大学が開発した 20 塩基対程度のマイクロホモロジーアームを利用した PITCh 法²²⁾ や 大阪大学が開発した ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotide) を介して長鎖 DNA を挿入する 2H2OP 法²³⁾ などが知られている。また、理研と米国・ソーク研究所は、NHEJ (non-homologous end joining) 修復経路を利用した効率的かつ正確な HITI 法を開発している²⁴⁾。この手法は相同組換え活性が低い非分裂細胞においてはノックインが困難であった点を克服すると共に、挿入する断片の方向を制御できる優れた方法である。さらに集積技術を利用して修復因子を効率的に作用させる LoAD システムによる培養細胞での同時複数遺伝子座へのノックインが報告されている²⁵⁾。

ゲノム編集技術の応用という観点では、以下のような動きが見られる。

微生物では、モデル微生物でのゲノム編集技術確立に加えて、産業用微生物・細胞を用いた高機能物質生産、微細藻類の脂質生産量を向上によるバイオ燃料生産など応用分野を指向した研究開発が進められている。

これらの分野では、CRISPR-Cas9によって改変のPOC検証を行いつつ、産業向けに使いやすいゲノム編集ツール（使用料が比較的安価）に置き換える傾向が見られる。

農業におけるゲノム編集の応用としては、米国ではCRISPR-Casにより褐色化の原因遺伝子に変異を導入、黒くならないマッシュルームなど複数の品種が既に作出されている。さらに、オレイン酸を豊富に含む大豆がTALENを使って作出され、商業利用されている。中国でもゲノム編集を用いた育種が積極的に進められている。農作物に加えて、ブタ、ウシ、家禽における耐病性付与を指向した育種が世界中で進められている。遺伝子ノックアウトにより新しい品種を作出する動きは今後益々盛んになると予想されるが、国によってその規制レベルには違いが見られる。米国農務省はゲノム編集によって遺伝子機能を失わせた場合には遺伝子組換え作物に相当せず、規制は必要ないとの見解を示した。一方、EU最高裁判所は通常の遺伝子組換え作物と同じ規制で取り扱うべき、との判決を下している。日本では、ゲノム編集によって生じた欠失変異については、ゲノム編集ツールの発現に使われた導入核酸が残存していないことが証明できれば、遺伝子組換え生物から除外できることが示されている。

遺伝性疾患の治療に向けた研究が欧米や中国を中心に進められている。例えば、高チロシン血症のモデルマウスを用いて、CRISPRシステムとssODNを静脈注射することによって原因遺伝子の一塩基変異を修正することが証明された。国内における疾患治療研究例としては、血友病BモデルマウスにおいてAAVベクターを用いてCas9を肝臓細胞で発現させるゲノム改変が可能であることが示されている

ゲノム編集を利用した遺伝子治療は、*in vivo*治療と*ex vivo*治療に分けられる。*in vivo*治療は、体内に直接ゲノム編集ツールを導入する方法で血友病やムコ多糖症の臨床試験が進められている。最近、米国を中心にCRISPRを使ったレーバー先天性黒内障の臨床試験が開始された。一方、*ex vivo*治療としては、HIV感染における共受容体であるCCR5遺伝子を破壊したT細胞を作製して、感染者へ移植する臨床試験や免疫チェックポイント因子（PD-1など）を破壊したT細胞を移植する臨床試験が、米国と中国でがん治療として実施されている。国内では疾患治療に向けたゲノム編集を用いた臨床研究に大きな進展は見られないが、CAR-T細胞やTCR-T細胞を、ゲノム編集を用いて作製する取り組みが進行している。

ヒト受精卵でのゲノム編集の基礎研究は、中国、英国、米国を中心に進められている。中国で3倍体の受精胚を用いた研究が行われ、その後、CRISPR-Cas9を用いたヒト正常胚でのゲノム編集によって、ヒト初期発生に必要な遺伝子や受精などに関わる遺伝子の機能解析などが進行中である。ヒト受精卵でのゲノム編集を臨床応用することは、中国の事件があったため、世界的に禁止することが確認されている。しかしながら、ロシアの研究者がCRISPR-Cas9を利用したゲノム編集ベビーを作製する計画を発表するなど注意が必要である。日本では、文部科学省からヒト受精胚にゲノム編集技術等を用いる研究に関して、「ヒト受精胚に遺伝情報改変技術等を用いる研究に関する倫理指針」が制定され、基礎研究目的については審査を経て研究することを認める方針を示している。

CRISPRに関連した注目技術としてCRISPRライブラリーを用いた機能因子のスクリーニングがあげられる。目的の生物の全遺伝子に網羅的に対応したガイドRNAを発現するレンチウイルスベクターライブラリーを作製、培養細胞へ感染させることにより、遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを得ることが可能である。これをスクリーニングに用いることでがん化に関わる遺伝子を同定するといった利用が行われている。この方法は、様々な生命現象の解明に貢献すると期待され、創薬のターゲット因子スクリーニングでは複数の因子を同時に絞り込むことも可能である。

CRISPR-Casシステムは、環境中の核酸検出にも利用可能であることが示されている。Cas13は標的RNAに結合して、蛍光レポーターRNAを切断、検出することができる（SHERLOCK）²⁶。Cas12はDNAに結

合して非特異的に一本鎖DNAを切断する (DETECTR)²⁷⁾。日本からは同様にCas3を利用したCONANが報告されている²⁸⁾。これらCRISPR診断技術は、新型コロナウイルスの迅速診断技術POCTとして開発が進められている。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

・ゲノム編集ツールの新規開発

CRISPR-Cas9が現在広く使われているが、PAM配列の制限や特異性、ベクターを利用する際のサイズの問題などが指摘されている。そこでCas9と異なる新しいCasヌクレアーゼの開発が世界中で進行している。最近、米国からはほぼPAM配列に依存しないSpRY-Cas9が報告された²⁹⁾。Doudnaらのグループからはメタゲノム解析で見つかった小型のCasΦによるゲノム編集が報告された³⁾。日本からはCas9特許とは独立したクラス1のCRISPR-Cas3によるゲノム編集が報告された⁶⁾。

・DSBを介さない安全で正確なゲノム編集

ゲノム編集によるDSBは目的以外のDNA切断が避けられない。そこでDSBを伴わないゲノム編集が開発されている。一塩基置換酵素Base editor、Target AIDに続き、nCAs9に逆転写酵素を連結させることにより、DNAの標的部位に設計した遺伝情報を直接書き込む新たなゲノム編集法Prime editorが開発された⁹⁾。さらに、CRISPR-CasシステムとトランスポザーゼCASTの協働¹⁰⁾やタイプI Cascadeとの協働¹¹⁾により、DSBなしでドナーDNAを標的ゲノムに挿入可能にした。

・エピゲノム編集

エピゲノム編集は、転写調節領域への結合・制御やゲノム領域のメチル化/ヒストン修飾を超えて、内在性の転写制御因子をゲノム領域に集積・転用する方法が開発されている^{14), 30)}。ソーク研究所はmdx欠損DMDモデルマウスにおいてユートロフィン増強発現により病態改善に成功し³¹⁾、筋ジストロフィーモデルマウスでは、ラミニン相同遺伝子の活性化による病態改善に成功した³²⁾。脆弱X症候群患者由来iPS細胞において脱メチル化によるFMR1遺伝子のエピゲノム編集治療を報告している³³⁾。

・RNA編集

タイプVI CRISPR-Cas13を利用したヒト/植物細胞でのRNAノックダウン、RNA一塩基置換が進められている。中国では疾患モデルマウスにおいてCas13d/CasRxによりグリア細胞を神経細胞にリプログラムすることで神経細胞の修復に成功している³⁴⁾。さらにシンプルに、RNAにより内在性ADARを標的部位に集積することで、CRISPRを使わないRNA編集も報告された³⁵⁾。

・CRISPR診断 (核酸検出技術)

ゲノム編集技術を利用して、微量の核酸を検出する技術が開発され注目されている。臨床現場で特殊な装置を必要とせず、血液や尿に含まれるウイルスや細菌を短時間、高感度に検出するPOCT技術として利用される。米国からCas12を使ったDETECTR²⁷⁾、Cas13のSHERLOCK²⁶⁾、日本からはCas3を利用したCONANが報告されている²⁸⁾。これらのCRISPR検査法はPCR検査法とほぼ同等のCOVID-19検出感度をもち、新たな新型コロナウイルス迅速診断技術として期待されている。

・ゲノム編集による遺伝子治療

ゲノム編集治療はヌクレアーゼを用いる点が従来の遺伝子治療と異なる。ゲノム編集治療はヌクレアーゼを用いてゲノム部位特異的な遺伝子ノックアウトとノックインを実現できる。

遺伝子ノックアウト治療の世界初の実施例は、米国におけるAIDSに対するものであった。体外に取り出したAIDS患者リンパ球のHIVコレセプターCCR5遺伝子をZFNで破壊し（ZFNのデリバリーはアデノウイルスベクターを使用）、そのリンパ球を患者に戻した。治療後、リンパ球の増加が報告された³⁶⁾。

遺伝子ノックイン治療の世界初の実施例は、2018年サンガモ・セラピューティクス社がZFNを利用して行ったムコ多糖症に対するものであった。AAVベクターを用いて、正常遺伝子を肝細胞のアルブミン遺伝子プロモーター下流に導入し、導入遺伝子の大量発現を狙った。2019年の中間報告によると有効性は確認されず、最大用量のベクターを投与された患者で免疫性肝炎の発症が見られたという。何に対する免疫反応が明らかにされていないが、AAVベクター自体が抗原となって免疫性肝炎を発症した可能性の他、ZFNを抗原とする免疫性肝炎の可能性があり、ヌクレアーゼの免疫原性が問題になりそうである。また、CRISPR-Cas9を用いたレーバー先天性黒内障の臨床試験が米国を中心に開始された。

・ゲノム編集食品

ゲノム編集技術により遺伝子ノックアウトした品種改良は実用化段階にある。筑波大学はGABAを通常のトマトの約15倍多く含むトマトを開発した。農研機構は収量の多いイネを開発した。近畿大学と京都大学は筋肉量の多いマダイを開発した。ただ、これらはまだ上市・流通されていない。

・その他

抗生剤濫用による耐性菌増加問題に対して、自治医科大学はCRISPR-Cas13aをバクテリオファージに搭載し、特定の遺伝子を持つ細菌を狙い撃ちでき人間に無害な新しい殺菌技術を開発した³⁷⁾。米国ではCRISPR-Cas9によってステロイド受容体をノックアウトしてステロイド抵抗性に改変した殺ウイルスTリンパ球が作成された³⁸⁾。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

・戦略的イノベーション創造プロジェクト(SIP第2期、2019～2023年度)

府省連携SIP「スマートバイオ産業・農業基盤技術」として、2014年度から農水畜産物のゲノム編集技術開発、標的遺伝子探索、有用品種作出、社会実装の検討が行なわれた。第2期プロジェクトとして、複数形質の同時改変によるゲノム編集農作物の開発、DNAの精密な書き換えを可能とするゲノム編集技術の開発等が行なわれている。

・AMED先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業(2019～2023年度)

立体構造解析からCas9のコンパクト化、高活性化、PAM改変などが実施され、デリバリー技術を中心サービスとしたモダリス株式会社(2020年にIPO)を生み出した、革新的バイオ(2014～2019年度)の次期開発事業プロジェクト。安全な遺伝子治療を目指した万能塩基編集ツールの創出、次世代CAR-T細胞療法の開発など遺伝子治療に向けた研究開発が主体。

・ NEDO スマートセルプロジェクト (2016～2020年度)

遺伝子設計に必要な大規模生物情報の高速取得システム、細胞内プロセス設計、国産のゲノム編集技術、植物の育種や生育を制御する技術などを研究開発している。核酸結合ドメインである PPRモチーフを利用した核酸改変技術研究が九州大学と九大発ベンチャーによって進められ、産業分野での植物改変に使用可能な基礎技術の開発検討が行われている。徳島大学の刑部によりクラス1の新しい技術としてTiDが開発された。

・ JST 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム (OPERA、2016～2020年度)

産学連携研究のコンソーシアムを形成し、ゲノム編集基礎技術開発、微生物での改変、動物や植物での改変などのテーマを設定し、効率的な技術開発を目指すと同時に、この技術の社会受容のための社会動向調査を実施している。広島大学のPlatinum TALEN技術をベースにしたプラチナバイオ社が設立され、本プロジェクトに参加した。

・ NIH Somatic Cell Genome editing (SCGE) (1億9,000万ドル)(米国)

体細胞治療実現に向けて必要な各技術の開発。

・ DAPRA Safe Gene (6,500万ドル)(米国)

Gene driveなど、安全保障の側面が強い研究開発が進められている。

・ HORIZEN2020 (欧州)

Improving Genome Editing Efficiency (IMGENE)として、2017年から5年間のCRISPRゲノム編集研究が産学連携で進められている。

ゲノム編集技術研究の軸足は大学から企業に移りつつあり、米国ではゲノム編集によりオレイン酸を多く含む大豆が世界初のゲノム編集食品として上市されている。医療分野では、クリスパー・セラピューティクス社、エディタス・メディシン社、インテリア・セラピューティクス社が設立され、それぞれ10億ドル以上の資金を調達し、疾患治療法の開発を中心とした研究を進めている。塩基編集を基盤技術として2018年に設立されたビーム・セラピューティクス社は、2019年に米ナスダック市場に新規上場(IPO)を果たした。中国では、政府主導でゲノム編集研究を推進しており、医療や農業に力を注いでいる。

ZFNを用いたゲノム編集治療では、AIDSに対する世界初の実施例が発表されてから既に数年が経過した。CRISPR-Cas9を用いた治療では、CRISPR-Cas9の基礎的特許ライセンスを保有するクリスパー・セラピューティクス社が2019年11月、遺伝性血液疾患(ベータサラセミアと鎌状赤血球症)に対して治験を実施中である。クリスパー・セラピューティクス社と同じくCRISPR-Cas9の基礎的特許ライセンスを保有するエディタス・メディシン社が2019年8月遺伝性の眼疾患患者の治験を行なうための患者の募集開始を発表した。この治験はCRISPR-Cas9を用いた*in vivo*ゲノム編集治療としては世界初となる見込みである。ゲノム編集技術のCAR-T細胞療法への応用も早晚始まるだろうと思われる。

(5) 科学技術的課題

ゲノム編集技術に関する課題は複数あげられるが、まずは、国産ゲノム編集ツールの開発が重要である。日本からはCas9特許とは独立したクラス1のCRISPR-Cas3によるゲノム編集が報告された⁶⁾。しかしながら効

率、改変体、小型化、*in vivo*ゲノム編集などの点では、長年研究が重ねられてきたクラス2のCas9、Cas12より遅れている。今後も国内プロジェクトにおいて基盤ツール開発を継続的に進め、国産の改変技術（遺伝子ノックイン技術など）やデリバリー技術と融合することが、国産ゲノム編集技術を発展させる上で重要である。

今後、遺伝子治療などに利用されるためには、オフターゲット変異を起こさない、より安全、より正確なゲノム編集技術が必要である。この部分でも日本は米中に後れを取っている。特に米国では、ゲノムを切断しない編集、Base Editor, Prime Editor, Casトランスポゾンなどさまざまなゲノム編集技術が登場している。また、標的遺伝子の転写調節領域に結合することで遺伝子発現を調節したり、ゲノム領域のメチル化/ヒストン修飾によるエピゲノム編集が進められており、すでに前臨床段階におけるモデル動物でのエピゲノム編集治療が報告されている。日本でもTarget-AIDやDNA脱メチル化編集が報告されているが、エピゲノム編集分野におけるさらなる研究開発が必要である。

さらにゲノム編集を止める技術も必要になるだろう。細菌の免疫系であるCRISPR-Casシステムに対抗するためにファージがCas活性を阻害するタンパク質としてAnti-CRISPR (Acr) が発見された³⁹⁾。Acrは、CRISPR-Casの3段階の免疫応答（獲得、発現、阻害）のそれぞれを阻害し、またCRISPRのタイプごとに異なるため、たくさんの種類（約2500候補遺伝子）が存在する⁴⁰⁾。実際にAcrタンパクを使って、細胞、植物、動物でゲノム編集の制御可能であることが報告されている。別の方法としては、光や化学物質によるゲノム編集/エピゲノム編集制御技術の開発も進められている。基礎研究から応用研究、遺伝子治療まで、これらゲノム編集制御技術が必要とされている。

ゲノム編集を利用した一塩基置換や数十塩基挿入、相同組換えを利用したノックインの効率化、実用化が進められ、より効率的、より正確なゲノム編集ができるようになってきた。一方で大規模ゲノム領域、染色体レベルでの編集という意味では、さらなる研究開発が必要である。細胞内におけるDNA損傷修復メカニズムの解明、修復機構因子の集積、相同組換え効率のさらなる向上が求められる。細胞周期や細胞分化状態に合わせた異なるゲノム編集技術や方法が求められている。ヒストン解析、染色体解析、一細胞解析、機械学習、AIなどの新規解析技術と組み合わせた基礎研究が重要である。

様々な生物におけるゲノム編集技術の開発はまだ必要とされている。植物のCasタンパク質RNPを用いた、より効率的な品種改良が重要である。動物受精卵においては、ブタ、サルなどのより大きなモデル動物においては、100%ノックアウト、ノックイン動物の作製が求められる（同一個体中にゲノム編集された細胞とされなかった細胞が混在する、いわゆるモザイク問題の解決）。今後はゲノム編集を利用することにより、ヒト遺伝子を置換したヒト化動物の研究開発が進められるだろう。

ゲノム編集技術は、遺伝子改変とは異なる用途にも利用されている。前述の核酸検出薬としてのCRISPR診断法は代表的なものといえる。新型コロナウイルスを含む新興感染症の診断薬として、ウイルスゲノムが解読できればすぐに診断薬を開発できるメリットが挙げられる。さらには微量サンプルにおいて一塩基変異を判別できる（感度と特異度が高い）ことから、がんの超早期発見（リキッドバイオプシー）としても期待されている。パネル技術と組み合わせることで、網羅的な感染ウイルスの検出⁴¹⁾、核酸だけでなく細菌やタンパク質の検出も可能になっている。環境中の核酸モニタリング技術として研究開発が進められている。

テープレコーダーのようにDNAを記録媒体として利用する研究（DNA writer）も行われている。GESTALT法をゼブラフィッシュ受精卵に利用することで、成体各器官の細胞系譜を明らかにすることができた⁴²⁾。そもそもCRISPR-Casは細菌に感染するファージの一部配列をCRISPRアレイに記憶するシステムであり、Cas1-Cas2を利用して馬が走る数秒の映像をDNAに記録保存する事に成功している⁴³⁾。さまざまな生体反応や細胞間相互作用の解明、生体全体の細胞系譜解析など時空間的解析への利用が期待される。

2.4

(6) その他の課題

産学連携においては、ゲノム編集ツールの特許が大きな問題となる。特にCRISPR-Cas9については、企業がこの技術を利用するためには複数の特許権者へ多額の使用料を支払う必要があるとされている。そのため、大企業がこの技術を利用することを控える傾向にあり、国内での産業開発力が低下している。この問題を解決する方法は、国産技術の開発であるが、ベンチャー企業が特許料を払いつつ、新しい技術を開発する後押し(国策)が必要となる。国産技術での巻き返しは見られるが、国プロや産業界からの支援は必須である。

2019年、各国でゲノム編集により作出された作物の取り扱い方針が決まった。米国は植物については規制対象外とした。南米諸国や日本、オーストラリアなどは、外来遺伝子等が残存していないことが確認されれば規制対象外とする。一方、EUやニュージーランドは、ゲノム編集を遺伝子組換えとして扱う。これはリスク評価の結果ではなく法律条文の解釈の結果であった。なお、米国はゲノム編集動物については遺伝子組換え生物として規制する方針を打ち出している。日本の取扱いについては厚生労働省ホームページに記載されている(www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya)。基本的に厚労省に届出、安全性確認、公表を経て、流通される。遺伝子組換えに該当しないノックアウトなどの作物は基本的に食品表示基準の対象外となっている。諸外国との基準の統一化、グローバル競争に見合った考えが必要とされる。

中国からゲノム編集したヒト受精卵から双子が誕生して、世界中の科学者から非難を浴びた。ヒト受精胚でのゲノム編集は、世界各国で基本的に中止されており、基礎研究においてその目的に応じて受精胚までの研究が認められている。2020年7月厚生労働省と文部科学省の合同部会は、ゲノム編集技術を使ってヒトの受精卵を改変し、遺伝性疾患の原因解明や治療法を探る基礎研究を進める上での指針案を了承した。併せて不妊治療に役立てる目的に限り、提供された精子と卵子から新たに受精卵を作り、ゲノム編集で改変する基礎研究に関する別の指針案も了承した。いずれの指針案も今後、意見公募などを経て指針となる。一方、ゲノム編集で改変した受精卵を母胎に戻す臨床研究については、安全性や倫理面の課題から、厚労省の専門委員会が法制化を含め規制強化の必要性を提言する報告書をまとめている。

また、ゲノム編集技術の社会受容ためには技術の安全性を示し、市民を交えて議論することが急務である。一般社団法人日本ゲノム編集学会および関連団体において、社会受容に向けた活動を活発にすることが重要である。

人材育成については、産業界からゲノム編集技術を使いこなせる人材の輩出を強く求められている。2018年JSTの卓越大学院プログラムにおいて広島大学の「ゲノム編集先端人材育成プログラム」が採択され、基礎研究者、治療開発者、産業技術開発者の育成を進めている。このような教育システムを産学連携のもとに展開し、産業利用に必要な技術を開発する人材、安全性評価をできる人材、ベンチャー企業家を育成することが必要である。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ 小型 Cas9 や PAM の制約を回避する SpCas9-NG の開発に成功した。 ・ クラス 1 CRISPR-Cas3 によるヒト細胞におけるゲノム編集に成功し、日本発ゲノム編集基盤技術として知財も確保された。 ・ 脱アミノ化酵素と nCas9 を利用した一塩基置換酵素 Target-AID に続いて、標的配列の C→T および A→G の異種塩基置換を起こす Target-ACEmax が開発された。 ・ RNA 編集の可能な PPR が開発された。 ・ エピゲノム編集：dCas9 を利用して標的遺伝子のはたらきを ON にする新技術（TREE システム）が開発されている。 ・ マウス胚におけるエピゲノム編集によって DNA 脱メチル化に成功。 ・ CRISPR ライブラリーを利用して、細胞増殖遺伝子、がん遺伝子、エピゲノム修飾などの探索が進められている。 ・ ゲノム編集の共同研究論文数で日本の研究者が世界で 2 位と 5 位に入る⁴⁴⁾。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> ・ 農水畜産物でのゲノム編集が進展している（イネ、トマト、キノコ、ジャガイモ、ニワトリ、ブタ、ウシ、マダイでの遺伝子改変）。 ・ Cas3 を用いた新型コロナウイルスの検出技術の開発が進行する。 ・ エピゲノム編集技術を用いて動物実験においてヒト疾患の治療に成功している。 ・ iPS 細胞、免疫 T 細胞、疾患モデル動物を用いて、血友病、表皮水疱症、筋ジストロフィーなどの治療法開発、再生医療に向けた研究が進展している。 ・ 優れた基礎研究の成果を応用に結びつけるために技術研究組合やコンソーシアムを設立しようとする動きが見られる。 ・ ゲノム編集関連ベンチャーのモダリス株式会社が IPO を果たす。 ・ 知財係争のためか日本の製薬企業、ベンチャー、産学連携研究が米中に比べて進んでいない。
米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ 基礎研究の全ての分野で世界トップの水準を維持し、技術レベルをさらに向上させている。 ・ 全く新規の小型の Cas Φ が開発され、遺伝子治療での送達が可能ツールと期待される。 ・ ヒストンのセロトニン化という新しい概念がエピゲノム編集によって解明された⁴⁵⁾。 ・ オフターゲットの少ない HiFi-Cas9 が開発された。 ・ CRISPR にトランスポゾン転移酵素をつなげたゲノム編集ツールが開発された。 ・ nickase-Cas9 に逆転写酵素を融合させたゲノム編集ツールが開発された。 ・ アミノ進化による Cas ヌクレアーゼ変異体開発が進み、PAM レス Cas9 など多くの改変体が報告されている。 ・ デアミナーゼを連結した Base Editor、標的に自在に塩基改変できる Prime Editor、ノックイン技術として Cas トランスポゾン、など、DSB を伴わないゲノム編集技術が次々と報告されている。 ・ ゲノム編集を DNA 記録媒として利用したり、体細胞系譜を追跡する技術など新しい利用方法が開発されている。

2.4

俯瞰区分と研究開発領域
分子・細胞
基礎基盤科学技術

	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> 微生物での有用菌株育種、農水畜産物の品種改良、遺伝子治療への応用など、全ての分野での開発で世界トップレベルであり、大学機関、大手企業、ベンチャー企業、寄付財団等の密接な連携により、さらなる研究開発力の向上が進められている。クリスパー・セラピューティクス、エディタス・メディシン、インテリア・セラピューティクス、ビーム・セラピューティクスなどを代表とする多数のベンチャー企業が農作物開発、産業エネルギー開発、ヒト疾患治療法などの最先端研究開発を進めている。 CRISPR/Cas9, Cas12, Cas13さらにCRISPR関連の基盤技術および応用技術知財の多くを確保している。 TALLENでの高オレイン酸大豆の作出と産業利用が進んだ。 <i>in vivo</i>と<i>ex vivo</i>のゲノム編集治療を積極的に進める。<i>in vivo</i>ゲノム編集治療としてレーバー先天性黒内障の臨床試験が開始された。 ZFN、CRISPRを使ったゲノム編集治療、より安全なエピゲノム編集治療の研究開発治験が進められている。FDAには30以上の治験が登録され、世界の遺伝子治療研究をリードしている。 新規核酸検出技術（Sherlock法およびDETECTR法）が開発され、新型コロナウイルスPOCT診断技術として開発されている。
欧州	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> CRISPR-Cas9でのゲノム編集によって哺乳類培養細胞で大規模な欠失や染色体の再編が誘導されることを示した。 ゲノム編集技術を利用して、遺伝子スクリーニング、遺伝子の機能解析など生物学的な基礎研究が目立つ。
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> がん治療のターゲットをゲノムワイドに探索する研究成果が報告されている。 TALLENの基本特許を有するセレクトイス社がCAR-T細胞作製など牽引している。米国企業や大学と連携して、ゲノム編集治療を進めている。 巨大製薬会社によるサラセミアなどの先天性遺伝性疾患に対する遺伝子治療への応用研究が進んでいる。 ドイツ・メルク（Merck）は米国からCRISPR-Cas9特許を取得して、科学研究支援、遺伝子治療開発プログラムを推進している。 ゲノム編集作物は遺伝子組換え技術によって生み出された作物と同等という、欧州司法裁判所の判決が示されている。
中国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> CRISPRゲノム編集関連の研究論文数が増えており、自国雑誌への成果報告も多数あるが、最先端の研究がメジャー誌にも掲載されてきている。全体の基礎研究レベルが上昇傾向にある。 ゲノム編集ツールや遺伝子ノックインなどの技術開発の論文も複数発表が見られる。 CRISPR-Cas9を用いた植物でのゲノム編集関連の論文数を多数発表している。 マウス個体でのエピゲノム編集（Mecp2のDNAメチル化）で、自閉症スペクトラムの表現型を示した。 結晶構造解析、エピゲノム編集、ライブラリー解析などゲノム編集研究に関して米国と競争するレベルにまできている研究も多数存在する。

	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ 国策としてゲノム編集による技術開発と新品種開発を進めている（年間数十億から数百億円の研究費を投入）ただし、利用されているゲノム編集ツールや方法に中国独自のものは少ない。 ・ 農作物の品種改良で研究成果が見られる。Chinese Academy of Sciencesを中心として農作物（イネ、トウモロコシ、小麦、大豆など）研究が継続して進展している。 ・ 多様な動物に積極的にゲノム編集を利用している。イヌ、マウス、ラット、ブタ、ウサギ等のゲノム編集動物作製を進め、特にサルの大規模なコロニーを対象とする実験を進めている。 ・ ゲノム編集治療に向けた研究も活発である。CRISPR を利用したT細胞でのPD1 遺伝子破壊によるがん治療の臨床試験が進行中である。 ・ ゲノム編集によって作製したサルの体細胞からクローンサルを誕生させた。 ・ 中国の研究者が、世界初となる遺伝子进行操作した双子の女兒を誕生させたが、世界中の非難を浴びて、中国の法廷で懲役3年の実刑判決を受けた。
韓国	基礎研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> ・ ゲノム編集研究を先導してきたソウル国立大学は、高い質の論文を発表している。 ・ dCas9やdCpf1 を利用してA→Gなどの一塩基置換 Base Editorを開発した。 ・ CRISPR/Cas9 のオフターゲット作用の検出技術(Digenome-Seq法)やクロマチン解析 (DIG-seq) を開発している。
	応用研究・開発	△	↘	<ul style="list-style-type: none"> ・ 農水畜産物での品種改良技術開発に力を入れており成果が見られる。植物でのCasタンパク質RNPを利用した遺伝子組換えを介さないゲノム編集が報告されており、塩基改変技術を利用した植物ゲノム改変にも成功している。 ・ 新しいツール開発やオフターゲット作用の検出サービスなどを提供している。ToolGen 社がモンサントとライセンス契約を結んで研究開発を進めている。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

関連する他の研究開発領域

・ 遺伝子治療（CAR-T等）・細胞治療（ライフ・臨床医学分野2.1.6）

参考・引用文献

- 1) M. Jinek, et al., “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”, *Science* 337, no. 6096 (2012) : 816-821. doi : 10.1126/science.1225829
- 2) B. Zetsche, et al., “Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system”, *Cell* 163, no. 3 (2015) : 759-771. doi : 10.1016/j.cell.2015.09.038

- 3) P. Pausch, et al., “CRISPR-Cas Φ from huge phages is a hypercompact genome editor”, *Science* 369, no. 6501 (2020) : 333-337. doi : 10.1126/science.abb1400
- 4) CA. Vakulskas, et al., “A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells”, *Nat. Med.* 24, no. 8 (2018) : 1216-1224. doi : 10.1038/s41591-018-0137-0
- 5) H. Nishimasu, et al., “Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space”, *Science* 361, no. 6408 (2018) : 1259-1262. doi : 10.1126/science.aas9129
- 6) H. Morisaka, et al., “CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 5302. doi : 10.1038/s41467-019-13226-x
- 7) NM. Gaudelli, et al., “Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage”, *Nature* 551, no. 7681 (2017) : 464-71. doi : 10.1038/nature24644
- 8) K. Nishida, et al., “Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems”, *Science* 353, no. 6305 (2016) : aaf8729. doi : 10.1126/science.aaf8729
- 9) AV. Anzalone, et al., “Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA”, *Nature* 576, no. 7785 (2019) : 149-57. doi : 10.1038/s41586-019-1711-4
- 10) J. Strecker, et al., “RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases”, *Science* 365, no. 6448 (2019) : 48-53. doi : 10.1126/science.aax9181
- 11) SE. Klompe, et al., “Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration”, *Nature* 571, no. 7764 (2019) : 219-25. doi : 10.1038/s41586-019-1323-z
- 12) LA. Gilbert, et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes”, *Cell* 154, no. 2 (2013) : 442-51. doi : 10.1016/j.cell.2013.06.044
- 13) LS. Qi, et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”, *Cell* 152, no. 5 : 1173-83. doi : 10.1016/j.cell.2013.02.022
- 14) AM. Chiarella, et al., “Dose-dependent activation of gene expression is achieved using CRISPR and small molecules that recruit endogenous chromatin machinery”, *Nat. Biotechnol.* 38, no. 1 : 50-5. doi : 10.1038/s41587-019-0296-7
- 15) S. Morita, et al., “Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions”, *Nat. Biotechnol.* 34, no. 10 (2016) : 1060-5. doi : 10.1038/nbt.3658
- 16) OO. Abudayyeh, et al., “RNA targeting with CRISPR-Cas13”, *Nature* 550, no. 7675 (2017) : 280-4. doi : 10.1038/nature24049
- 17) DBT. Cox, et al., “RNA editing with CRISPR-Cas13”, *Science* 358, no. 6366 (2017) : 1019-27. doi : 10.1126/science.aaq0180
- 18) T. Merkle, et al., “Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides”, *Nat. Biotechnol.* 37, no. 2 (2019) : 133-8. doi : 10.1038/s41587-019-0013-6
- 19) J. van Haasteren, et al., “The delivery challenge : fulfilling the promise of therapeutic genome editing”, *Nat. Biotechnol.* 38, no. 7 (2020) : 845-855. doi : 10.1038/s41587-020-

0565-5

- 20) P. Gee, et al. “Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 1334. doi : 10.1038/s41467-020-14957-y
- 21) Y. Osakabe, et al., “CRISPR-Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine”, *Nat. Protoc.* 13, no. 12 (2018) : 2844-2863. doi : 10.1038/s41596-018-0067-9
- 22) T. Sakuma, et al., “MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems”, *Nat. Protoc.* 11, no. 1 (2018) : 118-133. doi : 10.1038/nprot.2015.140
- 23) K. Yoshimi, et al., “ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes”, *Nat. Commun.* 7 (2016) : 10431. doi : 10.1038/ncomms10431
- 24) K. Suzuki, et al., “In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration”, *Nature* 540, no. 7631 (2016) : 144-149. doi : 10.1038/nature20565
- 25) S. Nakade, et al., “Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 3270. doi : 10.1038/s41467-018-05773-6
- 26) JS. Gootenberg, et al., “Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2”, *Science* 356, no. 6336 (2017) : 438-42. doi : 10.1126/science.aam9321
- 27) JS. Chen, et al., “CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity”, *Science* 360, no. 6387 (2018) : 436-9. doi : 10.1126/science.aar6245
- 28) K. Yoshimi, et al., “Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3”, *medRxiv.* (2020) : 1-30. doi : <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.20119875>
- 29) RT. Walton, et al., “Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants”, *Science* 368, no. 6488 (2020) : 290-6. doi : 10.1126/science.aba8853
- 30) M. Jost, et al., “Titrating gene expression using libraries of systematically attenuated CRISPR guide RNAs”, *Nat. Biotechnol.* 38, no. 3 (2020) : 355-64. doi : 10.1038/s41587-019-0387-5
- 31) HK. Liao, et al., “In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation”, *Cell* 171, no. 7 (2017) : 1495-1507. doi : 10.1016/j.cell.2017.10.025
- 32) DU. Kemaladewi, et al., “A mutation-independent approach for muscular dystrophy via upregulation of a modifier gene”, *Nature* 572, no. 7767 (2019) : 125-130. doi : 10.1038/s41586-019-1430-x
- 33) XS. Liu, et al., “Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene”, *Cell* 172, no. 5 (2018) : 979-92. doi : <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.012>
- 34) HB. Zhou, et al., “Glia-to-Neuron Conversion by CRISPR-CasRx Alleviates Symptoms of Neurological Disease in Mice”, *Cell* 181, no. 3 (2020) : 590-603. doi : 10.1016/j.cell.2020.03.024
- 35) L. Qu, et al., “Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs”, *Nat. Biotechnol.* 37, no. 9 (2019) : 1059-69. doi : 10.1038/s41587-019-0178-z
- 36) P. Tebas, et al., “Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV”, *N. Engl. J. Med.* 370, no. 10 (2014) : 901-910. doi : 10.1056/NEJMoa1300662

- 37) K. Kiga, et al., “Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 2934. doi : 10.1038/s41467-020-16731-6
- 38) R. Basar, et al., “Large-scale GMP-compliant CRISPR-Cas9-mediated deletion of the glucocorticoid receptor in multivirus-specific T cells”, *Blood Advances* 4, no. 14 (2020) : 3357–3367. doi : 10.1182/bloodadvances.2020001977
- 39) J. Bondy-Denomy, et al., “Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system”, *Nature* 493, no. 7432 (2013) : 429-32. doi : 10.1038/nature11723
- 40) AB. Gussow, et al., “Machine-learning approach expands the repertoire of anti-CRISPR protein families” *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 3784. doi : 10.1038/s41467-020-17652-0
- 41) CM. Ackerman, et al., “Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13”, *Nature* 582, no. 7811 (2020) : 277-82. doi : 10.1038/s41586-020-2279-8
- 42) A. McKenna, et al., “Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing”, *Science* 353, no. 6298 (2016) : aaf7907. doi : 10.1126/science.aaf7907
- 43) SL. Shipman, et al., “CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the genomes of a population of living bacteria”, *Nature* 547, no. 7663 (2017) : 345-9. doi : 10.1038/nature23017
- 44) Y. Huang, et al., “Collaborative networks in gene editing”, *Nat. Biotechnol.* 37, no. 10 (2019) : 1107-1109. doi : 10.1038/s41587-019-0275-z
- 45) YE. Loh, et al., “Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3”, *Nature* 567, no. 7749 (2019) : 535-539. doi : 10.1038/s41586-019-1024-7