

表 題 CRISPR/Cas9 を応用した子宮頸癌に対する新規分子標的治療法の
開発のための基礎研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 葭葉 貴弘

担当指導教員氏名 松原 茂樹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
生殖・発達医学
生殖医学

2019年1月10日申請の学位論文

目次

	頁
はじめに	2
対象と方法	6
結果	17
考察	30
おわりに	38
引用文献	39

はじめに

子宮頸がんは全世界で女性のがんによる死亡原因の第2位を占める(1)。毎年約50万人が罹患し、27万人が死亡する(1)。進行子宮頸がんに対しては手術療法、放射線療法、化学療法、あるいはそれらの併用が行われる。しかしながら進行例の予後は依然として不良であり、30年間で子宮頸がん全体の治療成績の改善はみられていない(2)。子宮頸がんはヒトパピローマウイルス(HPV)感染が引き金になって発生するが(3-5)、HPVの中でも浸潤がんから検出される頻度が高いHPV16型、18型など約20種類の遺伝子型は高リスクHPVとして知られている(6)。このような高リスク型HPVが子宮頸部上皮基底細胞に感染し宿主の染色体にインテグレーションすると、HPVのE6が高発現するようになる。E6はHPVが持つ主要ながん遺伝子の一つであり、免疫応答の抑制、テロメラーゼ発現の活性化による細胞の不死化などによって発がんに関与するが、中でもがん抑制遺伝子p53を不活化することによりアポトーシスを抑制し、細胞周期への制御を破綻させることが子宮頸がんの発症に不可欠である(6,7)。

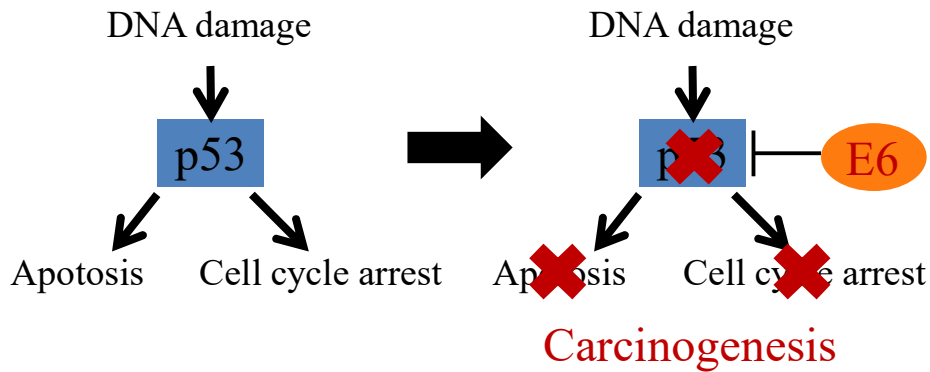


図 1. 高リスク型 HPV による発がんのメカニズム

高リスク型 HPV の持つがん遺伝子 E6 は宿主のがん抑制遺伝子 p53 を不活化するなどして発がんに関与している。

従って E6 の発現を抑制できれば、子宮頸がんは治癒が可能と期待される。また、E6 の発現はがん細胞においてのみ不可欠であるが、子宮頸部を含む正常組織では発現がないか、発現していてもその機能や増殖に関与しない (8)。すなわち E6 を特異的に阻害する治療法は、病変部のみに作用し正常組織には影響を与えない、安全性の高い治療となるであろう。

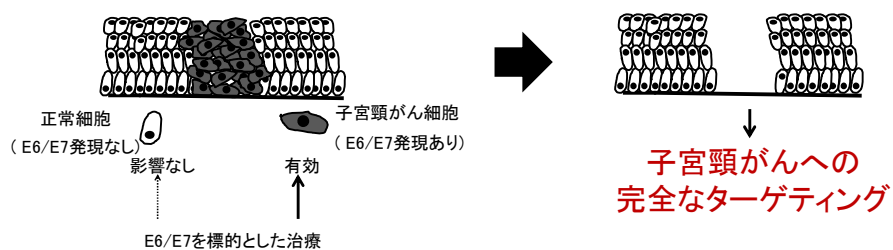


図 2. E6 をターゲットとする子宮頸がん治療のイメージ

がん細胞のみに発現する E6 を標的とすることで、E6 を発現しない周囲の正常組織に影響を与えずに治療が可能である。

CRISPR/Cas9 は、近年注目されているゲノム編集技術のひとつで、特定の DNA 配列を認識するための単ガイド RNA (single guide RNA, sgRNA) と、DNA 二本鎖切断酵素である Cas9 により、目的の DNA 配列に二本鎖損傷 (double strand break, DSB) を引き起こすことができる (9)。切断された DNA は非相同末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) により修復を受けるが、その際に高い確率で塩基の挿入や欠失が起き、遺伝子変異が生じる。遺伝子のコーディング領域でこれらの変異が起これば、その遺伝子はノックアウトされる (10)。

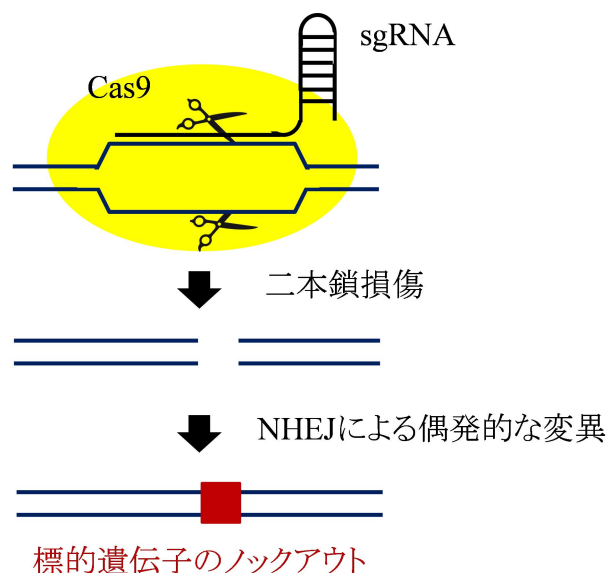


図 3 . CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

特定の DNA 配列を認識するための sgRNA と DNA 二本鎖切断酵素 Cas9 を細胞内で発現させるだけで目的の DNA 配列に二本鎖損傷を引き起こすことができる。切断された DNA は NHEJ により修復を受けると高確率でフレームシフト変異が起き、遺伝子はノックアウトされる。

E6 を標的とした CRISPR/Cas9 を用いることにより、子宮頸がん細胞の E6 を特異的にノックアウトできるかもしれない。しかしながら、この戦略を治療に応用するためには、標的となる子宮頸がん細胞に効率よく遺伝子導入可能なベクターが必要である。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは非病原性ウイルス由来であり、非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であるという優れた特長を有する (11)。人体への直接投与により広範囲にわたる細胞への遺伝子導入、長期の蛋白質発現が認められ、現在 AAV ベクターを利用した臨床試験が世界中で多く行われている (12)。また AAV ベクターは多くの血清型が報告され、それぞれの型別に導入効率の高い組織、臓器が知られている。例えば骨格筋では 1 型と 7 型、神経では 2 型と 3 型、網膜は 5 型、肝臓は 8 型、が高い導入効率を示す (13)。われわれは以前、2 型の AAV (AAV2) ベクターが最も効率よく子宮頸がん細胞に遺伝子導入可能であることを報告した (14)。

高リスク型 HPV の E6 を標的とした子宮頸がん治療はいまだ実現していない。本研究では、高リスク型 HPV の E6 を標的とした CRISPR/Cas9 を用いた、効果的で特異性の高い子宮頸がん新規治療法の開発を目的に、基礎研究を行った。

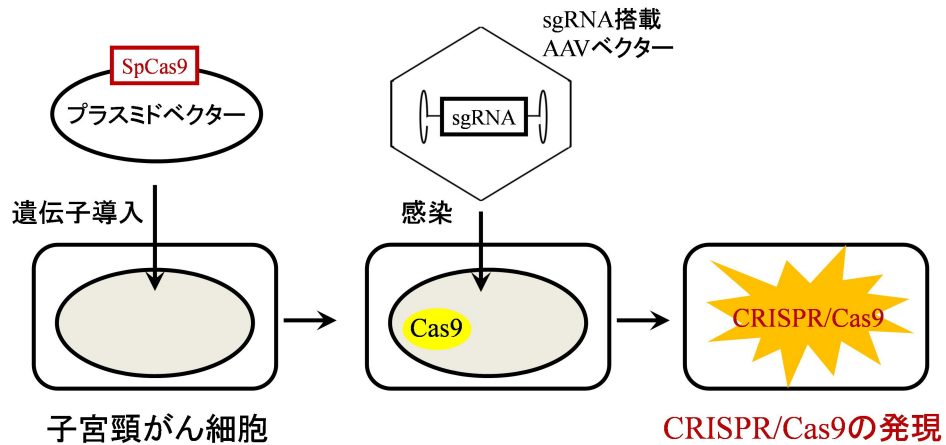


図 4. 子宮頸がん治療モデル

プラスミドベクターにより Cas9 を遺伝子導入した子宮頸がん細胞に sgRNA 搭載 AAV ベクターを感染させ子宮頸がん細胞内で CRISPR/Cas9 を発現させた。

対象と方法

1) 培養細胞

18 型 HPV (HPV18) 陽性ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa、HCS-2、SKG-I、ヒト不死化細胞株 293 は、Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB, 大阪) から購入した。これらの細胞は、10%非働化ウシ胎仔血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 、及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 添加 Dulbecco' s Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12) 培地 (Life Technologies) 中で、37°C、5%二酸化炭素下で培養した。

2) プラスミドベクターの作製

pRGEN-Cas9-CMV (Toolgen, Seoul, South Korea) から *Spe* I および *Xba* I で切りだした CMV プロモーターの一部と human influenza hemagglutinin (HA) タグを付加した Cas9 の DNA 断片を pCMV-IRES-bsr (15) の *Spe* I および *Xba* I サイトに挿入し、Cas9 発現ベクター (pCMV-HA-Cas9-IRES-bsr) を作製した (図 5)。

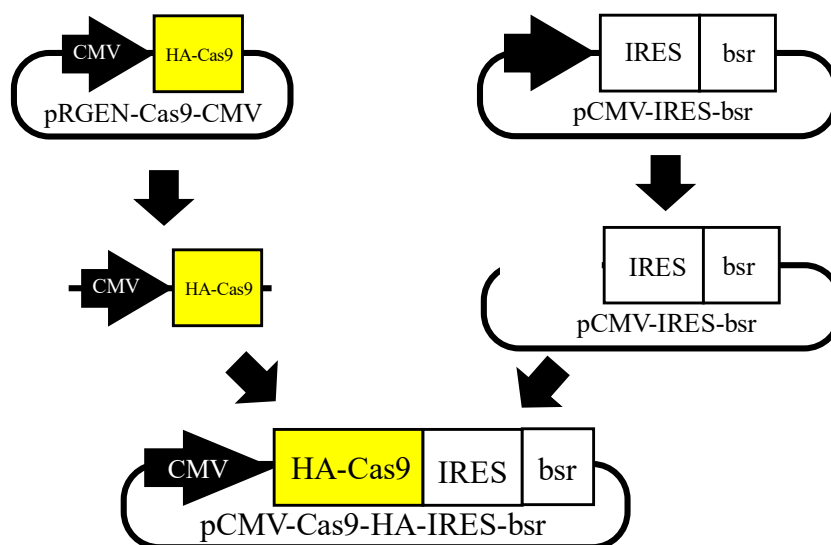


図 5. Cas9 発現ベクターの作製

CMV: cytomegalovirus promoter、IRES: internal ribosome entry site

bsr: blasticidin S resistant gene

HPV18 の E6 の至適 CRISPR 標的配列を Optimized CRISPR Design

(<http://crispr.mit.edu/>) で検索し、最もスコアの高い配列を選択した。5'

-CACCGGAGCTTGTAGGGTCGCCGTGT-3' と

5'-AAACACACGGCGACCCTACAAGCTC-3'の2つのオリゴDNAをアニーリングさせ pRGEN-U6-sgRNA (Toolgen) の *Bsa* I サイトに挿入して、E6 を標的とした sgRNA (sgE6) 発現ベクター (pRGEN-U6-sgE6) を作製した。このベクターに pWlacZ (16) から切り出した 2 つの inverted terminal repeats (ITR) 配列を付加し、pW-U6-sgE6 を作製した (図 6)。コントロールベクターとしてそのままの pRGEN-U6-sgRNA に pWlacZ から切り出した 2 つの ITR 配列のみを付加した pW-U6-sgNC を作製した (図 6)。

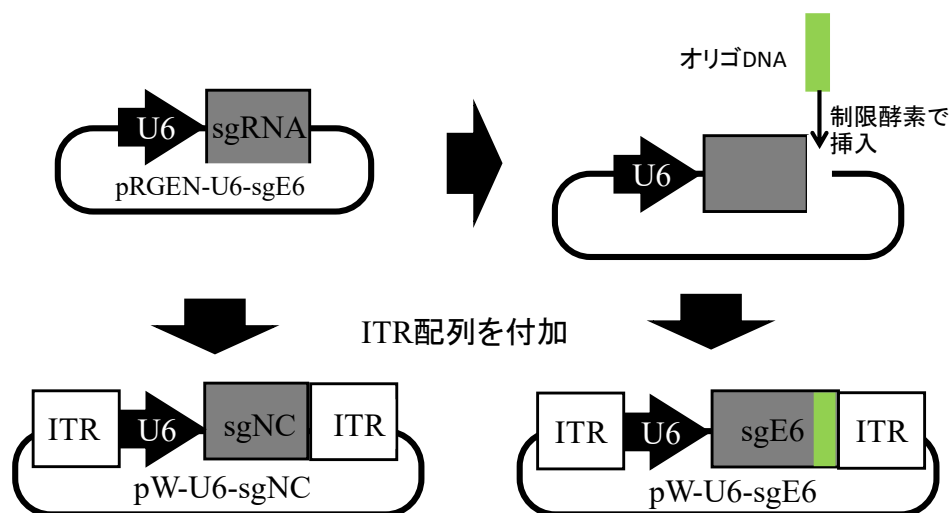


図 6. E6 を標的とした sgRNA 発現ベクターの作製

U6: U6 promoter、オリゴ DNA: HPV18 の E6 の至適 CRISPR 標的配列を含むオリゴ DNA、
ITR: inverted terminal repeat、sgE6: single guide RNA targeted for HPVE6

3) Cas9 発現子宮頸がん細胞株の樹立

pCMV-HA-Cas9-IRES-bsr を、Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて HeLa、HCS-2、SKG-I に遺伝子導入した。その後ブラストサイジン S 塩酸塩 (Funakoshi, 東京) 10 μ g/mL を含んだ培養液中で選択培養し、シングルコロニーを回収した。

4) Cas9 発現子宮頸がん細胞の増殖曲線

3 で単離した Cas9 発現腫瘍細胞を 96 穴プレートに 1 穴あたり 500 個接種した。24 時間毎に Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TAKARA BIO, 草津) を 10 μ L ずつ加え、24 時間後に SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて 450nm 波長の吸光度を測定し、増殖曲線を作成した。

5) AAV ベクターの作製

sgE6 搭載 AAV ベクター (AAV-sgE6) 及びコントロール AAV ベクター (AAV-sgNC) を作製した。AAV-sgE6 の作製には pW-U6-sgE6、アデノウイルスヘルパープラスミド (16)、2 型 AAV ヘルパープラスミド (17,18) の 3 つのプラスミドベクターを、AAV-sgNC の作製には pW-U6-sgNC、アデノウイルスヘルパープラスミド、2 型 AAV ヘルパープラスミドの 3 つのプラスミドベクター

をそれぞれ 293 細胞にリン酸カルシウム共沈法で遺伝子導入、72 時間後に細胞を回収し、3 回凍結・融解を繰り返し組み換え AAV ベクターを回収した。ベクター溶解液は、塩化セシウム密度勾配超遠心法により精製した (19)。ベクターの力価は既報の real-time PCR 法 (19) により測定した。

6) E6 遺伝子変異の検出

Cas9 遺伝子導入細胞を 6 穴ディッシュに 5×10^4 個接種し、24 時間後に AAV-sgE6 を 1×10^5 vg/cell 感染させた。感染 48 時間後に細胞をトリプシン処理して回収し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用し、説明書に従って DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型に TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TAKARA BIO) と PTC-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて PCR を行い、E6 を増幅した。使用したプライマーは次のとおりである。

forward:5'-GGGAGTGACCGAAAACGGTC-3'、

reverse:5'-GTGTTTCTCTGCGTGTGT-3'。PCR は 95°C30 秒、56°C30 秒、75°C30 秒を 40 回行った。PCR 産物を Mighty TA-cloning Kit (TAKARA BIO) を用いて説明書に従いクローニングし、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Life Technologies) を用いてサンガー法で DNA シークエンスを行った。

7) T7 endonuclease 1 (T7E1) アッセイ

腫瘍細胞を 6 穴プレートに 5×10^4 個ずつ接種し、24 時間後に AAV-sgE6 または AAV-sgNC をそれぞれ 1×10^5 vg/cell ずつ 感染させた。感染 48 時間後に細胞をトリプシン処理し、QIAamp® DNA Mini Kit を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型に前述と同様に E6 を PCR で増幅した。PCR 産物を thermal cycler PTC-100 を使用し、95°C で 2 分変性させた後、10 分で 30°C まで冷却しアニーリングさせた。二本鎖 DNA を T7 Endonuclease (M0302S, NewEngland Bio Labs, Ipswich, MA, USA) に、37°C で 20 分反応させ、0.8% アガロースゲルで電気泳動後、BioDoc-It® Imaging Systems (UVP, Upland, CA, USA) で撮影した。

8) 定量的 polymerase chain reaction (qPCR) 法

腫瘍細胞を 6 穴プレートに 5×10^4 個ずつ接種し、24 時間後に AAV-sgE6 または AAV-sgNC をそれぞれ 1×10^5 vg/cell ずつ 感染させた。感染 48 時間後に細胞をトリプシン処理し、QIAamp® DNA Mini Kit を用いて DNA を抽出した。qPCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TAKARA BIO) を用いて説明書に沿って行った。PCR は、95°C 15 秒、58°C 15 秒、72°C 20 秒を 40 サイクル行った。

E6 遺伝子変異率を測定する方法として、既報の qPCR を用いた方法 (20) を
 改変して行った (図 7)。各プライマーの配列は以下のとおりである。

Mut primer forward: 5'-TTTGAGGATCCAACACGGCGA-3'

Mut primer reverse: 5'-GTCTTGCAGTGAAGTGCTCAG-3'

CTL primer forward: 5'-GTGCCAGAAACCGTTGAATCC-3'

CTL primer reverse: 5'-CCAGCTATGTTGTGAAATCGTCG-3'

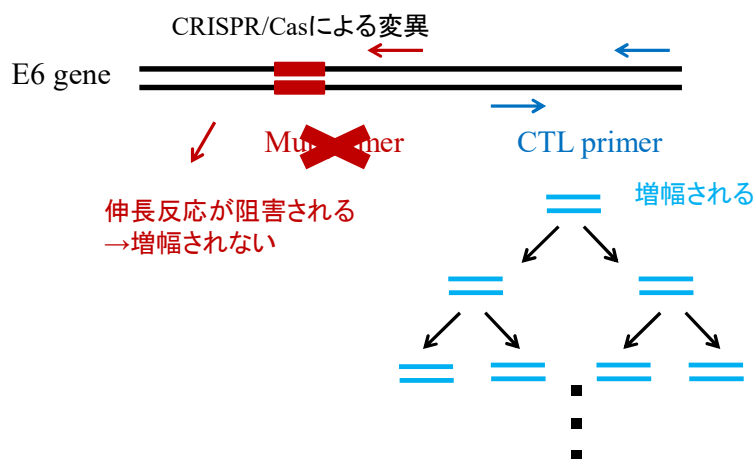


図 7 qPCR を用いた CRISPR/Cas9 による遺伝子変異率測定法の原理

CRISPR/Cas9 により生じる標的配列の変異は PAM から 2~3 塩基に好発することが知られる。ここにプライマーペア (Mut primer) の一方の 3' 末端を重ねるように設計すると、CRISPR/Cas9 により生じた標的配列の変異で生じたミスマッチにより増幅効率が著しく低下する。他方 E6 の標的部位と離れた部位のプライマーペア (CTL primer) 間の配列は問題なく増幅される。この差を利用して変異率を推定するものである。

このアッセイの妥当性を検証するため、前述の DNA シークエンスで変異が確

認された E6 配列を含むプラスミドベクターと、変異のない E6 配列を含むプラスミドベクターを鋳型に、2 組のプライマーで qPCR を行った。さらにこのアッセイの定量性を検証するため、変異のない E6 配列を含むプラスミドと変異が確認された E6 配列を含むプラスミドを、様々な割合 (10:0、9:1、8:2、5:5、2:8、1:9、0:10) で混合したものを鋳型に qPCR を行った。qPCR の結果は相対定量 (Relative Quantification, RQ) 値で評価し (21)、変異率は $(1 - \text{RQ 値}) \times 100$ (%) の式で算出した。

9) ウェスタンブロット

6 穴プレートに 5×10^4 個ずつ細胞を接種し、24 時間後に AAV-sgE6 または AAV-sgNC をそれぞれ 1×10^5 vg/cell ずつ感染させた。ベクター感染 48 時間後に細胞を lysis buffer (1% NP-40、150mM NaCl、50mM Tris-HCl、pH 8.0) を用いて溶解し、蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質を SDS サンプルバッファー (0.5M Tris-HCl (pH 6.8)、10%SDS、 β メルカプトエタノール、グリセロール、1%BPB、EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Switzerland)) にそれぞれ混合し、5% (HA, Rb) または 12.5% (E6, p53, BAX, アクチン) ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動して分離し、ポリフッ化ビニリデンメンブレン (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。メンブレンは

PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (TOYOBO, 大阪) を用いて室温で1時間静置した後、Tris Buffered Saline-Tween-20 (TBS-T) で3回洗浄し、Can Get Signal® Immunoreaction Enhance Solution 1 (TOYOBO) を用いて、抗 HA-probe モノクローナル抗体 (Cat. no. sc-7392, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 、抗 HPV18E6 モノクローナル抗体 (Cat. no. sc-365089, Santa Cruz Biotechnology) 、抗 p53 モノクローナル抗体 (Cat. no. sc-126, Santa Cruz Biotechnology) 、抗 BAX モノクローナル抗体 (Cat. no. 5023, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 、抗 Rb モノクローナル抗体 (Cat. no. 9313, Cell Signaling Technology) 、抗アクチンポリクローナル抗体 (Cat. no. A2066, Sigma-Aldrich) に室温で1晩反応させた。TBS-T で3回洗浄後、Can Get Signal® Immunoreaction Enhance Solution 2 (TOYOBO) を用いてペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体 (GE healthcare Japan, 東京) または抗ウサギ抗体 (GE healthcare Japan) を室温で1時間反応させた。TBS-T で3回洗浄した後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare Japan) を用いて化学発光させ、冷却 CCD システム (LAS-4000mini : GE healthcare Japan) で検出した。

10) アポトーシス

細胞を 12 穴ディッシュに 5×10^4 個ずつ接種し、24 時間後に AAV-sgE6 または AAV-NC を 1×10^5 vg/cell ずつ感染させた。感染 24 時間後に Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit (PromoKine, Heidelberg, Germany) を説明書に従って使用し、FITC-Annexin V 陽性細胞を倒立型顕微鏡 IX73 (OLYMPUS, 東京) を用いて観察した。高倍率視野 (high power field, HPF) 当りの陽性細胞数を計測した。

11) AAV 感染子宮頸がん細胞株の *in vitro* 増殖

細胞を 96 穴プレートに 1 穴あたり 50 個ずつ接種し、24 時間後に AAV-sgE6 または AAV-sgNC を $0 \sim 1 \times 10^7$ vg/cell ずつ感染させた。感染から 96 時間後に Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を $10 \mu\text{L}$ ずつ加え、24 時間後に SpectraMax 190 を用いて 450nm 波長の吸光度を測定した。

12) 動物実験

体重 15~20g、6~7 週齢の BALB/c ノードマウス (CLEA Japan, 東京) を用いた (n=8)。子宮頸がん細胞 3 株のうち、ノードマウスに対して造腫瘍能が確認されている SKG-I を選択した。Cas9 発現 SKG-I 細胞 (SKG-I/Cas9) を 5×10^6 個ずつノードマウスの背部皮下に接種し、同時に AAV-sgE6 または

AAV-sgNC を 2×10^{12} vg ずつ、細胞を接種した部位に 1 回のみ局注した。週 2 回ノギスを用いて腫瘍径を計測し、腫瘍体積（長径 \times 短径² \times 1/2）を算出した。AAV-sgNC 投与群の腫瘍の長径が 20mm を超えた時点で、全てのマウスを断頭により犠牲死させ、マウスの体重変化、および接種部位を肉眼的に観察した。また両群のマウスの残存腫瘍から QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA を抽出し、前述の qPCR 法によって E6 遺伝子変異率を測定した。

マウスは Specific Pathogen Free の環境下で飼育した。なお、動物実験は自治医科大学（栃木）の倫理委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインを順守し行った。

13) オフターゲット効果の検討

前述の Optimized CRISPR Design を用いてオフターゲット候補の配列を 10 か所選定した。選定したそれぞれのオフターゲット候補配列を PCR 増幅するため、Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) を用いてそれぞれの配列を増幅するためのプライマーを設計した。

前述の方法で Cas9 発現 293 細胞 (293/Cas9) を樹立した。293/Cas9 を 6 穴ディッシュに 5×10^4 個接種し、24 時間後に AAV-sgE6 を 1×10^5 vg/cell 感染させた。感染 48 時間後に細胞をトリプシン処理して回収し、QIAamp DNA Mini

Kit を使用し、説明書に従って DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型に TaKaRa Ex Taq Hot Start Version と PTC-100 を用いて PCR を行い、オフターゲット候補配列を増幅した。PCR 産物を Mighty TA-cloning Kit を用いて説明書に従いクローニングし、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer を用いてサンガー法で DNA シークエンスを行った。

14) 有意差検定

2 群間の比較は Student-t 検定を用いて検定した。多群の比較は一元分散分析後、Bonferroni の方法を用いて検定した。いずれも P 値が 0.05 未満を有意とした。

結果

1) Cas9 発現子宮頸がん細胞の樹立

遺伝子導入子宮頸がん細胞における Cas9 蛋白質の発現を、抗 HA 抗体を用いてウェスタンブロットで検出した (図 8)。HA-Cas9 遺伝子導入株にのみ、Cas9 蛋白質の発現が認められ、Cas9 発現子宮頸がん細胞株 (HeLa/Cas9、HCS-2/Cas9、SKG-I/Cas9) の樹立が確認された。

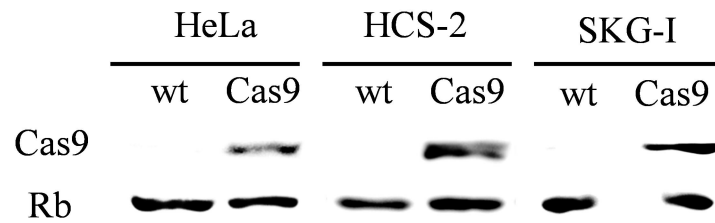


図 8. Cas9 発現子宮頸がん細胞の樹立。ウェスタンブロット法による Cas9 発現の検出。Cas9 遺伝子導入株のみ、Cas9 の発現が認められた。wt: 野生株、Cas9: Cas9 遺伝子導入株、Rb: Retinoblastoma。

2) 細胞増殖に与える影響

3 種類の子宮頸がん細胞 (HeLa、HCS-2、SKG-I) の親株と Cas9 発現株の、*in vitro* における細胞増殖を比較した。図 9A-C に示すように、両者の細胞増殖に差は見られなかった。すなわち Cas9 発現は *in vitro* における細胞増殖に影響を与えなかった。

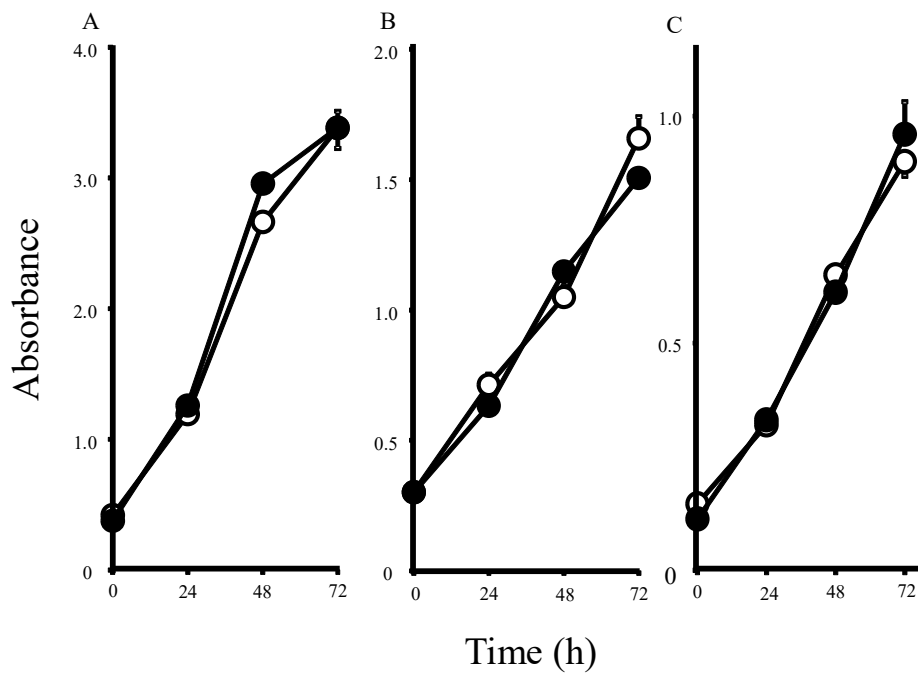


図 9. Cas9 発現子宮頸がん細胞株の細胞増殖曲線

A: HeLa、B: HCS-2、C: SKG-I。3つの細胞全て、それぞれの野生株と細胞増殖に差は見られなかった。白丸: 野生株、黒丸: Cas9 発現株。結果は mean \pm SD で示した。

3) シークエンス法による E6 遺伝子変異の検出

AAV-sgE6 感染 48 時間後の HeLa/Cas9 細胞の E6 に対し DNA シークエンスを行ったところ、標的部位を中心に様々な塩基の欠失や挿入が検出された (図 10)。シークエンスに提出した 8 個の E6 配列のうち 7 個に塩基の変異が認められ、図 10 に示す以外にも 20 塩基以上に及ぶ長大な変異が検出された。E6 を標的とした CRISPR/Cas9 による、E6 のゲノム編集が *in vitro* で確認された。

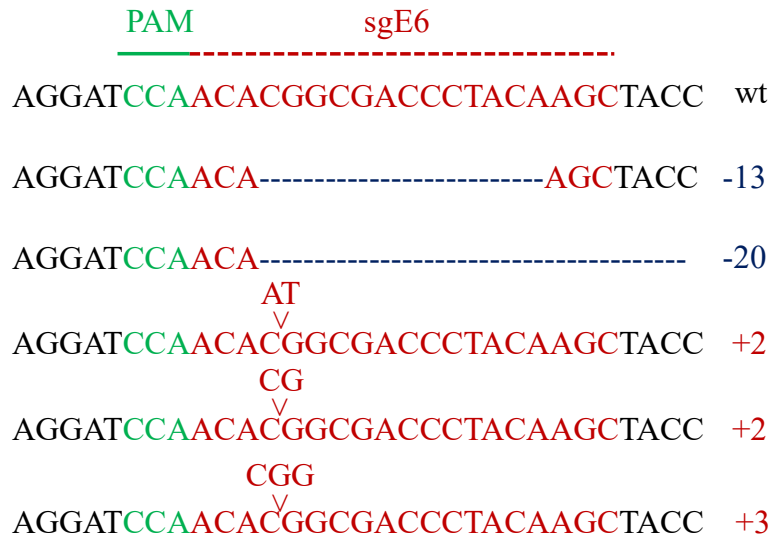


図 10. E6 遺伝子変異の検出

サンガー法による DNA シークエンス。AAV-sgE6 感染 48 時間後の Cas9 発現 HeLa 細胞の E6 遺伝子変異パターンの一部を示している。PAM: protospacer-adjacent motif、sgE6: E6 の標的
部位、wt: 野生型配列、横棒: 塩基の欠失。

4) T7E1 アッセイによる E6 遺伝子変異の検出

T7E1 は二本鎖 DNA のミスマッチを認識しこれを切断する活性を有している。切断された DNA 断片はアガロースゲル電気泳動で、より短いバンドとして検出され、TALEN や CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術による変異の導入の確認によく用いられる (図 11A)。

本アッセイによって AAV-sgE6 感染細胞のみ、T7E1 による切断産物が検出された (図 11B-D)。すなわち E6 を標的とした CRISPR/Cas9 により、E6 に遺伝子変異が導入されたことが、複数の方法により確かめられた。

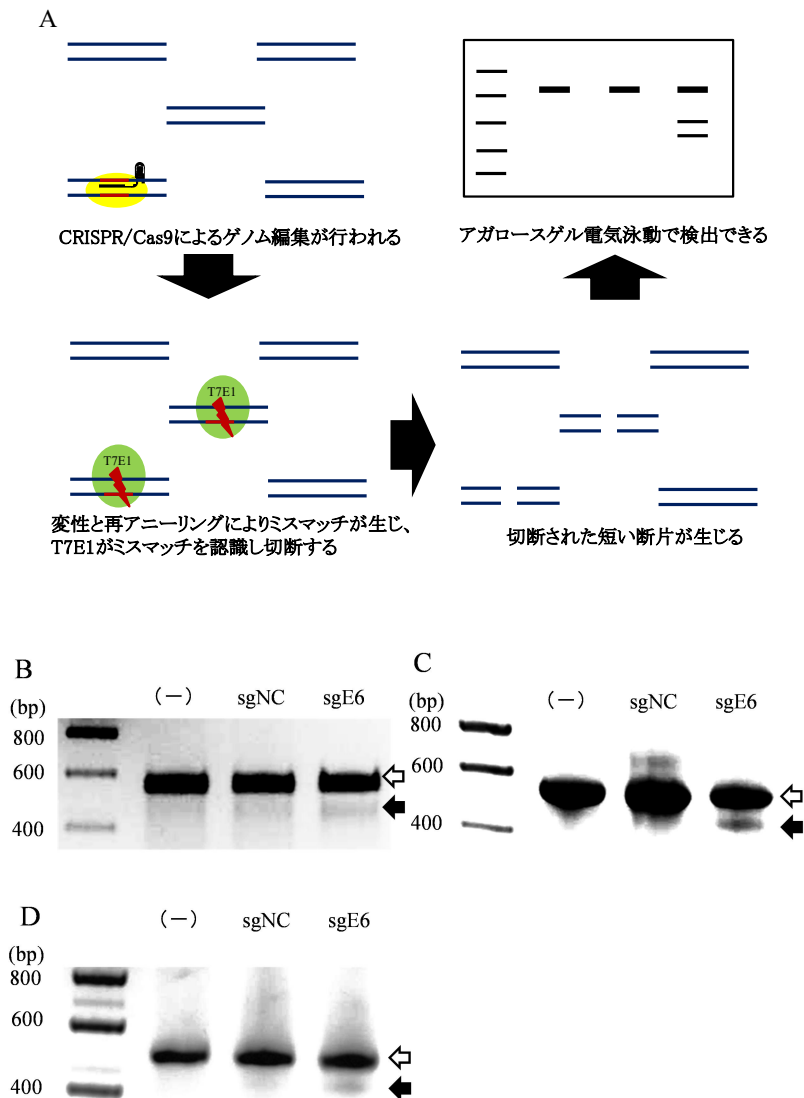


図 11. AAV-sgE6 感染 48 時間後の Cas9 発現子宮頸がん細胞の E6 遺伝子変異の検出。
 (A) T7 endonuclease 1 assay の原理, T7E1: T7 endonuclease 1。 (B-D) T7E1 assay による E6 遺伝子変異の検出。 B: HeLa/Cas9, C: HCS-2/Cas9, D: SKG-I/Cas9。 白矢印: noncleaved products, 黒矢印: cleaved products, (-): ベクター感染なし, sgNC: AAV-sgNC, sgE6: AAV-sgE6。

5) qPCR 法による変異率の測定

変異プラスミドベクターを鋳型とした qPCR において、CTL プライマーペア群の増幅効率に比べ、Mut プライマーペア群の RQ 値が著しく減少した (図 12A,B)。変異率の定量性の検討では、変異プラスミドベクターの割合が多くなるにつれて Mut プライマーペア群の増幅率が低下し、その低下率は、変異プラスミドベクターの混合率とほぼ一致していた (図 12C,D)。

この方法を用いて E6 遺伝子の変異率を測定した。その結果 AAV-sgE6 感染後の HeLa/Cas9 において、CTL プライマーペア群に比べ、Mut プライマーペア群の RQ が 0.18 に、HCS-2/Cas9 では 0.23 に、SKG-I/Cas9 では 0.13 に低下していた (図 12E-G)。変異率は HeLa/Cas9 では 82%、HCS-2/Cas9 では 77%、SKG-I/Cas9 では 87%と推定された (図 12H-J)。一方ベクターを投与していない細胞や AAV-sgNC を感染させた細胞では変異はみられなかった(図 12E-G)。

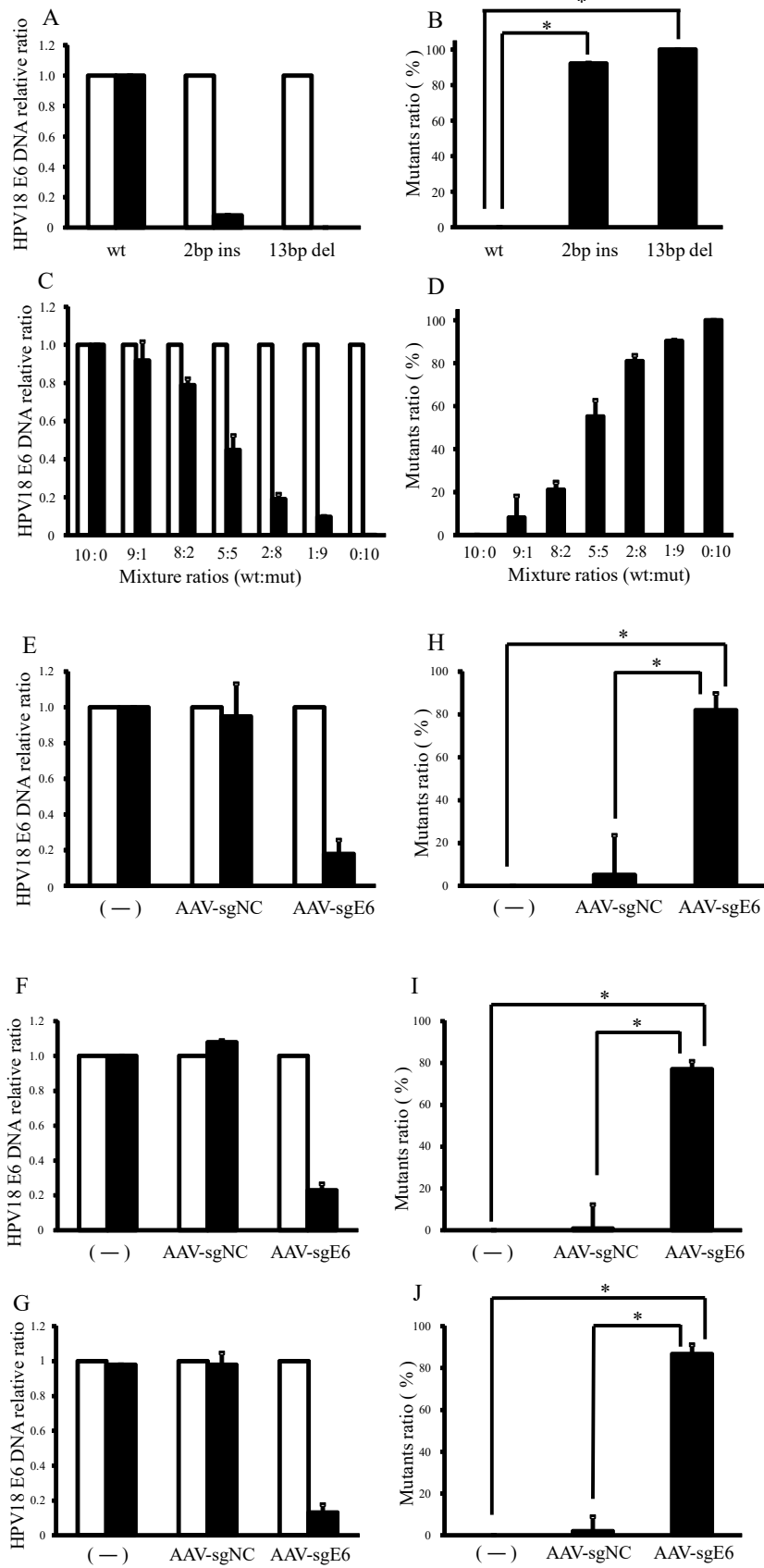


図 12. qPCR 法を用いた CRISPR/Cas9 による E6 遺伝子変異率の測定方法の検証と、AAV-sgE6 感染 48 時間後の Cas9 発現子宮頸がん細胞の E6 遺伝子変異率。

(A) 野生型 E6 または変異 E6 遺伝子配列を含むプラスミドベクターを鋳型として行った qPCR の相対定量 (relative quantification, RQ) 値。(B) その結果をもとに算出した変異率。*: $p < 0.05$ 。結果は mean \pm SD で示した。白棒: CTL プライマー群、黒棒: Mut プライマー群、wt: 野生型 E6 遺伝子群、2bp ins : 2 塩基挿入変異 E6 遺伝子群、13bp del: 13 塩基欠失変異 E6 遺伝子群。変異率は $(1 - \text{RQ 値}) \times 100 (\%)$ の式で算出した。(C) 野生型プラスミドベクターと変異型プラスミドベクターを様々な割合 (10:0、9:1、8:2、5:5、2:8、1:9、0:10) で混合した際の各プライマー群の RQ 値。(D) その結果をもとに算出した変異率。白棒: CTL プライマー群、黒棒: Mut プライマー群。(E-J) AAV-sgE6 感染 48 時間後の Cas9 発現子宮頸がん細胞から抽出した DNA を鋳型として行った qPCR の RQ 値 (E: HeLa/Cas9, F: HCS-2/Cas9, G: SKG-I/Cas9) と E6 遺伝子変異率 (H: HeLa/Cas9, I: HCS-2/Cas9, J: SKG-I/Cas9) 。*: $p < 0.05$ 。結果は mean \pm SD で示した。白棒: CTL プライマー群、黒棒: Mut プライマー群。

6) 蛋白質発現

ベクターを投与していない細胞や AAV-sgNC を感染させた細胞では E6 の発現が観察された。またこれらの細胞ではがん抑制遺伝子 p53 や、BAX の発現が見られなかった。一方 AAV-sgE6 を感染させた細胞では、E6 の発現が著明に低下し、p53 や BAX の発現が著明に上昇した (図 13) 。E6 を標的とした CRISPR/Cas9 による E6 のノックアウトと、それによる p53、BAX の発現の上昇が蛋白質レベルで示された。

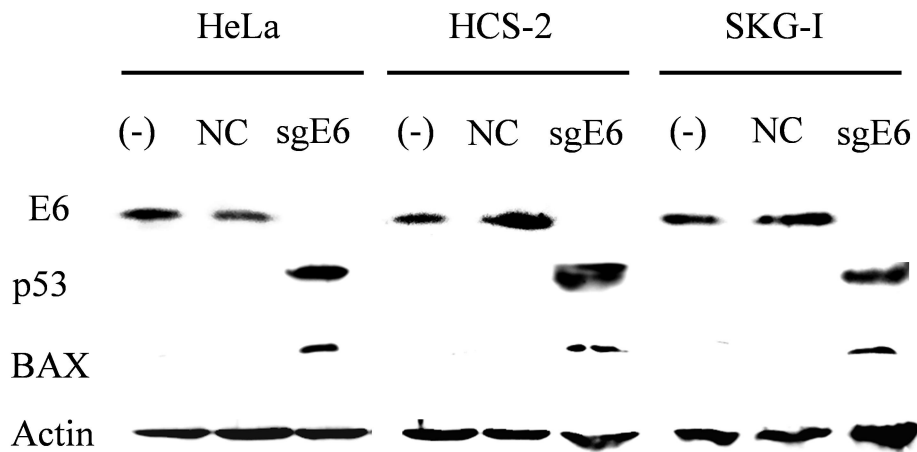


図 13 . AAV-sgE6 感染後の蛋白質発現

AAV-sgE6 または AAV-sgNC 感染 48 時間後に、3 種の Cas9 発現子宮頸がん細胞株における E6、p53、BAX の蛋白質発現をウェスタンブロット法で解析した。3 種の細胞株全てにおいて E6 の発現抑制と、p53、BAX の発現増強を認めた。(-): ベクター感染なし、NC: AAV-sgNC、sgE6: AAV-sgE6。

7) アポトーシス

AAV-sgE6 感染群においては ($46.0 \pm 5.0/\text{HPF}$)、未感染群 ($1.0 \pm 1.4/\text{HPF}$) や AAV-sgNC 感染群 ($0.8 \pm 1.3/\text{HPF}$) に比べ、FITC-AnnexinV 陽性細胞が有意に増加した (図 14A,B)。すなわち E6 を標的とした CRISPR/Cas9 は、*in vitro* において腫瘍細胞のアポトーシスを誘導した。

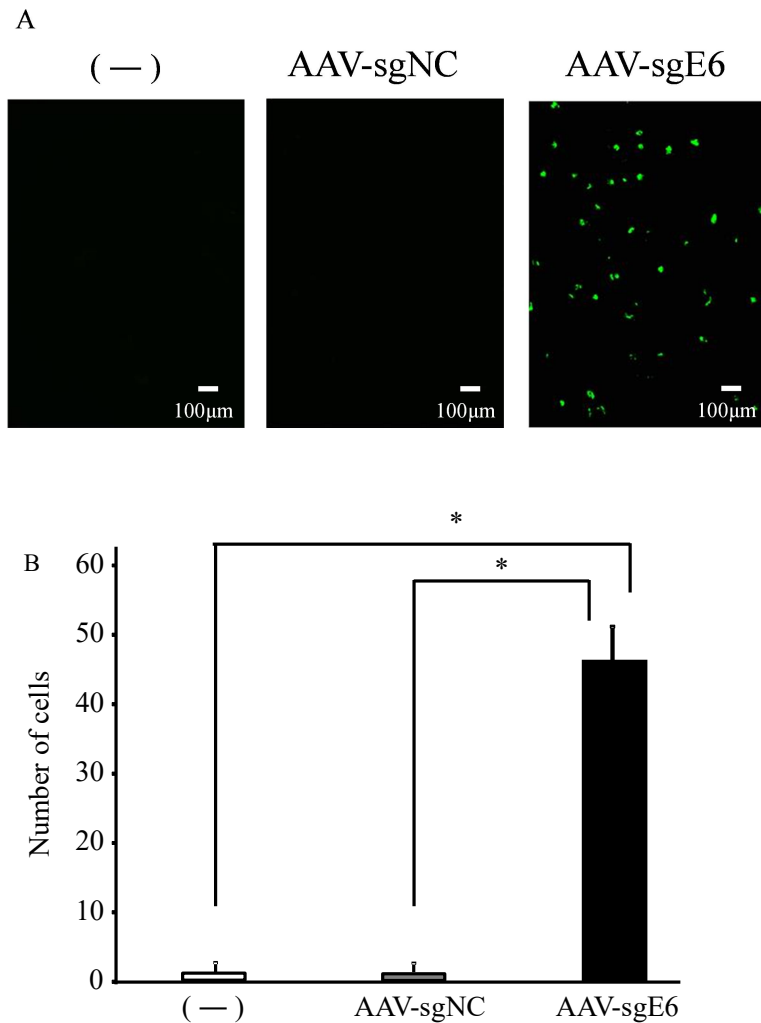


図 14. AAV-sgE6 感染後のアポトーシス

(A) 蛍光免疫染色による、AAV-sgE6 または AAV-sgNC 感染 48 時間後の Cas9 発現 HeLa 細胞のアポトーシス細胞。(B) 高倍率視野 (HPF) 当りの陽性細胞数。*: $p < 0.05$ 。結果は mean \pm SD で示した。

8) *in vitro* 細胞増殖

いずれの腫瘍細胞株においても、1 細胞あたりの AAV-sgE6 のウイルス粒子数が増加するにつれて生細胞数が減少した (図 15)。すなわち AAV-sgE6 は Cas9 発現子宮頸がん細胞株の *in vitro* における細胞増殖を用量依存的に抑制した。

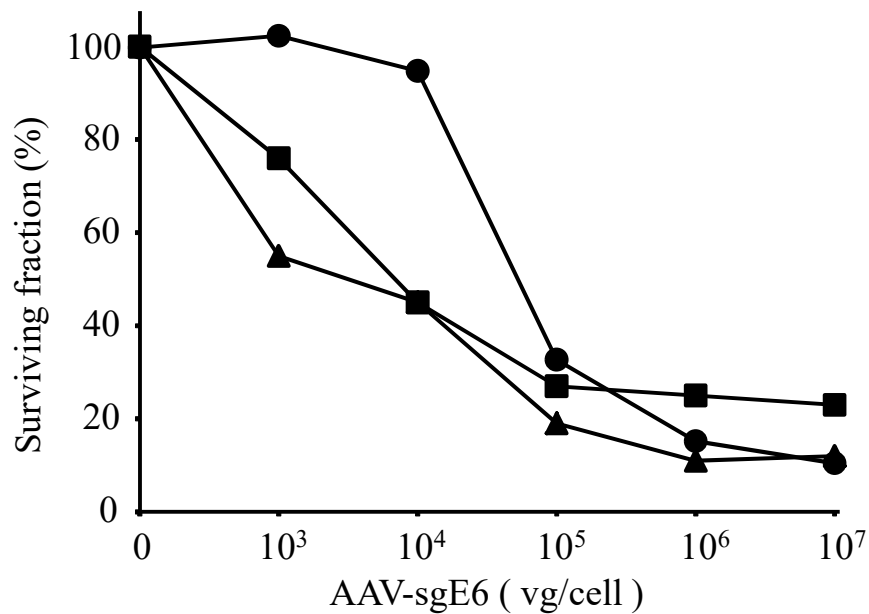


図 15 . AAV-sgE6 感染後の細胞増殖

WST-1 アッセイによる。AAV-sgE6 感染 72 時間後の生細胞（黒丸: HeLa/Cas9、黒三角: HCS-2/Cas9、黒四角: SKG-I/Cas9）。3 種の Cas9 発現子宮頸がん細胞株全てにおいて AAV-sgE6 は用量依存的に細胞増殖を抑制した。結果は mean ± SD で示した。

9) 動物実験

AAV-sgE6 投与群は、AAV-sgNC 投与群に比べ腫瘍の増殖が有意に抑制された (図 16A)。実験終了時点である投与後 42 日目の AAV-sgE6 群の腫瘍体積は $114 \pm 60 \text{mm}^3$ で、AAV-sgNC 群 ($817 \pm 114 \text{mm}^3$) と比較して有意に小さかった (各々 $n=4$, $p<0.05$) (図 16B,C)。すなわち E6 を標的とした CRISPR/Cas9 は *in vivo* において腫瘍増殖を抑制した。

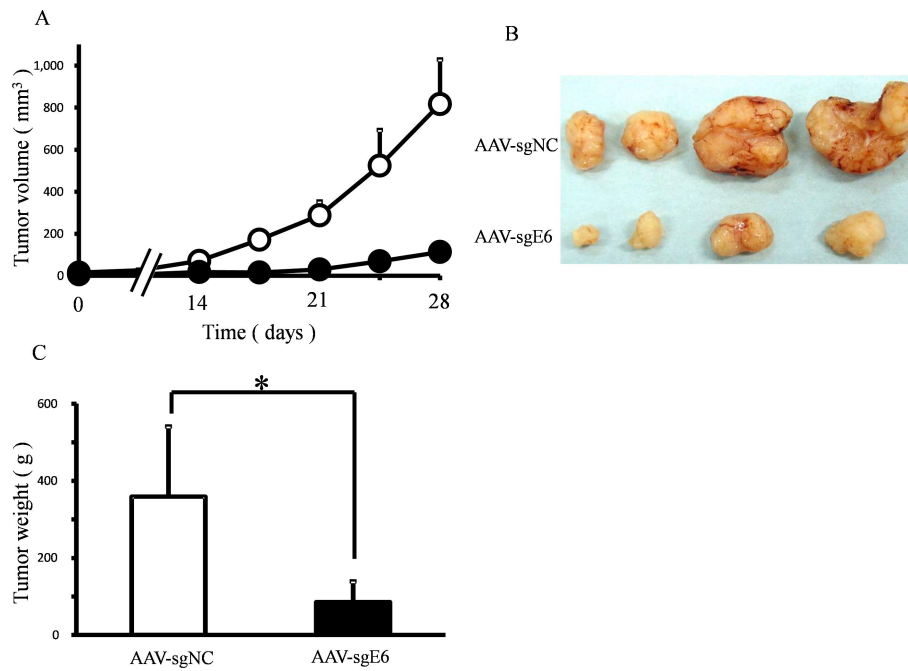


図 16. AAV-sgE6 感染後の *in vivo* 腫瘍増殖

(A) マウス皮下に Cas9 発現 SKG-I を接種し、直後に AAV ベクターを投与した後の腫瘍増殖曲線。*: $p < 0.05$ 。結果は mean \pm SD で示した。白丸: AAV-sgNC 投与群、黒丸: AAV-sgE6 投与群。(B) AAV ベクター投与 28 日後の SKG-I 由来腫瘍。(C) AAV ベクター投与 28 日後の SKG-I 由来腫瘍の重量。*: $p < 0.05$ 。結果は mean \pm SD で示した。

また残存腫瘍の E6 遺伝子に変異は見られなかった (データ省略)。犠牲死直前の両群の体重に差は見られなかった (図 17A)。皮下の腫瘍周囲を観察したが、肉眼的に異常は見られなかった (図 17B)。

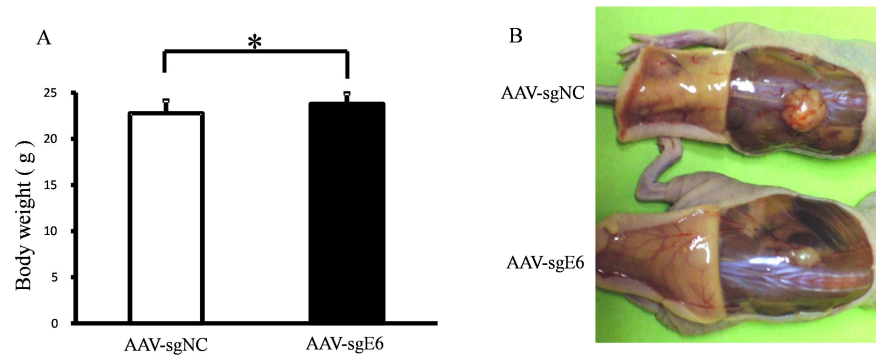


図 17. AAV-sgE6 感染後の有害反応

(A) AAV-sgE6、または AAV-sgNC 投与 28 日後のマウスの体重。*: not significant。結果は mean \pm SD で示した。(B) AAV-sgE6、または AAV-sgNC 投与 28 日後の局所所見。

10) オフターゲット効果の検討

Optimized CRISPR Design で選定した 10 のオフターゲット候補についてオフターゲット効果の有無を検証したところ、そのうち 9 つの配列では遺伝子変異は検出されなかった (表)。しかし 1 つのサイトにおいてはシーケンスを行った 8 つのプラスミドのうち 1 つにのみオフターゲット効果を疑う塩基の変異が検出された (表)。全体としてオフターゲット効果は 80 分の 1 (1.25%) に観察された。

	Chromosome	Position	Exon	Sequence	PAM	Indel(+)
On target				AGCTTGTAGGGTCGCCGTGT	TGG	
OTS1	chr15	45879673	NM_012388	AGG C AGTAGGGT G GCCGTGT	CAG	0/8
OTS2	chr3	40791751		AGG T GGTAGGGT C CCCGTGT	GGG	0/8
OTS3	chr1	23763067	NM_017707	AGGG T TAGGG C CGCCGTGT	GAG	0/8
OTS4	chr16	49703293		G GCCTCTAGGGTCGCC A TGT	GGG	0/8
OTS5	chr15	40426253		T GCTT G GAGGG C TGCCGTGT	GAG	0/8
OTS6	chr10	73886257		AGCCTG T TGGGT G GCCGT A T	GAG	0/8
OTS7	chr5	136653334		G ACTTGTAGGG T T G ACGTGT	CAG	0/8
OTS8	chr2	171156446		AG A TTGTAG C ATCG A GTGT	AAG	0/8
OTS9	chr5	149759038	NM_001008 657	AGCCT G GAGGG T G GACGTGT	GAG	0/8
OTS10	chr16	67691947	NM_001082 487	AG T TTGTAGGG T G CCCT G C	AAG	1/8

表. AAV-sgE6 感染後の *in vitro* オフターゲット効果の検証

サンガー法による DNA シークエンス。AAV-sgE6 感染 48 時間後の Cas9 発現 293 細胞における 10 のオフターゲット候補配列における遺伝子変異割合。赤字は E6 標的配列との相違を表している。OTS: Off Target Site、PAM: protospacer-adjacent motif。

考察

本研究では、高リスク型 HPV の E6 を標的とした CRISPR/Cas9 と AAV ベクターを用いた、効果的で特異性の高い子宮頸がん新規治療法の開発を目的に基礎的検討を行った。われわれが以前行った AAV ベクターの血清型スクリーニングでは、子宮頸がん細胞に最も高い遺伝子導入効率を示したのは AAV2 ベクターであった。この結果を元に、本研究でもベクターとして AAV2 を選択した。はじめに Cas9 搭載 AAV ベクターを作成し子宮頸がん細胞への Cas9 遺伝子導入を試みたが、この方法では導入が確認できなかった（データ省略）。AAV ベ

クターは搭載できる遺伝子長に限界があり、約 4.7kb を超えた遺伝子を搭載した場合、遺伝子導入効率が極端に低下する(22)。今回用いた Cas9 の遺伝子長は約 4.2kb で、プロモーターや PolyA 配列を含めると 4.7kb を越えているため、遺伝子導入が十分に行われなかったと推察される。そこで我々は、ひとまず AAV ベクターによる Cas9 遺伝子導入を断念し、Cas9 を恒常発現する子宮頸がん細胞株を樹立し、これを対象に検討した。

樹立した Cas9 発現子宮頸がん細胞株は、3 株ともそれぞれの親株と増殖速度は変わらなかった。すなわち Cas9 発現は子宮頸がん細胞の増殖に影響を与えないことが確認された。Cas9 を全身の組織で発現するノックインマウスの検討でも、生理機能を含む表現型に異常はみられない (23) ことから、Cas9 単独の発現は哺乳類の細胞にそれほど大きな影響は与えないと考えられる。

次に E6 を標的とする sgRNA 発現 AAV ベクターを作製した。E6 の標的配列の選定には、オンラインサービスを利用した。U6 プロモーター制御下にこの標的配列を含む sgRNA を発現する AAV ベクター (AAV-sgE6) を作製し検討した。AAV-sgE6 を Cas9 発現子宮頸がん細胞に感染させたところ、E6 の標的配列に様々な変異が確認された。すなわち E6 を標的とする CRISPR/Cas9 により、子宮頸がん細胞の E6 に遺伝子変異の導入が可能であることが示された。

CRISPR/Cas9 による遺伝子変異の検出方法として最も一般的に用いられて

いるのは、T7E1 アッセイである。今回の検討においても、AAV-sgE6 感染群のみ、遺伝子変異を示す新たなバンドが観察された。

しかしながら、T7E1 アッセイは作業工程が多いため条件設定が煩雑であり、さらには定量性に乏しい。そこで我々は、既報の qPCR を用いた遺伝子変異率検出法 (20) を試みた。この方法はいわゆるミスマッチ PCR 法である。E6 の標的配列の一部に、一方のプライマーの 3' 側の一部が一致するプライマーペア (Mut primer) を設計した。また E6 の標的配列とは十分離れた、別の配列に一致するプライマーペア (CTL primer) を設計した。Mut primer を用いた qPCR は、CRISPR/Cas9 により生じた標的配列の変異によりミスマッチが生じて増幅効率が著しく低下する。一方、CTL primer の増幅効率は、変異の有無に影響されない。この方法を用いれば、Mut primer を用いた qPCR と CTL primer を用いた qPCR の RQ 値とを比較することにより、標的部位の変異の有無が確認できるのみならず、変異率の定量も可能である。

この方法の妥当性を検証するため、前述の DNA シークエンスで変異が確認された E6 配列を含むプラスミドベクターを用いて検証した。その結果、変異プラスミドベクターを鋳型とした qPCR において、Mut primer 群の RQ 値が著しく減少した。次に定量性の検証として、変異のない E6 配列を含むプラスミドベクターと、変異配列を含むプラスミドベクターを様々な割合で混合したものを鋳

型とした qPCR を行った。その結果、CTL primer 群の RQ 値に対する Mut primer 群の RQ 値の低下率が、変異プラスミドの混合率とほぼ一致した。以上より、本法は CRISPR/Cas9 により引き起こされた E6 の変異の確認と変異率の定量方法として応用できることが確認された。この方法を用いて AAV-sgE6 を感染させた Cas9 発現子宮頸がん細胞における E6 変異の有無と変異率を検討した。その結果、全ての細胞株において E6 の変異が確認された。またその変異は E6 全体のおよそ 8 割に及んでおり、ゲノム編集の効率としては比較的高いものと思われた。

続いて E6 およびそれらに関連する因子の発現をウェスタンブロットで検討した。その結果、AAV-sgE6 を感染させた 3 種の子宮頸がん細胞全てにおいて、E6 の発現が低下し、一方、p53 と BAX の発現は上昇した。また、Annexin V を指標としたアポトーシスの検討では、著明なアポトーシスの誘導が観察された。通常、子宮頸がんにおいては E6 の作用で p53 が分解されているため (6,7)、その下流の BAX の発現が抑制され、その結果アポトーシスの誘導が阻害されている。Cas9 と AAV-sgE6 による E6 発現抑制効果によってこれらの異常が解消され、アポトーシス誘導作用が正常に機能するようになったと考えられる。

次に E6 を標的とした CRISPR/Cas9 の、実際の子宮頸がん細胞への増殖抑制効果を *in vitro* で検討した。その結果、全ての Cas9 発現子宮頸がん細胞に対し

て、AAV-sgE6は濃度依存性に増殖抑制効果を示した。

以上の実験結果をもとに、E6を標的としたCRISPR/Cas9の効果を*in vivo*動物実験で検討した。その結果、AAV-sgE6投与群ではAAV-sgNC投与群に比べて腫瘍の増殖が著明に抑制された。AAV-sgE6投与群から抽出したDNAを、前述のqPCR法で検討したところ、E6の変異は検出されなかった。これらの残存腫瘍は、ベクターが感染しなかったか、感染してもゲノム編集が行われなかった細胞によって形成された可能性が推察される。従って、今後さらに効果を高めていく工夫としては、ベクターの投与量や投与回数を増やすこと、E6の異なった標的配列を含むsgRNAを複数搭載すること、などが考えられる。最近、AAVが細胞に感染する際の重要なレセプターが、KIAA0319Lと呼ばれる蛋白質であることが報告された(24)。将来的に、この知見がAAVベクターの遺伝子導入効率を飛躍的に上昇させる鍵になるかもしれない。

ゲノム編集技術を用いて子宮頸がんのE6をノックアウトする試みが過去に数件報告されている(25-28)。これらの報告では、*in vitro*あるいは*ex vivo*での効果が確認されている。本研究ではさらに、子宮頸がんに対して高い遺伝子導入効率を示すAAV2ベクターと、ゲノム編集技術の中でも簡便で効率の良いCRISPR/Cas9を組み合わせることにより、*in vivo*において高い抗腫瘍効果が示された。

副障害の検討では、AAV-sgE6 を投与したマウスに体重減少はみられず、投与局所にも明らかな異常はみられなかった。その理由として、AAV ベクター自体に毒性がないこと、また、E6 は子宮頸がん細胞以外の正常組織には全く発現していないため、E6 を標的とした CRISPR/Cas9 は正常組織に対しては影響を与えないこと、の 2 点が考えられる。以上から本治療戦略は正常組織に対して影響を与えず、安全性が高いことが示唆された。

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集は特異性の高い方法であるが、標的部位の誤認識による非特異的 DNA 切断、いわゆるオフターゲット効果が存在することが知られている (29)。理論的にはオフターゲット効果によりがん遺伝子の活性化や、がん抑制遺伝子の不活性化が起これば発がんの引き金となりうるし、また生殖細胞における遺伝子変異は子孫の発現系にまで影響を及ぼす可能性もある。よって将来的な臨床応用のためには本実験系におけるオフターゲット効果の評価は必要と考えられた。しかしながら現時点でオフターゲット効果の評価について確立された方法はないため (30,31)、今回我々はサンガー法による DNA シークエンスを用いた方法を考案しオフターゲット効果について評価を行った。その結果この実験系でオフターゲット効果が生じる可能性が存在することが判明した。この効果により細胞自体にどのような影響があるか、さらには *in vivo* における影響があるかは、当治療戦略に適したオフターゲット効果の検証方法

を含めて今後さらなる検討を要すると思われた。

HPV に対しては、キャプシド構造の構成分子である L1 蛋白質を抗原とした HPV ワクチンが実用化され、世界中で投与されている (32,33)。既にワクチン接種により HPV 感染の減少が報告され (34)、今後はそれに伴って子宮頸がんの減少が期待される。一方、世界中で数千万人に上る高リスク型 HPV 既感染者や、子宮頸部上皮内新生物 (CIN) および子宮頸がん患者に対する、HPV を標的とした根治的治療法は未だ確立していない。今回われわれが検証した E6 を標的とした CRISPR/Cas9 による治療戦略は、高リスク型 HPV の E6 を高効率で抑制し、腫瘍増殖抑制効果が期待できる。

臨床応用としては、第 1 に前がん病変である CIN2/3 や、初期浸潤がんが対象となろう。現在、これらの疾患に対する治療は、子宮頸部円錐切除術や子宮全摘術のような手術療法のみである (35,36)。若年者に対しては妊孕性温存のため前者が選択されることが多い (37)。しかし、円錐切除後の子宮頸がんの発生率は健常者の 4 倍にもおよぶことから (38)、円錐切除の根治性の低さが懸念されている。また、円錐切除症例では子宮頸管の短縮や、それに伴う子宮内腔への感染により、不妊、流早産などの合併症が高頻度に発生することが知られており、その影響は生殖、周産期分野にも及ぶ (37)。そのため、円錐切除に代わる効果的で侵襲の少ない治療法の開発が期待されている。これらの疾患は病変

が限局していることから、本治療戦略が最も効果を示す可能性が高い。一方、本疾患は前述の様に、若年者や挙児希望者に多いことから、高い安全性が必須である。今回の検討では明らかな副障害は観察されなかったが、将来の臨床応用に向けて、さらなる安全性の検討が必要であろう。

進行子宮頸がんに対しては、本治療戦略は局所療法であることから、広範囲の浸潤や転移に対しての効果は限定的であり、根治は期待できない。しかし bulky tumor に対してその縮小を狙った治療には応用可能であろう。すなわち bulky tumor を縮小させ手術の根治性を高める、あるいは放射線療法の効果を上げる、などの目的で行われる neoadjuvant chemotherapy の代替となり得るかもしれない。さらには、局所再発がんの一部にも応用可能かもしれない。

本研究では、AAV ベクターによって子宮頸がん細胞に導入できたのは、E6 を標的とした sgRNA のみであった。今回用いた *Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 (SpCas9) は、2013 年に報告されて以来、ゲノム編集に現在最も広く用いられている Cas9 である。SpCas9 は標的配列を規定する PAM 配列が NGG と短いことから、標的配列の選択の自由度が高いなどの利点がある。しかしながら前述の理由で AAV ベクターには搭載困難である。最近、遺伝子長が 3.3kb と短く AAV ベクターに搭載可能な *Staphylococcus aureus* 由来の Cas9 (SaCas9) が報告された (39) 。この SaCas9 は、sgRNA とともに AAV ベクターに搭載す

ることが可能であり、理論的にはそれ単独でのゲノム編集、ひいては子宮頸がんに対する E6 を標的とした治療を可能にする。現在われわれは、SaCas9 と E6 を標的とした sgRNA の両方を搭載した AAV ベクターを作成し、子宮頸がんに対する効果を検証中である。

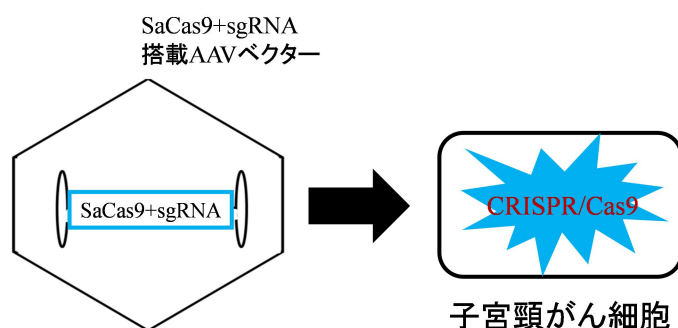


図 18 SaCas9 と sgRNA 両方を搭載した AAV ベクターによる子宮頸がん治療のイメージ
SaCas9 ならば sgRNA とともに AAV ベクターに搭載することが可能であり、より臨床応用に近づくとと思われる。

今回の研究から、高リスク型 HPV の E6 を標的とした CRISPR/Cas9 を用いた、効果的で特異性の高い、子宮頸がん新規治療法の可能性が示唆された。

おわりに

高リスク型 HPV の E6 を標的とした sgRNA 搭載 AAV ベクター (AAV-sgE6) は、Cas9 発現子宮頸がん細胞の E6 の発現を抑制しがん抑制遺伝子 p53 を正

常に機能させることで子宮頸がん細胞をアポトーシスに誘導することが明らかとなった。またそれにより Cas9 発現子宮頸がん細胞株において *in vitro* および *in vivo* 実験で著明な増殖抑制効果を認めた。同時に AAV-sgE6 の投与による *in vivo* 実験の観察範囲では有害事象は認めず、sgRNA 搭載 AAV ベクターの局所投与による CRISPR/Cas9 利用ゲノム編集は忍容可能であると考えられる。

以上より、CRISPR/Cas9 を応用した子宮頸がんに対する新規分子標的治療法は、有効性、安全性が高く子宮頸がんに対する有望な選択肢になりうると考えられた。

引用文献

- 1) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 136: E359-86, 2015.
- 2) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 66: 7-30, 2016.

- 3) Woodman CB, Collins SI, and Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancere*. 7: 11-22, 2007.
- 4) Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, and zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3: 1151-1157, 1984.
- 5) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, and zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80: 3812-3815, 1983.
- 6) Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 98: 1505-11, 2007.
- 7) Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 10: 550-60, 2010.
- 8) Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, VeldersMP, Kast WM. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol*. 186: 169-182, 2001.

- 9) Jinek M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337: 816-21, 2012.
- 10) Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 157: 1262-78, 2014.
- 11) Mueller C, Flotte TR. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*. 15: 858-63, 2008.
- 12) Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol*. 507: 229-54, 2012.
- 13) Wu Z, Asokan A, and Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*. 14: 316-327, 2006.
- 14) Sato N, Saga Y, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Fujiwara H, Suzuki M, Ozawa K, Mizukami H. Eradication of cervical cancer in vivo by an AAV vector that encodes shRNA targeting human papillomavirus type 16 E6/E7. *Int J Oncol*. 52: 687-696, 2018.
- 15) Urabe M, Hasumi Y, Ogasawara Y, Matsushita T, Kamoshita N, Nomoto A, Colosi P, Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K. A novel dicistronic AAV

- vector using a short IRES segment derived from hepatitis C virus genome. *Gene*. 200: 157-62, 1997.
- 16) Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, Iwaki Y, Colosi P. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther*. 5: 938-45, 1998.
- 17) Mochizuki S, Mizukami H, Kume A, Muramatsu S, Takeuchi K, Matsushita T, Okada T, Kobayashi E, Hoshika A, Ozawa K. Adenoassociated virus (AAV) vector-mediated liver- and muscle-directed transgene expression using various kinds of promoters and serotypes. *Gene Ther Mol Biol*. 8: 9-18, 2004.
- 18) Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol*. 73: 3994-4003, 1999.
- 19) Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y. Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. *J Gene Med*. 11: 1020-9, 2009.
- 20) Yu C, Zhang Y, Yao S. A PCR based protocol for detecting indel mutations

- induced by TALENs and CRISPR/Cas9 in zebrafish. *PLoS One*. 9: e98282, 2014.
- 21) Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*. 25: 402-8, 2001.
- 22) Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 7: 2101-12, 1996.
- 23) Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*. 159: 440-55, 2014.
- 24) Pillay S Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, Jae LT, Wosen JE, Nagamine CM, Chapman MS, Carette JE. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*. 530: 108-12, 2016.
- 25) Hu Z, Yu L, Zhu D, Ding W, Wang X, Zhang C, Wang L, Jiang X, Shen H, He D, Li K, Xi L, Ma D, Wang H. Disruption of HPV16-E7 by

- CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int.* 2014: 612823, 2014.
- 26) Yu L, Wang X, Zhu D, Ding W, Wang L, Zhang C, Jiang X, Shen H, Liao S, Ma D, Hu Z, Wang H. Disruption of human papillomavirus 16 E6 gene by clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas system in human cervical cancer cells. *Onco Targets Ther.* 8: 37-44, 2014.
- 27) Zhen S, Hua L, Takahashi Y, Narita S, Liu YH, Li Y. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochem Biophys Res Commun.* 450: 1422-6, 2014.
- 28) Kennedy EM, Kornepati AV, Goldstein M, Bogerd HP, Poling BC, Whisnant AW, Kastan MB, Cullen BR. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J Virol.* 88: 11965-72, 2014.
- 29) 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.* 31:827-32, 2013.
- 30) Tsai, S.Q. & Joung, J.K. What's changed with genome editing? *Cell Stem Cell.* 15: 3-4, 2014.
- 31) Marx, V. Gene editing: how to stay on-target with CRISPR. *Nat. Methods.* 11: 1021–1026, 2014.
- 32) Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G; HPV PATRICIA study group. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women : an interim analysis of a phase III double-blind, randomized controlled trial. *Lancet.* 369: 2161-2170, 2007.
- 33) Romanowski B. Long term protection against cervical infection with the human papillomavirus: review of currently available vaccines. *Hum Vaccin.* 7: 161-169, 2011.

- 34) Drolet M, Bénard É, Boily MC, Ali H, Baandrup L, Bauer H, Beddows S, Brisson J, Brotherton JM, Cummings T, Donovan B, Fairley CK, Flagg EW, Johnson AM, Kahn JA, Kavanagh K, Kjaer SK, Kliewer EV, Lemieux-Mellouki P, Markowitz L, Mboup A, Mesher D, Niccolai L, Oliphant J, Pollock KG, Soldan K, Sonnenberg P, Tabrizi SN, Tanton C, Brisson M. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 15: 565-80, 2015.
- 35) Sevin BU, Nadji M, Averette HE, Hilsenbeck S, Smith D, and Lampe B: Microinvasive carcinoma of the cervix. *Cancer.* 70: 2121-2128, 1992.
- 36) Massad LS, Einstein MG, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW; 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol.* 121: 829-846, 2013.
- 37) Bevis KS, and Biggio JR. Cervical conization and the risk of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 205: 19-27, 2011.
- 38) Melnikow J, McGahan C, Sawaya GF, Ehlen T, Coldman A. Cervical

intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study. *J Natl Cancer Inst.* 101: 721-8, 2009.

- 39) Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 520: 186-91, 2015.