



## 【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- ・ [診療ガイドライン](#)
- ・ [研修医のお役立ち論文コンテンツ](#)
- ・ [用語集](#)

本編は次ページより掲載しております。

# ゲノム編集技術の概要とその可能性

大森 司\*



大森 司

## The potential of Genome-editing techniques

Tsukasa OHMORI

**要約：**近年のゲノム編集技術は DNA に二本鎖 DNA 切断(double-strand break; DSB)を引き起こす手法と、生体が保持する DSB の修復機構に基づいている。標的と成る遺伝子座に DSB を引き起こす手法にはジンクフィンガースクレアーゼ(ZFN), TAL エンドヌクレアーゼ(TALEN), CRISPR/Cas9 がある。DSB が生じると、修復過程である非相同組換えによってフレームシフトを生じ、標的遺伝子の発現が異常となる。一方、DSB の両側 DNA に相同性をもつ遺伝子配列が存在した場合、一定の確立で相同組換えによる遺伝子修復が生じる。DSB の手法は、とくに第 3 世代にあたる CRISPR/Cas9 に著しい進歩が認められており、Cas9 のオルソログ、改変型 Cas9、また相同組換えの効率を上昇する手法が次々と報告されている。血栓止血領域においても、本技術を応用した次世代遺伝子治療の開発が期待される。

1994年 自治医科大学卒業  
1994年 山梨県立中央病院内科  
研修医  
1996~2003年 南部町国民保険  
診療所、財団法人 身延山病  
院  
山梨医科大学臨床検査医学講  
座 研究生  
2004年 自治医科大学分子病態  
治療研究センター分子病態研  
究部  
2015年 自治医科大学医学部生  
化学講座病態生化学部門

**Key words:** CRISPR/Cas9, TALEN, Zinc finger nuclease

## 1. ゲノム編集とは？

ゲノム上の遺伝子異常が、様々な先天性の出血性疾患、血栓性疾患の原因となりうる(本特集の他項参照)。出血性疾患としては、血液凝固第 VIII 因子、第 IX 因子の遺伝子異常による血友病が有名である。血友病は単一の遺伝子異常であり、凝固因子の治療域が広いことから遺伝子治療のよい標的疾患と考えられてきた。事実、血友病 B を対象としたアデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が一定の効果を挙げている<sup>1,2)</sup>。これまでの遺伝子治療は、ゲノム配列上の異常遺伝子はそのままで、プロモーター配列と正常遺伝子をベクターによって細胞に導入する手法が一般的であった。近年、注目されているゲノム編集技術とは、ゲノム上の DNA 配列自身

を、特定の手法を用いて修飾・修正する技術である。

## 2. 相同組換えの技術をもちいたノックアウトマウスの作製

ゲノム編集という言葉は新しい概念に感じるが、染色体上の DNA 配列を特定の遺伝子配列に置き代える手法は以前より行われている。これは相同組換えを利用したノック・アウトマウスの作製である(図 1)。以下に、一般的なノックアウトマウスの作成法を概説する。目的の遺伝子を修飾したい配列の両側に数 kbp の相同性をもつ配列(アーム)をもつターゲティングベクターを作製し、これを ES 細胞にエレクトロポレーション法をもちいて導入する。アームの外側には、DTA もしくはチミジンキナーゼ配列が存在し、非相同組換えによってベクターが染色体上に挿入された ES 細胞は理論上、増殖できない。また、ターゲティングベクターには挿入したい遺伝子と同時にネオマイシン耐性遺伝子を含み、本ターゲティングベクター由来の遺伝子が挿入された細胞

\*責任者連絡先：  
自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門  
〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1  
Tel: 0285-58-7397, Fax: 0285-44-7817  
E-mail: tohmori@jichi.ac.jp

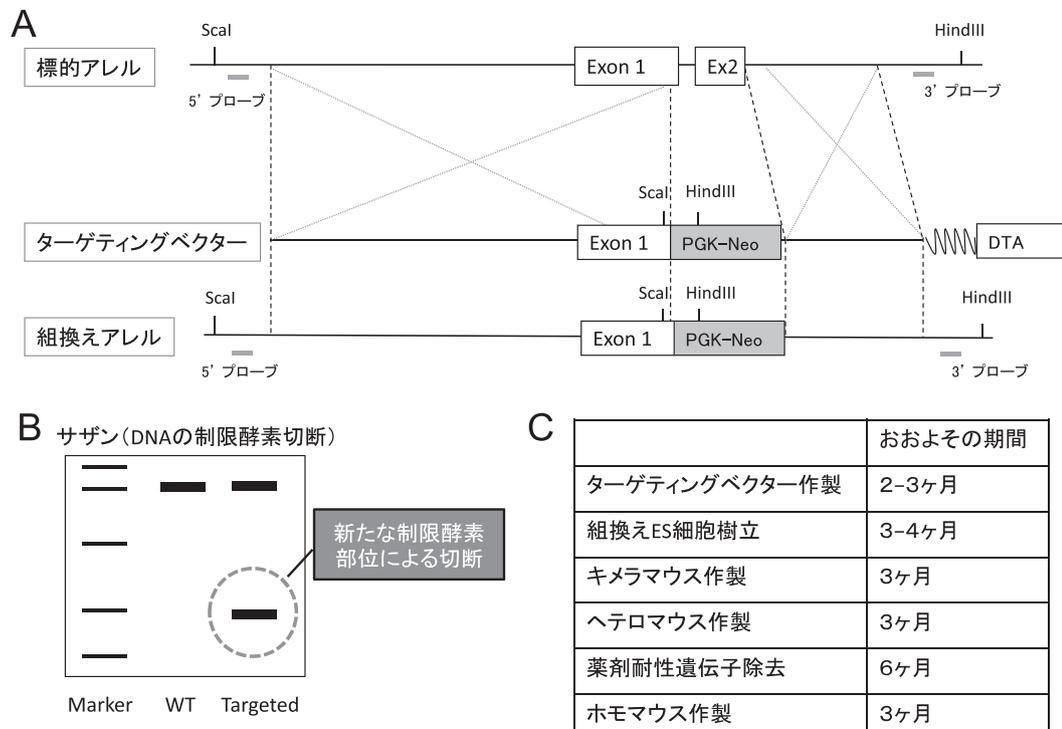


図1 ノックアウトマウス作製の例

通常のノックアウトマウスはES細胞を用いて相同組換えを利用して作製する。(A)末端にDTA(ジフテリア毒素A)、挿入部位にPGK-Neo(PGKプロモーターとネオマイシン耐性遺伝子)を持つターゲティングベクターを電圧ポレーション法でES細胞に導入する。培地にG418をいれ、ターゲティングベクターの配列を持つES細胞を選択する。また、非同組換えが生じたES細胞はDTAにより死滅する。(B)サザン解析の例：ターゲティングベクターには制限酵素部位を新たに導入し、相同組換えが生じたかどうかを後に調べられるようにしておく。(C)ノックアウトマウス作製までの工程・時間：ヘテロマウス作製までに早くても約1年を要する。

を、薬剤をもちいて選択していく。このような選択を行った上でコロニーを選択し、PCR解析、サザン解析をもちいて、標的遺伝子の相同組換えが両アームで生じたかを確認した上で、胚盤胞に導入しキメラマウスを作製する。キメラマウス取得後にF1ヘテロマウスを得る。ターゲティングベクターの構築から、F1マウスを得るまでに少なくとも1年を要する。さらに薬剤耐性遺伝子を除去するには、CAG-Cre、CAG-Flpeトランスジェニックマウスとの交配が必要となる。本手法は基礎研究の面では確立した手法だが、相同組換えの効率を考えると、実際に遺伝子治療への応用は現実的ではない。われわれは、ある遺伝子座のノックアウトマウスを作製する際にネオマイシン耐性のESコロニーを768個ピックアップし、最終的にサザン解析で相同組換えが確認できたのは10コロニーであった。本手法をブタ線維芽

細胞に応用し、ES細胞と同様に相同組換えが生じた線維芽細胞を得て、クローン術により血友病ブタを産出した<sup>3)</sup>。線維芽細胞はES細胞よりも相同組換えの効率が悪く、相同組換えが正確に生じたクローンは薬剤のセレクション後にもかかわらず、2,000コロニー中、1コロニーのみであった。このように、この手法を用いて遺伝子改変動物を作製する過程は多くの費用と時間を要するため、その作製を躊躇してしまうことも多い。また、このような低頻度の相同組換えでは、疾患の治療を目指したゲノム上の遺伝子改変などは期待できない。

### 3. 二本鎖DNA切断修復機構

遺伝子の相同組換えを利用した遺伝子修飾の効率が極めて悪いことが、ゲノム編集を身近なテクニッ

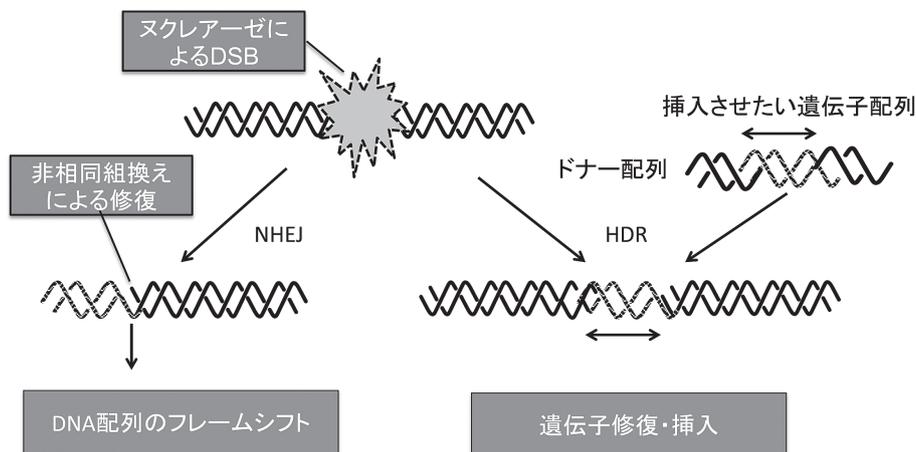


図2 二本鎖 DNA 切断部位の修復機構

二本鎖 DNA 切断部位の修復機構は非相同組換え (NHEJ) と相同組換え (HDR) に分けられる。NHEJ 際には塩基の欠失を伴うことが多く、DNA 配列のフレームシフトを引き起こす。一方、挿入(修復)した遺伝子配列と両端に相同性をもつドナー配列が存在すると一定の割合で相同組換えが生じる。

クとして用いるのに大きな障壁であった。この相同組換えは、標的ゲノム部位の二重鎖切断 (DSB; double-strand break) が生じると格段に効率が改善することが報告された<sup>4)</sup>。最近のゲノム編集技術と呼ばれる技術は、特定の二本鎖 DNA の領域に DSB を引き起こし、これにより、DNA の修復過程である非相同組換えによる標的遺伝子の欠損、または、相同組換えによるノックインによりゲノム編集を行う技術を指す。

DSB の修復機構は、非相同組換え (non-homologous end-joining; NHEJ) と相同組換え (HDR; homologous recombination) に分類される<sup>5)</sup>。NHEJ とは細胞周期に依存しない修復であり切断された DNA の末端を単純につなげる機構である。この連結時にはエラーが入りやすく、連結時に数 bp から数 10 bp の塩基欠失を生じる。これらがフレームシフトを引き起こすことにより遺伝子産物が異常となる (図2)。一方、HDR は細胞周期依存性の反応で、正常遺伝子を鋳型として修復するため正確な遺伝子修復が可能となる。この際に、異常遺伝子部位を切断し、正常配列を持つドナー DNA 配列が存在すれば、この正常 DNA を鋳型として相同組換えによる遺伝子修復が生じる (図2)。更には、ノックアウトマウスの作製のように特定の配列を挿入可能である。上述の通

り、DSB を介した相同組換えの効率は、従来のノックアウトマウス作成技術と比較して格段に高く、ホモロジーアームの長さも短くて済むために、従来よりもドナーベクターの作製に対する労力も少ないという利点もある。

#### 4. ゲノム編集技術の概要

ゲノム編集は特定の DNA ゲノム配列に DSB を引き起こす技術に基づいている。現在、ゲノム編集に用いられる DSB を引き起こすツールは、第一世代のジンクフィンガーヌクレアーゼ (zinc-finger nuclease; ZFN)、第2世代の TAL エフェクターヌクレアーゼ (transcription activator-like effector nuclease; TALEN)、第3世代の CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) である。とくに CRISPR/Cas9 の発見から急速にゲノム編集への応用が加速している。以下にそれぞれの技術の特徴について簡単に概説する。

1) zinc-finger nuclease (ZFN) : N 末端に特定の配列を認識するジンクフィンガー-DNA 結合ドメインと C 末端に配列非特異的に DNA を切断する制限酵素 (FokI) を融合させる合成蛋白質 (ヌクレアーゼ) である (図3A)<sup>6)</sup>。FokI は2量体を形成し、

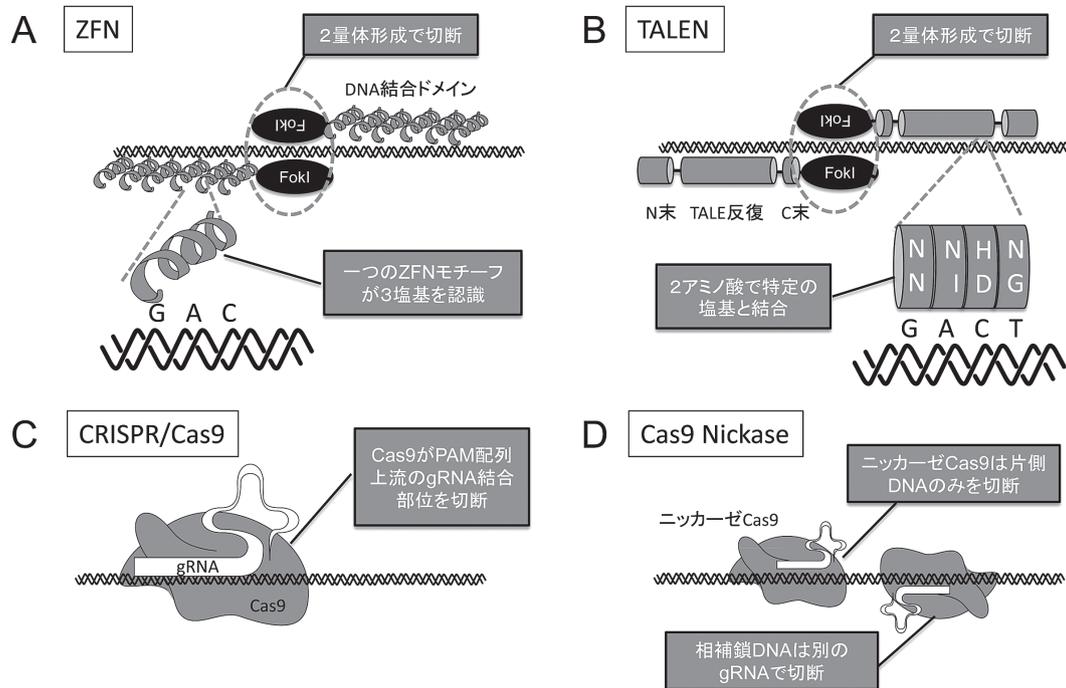


図3 ゲノム編集技術の概要

(A)ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)：N末端に特定のDNA配列を認識するDNA結合ドメイン，C末端のヌクレアーゼドメイン(FokI)よりなる。FokIは2量体の形成でDNAを切断する。一つのZFNモチーフが3塩基を認識する。(B)TALエフェクターヌクレアーゼ：N末端の輸送シグナル，TALEリピート(DNA認識部位)，C末端，FokIヌクレアーゼを持つ。人工の2アミノ酸で特定の塩基と結合する。(C)CRISPR/Cas9：PAM配列の上流に結合したgRNAをCas9が認識してDNAを切断する。(D)ニッカーゼCas9：Cas9に特定の変異を入れ，一本のDNAのみを切断する酵素。二本鎖を切断するために相補鎖となるDNAにもgRNAを設計することでオフターゲット効果を減じる。

初めてDSBを引き起こすため，相補鎖DNAの反対の配列も認識するものを発現させる必要がある。ZFNの問題点は，ジンクフィンガー-DNA結合ドメインのDNA認識の特異性である。一つのジンクフィンガーは3塩基DNAを認識するが，モジュールの連結により認識の特異性が変化してしまう可能性がある。現在は，TALEN，CRISPR/Cas9が発展し，ZFNを用いることは少なくなっている。

- 2) TALEN: ZFNと同様にFokIとDNA結合ドメインからなる構造をとる(図3B)。ZFNと同様にFokIの2量体形成によってDSBを引き起こす。DNA結合ドメインはXanthomonas属のプロバクテリアが分泌する転写を変化させる蛋白質 transcription activator-like effector(TALE)由来である<sup>7)</sup>。N末端に輸送シグナル，約34アミノ酸からなるTALEリピート，各局在シグナルや転写活性化

ドメインをもつC末端よりなる。TALEリピートの驚くべき点はたった2個の人工アミノ酸配列が特定の塩基を認識することである(NN, NI, HD, NGがG, A, C, Tに対応，等)。一つのDNA結合アミノ酸配列が一つの塩基DNAを認識しているために，ZFNのように互いの塩基配列の認識が変化することがなく，特異性が高いと考えられている。

- 3) CRISPR/Cas9: ゲノム編集技術の概念はこのCRISPR/Cas9の出現により大きく変化した<sup>8)</sup>。元来，CRISPR/Cas9は細菌の持つ外来DNAの排除機構である。細菌は外部からのDNAを断片化し内在ゲノム領域に取り込んだ後に短いRNA配列(crRNA)を合成する。次に同様のDNA配列が入り込んだ際に，crRNAがtracrRNAとともに，これを認識し，Casヌクレアーゼにより外来DNAを切断する<sup>9, 10)</sup>。本機構を哺乳類細胞に応用する

には gRNA と呼ばれる crRNA と tracrRNA を結合させた RNA, Cas9 蛋白質を発現することで特定の DNA 配列の切断が可能となる(図 3C)<sup>11, 12)</sup>. Cas9 蛋白質は, どんな DNA 配列を切断するにしても共通であり, 約 20 塩基の gRNA 配列を変えるのみで, ほぼ全ての遺伝子座に应用可能である. gRNA が認識する 20 塩基配列の 3' 側には Protospacer adjacent motif(PAM)配列が必要であるが, 通常用いられる連鎖球菌の Cas9(SpCas9)の PAM 配列は NGG(N は任意)と, ほとんど制約はない. このように簡便にゲノム配列に DSB を引き起こすことが可能であることから, 本技術は急速に広まっている. 事実, PubMed で CRISPR, Cas9 で検索すると, 2012 年にはわずか 3 論文だが, 2013 年に 109 論文, 2014 年に 370 論文, 2015 年には 8 月までにすでに 454 論文が報告されている. CRISPR/Cas9 は簡易な方法である一方, ペアで使用する TALEN と比較してオフターゲット切断のリスクが高いと考えられている.

## 5. CRISPR/Cas9 の技術応用

CRISPR/Cas9 についての技術は急速に発展しており, その全てをフォローすることが困難であるが, 筆者が興味をもった報告について, CRISPR/Cas9 の特性を含め概説する. 2012 年に CRISPR/Cas9 の働きが明らかとなり<sup>9, 10)</sup>, 2013 年に哺乳類細胞への応用が報告された<sup>11, 12)</sup>. この報告のわずか 1 カ月後の 3 月にはゼブラフィッシュでの CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術<sup>13)</sup>, 5 月にはマウスの作製が報告されている<sup>14)</sup>. 本マウス作製技術では Cas9 mRNA と gRNA の受精卵への注入により 50~90% の確立で変異が挿入できる<sup>14)</sup>. この過程はマウスが生まれるまで, わずか 1 カ月弱程度の時間しか要さないため, 既存のノックアウトマウスを作成手法よりも極めて効率的である. ただし, ドナー DNA を一本鎖オリゴで同時に挿入し HDR による遺伝子修復を試みた場合には 14 匹中 1 匹のみであり, HDR による遺伝子修復の技術には改善の余地がある. また, CRISPR/Cas9 による遺伝子改変動物の作製は, ES 細胞が応用できない動物種(ラット, ウサギ, サル)にも応用できる<sup>15-17)</sup>. 現在の CRISPR/Cas9 に対する報告

は, このような欠点を補い, 如何にヒト治療や病態解析へ向かうかというところに集約されていると思われる.

CRIPR/Cas9 の欠点として挙げられるのはオフターゲットの問題である<sup>18)</sup>. 本報告では 6 つの gRNA 配列中 4 つにオフターゲットが認められ, gRNA の 5' 側に mismatches が多く(最高で 23 塩基中 5 塩基の違いの部位でも生じている), gRNA 鎖の 5' 部位の特異性が低いことを示している<sup>18)</sup>. このオフターゲットの問題にいち早く対応したのが double nicking による手法である<sup>19)</sup>. Cas9 蛋白質の触媒ドメインの変異(D10A や H480A)によって Cas9 蛋白質を一本鎖 DNA のみを切断するニッカーゼに変換する(図 3D)<sup>19)</sup>. 近接する同一遺伝子の別部位に対する相補鎖 DNA にも gRNA 配列を同時に発現させることにより, 挟まれた部位の DSB を促す. 細胞レベルではオフターゲットの可能性を 50~1,500 倍減じるとされている<sup>19)</sup>. さらに, オフターゲットは gRNA 配列を 20 未満にすることで, 目的遺伝子の DSB を阻害することなく, 5,000 倍改善しうる<sup>20)</sup>. ニッカーゼ Cas9 を使用し, gRNA 配列を工夫することによりディープシーケンシングによっても変異が同定できないレベルまでオフターゲットを減じられることが報告されている<sup>21)</sup>.

次にゲノム修復技術の問題点として, 標的遺伝子の挿入を引き起こす HDR の割合が低いことが挙げられる. HDR と比較して NHEJ の確率をはるかに大きい. HDR を促進する一つの戦略としては, NHEJ に関連する蛋白質のノックダウンや強発現により HDR の割合を亢進させる手法が用いられている<sup>22-24)</sup>. NHEJ に関連する KU70, KU80, DNA ligase IV を RNA 干渉の系で抑制すると HDR 効率が 4~5 倍改善する<sup>22)</sup>. アデノウイルス由来の 4E1B55K, E4orf6 の共発現によって NHEJ が 5.5% から 0.7% に減じることが報告されている<sup>22)</sup>. また, DNA ligase4 の阻害剤である Scr7 を用いると HDR 効率が細胞レベルで 19 倍亢進し, マウス受精卵でも挿入効率が数倍上昇する<sup>24)</sup>.

一般に用いられている Cas9 蛋白質は溶血性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)由来であり, 遺伝子長は 4.5 kbp ほどになる. 遺伝子治療に用いられるウイルスベクターは挿入できる遺伝子長に制限があっ

たり、遺伝子長が長くなるとベクター産生効率が低下する場合がある。そのため、様々な細菌から Cas9 オルソログを検索し、より使用しやすい Cas9 を同定する試みがなされた<sup>25)</sup>。黄色ブドウ球菌から得られた SaCas9 は SpCas9 よりも 1 kbp 短く、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)にも挿入可能である。AAV を用いて Pcsk9 遺伝子(コレステロール調節遺伝子)の 40%以上の遺伝子改変が可能であったと報告されている<sup>25)</sup>。SaCas9 の必要とする gRNA 配列長、ならびに PAM 配列が SpCas9 と異なることは注意が必要だが、今後、実際の遺伝子治療に結びつけるにはよいツールと考えられる。また、PAM 配列の制約により標的の DNA 部位に DSB が入れられないことも予測されるが、認識する PAM 配列が異なる誘導体も作製されている<sup>26)</sup>。

## 6. 血友病遺伝子治療への応用

血友病遺伝子治療の分野においてもゲノム編集技術を用いた治療法がマウスレベルで報告されている。最初の報告は ZFN を用いた方法である。AAV と ZFN の組み合わせにより、血友病 B の遺伝子異常を是正し、出血傾向を改善した<sup>27, 28)</sup>。ヌクレアーゼの発現がオフターゲットによる DSB を引き起こすことを嫌い、Barzel らはアルブミンの遺伝子座に AAV8 を用いて相同組換えを利用して挿入し、血中 FIX が 7~20%に上昇することを報告している<sup>29)</sup>。細胞レベルでは、血友病 A 患者の F8 の逆位が TALEN で可能なこと<sup>30)</sup>、また血友病患者 iPS の F8 大欠失を CRISPR/Cas9 で修復したことが報告されている<sup>31)</sup>。本報告では修復した iPS 細胞を内皮細胞に分化後、血友病 A マウスに皮下投与すると出血傾向が改善するという<sup>31)</sup>。

## 7. おわりに

CRISPR/Cas9 の開発が急速に進み細胞レベルでの異常遺伝子座の修復が可能となってきた。また、CRISPR/Cas9 システムはオフターゲットさえ除外できれば、簡便に遺伝子改変動物を作製することが可能であり、標的遺伝子の変異動物を使用した実験がより身近なものになると思われる。今後、本技術を

ヒト遺伝子治療に結びつけるには、in vivo での遺伝子修復技術の開発、オフターゲットの予測、Cas9 の効率的、かつ一過性の発現システムの構築が鍵となるだろう。今後の技術開発に期待したい。

著者の利益相反(COI)の開示：

委託研究費(バイエル薬品株式会社)

## 文献

- 1) Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, Della Peruta M, Lheriteau E, Patel N, Raj D, Riddell A, Pie J, Rangarajan S, Bevan D, Recht M, Shen YM, Halka KG, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Allay J, Kay MA, Ng CY, Zhou J, Cancio M, Morton CL, Gray JT, Srivastava D, Nienhuis AW, Davidoff AM: Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* **371**: 1994–2004, 2014.
- 2) Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM: Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**: 2357–2365, 2011.
- 3) Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Suzuki M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y: Porcine model of hemophilia A. *PLoS ONE* **7**: e49450, 2012.
- 4) Rouet P, Smith F, Jasin M: Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6064–6068, 1994.
- 5) Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS: Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* **2**: 249–268, 2012.
- 6) Porteus MH, Carroll D: Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* **23**: 967–973, 2005.
- 7) Joung JK, Sander JD: TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 49–55, 2013.
- 8) Ma Y, Zhang L, Huang X: Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J* **281**: 5186–5193, 2014.
- 9) Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksny V: Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: E2579–E2586, 2012.
- 10) 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**: 816–821, 2012.

- 11) 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**: 819–823, 2013.
- 12) 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**: 823–826, 2013.
- 13) Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK: Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**: 227–229, 2013.
- 14) Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**: 910–918, 2013.
- 15) Chen Y, Zheng Y, Kang Y, Yang W, Niu Y, Guo X, Tu Z, Si C, Wang H, Xing R, Pu X, Yang SH, Li S, Ji W, Li XJ: Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet* **24**: 3764–3774, 2015.
- 16) Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K, Izu H, Iguchi A, Ikawa M, Ogura A: Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp Anim* **64**: 31–37, 2015.
- 17) Shao Y, Guan Y, Wang L, Qiu Z, Liu M, Chen Y, Wu L, Li Y, Ma X, Liu M, Li D: CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc* **9**: 2493–2512, 2014.
- 18) 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**: 822–826, 2013.
- 19) 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**: 1380–1389, 2013.
- 20) Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK: Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* **32**: 279–284, 2014.
- 21) Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS: Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* **24**: 132–141, 2014.
- 22) Basu S, Aryan A, Overcash JM, Samuel GH, Anderson MA, Dahlem TJ, Myles KM, Adelman ZN: Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 4038–4043, 2015.
- 23) Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R: Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **33**: 543–548, 2015.
- 24) 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**: 538–542, 2015.
- 25) 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**: 186–191, 2015.
- 26) Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales AP, Li Z, Peterson RT, Yeh JR, Aryee MJ, Joung JK: Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* **523**: 481–485, 2015.
- 27) 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**: 3283–3287, 2013.
- 28) 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**: 217–221, 2011.
- 29) Barzel A, Paulk NK, Shi Y, Huang Y, Chu K, Zhang F, Valdmann PN, Spector LP, Porteus MH, Gaensler KM, Kay MA: Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice. *Nature* **517**: 360–364, 2015.
- 30) Park CY, Kim J, Kweon J, Son JS, Lee JS, Yoo JE, Cho SR, Kim JH, Kim JS, Kim DW: Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPSC cells using TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 9253–9258, 2014.
- 31) Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, Kim JH, Kim DW, Kim JS: Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* **17**: 213–220, 2015.