

CRISPR/Cas9 기술을 이용한 질병 치료 동향

성 상 현

서울대학교 생명과학부

E-mail: sshflash@snu.ac.kr

요약문

원핵세포로부터 유래한 CRISPR-Cas 유전체 편집 시스템은 특정한 DNA와 RNA 서열을 직접 조작하고 검출하고 시각화 할 수 있는 능력을 혁명적으로 발전시켰다. 비교적 간단한 사용법과 기술 자체의 강력함으로 인해 기초 생물학 분야뿐만 아니라 의학적인 적용에까지 전반적인 영향을 미치고 있다. 특정한 핵산 분자를 조절할 수 있는 새로운 Cas 시스템을 찾는 노력도 활발했으며, 다양한 이펙터와 결합하여 상당히 넓은 범위의 기능을 수행할 수 있다는 결과도 보고되고 있다. 기본적으로 CRISPR-Cas 시스템은 DNA에 손상을 만들고 원하는 형태의 회복을 도모하는 것을 목표로 하는데 현재는 RNA 및 후생유전학적 편집을 할 수 있는 것을 넘어, DNA에 손상을 입히지 않고도 유전체를 편집할 수 있는 기술들이 등장하고 있다. 본 글에서는 CRISPR-Cas 시스템의 발견에서부터 기능적인 확장에 더하여 전임상과 임상 단계에서 적용되고 있는 사례와 그 원리를 살펴봄으로써 현재의 기술이 앞으로의 유전자 치료에 어떠한 방향을 제시하고 있는지 살펴본다. 나아가 현재 CRISPR-Cas 시스템의 한계를 살펴보고 어떠한 점이 해결되어야 하는지 고찰하고자 한다.

Key Words: 유전체 편집, 유전자 치료, DNA 손상 복구, CRISPR-Cas, 오프-타겟 효과

목 차

1. 서론
2. 본론
 - 2.1. 유전체 편집 시스템의 대표적 사례
 - 2.2. 유전체 편집의 작동 기전과 사용 방식

- 2.3. RNA를 조절하는 CRISPR-Cas
- 2.4. CRISPR-Cas에 의한 유전자 조절
- 2.5. Cas9 기능을 조절하는 방법들
- 2.6. 기타 dCas9이 적용된 사례들
- 2.7. 의학 분야에서의 CRISPR 시스템의 적용 가능성 탐색
- 2.8. CRISPR-Cas을 적용하고 있는 사례들
- 2.9. 한계점과 잠재적인 해결 방법들
3. 결론
4. 참고문헌

1. 서론

유전 정보를 조절하거나 편집하는 기술은 유전자의 기능을 연구하고 생물학적인 기전을 파헤치는 데 매우 중요하다. 1971년에 제한효소를 이용해 서열 특이적으로 DNA를 자른 경우가 발표된 이후로 분자 생물학에서 제한효소는 상당히 널리 사용되어 왔다 [1]. 그 이후에 recombinase, meganuclease, zinc finger nuclease, transcription activator-like effector nuclease, CRISPR-Cas 시스템 등의 발견으로 인해 DNA를 원하는 대로 조작하는 기술은 엄청나게 발전했다 [2]. 특정한 서열의 DNA에 결합하는 단백질을 이용해 DNA를 조작하는 기술은 상당한 효용을 주었지만, 원하는 타겟에 작용하는 단백질을 새롭게 만들어 내는 것은 매우 복잡하고 어려운 일이었다. 비교적 최근에 등장한 CRISPR-Cas9 기술은 원하는 타겟 서열을 조작하기 위해 필요한 전문적인 지식이나 기술이 거의 필요 없었기 때문에 유전체를 엔지니어링 하는 데 혁명적인 영향을 미쳤다. CRISPR-Cas9의 타겟 특이성이 핵산끼리의 염기 페어링에 의해서만 결정될 뿐, 단백질-DNA의 상호작용에 의존하지 않기 때문이라는 특징이 중요했다.

자연상에서 CRISPR-Cas 시스템은 원핵생물의 획득 면역 기전으로 작용해서 외부에서 들어온 핵산을 제거하는 역할을 한다 [3]. 세균과 고세균의 다양한 종에는 여러 종류의 CRISPR-Cas 시스템이 존재하고 구성 성분이나 작동 기전이 다르다 [4]. 가장 대표적인 시스템은 클래스 2로써 단일한 이펙터 단백질을 가진다. 모든 CRISPR-Cas 시스템은 CRISPR RNA (crRNA)를 통해 타겟에 대한 특이성을 가지는데, 실험적으로 사용되는 경우에는 가이드 RNA (guide RNA, gRNA)로 약간 변형되어 사용된다. crRNA의 스페이서(spacer)라는 부분이 타겟 서열을 인지하고 결합하는데, 이때 타겟 서열은 Protospacer Adjacent Motif (PAM) 라는 서열에 인접하여 존재해야 한다. crRNA와 타겟의 결합 이후, Cas 단백질이 타겟 DNA를 절단한다. 따라서 crRNA 또는 gRNA의 스페이서 부분의 서열을 바꾸는 것만으로 원하는 타겟에 Cas 단백질이 작동하도록 조작할 수 있는 것이다. 이러한 편리함으로 인하여 응용 가능한 분야가 빠르게 확장되었고 기초 과학뿐만 아니라 임상 의학 분야에까지 적용될 가능성이 연구되고 있다 [5]. 또한, 새로운 형태의 CRISPR-Cas 시스템을 발견하여, DNA를 엔지니어링 할 수 있는 범위가 점차 확대되고 있다.

본 글에서는 최근에 CRISPR-Cas을 이용하여 유전자를 편집하고 후생유전학적으로 유전자를 조절하는 기술들이 발전한 근황을 먼저 설명한 후, 더욱 다양한 영역으로 확장된 적용 사례들을 언급하고자 한다. 최종적으로는 질병에 대한 진단, 치료 목적으로 CRISPR-Cas 시스템이 사용되고 있는 사례들에 대해 설명하고, 현재 주된 한계는 무엇인지 앞으로 발전 가능성이 있는 방향은 무엇인지에 대해 고찰하고자 한다.

2. 본론

2.1. 유전체 편집 시스템의 대표적 사례

CRISPR-Cas 시스템은 처음 발견된 이후로 상당한 수준의 다양성을 가진다는 것이 보고되었으며, 기초 생명과학 및 의학 분야에 적용 가능한 것에 대한 탐색이 빠르게 이루어지고 있다. 가장 널리 사용되는 것은 Cas9 단백질을 응용한 기술이지만, 다양한 방식으로 유전체를 편집하고 그 밖에도 추가적인 연구를 하기 위해서는 다양한 스펙트럼의 시스템이 요구된다. 여기서 대표적인 시스템들을 먼저 정리해 둔다 (그림 1).

2.1.1. CRISPR-Cas9

Cas9은 클래스 2 타입 II에 속하는 CRISPR 시스템으로 현재까지도 가장 널리 사용되고 있다. 특히, *Streptococcus pyogenes*에서 발견된 SpCas9이 원핵세포 밖에서 사용된 가장 첫 사례이며 포유동물 세포에도 빠르게 적용되었다 [6]. DNA 타겟을 인지하고 나서 SpCas9은 끝 부분이 평평한 DSB (이중 가닥 손상, double strand break)를 만든다. 이때 single guide RNA (sgRNA, crRNA와 transactivating RNA가 합쳐진 것)에 의해 타겟을 인지하는데 PAM 서열(Protospacer Adjacent Motif, NGG의 형태로 존재함)이 반드시 있어야 하기 때문에 약간이나마 제한이 생길 수밖에 없다. 그래서 directed evolution을 통해 다른 형태의 PAM을 인지할 수 있는 Cas9도 만들어졌다. 또한 Cas9의 특정한 부분에 돌연변이를 만들면 타겟 특이성이 향상되어 오프-타겟 효과가 줄어들었다. sgRNA의 이차 구조를 변형하여 온-타겟과의 결합을 향상시키기도 했으며, 이런 노력으로 초기 Cas9 보다 효율이 좋은 방식으로 개선이 이루어졌다 [7].

2.1.2. CRISPR-Cas12a

또다른 클래스 2 단백질은 Cas12a이며 Cpf1으로도 알려졌다 [8]. Cas12a는 타입 V에 속하는데, 타겟 사이트에 5' 오버행을 만들어 끝 부분이 어긋난 형태로 DNA를 절단한다. 따라서 평평한 말단을 만드는 Cas9과 달리 정확한 방향으로 원하는 DNA 서열을 삽입하는데 장점이 있다. 또한 Cas12a는 crRNA array를 절단하여 자신만의 crRNA를 생성할 수 있다. 즉, 하나의 맞춤형 crRNA array를 사용하여 쉽게 다양한 타겟에 대한 효과를 얻을 수 있다.

2.1.3. Cascade 와 Cas3

클래스 1의 타입 1 시스템은 자연상에 가장 널리 존재하는 CRISPR-Cas 시스템이며, DNA를 타겟팅하는 복합체인 캐스케이드(Cascade)와 endonuclease 인 Cas3로 이루어져 있다 [9]. 캐스케이드는 PAM 서열에 대한 비교적 자유로운 결합으로 인해 상당히 유연하게 타겟에 결합할 수 있다. Cas3은 타겟 DNA에 단일 가닥 손상을 형성하고, 그 이후에 3'에서 5' 방향으로 exonuclease 활성을 통해 서열을 제거한다. 이러한 활성을 조절하여 특정한 박테리아에 넣어주었을 경우, 원하는 박테리아만 선택적으로 사멸시킴으로써 항-박테리아 기능을 가질 수 있음이 보고되었다. 이런 방식으로 원하는 박테리아만 선택적으로 죽이는 것은 기존의 항생제에서는 불가능한 일이었기 때문에 스마트한 항생제로의 적용 가능성이 주목되고 있는 이유이기도 하다.

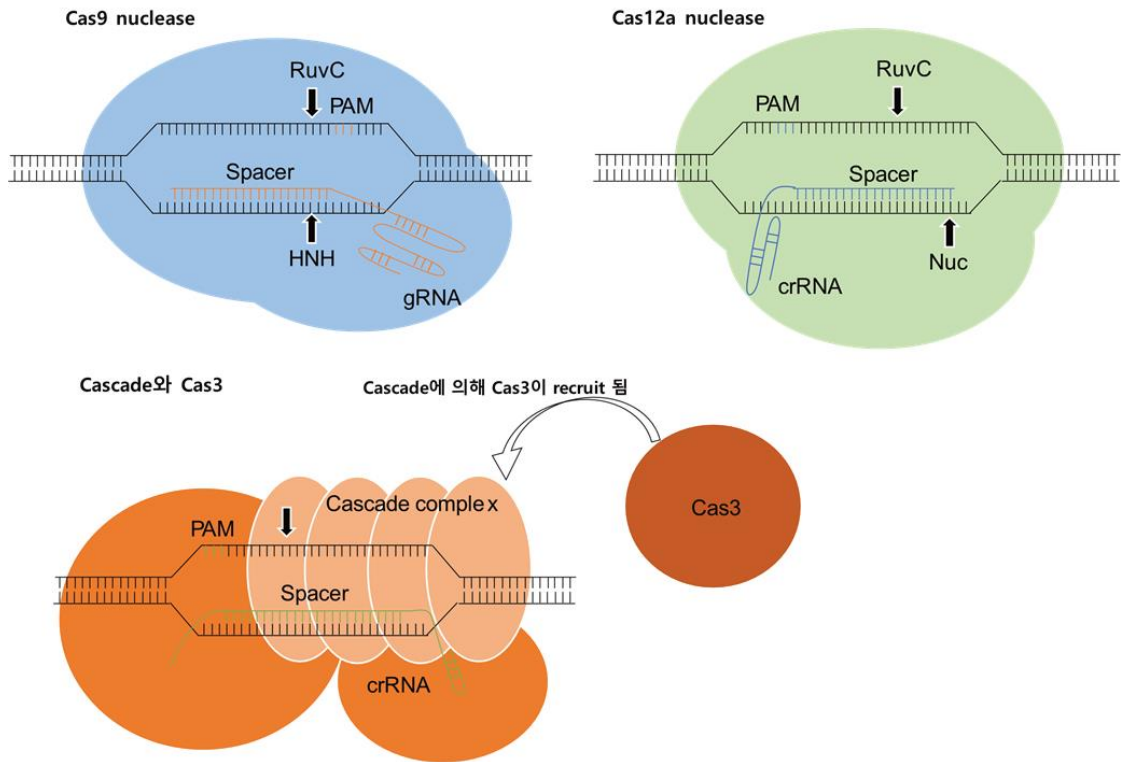


그림 1. 핵심적인 CRISPR-Cas 유전체 편집 도구들.

Cas9 단백질은 RNA의 가이드에 의해 타겟에 대한 선택성을 가진다. 가이드 RNA (gRNA)의 스페이서(spacer) 부분이 타겟 DNA의 Protospacer Adjacent Motif (PAM) 근처에 결합하면 Cas9 단백질에 의해 평평한 끝 부분을 가지는 DSB가 생성된다. Cas12a는 기본적으로 Cas9과 유사하게 타겟을 인식하지만, 어긋난 말단의 형태로 DSB를 생성한다. 캐스케이드는 다양한 단백질을 포함하는 복합체이며 타겟 DNA를 인식한 후에 Cas3 단백질을 데리고 와서 단일 가닥에 nick을 생성한다. 그 이후 3'에서 5' 방향으로 타겟 DNA의 분해가 추가적으로 진행된다.

2.2. 유전체 편집의 작동 기전과 사용 방식

유전체 편집의 기본적인 작동 방식은 nuclease가 선택적인 DNA 손상을 만들고 DDR (DNA 손상 반응, DNA damage response)로 이어진다. 그러면 다양한 복구 기전이 활성화되는데 크게 나누면 상동성을 가지는 서열끼리의 재조합에 기반하는 HDR (상동성 기반 복구, homology directed repair)과 서열의 상동성과는 상관없이 두 말단을 연결해 버리는 NHEJ (비상동성 말단 결합, non-homologous end joining)로 나누어진다 [10]. 이러한 복구 기전들을 잘 이용함으로써 전략적으로 유전체 편집을 수행할 수 있다 (그림 2).

2.2.1. NHEJ와 HDR

진핵생물은 기본적으로 DSB를 오류가 발생하기 쉬운 NHEJ로 처리하는데, 결과적으로 작은 삽입이나 결손이 발생한다. 만약 타겟 사이트에 상동의 서열을 가지는 회복용 템플릿(repair template)을 Cas9과 함께 넣어주었을 경우, 오류가 없는 HDR이 활성화될 수 있는데 기본적인 발생 빈도는 NHEJ에 비해 낮다. NHEJ는 특정한 유전자를 삭제해서 knock-out 시키는데 유용하고 HDR은 점 돌연변이나 긴 서열을 삽입하는 등 원하는 형태의 변화를 타겟에 만들어낼 수 있다. HDR의 효율을 증가시키는 것은 유전체 편집을 정확한 형태로 구현하기 위해 필수적인 과제 중 하나이다 [11].

2.2.2. 유전자 삭제

Cas9이 DNA에 손상을 만든 이후에 NHEJ가 작동하면 유전자를 knock-out시킬 수 있다. 엑손 영역에 삽입이나 결손이 발생하면 틀 이동(frameshift) 돌연변이가 발생할 수 있고 이는 대개 종결 코돈이 너무 일찍 생성되어 유전자의 기능을 망가뜨리는 결과를 가져온다. 또는 한 유전자의 두 영역을 타겟팅함으로써 두 군데에 손상이 발생하고 가운데 조각이 빠진 채로 DNA가 이어지게 되면 상당히 큰 결손을 유발할 수도 있다 [12].

2.2.3. 유전자 삽입

항원결정기(epitope) 태그나 형광 단백질을 코딩하는 서열을 원하는 유전자에 삽입함으로써 특정 유전자의 기능을 자연스러운 세포 내 환경에서 연구할 수 있다 [13]. 대개 삽입하고자 하는 서열이 포함된 DNA를 제공자(donor) 템플릿이나 회복 템플릿 등으로 부르는데, 이러한 템플릿 양쪽에 타겟 사이트에 대한 homology를 가지는 서열을 달아줌으로써 HDR에 의한 정확한 방향성의 복구 기전이 작동되도록 한다. 심지어 단일 가닥의 DNA (single strand DNA, ssDNA)를 합성해서 HDR을 일으킬 수도 있기 때문에 경우에 따라서는 긴 클로닝 과정 없이 합성한 단일 가닥 DNA template를 사용할 수도 있다. 최근에 HDR에 기반한 CORRECT (코렉트, consecutive reguide or re-Cas steps to erase CRISPR-Cas-blocked targets)라는 기법이 개발되었는데, 질병과 연관된 다양한 돌연변이를 한 번에 knock-in 할 수 있다 [14]. 회복 템플릿에 미리 돌연변이를 만들어 Cas9에 의해 타겟 사이트가 다시 잘리지 않도록 하는 것이 대부분이다. 현재 마우스뿐만 아니라 인간 배아 줄기 세포 등에 다양한 방식으로 유전자 삽입이 적용되고 있다 [15].

2.2.4. 단일 염기 편집

인간의 질병과 가장 연관이 큰 유전적 변이는 점 돌연변이이다. 따라서 단일한 염기 수준에서 유전체를 조절할 수 있는 기술이 유전적 질병 모델을 만들고 치료법을 개발하는데 필수적이다. 앞서 언급한 대로 회복 템플릿을 함께 넣어줌으로써 HDR 기반의 복구를 통해 원하는 점 돌연변이를 만들거나 없앨 수 있다. 그러나, 이러한 방식은 분열을 하지 않는 세포의 경우 HDR 효율이 감소해 있기 때문에 성공적인 결과를 만들어낼 확률이 낮다. 또한, DSB의 생성이 선행되어야 하기 때문에 오프 타겟에서 돌연변이를 만들어낼 위험을 안고 있다.

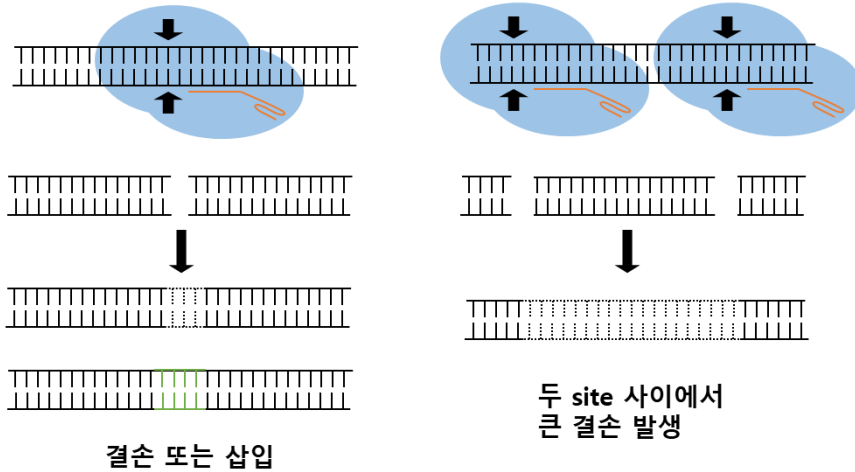
이런 점을 극복하기 위해 최근에는 Cas9 nickase나 효소 작용이 망가진 dCas9 (catalytically deficient Cas9)을 이용해서 DSB를 만들지 않고 단일 염기를 편집할 수 있는 방법이 개발되고 있다 [16, 17]. Cas9 nickase나 dCas9은 시티딘 아민제거효소(cytidine deaminase)에 결합되어 사용되는데, 스페이서 서열 내부의 5bp 범위에서 C>T (또는 G>A)의 변화를 만들 수 있다. 세포 내의 복구 기전이 Cas9에 의한 변화를 되돌릴 수 있는데, 이를 막기 위해 UGI (우라실 글리코실레이즈 억제자, uracyl glycosylase inhibitor)를 사용하여 원래의 형태로 복구되는 것을 막아주기도 한다. 최근에 개발된 cytidine deaminase-dCas9-UGI가 한번에 들어가 있는 시스템의 경우 포유동물 세포에서 15~75%의 효율로 영구적인 염기 변화를 만들었다 [18]. 이 시스템은 생쥐 배아, 제브라 피쉬 배아, 임신 중인 생쥐 태아, 인간 배아 세포에까지 적용되어 활성이 검증되었다 [19].

이후에 지속적인 업그레이드를 통해 단일 염기 편집 기술이 발전했고 편집 효율, 염기를 편집할 수 있는 타겟 범위, 편집할 수 있는 돌연변이의 종류 등이 향상되었다. 그럼에도 단일 염기 편집의 한계 중 하나는, 세포 내 자연스러운 변화에 의해서도 점 돌연변이가 생길 수 있다는 변수와 시퀀싱 과정에서 발생하는 오류 때문에 정확히 원하는 방향으로 변화한 것인지 확인하기 어렵다는 것이다. 또한, Cas9과 DNA가 상호작용하지 않는 오프-타겟에서도 염기가 변화한 사례가 관찰되어 정확한 편집을 위한 기술 개발이 요구되고 있다.

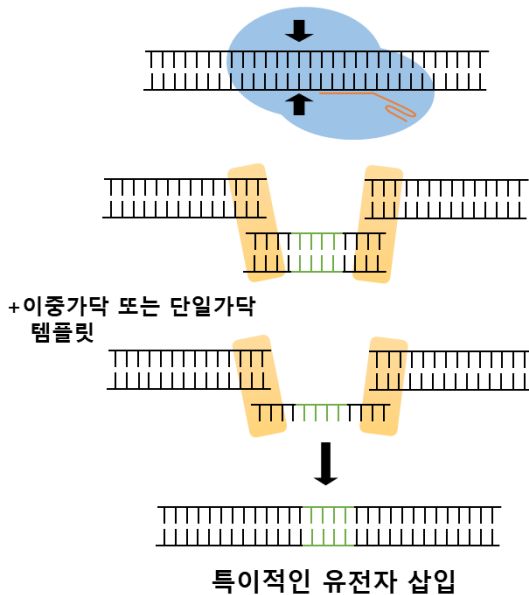
2.2.5. 하이 쓰루풋(high throughput) 스크리닝

RNA 간섭(RNA interference)은 포유동물 세포에서 대량의 유전자의 기능을 조절하고 역할을 이해하는데 핵심적인 도구이다. 그러나 유전자의 기능을 완전히 억제하는 것이 아니라는 점이 한계로 작용한다. 이를 극복하기 위해 Cas9 기반의 knock-out 스크리닝이 도입되었다. 대량으로 gRNA 라이브러리를 비교적 간편하게 만들 수 있고, 렌티바이러스를 이용해 세포에 쉽게 도입할 수 있다는 장점 덕분에 생쥐 세포와 인간 세포를 대상으로 하는 knock-out 스크리닝이 가능하게 되었다 [20]. 심지어 single-cell RNA 시퀀싱이 가능해지면서 개별 세포 수준에서 knock-out에 의한 유전자 네트워크의 변화까지 관찰 가능하게 되었다. 암 발생을 모델링하는 생쥐 세포에서 여러 가지 새로운 유전자의 기능이 밝혀지기도 했다 [21]. 합성 치사(synthetic lethal) 표현형을 보이는 유전자 쌍에 대한 동시 knock-out을 통해 새로운 drug를 찾을 가능성도 보고되었다.

NHEJ에 의한 복구



HDR에 의한 복구



단일 염기 편집

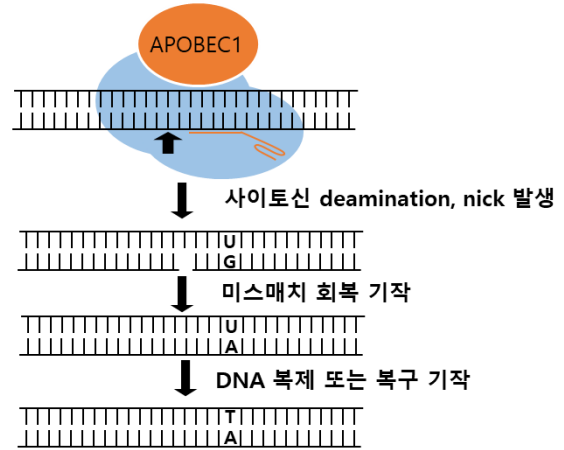


그림 2. 유전체 편집 전략.

Nuclease에 의해 발생한 DSB는 크게 두 가지 방식으로 회복된다. NHEJ (비상동성 말단 결합, non-homologous end joining) 의 경우는 오류에 취약하고 작은 결손이나 삽입이 발생하기 쉽다. 만약 타겟 영역에 두 개의 DSB를 유도하고 NHEJ에 의해 회복되면 상당히 커다란 결손을 발생할 수도 있다. HDR (상동성 기반 복구, homology directed repair)의 경우에는 이중 가닥이나 단일 가닥의 템플릿을 추가하여 넣어주는데, 이들 템플릿은 DSB가 발생한 타겟 주변의 서열과 상동성(노란색 박스로 표시됨)을 가지도록 디자인된다. 상동 서열끼리 DNA 재조합이 일어나면 오류 없이 템플릿이 삽입됨으로써 원하는 방향으로 유전체를 편집할 수 있다. 단일 염기 편집 방법에서는 Cas9 nickase가 주로 사용되며, 다양한 효소들이 결합한 형태로 사용된다. 예시는 사이토신의

아민기를 제거할 수 있는 APOBEC 효소이며, 일련의 반응에 따라 결과적으로 C에서 T로의 점 돌연변이가 발생한다. 염기 편집의 효율을 증가시키기 위해, 세포 내의 염기 제거 회복 기전(base excision repair)을 막을 수 있는 처리를 함께 시행하기도 한다.

2.3. RNA를 조절하는 CRISPR-Cas

CRISPR-Cas 시스템은 DNA를 조절하는 데는 탁월했지만 RNA를 조절하는 것은 힘든 일이었다. RNA 간섭이나 역방향 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide)를 사용해서 유전자의 발현을 억제할 수 있지만, 빠르고 대량으로 원하는 변화를 만들어 내기에는 충분치 않았다. 그러나 최근에는 CRISPR-Cas 기술이 발전하며 특정한 RNA 또한 세포 내에서 조절하기에 이르렀다.

2.3.1. RCas9

Cas9은 ssDNA에 결합하는 PAM-presenting oligonucleotide (PAMmer)를 함께 제공함으로써 ssDNA도 절단할 수 있다 [22]. 비슷한 방식으로 PAMmer를 사용하여 Cas9이 ssRNA를 자르도록 조작할 수도 있다. DNA는 건드리지 않고 RNA만을 자르기 위해서는, PAMmer가 DNA의 PAM을 포함하지 않는 RNA 부분을 타겟팅하도록 해야 한다. 이처럼 RNA를 타겟팅하는 Cas9을 RCas9으로 부르며, gRNA 및 타겟에 상보적인 PAMmer를 디자인하기만 하면 되는 간편함을 가지고 있다. RCas9은 RNA를 인지하는 단백질로 사용되어 특정한 태그를 부착시킬 필요 없이 세포 내의 RNA를 검출하고 관찰할 수 있다. 또한 ssRNA를 절단하는 데에도 사용될 수 있는데, 이는 DNA 서열은 변화시키지 않는다는 점에서 엄청난 장점을 가진다 [23]. DNA를 직접 조작할 경우 오프-타겟에 영구적인 변화를 일으킬 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 그러나 RCas9은 독성이 있거나 위험한 RNA를 전사 이후에 제거하게 되므로 유전체에 영구적인 변형을 가한다는 부담을 갖지 않는다. 실제로 미세부수체 반복서열 확장(microsatellite-repeat expansion)에 의한 질병에 관여하는 RNA를 RCas9으로 제거한 사례가 존재한다 [24]. 다만 환자 세포를 *ex vivo*에서 처리하여 해당 RNA를 제거했기 때문에 *in vivo*에서의 효율이 어떨지는 미지수다. RCas9의 문제점은 지속적으로 생산되는 RNA를 계속해서 제거해주어야 한다는 점인데, AAV (아데노 연관 바이러스, Adeno-associated virus)를 통해 장기적으로 특정 유전자를 발현시키는 기술과 결합하여 해결이 어느 정도 가능할 것으로 보인다.

2.3.2. Cas13

CRISPR-Cas 시스템 중에 자연적으로 RNA를 인지하여 자를 수 있는 것이 최근에 발견되었다. 박테리아에서 "C2c2" 라고 알려진 Cas13이 그것이다 [25]. Cas13은 클래스 2, 타입 VI CRISPR 단백질인데, ssRNA 타겟을 인지하여 활성화된다. *Leptotrichia wadei*에서 발견된 Cas13a와 *Prevotella* sp. P5-125에서 발견된 Cas13b가 대표적이며, 이 둘은 PAM과 같은 특정 모티프를 필요로 하지 않는다. Rcas9과 유사하게 효소 기능이 망가진 dCas13a의 경우 세포에서 특정 RNA를

시각화하는데 사용될 수도 있다. Cas13a의 흥미로운 점은 타겟 RNA에 결합한 후, 주변의 uracil 염기를 마구 자른다는 점인데, 이로 인해 타겟팅 되지 않은 RNA도 잘릴 수 있다. 이런 특성을 역이용하여, 특정한 바이러스 RNA를 검출하는 데 사용되기도 했다. 이 기술은 SHERLOCK (설펑, specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)으로 이름 붙여졌다 [26].

RNA에 대해서도 단일 염기 편집 기술이 개발되었는데, dCas13을 adenosine deaminase에 결합시킨 것이다. 이 시스템은 REPAIR (리페어, RNA Editing for Programmable A to I Replacement)로 불리며, 진핵 세포에서 아데노신을 이노신(번역이나 스플라이싱 과정에서 기능적으로 guanine과 동일하게 취급됨)으로 바꿀 수 있다 [27]. dCas13을 다양한 단백질에 결합시킴으로써 RNA 편집이나 시각화가 적용 가능한 분야가 점차 확장되고 있다.

2.4. CRISPR-Cas에 의한 유전자 조절

DNA에 손상을 생성함으로써 유전체를 편집하는 것 이외에도 Cas9의 DNA 인지 능력만을 이용하여 특정 유전자 특이적인 조절을 하는 것도 가능하다. Cas9의 nuclease 도메인에 몇 가지 점 돌연변이를 생성함으로써 RNA에 의해 가이드 되는 DNA 인지 능력은 유지한 채 nuclease 활성만을 제거할 수 있다. 이러한 dCas9을 전사 억제자, 활성화자, 후생유전학적 조절자, 형광 단백질 등 다양한 이펙터 단백질에 연결하여 여러 가지 기능을 수행하도록 할 수 있다 (그림3).

2.4.1. CRISPR 간섭(interference)

dCas9이 DNA에 결합하는 것만으로 RNA 중합 효소를 물리적으로 방해함으로써 전사 억제 효과가 발생한다 [28]. dCas9에 의한 입체적인 전사 억제를 CRISPR 간섭이라고 하는데 원핵세포에서는 효율이 좋은 반면, 진핵세포에서는 덜 효율적이다. 진핵세포에서 억제 효과를 높이기 위해 dCas9은 전사 억제 도메인을 연결시켰는데 대표적인 것이 자연적인 zinc finger 전사 인자에서 많이 발견되는 KRAB (크루펠 관련 박스, Kruppel-associated box)이다 [29]. KRAB은 헤테로크로마틴을 생성하는 도메인이며, 그로 인해 dCas9-KRAB이 결합한 영역 주변의 전사를 억제할 수 있다. dCas9-KRAB은 포유동물 세포에서도 프로모터 지역이나 5' UTR (비 번역 지역, untranslated region), 인핸서 등을 타겟팅 함으로써 단일 유전자뿐만 아니라 non-coding RNA까지 억제할 수 있다.

2.4.2. CRISPR 활성화(activation)

dCas9을 반대로 전사 활성화 단백질에 결합함으로써 CRISPR 활성화로 불리는 방식으로 사용하는 것도 가능하다. 진핵세포에서 nuclear factor- κ B의 서브 유닛인 p65나 VP64 등의 전사 활성화 단백질에 연결된 dCas9을 사용하여 리포터 유전자나 세포 내의 유전자를 활성화했다 [29]. 프로모터 지역에 여러 개의 gRNA가 결합하도록 해서 시너지를 일으킬 수도 있다. 또한, 서로 다른 활성화 도메인을 동시에 사용해서 시너지를 낼 수도 있다. 세포 내의 유전자 여러 개를 동시에 활성화해서 세포의 리프로그래밍을 유발하기도 한다. 일차 생쥐 배아 섬유아세포(primary mouse embryonic fibroblast)에서 세포 계보 특이적인 전사인자들을 VP64-dCas9-VP64를 통해 활성화

시켰을 때 신경 세포로 직접 변화시키는 것이 가능했다 [30]. 비슷한 방식으로 특정 세포가 전분화능(pluripotency)을 가지거나 근육을 만드는 세포로 바뀌도록 하는 경우도 보고되었다 [31].

2.4.3. 후생유전학적 편집

dCas9을 기반으로 한 기술로 특정한 후생 유전학적 변형, 즉 히스톤이나 DNA의 아세틸레이션, 메틸레이션 등을 만들어낼 수 있다 [32]. 대표적으로 dCas9을 인간 히스톤 아세틸화효소인 p300에 연결하여 특정한 프로모터나 인핸서를 타겟팅하도록 하면 H3K27의 아세틸레이션을 통해 강한 유전자 활성화를 일으킬 수 있다. dCas9을 methylcytosine dioxygenase인 TET1에 연결하여 DNA demethylation을 일으키기도 한다. 치료 목적으로 적용된 사례는 fragile X 신드롬에 연관되어 있는 FMR1 유전자 억제제를 완화시키기 위해 5' UTR의 CGG-확장 돌연변이를 dCas9-TET1을 통해 demethylation 시킨 경우가 있다 [33]. 주목할 만한 점은 FMR1 유전자가 후생유전학적으로 편집된 세포를 생쥐 뇌에 이식했을 때도 유전자 발현이 유지되었다는 것이다. 유전 가능한 전사 억제를 위해서는 dCas9-KRAB이 DNA methyltransferase와 함께 사용된다.

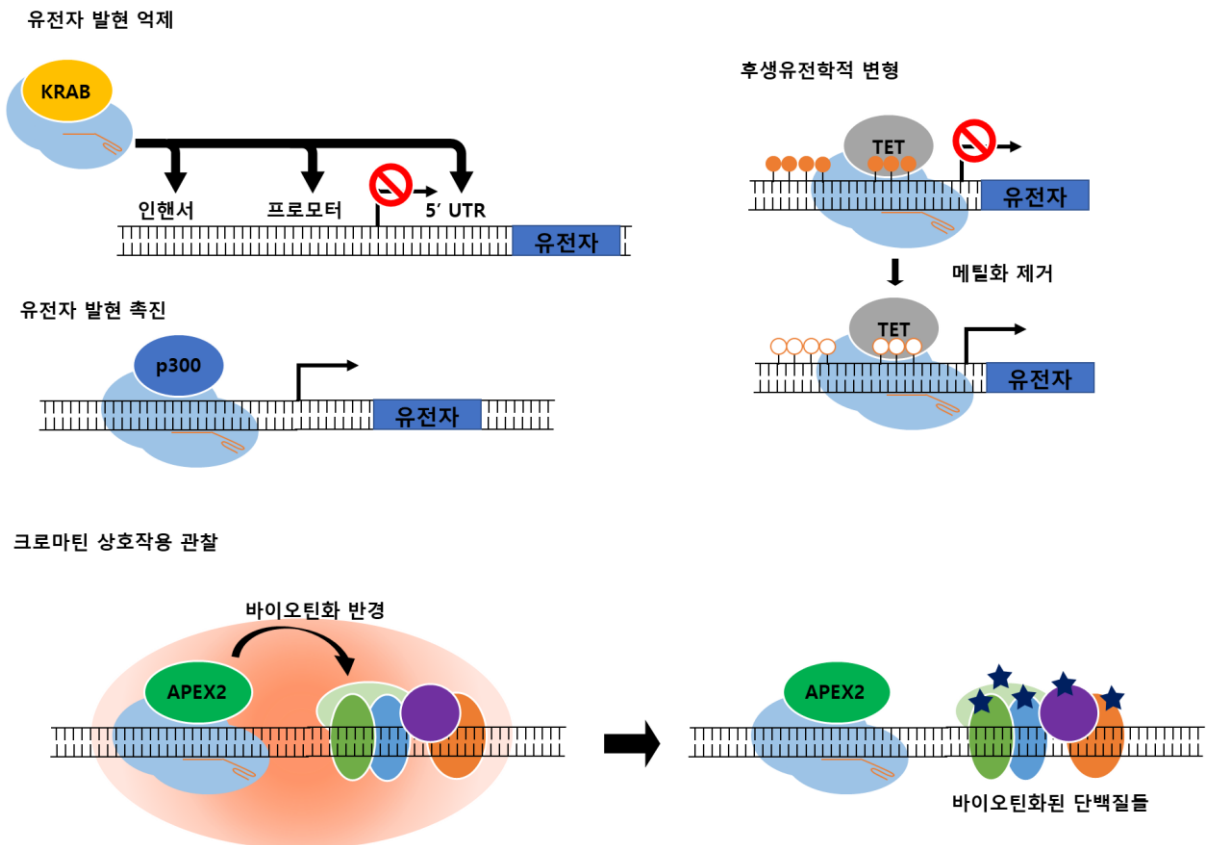


그림 3. dCas9을 이용한 유전자 조절 방법 및 기타 적용 사례.

전사를 억제하기 위해 dCas9 (활성이 없는 Cas9, catalytically deficient Cas9)을 다양한 이펙터 단백질에 결합시켜 사용한다. 예시는 KRAB (크루펠 관련 박스, Kruppel-associated box)이라는 단백질이며 프로모터를 포함한 다양한 영역과 상호작용하여 후생유전학적인 전사 억제 기능을

수행할 수 있다. 유전자의 활성을 증가시킬 경우에는 히스톤 아세틸화효소인 p300, 전사 활성자인 VP64 등이 주로 사용된다. dCas9이 methylcytosine dioxygenase인 TET1과 결합하면 과도한 메틸레이션에 의해 억제되어 있는 유전자의 메틸화를 제거하게 되고, 유전자의 발현을 증가시킬 수 있다. CRISPR-Cas9으로 크로마틴의 상호작용을 관찰할 수도 있다. Peroxidase인 APEX2 효소를 이용하면 dCas9이 타겟팅 되는 주변을 바이오틴화시킬 수 있다. 예시에서는 단백질이 바이오틴화되었으며 해당 단백질들을 당겨내어 질량 분석을 수행하면 타겟팅 된 영역에 결합하는 단백질 목록을 얻을 수 있다. 목적에 따라서는 상호작용하는 DNA, RNA에 대해서도 동일한 접근이 가능하다.

2.5. Cas9 기능을 조절하는 방법들

유도 가능 시스템은 유전자 활성화를 위해 특정한 자극을 필요로 한다. 사용되는 자극에 따라 다양한 inducible Cas9 시스템을 설계할 수 있고, 특정한 유전자를 시공간적으로 조절할 수 있게 된다.

2.5.1. 화학적인 유도(chemical induction)

화학 물질을 이용하여 Cas9을 발현시킬 때는 주로 유도 가능한 프로모터를 사용한다. 이러한 기법은 특정한 세포 종류에서 정확히 원하는 타이밍에 유전자를 knock-out 시킬 때 사용된다. 독시사이클린(doxycycline)에 의해 유도되는 Cas9 발현이 인간 만능 줄기 세포와 성체 생쥐에 적용되었다 [34, 35]. 그러나 독시사이클린에 독립적인 돌연변이 발생이 관찰되면서, 약간의 Cas9이 발현될 수 있다는 위험성이 보고되었다.

유도성의 dCas9을 사용하여 후생유전학적인 변형을 만든 사례도 있다. 독시사이클린으로 유도되는 CRISPR 간섭을 이용해 효율적이며 조절 가능하고 가역적인 질병 모델링이 가능해졌다. 앞서 언급한 독시사이클린 독립적인 유전자 발현을 막기 위해 dCas9 단백질을 쪼개서 발현시킨 사례도 있다. dCas9 활성화 시스템을 절반씩 쪼개고 화학적으로 유도되게 하면 독시사이클린 존재 하에서만 온전한 dCas9이 생산될 수 있다 [36]. 물론 이 방법으로 전적으로 미세한 유전자 발현을 막을 수 있는 것은 아니지만 상당한 진전을 보았고, 좀 더 정확한 타이밍 조절이 가능해졌다.

2.5.2. 광유전학(optogenetics)

빛에 의해 유도되는 dCas9 시스템을 사용하여 시간적인 조절 뿐만 아니라 공간적인 조절도 가능해졌다 [37]. 대표적인 사례로는 식물에서 얻어진 CRY2라는 단백질이 있는데, 이 단백질은 빛을 쬐어주었을 때 결합 파트너인 CIB1과 결합한다. 이러한 성질을 이용하여 빛에 의해 활성화되는 dCas9-p65와 dCas9-VP64가 설계되었다. 또한 split-단백질 시스템과 함께 사용되어 여러 사례에서 유전자의 정확한 조절이 가능하다는 것이 보고되었다. 대표적으로 유도 만능 줄기 세포에서 특정한 유전자를 광유전학적으로 활성화시켜 신경 세포로 분화시켰다. 좀 더 복잡한 경우는, 여러 종류의

화학적 유도 기법과 광유전학 기법을 동시에 사용하여 다양한 유전자의 발현을 동시에 조절한 것이다 [38]. 이런 식으로 시공간적인 조절이 가능하며 가역적이라는 특성 덕분에 광유전학적 기법을 이용한 조절 시스템은 앞으로도 널리 사용될 것이다.

2.6. 기타 dCas9이 적용된 사례들

CRISPR-dCas9의 가능성은 유전자의 발현을 조절하는 것을 훨씬 뛰어넘는다. 여기에 소개되는 내용들은 다른 방법론으로는 접근하기 힘들었던 부분에 대한 것들이다.

2.6.1. Non-coding 영역에 주석 달기(annotation)

CRISPR 간섭이나 CRISPR 활성화를 사용해서 non-coding 영역의 기능을 하이-쓰루풋으로 확인하기 위한 시도가 이어지고 있다 [39]. 후생유전학적인 편집을 통해 DNA에 돌연변이를 만들지 않고 상위의 조절 영역을 변형해보는 접근이다. 이렇게 유전자의 발현을 조절할 것으로 예상되는 영역에 대해 후생유전학적인 조절을 할 수도 있고, non-coding RNA가 생산된다고 알려진 영역을 타겟팅함으로써 그들의 기능을 확인할 수도 있다. 특히 non-coding RNA는 약간의 삽입이나 결손이 있더라도 기능에 큰 차이를 보이지 않는 경우가 있어서 dCas9을 이용한 후생유전학적 변형이 효과적일 것으로 예상된다.

2.6.2. 크로마틴의 상호작용 관찰

크로마틴의 구조는 유전체의 기능에 상당한 영향을 미치는데, 세부적인 조절을 통해 정확히 인과관계를 규명하는 방법론은 마땅치 않았다. 대체로 특정한 크로마틴 영역에 결합하는 단백질을 중심으로 연구가 진행되는데, dCas9에 특정한 태그를 부착 시켜 원하는 영역을 타겟팅 하도록 한 후, 면역침강(immunoprecipitation)을 통해 dCas9이 결합한 영역을 전반적으로 당겨낼 수 있다. 그리고 당겨진 복합체들에 포함되어 있는 단백질을 분석함으로써 특정 영역에 위치하며 상호작용하고 있는 단백질들의 목록을 얻을 수 있다. 이런 방법론을 enChIP (엔칩, engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation)이라고 부른다 [40]. 또는 dCas9을 변형된 과산화효소인 APEX 2에 결합시켜 사용하기도 하는데, APEX2 는 특이성을 가지지 않고 주변의 단백질들에 바이오틴 분자를 결합시킨다 [41]. 그러면 바이오틴에 대한 면역 침강을 이용하여 enChIP과 유사하게 타겟팅된 영역 주변의 단백질을 알 수 있게 된다.

유전자의 발현은 근접하거나 멀리 떨어진 크로마틴 사이의 상호작용에 의해 조절되기도 한다. 이러한 크로마틴 상호작용을 직접적으로 조절하는 데에도 dCas9 시스템이 사용된다. CLOuD9 (클라우드 나인, Chromatin loop-range chromatin interaction)이라고 불리는 이 기법은 화학적으로 유도되는데, 선택적이고 가역적으로 크로마틴 loop을 형성하여 주변 유전자의 발현을 조절할 수 있다 [42]. 또는 광유전학적으로 크로마틴 loop을 형성시켜 좀 더 빠른 시간 내에 유사한 효과를 얻을 수도 있다. CRISPR 간섭을 이용하여 loop이 형성되는 영역의 헤테로크로마틴화를 유발함으로써

크로마틴 loop의 형성을 방해하여 유전자 발현을 조절한 경우도 있다. 이러한 방법론들에 의한 결과가 축적되면 크로마틴의 상호작용에 의해 조절되는 유전자 발현의 변화에 대한 더 깊은 이해를 얻을 수 있을 것이다.

2.6.3. 특정 영역 이미징하기

특정한 DNA 서열을 이미징하는 것은 유전체의 공간적인 구조를 연구하는 데 큰 도움을 준다. 형광 핵산 혼성화(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) 기법이 널리 사용되었는데, 세포를 고정시켜야 할 뿐만 아니라 잘 작동하는 probe 디자인에 신경을 써야 한다. 살아있는 세포에서 이미징하기 위하여 형광단백질에 결합된 dCas9을 사용할 수 있다 [43]. 실제로 단백질을 지정하는 유전자뿐만 아니라 단순 반복 서열에 대한 이미징이 가능하다. 심지어 수백 종류의 gRNA를 동시에 사용하여 인간 염색체 전체를 시각화하는 것도 가능하다. 현재 다양한 형광 단백질을 사용하거나, 형광 단백질과 결합하는 gRNA의 능력을 조절하여 다양한 영역을 한 번에 이미징하는 기술들이 더욱 개선되고 있다.

2.7. 의학 분야에서의 CRISPR 시스템의 적용 가능성 탐색

2.7.1. 전 임상에서 유전자 치료

CRISPR에 기반한 유전체/ 후생유전체 편집 기술은 외부의 유전자를 도입하여 치료하는 초기 유전자 치료에서 벗어나 인간 유전체를 직접 편집할 수 있는 가능성을 열었다. 가장 단순하면서 강력한 치료 방법은 질병의 원인이 되는 돌연변이를 직접적으로 교정하는 것이다. 아데노바이러스를 사용하여 SpCas9을 전달하여 쥐의 콜레스테롤 항상성 유전자를 타겟팅 하도록 만들어 LDL (저밀도 지질 단백질, low-density lipoprotein) 콜레스테롤을 감소시킨 사례가 있다 [44]. 전임상 단계에서 체세포의 유전체 편집 기술의 적용 가능성을 탐색하기 위해, 인간의 간세포를 쥐에 이식한 후 인간 유전자를 타겟팅 하는 연구까지 진행되었다 [45]. 직접적인 편집뿐만 아니라 dCas9-KRAB을 사용하여 후생유전학적으로 동일한 유전자를 억제하기도 했다.

망막색소변성증(retinitis pigmentosa)와 같은 시력 상실에 연관된 안구의 질병을 치료하기 위해서 유전체 편집을 시도하는 경우도 많다 [46]. Cas9으로 Nr1 유전자에 삽입 또는 결손을 만들어, 망막이 파괴되는 생쥐 모델에서 원추세포의 광수용기의 기능을 유지해 준다는 보고가 있다. 또한 Cas9을 통해 1.9kb의 서열을 삽입 시켜 Mertk 유전자의 기능을 쥐 모델에서 회복시켜줌으로써 망막색소변성증을 완화하기도 했다. 이러한 케이스는 모두 AAV를 이용하여 눈에 직접 치료 유전자를 전달했다.

현재까지 AAV는 높은 효율과 안정성, 그리고 다양한 조직에 대한 타겟팅으로 인해 가장 널리 사용되는 유전자 치료 전달법이다. AAV를 이용하여 골격근이나 심장 근육에 유전자를 전달할 수도 있다. DMD (뒤센형 근육 이상증, Duchenne muscular dystrophy)라는 신경근육성 질병을

치료하기 위해 AAV를 이용한 Cas9 전달이 시도되었고 효과를 보고 있다 [47]. 이 질병의 경우 디스트로핀(dystrophin)이라는 유전자에 결손이 생겨 틀 이동 돌연변이가 생기는 경우가 많은데, 추가적인 결손을 도입하여 프레임을 맞춰주어 부분적으로나마 정상적인 기능을 회복시켜 주어 효과를 보았다. DSB가 생길 때의 문제점을 막기 위해, 단일 염기 편집법을 적용시키는 방향도 연구되고 있다.

바이러스를 이용한 전달 방법뿐만 아니라 지질성의 나노입자를 사용하는 기법도 연구되고 있다 [48]. 최근에 지질 나노입자로 SpCas9의 mRNA와 Ttr 유전자에 대한 gRNA를 생쥐에 주입하여 치료 효과를 내기 위해 필요한 정도의 유전체 편집과 유전자 조절 능력이 검증되었다. 이처럼 바이러스에 독립적이고 일시적인 방식의 전달 기술을 사용함으로써 면역 체계의 활성을 피하고 DNA 벡터가 유전체에 직접 삽입될 가능성을 피할 수 있다. 세포 내로의 전달 효율, 실제로 유전체가 편집되는 효율, 안정성 등을 종합적으로 고려하여 치료 목적에 적합한 전달 방식을 선택하는 것도 중요한 문제가 될 것이다.

2.7.2. 임상으로의 확장

가장 임상적으로 진보된 형태의 유전체 편집 전략은 환자에게서 얻어진 세포를 치료 효과를 낼 수 있는 방향으로 실험적으로 조작한 후, 다시 세포의 제공자에게 투여하는 것이다. 특히 자가조직의 T 세포를 조작하여 사용하는 입양 T 세포 면역치료(adoptive T cell immunotherapy) 방식이 개발되었다 [49]. 조금 자세하게는, 바이러스 벡터로부터 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, 특정한 항원을 인식하도록 조작된 T 세포의 수용체)를 과발현시키는 것이 아니라 프로그래밍 가능한 키메라 항원 수용체를 코딩하는 유전자를 세포 내의 'T 세포 수용체- α 일정 유전자'에 삽입함으로써, 과도한 자극에 의해 T 세포가 소모되는 것을 막는 동시에 세포 내의 T 세포의 수용체가 환자 자신의 세포를 공격하는 것을 막았다. 유전체 편집의 또 다른 중요한 적용 사례는, 인간 백혈구의 항원 시스템 중 일부를 knock-out 하여 universal cell donor (세포를 받아들이는 사람의 면역계에 의해 인지되지 않도록 조작된 세포)를 만든 것이다 [50]. Universal cell donor는 환자 맞춤형의 세포 치료를 시도할 때 실용적이며 경제적인 방법론이 될 수 있다.

2.8. CRISPR-Cas을 적용하고 있는 사례들

2.8.1. 비만

비만은 전 세계적으로 5억 명 이상에 영향을 미치고 있고, 심혈관계 질환, 암, 당뇨병과도 연관이 높다 [51]. 비만은 기본적으로 에너지의 축적이 소비보다 더 많은 상태이고 지질이 지방 세포에 축적됨으로써 발현된다. 한 연구에 따르면 fat mass and obesity-associated (FTO) 유전자의 변형이 발견되었는데, 이 유전자가 몸무게가 증가하는 원인 중 하나일 가능성이 있다. 연구진은

CRISPR-Cas을 이용해서 FTO 유전자를 생쥐 모델에서 편집했고, 에너지가 축적되는 방향이 아닌 사용되는 방향으로 유전자 스위치를 조절할 수 있었다 [52]. 비슷한 방식으로 여러 연구에서 세포의 에너지 대사 과정에 관여하는 유전자의 편집을 통해 비만에 대한 유전자 치료의 가능성을 넓히고 있다.

2.8.2. 암

암은 기본적으로, 축적되는 유전적, 후생유전적 돌연변이에 의해 발현되는 유전적 질병이라고 여겨진다. 암 세포 내에는 복잡한 전위, 돌연변이 등을 포함하여 다양한 유전적 변형이 일어나 있을 가능성이 높다 [53]. 초기에는 CRISPR-Cas 시스템이 암 발생에 관여되어 있는 돌연변이나 치료 타겟을 찾아내는 탐지 역할을 맡았다. 그런 연구에 기반하여 CRISPR-Cas은 암의 특성 자체를 조절하기 위해 oncogene을 knock-out 하거나 편집할 수 있다.

인간의 A549 adenocarcinoma의 CD38을 CRISPR-Cas을 통해 knock-out하여 암 세포의 부착 능력을 감소시키고, 생쥐 모델에 이식하였을 때 생존율이 감소하는 결과가 있다 [54]. CRISPR-Cas를 통해 만들어진 방광암 모델에서 'MPT0L145' 라는 유전자가 PIK3C3와 FGFR 기전에 대한 이중 억제자라는 사실이 발견되었고 이를 통해 새로운 치료 타겟을 발견한 셈이 되기도 했다 [55]. 비슷한 접근을 하고 있는 연구들이 전-종양유전자(proto-oncogene)을 knock-out 하는데 집중하여 암을 치료하고자 시도하고 있다. 종양유전자(oncogene)에서 기능획득(gain-of-function) 돌연변이를 교정하는 것뿐만 아니라 종양 억제 유전자의 기능상실(loss-of-function) 돌연변이를 조절하는 것도 암의 치료에서 중요하다.

CAR-T (키메라 항원 수용체 T 세포, Chimeric antigen receptor engineered T cell) 를 이용한 치료법은 가장 강력하고 주목받고 있는 세포 치료법이다 [56]. CRISPR-Cas9 시스템은 간단하면서도 효율적으로 CAR-T 세포를 조절할 수 있는 방법을 제공했다. CRISPR-Cas9로 편집한 CAR-T 세포는 증가한 T 세포의 기능을 보였고, 세포 면역치료에서도 증가한 효율을 보였다 [57, 58]. 대표적으로 CD19에 특이적인 키메라 항원 수용체를 CRISPR-Cas9를 이용해 TRAC 위치에 넣었고, 일반적인 CAR-T 세포에 비해 높은 기능을 보였다.

또한, 최근에는 'programmed cell death protein 1'을 타겟팅 해서 T 세포가 암 세포를 인지하는 것을 막는 신호 전달 과정을 억제하기도 했다 [59]. 자기 유래 T 세포가 꺼내어진 후, Cas9을 이용해 PD1 유전자를 knock-out하고 T 세포 수용체의 α 와 β 체인이 암 환자에게 다시 주입된 사례가 미국과 유럽에서 최초로 환자에게 유전체 편집이 적용된 사례이다.

2.8.3. 당뇨병

당뇨는 증가한 혈당에 의한 만성적인 대사 질환이고, 혈관, 눈, 심장, 신경, 신장을 포함하여 다양한 조직에 악영향을 미친다. 전 세계적으로는 해마다 4억 명 이상이 당뇨병을 겪고 있고 백만 명 이상이 사망한다. CRISPR-Cas9은 glucagon-like peptide-1 (GLP-1)같은 호르몬의 유전자를 편집하여 치료 효과를 기대할 수 있다. GLP-1은 인슐린의 분비를 촉진하고 혈당량을 낮춘다. 실제로 유형 1의 당뇨병에 대한 치료 효과가 널리 연구되고 있다. Ptpn22 유전자가 망가진 쥐 모델은

인슐린에 대한 autoantibody가 증가해 있고 유형 1 당뇨병에 취약하다. CRISPR 시스템으로 FOS/JUN 경로를 억제했을 때 당뇨병 생쥐 모델에서 상당한 치료 효과를 보았다 [60].

2.8.4. 바이러스 감염

애초에 CRISPR-Cas9 시스템이 박테리아의 후천 면역 시스템으로써 발견된 만큼, 감염성 바이러스에 대한 치료 효과를 기대할 수 있다. 다른 방식으로는 처리하기 힘든 바이러스 감염에 대해, 바이러스 유전체를 직접 분해하는 방식으로 접근 가능하다. 특히 hepatitis B 바이러스(HBV), Epstein-Barr 바이러스(EBV), human papilloma 바이러스(HPV) 등은 암 발생과도 깊은 연관이 있다. 그중에서도 HBV는 만성적으로 감염된 2억 5천만 명 이상이 존재하는 바이러스이다 [61]. HBV에 의한 간세포 암종(hepatocellular carcinoma)은 질병으로 인한 죽음에서 상당히 높은 순위를 차지한다. CRISPR-Cas9을 이용해서 HBV가 감염된 Huh-7 세포에서 HBV 유전체를 분해하도록 하면, HBV의 core 단백질과 표면 단백질의 발현이 상당히 감소했다 [62].

High risk HPV는 자궁경부암과 다양한 머리와 목 부위 암 발생을 일으킬 수 있다. 현재 HPV를 해결하기 위한 CRISPR-Cas9 기술로는, HPV-16이나 HPV-17에 감염된 세포의 E6/E7 유전자를 불활성화하여 세포 주기를 arrest 시키고 세포 죽음에 이르도록 하는 방식이 있다 [63].

마지막으로 잠재적인 치료 효과를 기대하는 분야는 HIV (인간 면역결핍 바이러스, human immunodeficiency virus)에 대한 치료이다. HIV의 DNA는 숙주의 유전체로 역전사를 통해 끼어들어 감으로써 바이러스 단백질을 지속적으로 생산하는데, 이것이 HIV를 근절하는 데 가장 중요한 지점이다. HARRT (능동적인 항바이러스 치료, Highly active antiretroviral therapy)라는 방식이 현재 HIV의 복제를 막기 위한 일차적인 처치이고 에이즈를 관리 가능한 질병의 수준으로 만들었다. 그러나 HAART는 근본적으로 HIV를 제거할 수는 없기 때문에 실질적인 원인을 제거할 수 있는 것은 아니다 [64]. 최초의 CRISPR/Cas 적용 사례에서는 gRNA가 HIV의 LTR (긴말단반복서열, long terminal repeat)을 타겟팅 하도록 해서 HIV 프로바이러스의 발현을 막고 치료 가능성을 보았다 [65]. 그 이후로 HIV의 핵심적인 coreceptor인 CCR5가 주요한 타겟으로 주목받았고, CCR5에 동형의 돌연변이를 가지는 줄기 세포를 에이즈 환자에 이식함으로써 HIV가 검출되는 정도를 확연히 감소시켰다.

2.9. 한계점과 잠재적인 해결 방법들

정확하고 선택적으로 원하는 편집을 만들 수만 있다면 CRISPR-Cas 시스템은 임상 분야에서 엄청난 성과를 낼 테지만, 아직까지는 극복되어야 할 한계가 많다.

(1) AAV는 유전자 치료에서 가장 널리 사용되는 전달 시스템이지만, 유전 정보를 포장하는 능력에 한계가 있다(~4.7kb 정도까지만 포장이 가능하다). 이를 극복하기 위해 더 작은 Cas9을 찾으려는 노력이 있었고 대표적으로 *Staphylococcus aureus*와 *Campylobacter jejuni*에서 발견된 Cas9이 있다. 포장 능력과는 별개로, AAV 벡터에 의한 Cas9의 발현이 계속 지속적으로 일어난다는 점과 벡터의

내용물이 유전체 내로 삽입된다는 점은 여전히 남아있는 문제이다 [65]. 따라서, *in vivo* 유전자 치료에 있어서는 hit-and-run 방식으로 Cas9 유전자 대신 단백질을 주입하거나, Cas9 mRNA를 바이러스가 아닌 시스템으로 전달하는 것이 유용할 수 있다. 이렇게 일시적인 발현을 통하면 아래에서 설명할 오프-타겟 효과를 줄이는 데도 상당히 기여할 수 있다. 마지막으로 AAV의 각 조직에 대한 접근성도 문제이다. 대표적으로 AAV는 간, 근육, 뇌, 안구 세포에만 특이적으로 잘 들어가는 경향이 있다 [66]. 이는 AAV를 직접 엔지니어링 하여 극복 가능할 수 있다. AAV의 캡시드에 human epidermal growth factor receptor 2에 대한 리간드를 포함시켜 AAV가 암 세포에 대해 20배 이상 잘 들어가도록 만든 사례가 있다.

(2) 오프-타겟 효과는 가장 오래도록 도마에 오를 문제점이다. gRNA를 선택하고 최적화하는 과정을 통해 최대한 오프-타겟 효과를 줄이려는 시도가 이어지고는 있다. 앞서 설명한 Cas9 nickase를 활용하는 것이 중요한 방향일 수 있다. VIVO (비보, verification of *in vivo* off-targets)라는 방법론은 CIRCLE-seq (서클 시퀀싱, cleavage effects by sequencing)이라는 시퀀싱 기법과 결합되어 오프-타겟을 찾기 위한 스크리닝에 적용되고 있다 [67]. 다양한 측면에서 잠재적인 오프-타겟을 검출하고, 의도하지 않은 유전체의 변화가 생성되는 과정을 이해하기 위한 노력이 필요하다.

(3) Cas 단백질의 면역 반응도 임상 적용에 중요한 문제점이다. 숙주의 면역 반응은 치료 효과를 떨어뜨리고 부작용을 일으킬 수 있으므로 최소화되거나 피해야 한다 [68]. 생쥐 모델에 Cas9을 전달하였을 때 발생하는 면역 반응에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만, 치료 목적으로 적용되었을 때의 정확한 영향은 불분명한 점이 있다. 최근에는 인간 혈액 샘플에서 *S. pyogenes*와 *S. aureus* Cas9에 대한 후천 면역이 확인되기도 했다 [69]. 바이러스에 의해 전달된 Cas9이 세포 내에서 발현할 때 만약 처리된 세포가 디스플레이한 Cas9 펩타이드에 의해 T 세포의 반응이 활성화된다면 문제가 상당할 수 있다. 인간의 경우 *S. pyogenes*와 *S. aureus*에 대한 노출이 빈번하기 때문에 더욱 새로운 형태의 Cas9을 찾는 것이 필요할 수도 있다. 또 다른 접근으로는 Cas 단백질의 항원결정기를 엔지니어링 할 수도 있고, Cas9이 처리되는 동안 일시적으로 면역억제제를 처리하는 방법도 있다. 나노입자나 지질 기반의 벡터를 이용해서 벡터를 전달함으로써 바이러스 벡터의 면역 반응을 극복할 수도 있다. Cas9 단백질을 인간화된 형태로 변형(humanize)시키는 것도 면역 반응을 최소화하는데 유효한 접근이다.

(4) CRISPR-Cas 시스템에 의한 유전체 편집이 종양 억제 유전자인 p53이 기능을 잃은 세포에서 효율이 좋다는 보고가 있다. 이는 세포 내의 DDR을 총괄하는 p53의 기능과 연관이 있을 수 있다 [70].

(5) HDR에 의한 유전자 편집의 효율이 중요하다. NHEJ에 의한 유전자 삭제나 불활성화 같은 변형보다는, HDR에 의한 정확하고 예상 가능한 방식의 유전자 편집이 훨씬 더 효용성이 크다. 그러나 HDR에 의한 회복에는 회복 템플릿이 필요하고, 분열을 하지 않는 세포에서는 HDR의 효율이 크게 떨어진다는 문제점이 있다. 따라서, HDR의 효율을 높이는 것이 유전자 치료에서 중요한 문제이다 [71]. 현재 단일 가닥의 DNA 템플릿을 사용하는 것, NHEJ 기전을 억제하는 것, DSB 사이트와 회복 템플릿의 유사성을 증가시키는 것 등 다양한 방식으로 HDR의 효율을 증가시키는 방법이 시도되고 있다. 연관된 문제로는 환자마다 가지고 있는 유전자의 돌연변이 형태가 다를 수 있기 때문에 그에 대한 맞춤형 회복 템플릿을 제조해야 한다는 점이다.

(6) 유전자가 편집된 세포의 적응도 문제도 중요하다. CRISPR-Cas 시스템에 의해 편집된 세포는 아무래도 적응도에 변화가 있을 가능성이 있고, 결과적으로 유전자 치료의 효율과 지속성에도 영향을 미칠 수 있다 [72]. 만약 편집된 세포가 성장에서 이점을 얻는다면 질병 표현형을 극복하기

위해 필요한 세포의 수는 적을 것이고 치료 효과도 쉽게 나타날 것이다. 생쥐 모델에서 타이로신 혈증을 고치기 위해 간 세포의 0.25%가 편집되었는데, 33일 후에는 교정된 세포의 비율이 33.5%에 도달 했고 질병의 표현형을 극복하기에 충분했다. 반대로 유전체 편집이 세포의 적응도를 감소시킨다면 상황이 힘들 수 있다. 대표적으로 암 세포에 유전자 편집을 한다면, 편집되지 않은 암 세포가 높은 적응도에 기반하여 편집된 세포를 경쟁에서 쉽게 이길 확률이 높다. 따라서 치료 효과를 얻기 위해서는 반복적으로 편집을 시도해야 함과 동시에 상당히 높은 편집 효율이 요구될 것이다. 이런 문제는 현재의 CRISPR-Cas기술로서는 극복하기에 상당히 높은 장애물이다.

3. 결론

CRISPR-Cas 시스템을 변형하여 진핵세포에서 사용 가능하게 된 것은 유전 공학 분야 전반에 있어서 커다란 혁명이었다. 가장 널리 사용되는 Cas9 시스템에 그치지 않고 다양한 형태의 편집 방법을 찾으려던 노력에 의해 RNA 분자까지도 조절하는 수준에 이르렀다. 심지어 아직도 발견되지 않은 방법들이 많이 있을 수 있고, 현재 발견된 Cas와 dCas 단백질에 어떤 이펙터 단백질을 덧붙이느냐에 따라 새로운 도구가 여전히 등장할 가능성이 높다.

gRNA 라이브러리를 제작하는 것의 쉬움과 차세대 염기 분석법의 발전으로 유전체 전반적으로 유전적, 후생유전적 스크리닝을 진행하는 것도 쉬워졌다. 이런 수준에서 연구를 진행하는 것은 생물학적인 기전을 이해하는 것과 더불어 치료 목적으로 사용될 새로운 타겟을 발견하는 데도 도움을 줄 것이다.

CRISPR-Cas에 기반한 치료법이 임상적 테스트를 거치고 있는 만큼 유전적 질병을 고치고 세포 치료를 진일보시킬 잠재력이 상당하다. 전임상 단계의 연구들은 유의미한 것들이 많은데 안정성과 효율에 있어서 더욱 세심한 관찰과 개선이 필요하다. 핵심적으로는 유전체에 가해질 오프-타겟 효과에 의한 변형을 검출할 수 있는 기술이 더욱 발전해야 할 것이고, 더 나아가서는 컨트롤할 수 있어야 실질적인 적용 단계에 이를 수 있을 것으로 전망된다. 유래 없는 잠재력을 가진 기술이 발견되고 개발되고 있는 만큼, 실질적인 유전자 치료 시대의 도래를 희망 가득한 마음으로 기다려 본다.

4. 참고문헌

- [1] **Danna K, Nathans D.** 1971. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Herpesvirus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 2913-7.
- [2] **Chandrasegaran S, Carroll D.** 2016. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *J Mol Biol* **428**: 963-89.
- [3] **Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, et al.** 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-12.
- [4] **Koonin EV, Makarova KS, Zhang F.** 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* **37**: 67-78.

- [5] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**: 1262-78.
- [6] Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, et al. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823-6.
- [7] Kocak DD, Josephs EA, Bhandarkar V, Adkar SS, et al. 2019. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nat Biotechnol* **37**: 657-66.
- [8] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, et al. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**: 759-71.
- [9] Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, Bultema JB, et al. 2011. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 529-36.
- [10] Wyman C, Kanaar R. 2006. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40**: 363-83.
- [11] Lin S, Stahl BT, Alla RK, Doudna JA. 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife* **3**: e04766.
- [12] Zhu S, Li W, Liu J, Chen CH, et al. 2016. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library. *Nat Biotechnol* **34**: 1279-86.
- [13] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, et al. 2016. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* **540**: 144-9.
- [14] Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, et al. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**: 910-8.
- [15] Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, et al. 2014. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* **159**: 440-55.
- [16] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, et al. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**: 420-4.
- [17] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, et al. 2016. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* **353**.
- [18] Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, et al. 2018. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol* **36**: 843-6.
- [19] Zuo E, Sun Y, Wei W, Yuan T, et al. 2019. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science* **364**: 289-92.
- [20] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, et al. 2014. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**: 84-7.
- [21] Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, et al. 2015. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* **160**: 1246-60.
- [22] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, et al. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* **507**: 62-7.
- [23] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, et al. 2014. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature* **516**: 263-6.
- [24] Batra R, Nelles DA, Pirie E, Blue SM, et al. 2017. Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell* **170**: 899-912.e10.

- [25] **Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, et al.** 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* **353**: aaf5573.
- [26] **Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, et al.** 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* **356**: 438-42.
- [27] **Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, et al.** 2017. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* **358**: 1019-27.
- [28] **Qi Lei S, Larson Matthew H, Gilbert Luke A, Doudna Jennifer A, et al.** 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* **152**: 1173-83.
- [29] **Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, et al.** 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* **154**: 442-51.
- [30] **Black JB, Adler AF, Wang HG, D'Ippolito AM, et al.** 2016. Targeted Epigenetic Remodeling of Endogenous Loci by CRISPR/Cas9-Based Transcriptional Activators Directly Converts Fibroblasts to Neuronal Cells. *Cell Stem Cell* **19**: 406-14.
- [31] **Liu P, Chen M, Liu Y, Qi LS, et al.** 2018. CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell* **22**: 252-61.e4.
- [32] **Thakore PI, Black JB, Hilton IB, Gersbach CA.** 2016. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods* **13**: 127-37.
- [33] **Liu XS, Wu H, Krzisch M, Wu X, et al.** 2018. Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell* **172**: 979-92.e6.
- [34] **Dow LE, Fisher J, O'Rourke KP, Muley A, et al.** 2015. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* **33**: 390-4.
- [35] **Chen Y, Cao J, Xiong M, Petersen AJ, et al.** 2015. Engineering Human Stem Cell Lines with Inducible Gene Knockout using CRISPR/Cas9. *Cell stem cell* **17**: 233-44.
- [36] **Bao Z, Jain S, Jaroenpuntaruk V, Zhao H.** 2017. Orthogonal Genetic Regulation in Human Cells Using Chemically Induced CRISPR/Cas9 Activators. *ACS Synth Biol* **6**: 686-93.
- [37] **Nihongaki Y, Yamamoto S, Kawano F, Suzuki H, et al.** 2015. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem Biol* **22**: 169-74.
- [38] **Gao Y, Xiong X, Wong S, Charles EJ, et al.** 2016. Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators. *Nature methods* **13**: 1043-9.
- [39] **Klann TS, Black JB, Chellappan M, Safi A, et al.** 2017. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol* **35**: 561-8.
- [40] **Fujita T, Fujii H.** 2013. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun* **439**: 132-6.
- [41] **Myers SA, Wright J, Peckner R, Kalish BT, et al.** 2018. Discovery of proteins associated with a predefined genomic locus via dCas9-APEX-mediated proximity labeling. *Nat Methods* **15**: 437-9.
- [42] **Morgan SL, Mariano NC, Bermudez A, Arruda NL, et al.** 2017. Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping. *Nat Commun* **8**: 15993.
- [43] **Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, et al.** 2013. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* **155**: 1479-91.

- [44] **Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, et al.** 2014. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res* **115**: 488-92.
- [45] **Wang X, Raghavan A, Chen T, Qiao L, et al.** 2016. CRISPR-Cas9 Targeting of PCSK9 in Human Hepatocytes In Vivo-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**: 783-6.
- [46] **Yu W, Mookherjee S, Chaitankar V, Hiriyan S, et al.** 2017. Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice. *Nature Communications* **8**: 14716.
- [47] **Young CS, Hicks MR, Ermolova NV, Nakano H, et al.** 2016. A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle Cells. *Cell Stem Cell* **18**: 533-40.
- [48] **Finn JD, Smith AR, Patel MC, Shaw L, et al.** 2018. A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep* **22**: 2227-35.
- [49] **Miller JF, Sadelain M.** 2015. The journey from discoveries in fundamental immunology to cancer immunotherapy. *Cancer Cell* **27**: 439-49.
- [50] **Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, et al.** 2017. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med* **9**.
- [51] **Garcia-Jimenez C, Gutierrez-Salmeron M, Chocarro-Calvo A, Garcia-Martinez JM, et al.** 2016. From obesity to diabetes and cancer: epidemiological links and role of therapies. *Br J Cancer* **114**: 716-22.
- [52] **Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, Quon G, et al.** 2015. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med* **373**: 895-907.
- [53] **Greer SU, Nadauld LD, Lau BT, Chen J, et al.** 2017. Linked read sequencing resolves complex genomic rearrangements in gastric cancer metastases. *Genome Med* **9**: 57.
- [54] **Bu X, Kato J, Hong JA, Merino MJ, et al.** 2018. CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* **39**: 242-51.
- [55] **Chen CH, Changou CA, Hsieh TH, Lee YC, et al.** 2018. Dual Inhibition of PIK3C3 and FGFR as a New Therapeutic Approach to Treat Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* **24**: 1176-89.
- [56] **Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, et al.** 2011. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* **3**: 95ra73.
- [57] **Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, et al.** 2017. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* **543**: 113-7.
- [58] **Liu X, Zhang Y, Cheng C, Cheng AW, et al.** 2017. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res* **27**: 154-7.
- [59] **Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, et al.** 2017. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* **8**: 17002-11.
- [60] **Lin X, Pelletier S, Gingras S, Rigaud S, et al.** 2016. CRISPR-Cas9-Mediated Modification of the NOD Mouse Genome With Ptpn22R619W Mutation Increases Autoimmune Diabetes. *Diabetes* **65**: 2134-8.
- [61] **Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, et al.** 2015. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* **386**: 1546-55.
- [62] **Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, et al.** 2014. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids* **3**: e186.

- [63] **Zhen S, Lu J-J, Wang L-J, Sun X-M, et al.** 2016. In Vitro and In Vivo Synergistic Therapeutic Effect of Cisplatin with Human Papillomavirus16 E6/E7 CRISPR/Cas9 on Cervical Cancer Cell Line. *Transl Oncol* **9**: 498-504.
- [64] **Zaccarelli M, Tozzi V, Lorenzini P, Trotta MP, et al.** 2005. Multiple drug class-wide resistance associated with poorer survival after treatment failure in a cohort of HIV-infected patients. *Aids* **19**: 1081-9.
- [65] **Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y.** 2013. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports* **3**: 2510.
- [66] **Samulski RJ, Muzyczka N.** 2014. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol* **1**: 427-51.
- [67] **Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J, Topkar VV, et al.** 2017. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nature methods* **14**: 607-14.
- [68] **Chew WL, Tabebordbar M, Cheng JK, Mali P, et al.** 2016. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat Methods* **13**: 868-74.
- [69] **Simhadri VL, McGill J, McMahon S, Wang J, et al.** 2018. Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population. *Mol Ther Methods Clin Dev* **10**: 105-12.
- [70] **Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, et al.** 2018. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine* **24**: 927-30.
- [71] **Aird EJ, Lovendahl KN, St Martin A, Harris RS, et al.** 2018. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol* **1**: 54.
- [72] **Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, et al.** 2014. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* **32**: 551-3.

The views and opinions expressed by its writers do not necessarily reflect those of the Biological Research Information Center.

성상현(2020). CRISPR/Cas9 기술을 이용한 질병 치료 동향. BRIC View 2020-T04
Available from <https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=3422> (Jan. 14, 2020)

Email: member@ibric.org