

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07981

研究課題名(和文) 先進的ゲノム編集技術を用いた難治性神経筋疾患に対する治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for refractory neuromuscular diseases using advanced genome editing technology

研究代表者

斉藤 史明(Saito, Fumiaki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：40286993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では未だ治療法のない難治性神経筋疾患に対する新たな治療法の確立を目指して、培養細胞を用いたゲノム編集治療の基礎的研究を行った。始めに筋強直性ジストロフィー患者由来細胞に対してDMPK遺伝子のCTGリピート配列に対するゲノム編集を行ったところ、疾患バイオマーカーであるRNA凝集体の減少を認めた。またプロモーター領域に対するCRISPR interference法を試みたところ、同様なRNA凝集体の減少を認めた。次にアルツハイマー病の原因と考えられるA β の減少を目指して、APP遺伝子に対するゲノム編集ならびにエピゲノム編集を行った。その結果いずれの方法においても培養上清中のA β は減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋強直性ジストロフィーの原因であるCTGリピートをゲノム編集で切除したりDMPK遺伝子の発現をCRISPR interference法で減少させる事により、同疾患の表現系を改善できることをin vitroの系で示した。またアルツハイマー病の原因であるA β をゲノム編集やエピゲノム編集で減少可能である事も示した。そして今後これらの技術を疾患治療へ応用するための基礎的なデータを蓄積する事ができた。特にゲノムを切断しないCRISPR interference法やエピゲノム編集は、通常のゲノム編集よりも安全性の高い方法として治療法の開発に向けて注目すべき技術であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, to establish novel therapeutic strategies for refractory neuromuscular diseases, we utilized advanced genome editing technologies and conducted a basic research using cultured cells. First, we tried to excise CTG repeat of DMPK gene by genome editing targeting the sequence and found a decrement of intranuclear RNA aggregates, which is a disease biomarker. In addition, CRISPR interference targeting the promoter region also exhibited similar improvement of the marker. Next, we performed genome editing and epigenome editing for APP gene, in order to reduce A β , which is thought to cause Alzheimer's disease. As a result, A β in the culture medium was decreased by both of these procedures.

研究分野：神経内科学

キーワード：ゲノム編集 エピゲノム編集 CRISPR/Cas9 筋強直性ジストロフィー アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

これまで原因が不明とされてきた神経変性疾患や遺伝性筋疾患の多くでその病態や遺伝子異常の詳細が明らかにされつつある。例えばアルツハイマー病 (以下 AD) においてはアミロイド前駆体タンパク (以下 APP) から β -secretase、 γ -secretase により A β が切り出され毒性を有する可溶性オリゴマーを経て不溶性の老人斑が形成されることが病初期の重要なカスケードとして明らかにされた。そして A の蓄積はその下流に位置するタウタンパクの異常リン酸化と神経細胞変性を惹起する。また多くの遺伝性疾患で様々な病原性変異が同定されてきたが、中でも目を引くのはリピート配列の伸長に基づく“リピート病”であろう。その代表的疾患である筋強直性ジストロフィー 1 型 (以下 DM1) では dystrophin myotonic protein kinase (以下 DMPK) 遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在する異常伸長 CTG リピートが mRNA に転写された後に核内に RNA 凝集体を形成する。そこにスプライシング調節因子 MBNL1 が吸着される結果正常な MBNL1 が枯渇し、RNA のスプライシング異常が生じることが原因と考えられている。

一方で 2012 年の CRISPR/Cas9 の登場以来ゲノム編集技術が飛躍的な進歩を遂げた。CRISPR/Cas9 は基本的にはゲノム上のターゲットとする部位 20 塩基に相補的な RNA (guide RNA) とヌクレアーゼである Cas9 により構成される。Guide RNA と Cas9 は複合体を形成し、guide RNA により導かれた Cas9 がゲノム上の特定の部位でゲノムを切断する。この際 guide RNA の配列は自由に設計し合成できるため、約 31 億塩基対あるヒトゲノム上の希望する特定の部位をピンポイントで切断できるのである。切断されたゲノムは自己修復機構により再度繋がるが、この際に数塩基のインデルが導入されるためフレームシフトが生じてタンパク質の産生が停止する。一方 guide RNA を 2 カ所に設定することにより、これらに挟まれた領域に欠失を導入することも可能である。さらにここから派生した様々な応用技術が開発されているが、疾患治療への応用という点ではゲノムを切断せずに特定の遺伝子発現を抑制する CRISPR interference 法 (以下 CRISPRi 法) やエピゲノム編集法が安全性の面では特に優れていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は CRISPR/Cas9 とそれに関連したこれら先進的ゲノム編集技術を用いて、これら難治性神経筋疾患に対する新規治療法開発のための基礎的研究を行う事である。対象疾患はタンパク異常凝集病である AD とリピート病である DM1 とする。AD は認知症の中でも圧倒的に高頻度の疾患で、全世界的に大きな社会問題となっている。また DM1 は成人発症の筋ジストロフィーの中で最も頻度が高い疾患である。これらの疾患に対して、各々の原因と考えられる遺伝子に対してゲノム編集を行う事で疾患治療に繋げる事が可能であるどうか検討を行った。具体的には、AD であれば APP から切り出される A を、そして DM1 であれば DMPK 遺伝子の CTG リピートを減少させる事を目指して、培養細胞の系を用いて各種ゲノム編集を行いその効果を解析した。一方で、将来的な臨床応用を考える際にはゲノム編集に起因する好ましくない効果、すなわちオフターゲット効果を十分に考慮する必要がある。本研究ではこの点に関してもバイアスのかからないゲノムワイドな手法を用いて検討を行った。これらのデータを蓄積することにより、これら疾患に対する治療法開発に向けた新たな一歩を踏み出すことができるものと考えられる。

3. 研究の方法

DM1 は DMPK 遺伝子の CTG リピートの異常伸長が原因である。そこでまず始めに DM1 患者由来の線維芽細胞を用いて CRISPR/Cas9 によりリピート配列をゲノムから切断することを試みた。すなわちリピート配列の 5' 側と 3' 側に guide RNA を設計することで 2 つの guide RNA に挟まれた領域に欠失を生じさせた。またオフターゲット効果の低減を狙いダブルニッキング法を用いて同様のアプローチでリピート配列の除去を試みた。さらに DMPK 遺伝子のプロモーター領域をターゲットにした CRISPRi 法により同遺伝子の転写を抑制することで、核内 RNA 凝集体の形成を低減する事ができるかどうかを RNA-FISH 法により検討した。一方、ゲノムワイドにオフターゲット効果を検証するために、high-throughput genome-wide translocation sequencing 法 (HTGTS 法) による解析を行った。

AD に対しては A の産生を抑制するために、HEK293 細胞を用いて APP 遺伝子に対するゲノム編集を行った。具体的な方法として、APP 遺伝子のエクソン 1 とプロモーター領域をターゲットとしたゲノム編集を行った。前者はインデルの導入によりフレームシフトが生じる事で、後者はプロモーターの配列が変化して転写因子の結合が阻害される事で APP の産生が低下し、A も減少するものと考えられる。さらに APP の転写抑制を狙いプロモーター領域をターゲットとしたエピゲノム編集を行った。本法ではプロモーターのシトシンがメチル化を受ける事で APP の転写が減少し、A の産生も抑制される事が期待される。これらの操作を行った後に培養上清中の A₁₋₄₀ と A₁₋₄₂ を ELISA 法により定量し比較検討を行った。

4. 研究成果

始めに DM1 に対して CRISPR/Cas9 の基本的な技術である Cas9 ヌクレアーゼを用いた方法と、Cas9 ニッカーゼを用いたダブルニッキング法を用いて、患者由来の線維芽細胞における DMPK 遺

伝子の CTG リピート配列の除去に関する比較検討を行った。後者は切断部位を 2 つの guide RNA を用いて規定するため、より配列特異性が高くオフターゲット効果の低減が期待される方法である。その結果両者の方法において CTG リピートを同程度に除去することが可能であることが PCR 方、サンガーシーケンス法により確認された。また核内における RNA 凝集体形成を RNA-FISH 法により観察したところ、いずれの方法においても凝集体形成が著しく抑制されることが明らかになった。ところがオフターゲット効果を HTGTS 法を用いて検討したところ、予想に反してダブルニッキング法においても通常の方法と同程度の特異的切断を認め、本法の安全面における優位性は確認できなかった。

上記の方法では複数の guide RNA を用いてリピート配列を挟む 2 カ所でゲノムを切断することが予想よりも高い頻度で非特異的切断を生じる原因である可能性が考えられた。そこで次に、ゲノム切断を伴わないより安全な CRISPRi 法を用いて RNA 凝集体の形成抑制を試みた。この結果予想通り *DMPK* の転写が抑制されることを定量的 PCR 法により確認した。さらに RNA-FISH 法で RNA 凝集体の形成を観察したところ、通常の CRISPR/Cas9 を用いる上記の方法と同程度に有意に凝集体形成が抑制されることが明らかになった (図 1)。安全性に優れる本法は将来的な治療法開発にあたり有望な方法になりうるものと考えられる。

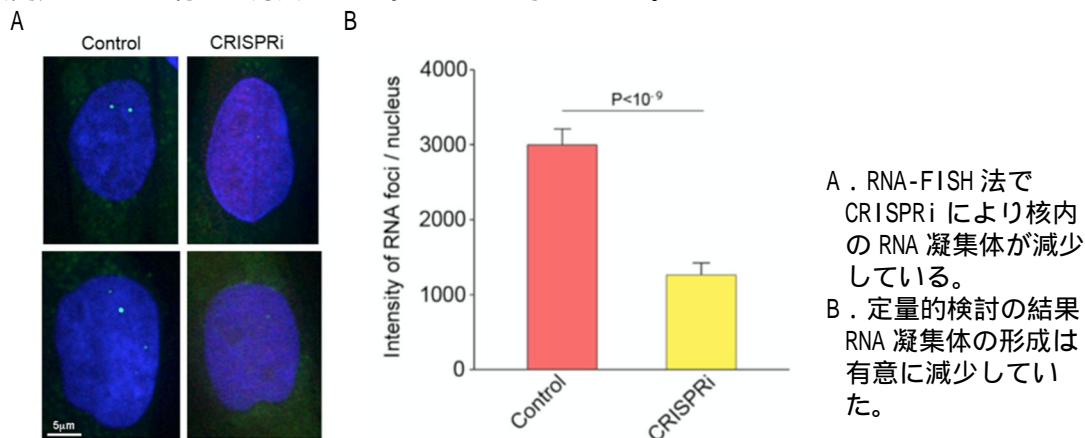


図 1

次に AD における原因の一端である $A\beta$ の産生を抑制するために、*APP* に対するゲノム編集を行った。まずは CRISPR/Cas9 により *APP* のエクソン 1 に対するゲノム編集を行った。サンガーシーケンスの結果、インデルの導入により多くのアリルでフレームシフトが生じている事を確認した。また定量的 RT-PCR で *APP* の mRNA が、またウエスタンブロットで *APP* タンパクが減少している事を示した。そして ELISA 法により培養上清中の $A\beta$ 1-40 と $A\beta$ 1-42 が有意に減少している事を明らかにした。一方 *APP* のプロモーターを標的としたゲノム編集によっても上記と同様の効果を認めた。さらにこれらゲノム編集の結果生じうるオフターゲット効果を *CEL1* ヌクレアーゼアッセイで検討したところ、明らかなオフターゲット効果は認められなかった。後者のプロモーター領域のゲノム編集は、エクソン 1 のゲノム編集と異なり *APP* のアミノ酸配列に変化を生じない事から、将来的な治療への応用を考慮する際により安全な方法と考えられる。

さらに *APP* のプロモーター領域を標的としたエピゲノム編集を行った。パイサルファイトシーケンスの結果、同領域にシトシンのメチル化が高頻度に生じている事が確認された。そして定量的 RT-PCR で *APP* の mRNA は減少している事を示した。そして ELISA 法により $A\beta$ 1-40 と $A\beta$ 1-42 は共に有意に減少している事を明らかにした (図 2)。本法は *APP* のアミノ酸配列に変化を生じず、さらにゲノムの切断も惹起しないことから、将来的な治療への応用にあたってさらに安全な方法と考えられた。

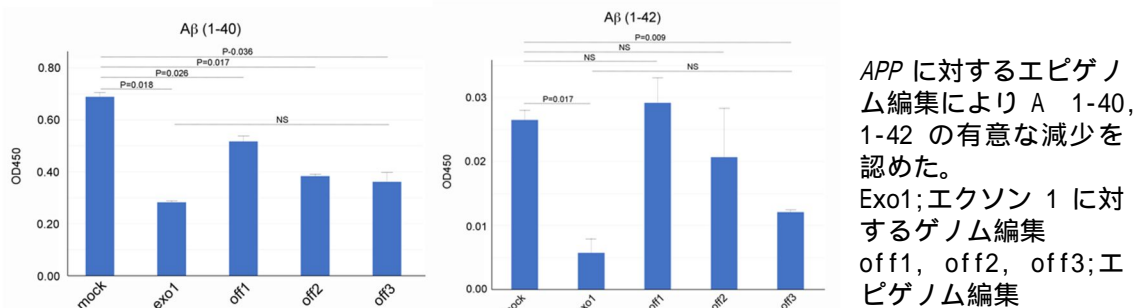


図 2

APP に対するエピゲノム編集により $A\beta$ 1-40, 1-42 の有意な減少を認めた。Exo1; エクソン 1 に対するゲノム編集 off1, off2, off3; エピゲノム編集

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda M, Taniguchi-Ikeda M, Kato T, Shinkai Y, Tanaka S, Hagiwara H, Sasaki N, Masaki T, Matsumura K, Sonoo M, Kurahashi H, Saito F.	4. 巻 18
2. 論文標題 Unexpected mutations by CRISPR-Cas9 CTG repeat excision in myotonic dystrophy and use of CRISPR interference as an alternative approach.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 131-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2020.05.024. eCollection 2020 Sep 11.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 田中園子, 池田美樹, 園生雅弘, 斉藤史明	4. 巻 45
2. 論文標題 アルツハイマー病に対する治療法開発のためのゲノム編集によるアミロイド の産生抑制	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 帝京医学雑誌	6. 最初と最後の頁 287-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 斉藤史明	4. 巻 45
2. 論文標題 先進的ゲノム編集技術を用いた難治性神経筋疾患に対する治療戦略	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 帝京医学雑誌	6. 最初と最後の頁 131-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中園子
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたアミロイド前駆体蛋白質の発現抑制に関する基礎的研究
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斉藤史明
2. 発表標題 CRISPR/Cas9による筋強直性ジストロフィーCTGリピート切除に伴う変異導入とCRISPR interference法の検討
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumiaki Saito, Miki Ikeda, Hiroki Hagiwara, Naomichi Sasaki, Toshihiro Masaki, Kiichiro Matsumura, Masahiro Sonoo
2. 発表標題 Reduction of mRNA aggregation in myotonic dystrophy by CRISPR interference.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤史明、池田美樹、池田真理子、加藤武馬、新海保子、田中園子、萩原宏毅、佐々木直)、真先敏弘、松村喜一郎、倉橋浩樹、園生雅弘
2. 発表標題 CRISPR/Cas9による筋強直性ジストロフィーのCTGリピート除去に伴う遺伝子変異とCRISPR interference法の有用性に関する検討.
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤史明
2. 発表標題 シンポジウム ゲノム編集技術が切り拓く神経内科学 CRISPR/Cas9を用いた筋強直性ジストロフィーに対する治療戦略
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉藤史明、田中園子、池田美樹、園生雅弘
2. 発表標題 APPのプロモーター領域に対する遺伝子編集によるアルツハイマー病治療のための基礎的研究
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会第37回日本老年精神医学会 合同開催
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中園子、池田美樹、松村喜一郎、園生雅弘、斉藤史明
2. 発表標題 アミロイド前駆体タンパクのプロモーターを標的としたCRISPR/Cas9によるゲノム編集 - アルツハイマー病への治療応用を目指して -
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会、第65回日本神経化学会大会、第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤史明、田中園子、池田美樹、園生雅弘
2. 発表標題 APPのプロモーター領域を標的としたアルツハイマー病治療のためのゲノム/エピゲノム編集
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第7回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sonoko Tanaka, Miki Ikeda, Kiichiro Matsumura, Masahiro Sonoo, Fumiaki Saito
2. 発表標題 Reduced A β production by CRISPR/Cas9 genome editing targeting the promoter of APP in cultured cells
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	真先 敏弘 (Masaki Toshihiro) (00585028)	帝京科学大学・医学教育センター・教授 (33501)	
研究 分担者	萩原 宏毅 (Hagiwara Hiroki) (80276732)	帝京科学大学・医療科学部・教授 (33501)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	池田 美樹 (Ikeda Miki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------