

平成 30 年 8 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14854

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を利用した薬剤の安全性評価モデル動物の開発とその応用

研究課題名(英文)Development of animal models for safety assessment of drugs using genome editing technology and its application

研究代表者

桑原 正貴 (KUWAHARA, MASAYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30205273

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):心電図における心室興奮の開始から終了するまでの時間に相当するQT間隔の延長は、ヒトの臨床において先天性および後天性QT延長症候群として注目されており、安全性薬理試験では薬物を開発する上での評価項目として重要視されている。本研究では心室筋における再分極を担うIKsチャネルをゲノム編集技術によりノックアウトして再分極予備力が低下したウサギのモデル動物を作製し、その有用性を明らかにすることを目的とした。ゲノム編集に数匹の変異個体が得られた。これらの動物について、IKrチャネル遮断薬のE-4031を麻酔下で投与し心電図におけるQT間隔に及ぼす影響を検討したが、顕著な延長を認めることができなかった。

研究成果の概要(英文):The prolongation of the QT interval corresponding to the time from the start to the end of ventricular excitation in the electrocardiogram has attracted attention as a congenital and acquired long QT syndrome in humans. It is considered important as an evaluation of QT prolongation in safety pharmacology. In this study, we aimed to clarify the usefulness of rabbit model animals whose knockout of IKs channel responsible for repolarization in the ventricular muscle by genomic editing technique and reduced repolarization reserve power. Several mutant individuals were obtained in genome editing. For these animals, we examined the effect of IKr channel blocker E-4031 under anesthesia and on the QT interval in the electrocardiogram, but no significant prolongation could be observed.

研究分野：獣医衛生学

キーワード：安全性薬理 ウサギ Kcnq1遺伝子 ゲノム編集技術 薬剤誘発性QT延長症候群

### 1. 研究開始当初の背景

心電図における心室興奮の開始から終了するまでの時間に相当する QT 間隔の延長は、ヒトの臨床において先天性および後天性 QT 延長症候群として注目されており、安全性薬理試験では薬物を開発する上での評価項目として重要視されている。しかしながら、従来の非臨床試験では、薬剤誘発性 QT 延長症候群(心電図 QT 間隔の延長による致死性の不整脈発症)の発生を予測することができなかった。そのため、不整脈誘発作用のある抗アレルギー薬のテルフェナジンや消化管機能調整薬のシサプリドなどが臨床の現場で患者に処方され、世界的に不整脈死が発生し大きな問題となった。このような事故を回避する目的で、日米欧医薬品規制調和国際会議は S7B および E14 ガイドラインを制定し非臨床試験の役割を明確に記載するに至った (The ICH Steering Committee, 2005. <http://www.ich.org/>)。特に QT 間隔を延長する医薬品の不整脈誘発リスクを直接評価できる催不整脈モデルの重要性を以下のように示している。「被検物質による心室再分極の遅延と催不整脈リスクとの正確な関係は不明である。不整脈モデルを用いて QT 間隔を延長する医薬品の催不整脈リスクを直接的に評価しようとするのは当然の試みであろう。催不整脈作用を表す指標および動物モデルは催不整脈性を評価するのに有用かもしれない。これらのモデルを開発し、ヒトでのリスク予測における有用性を検証することを強く勧める。」申請者は、各種動物における心筋の活動電位を構成するイオンチャネルの特徴と心臓の電気現象の関連性を明らかにし、QT 間隔延長の評価法や催不整脈モデルの作出を試みてきた。これらの研究を通してげっ歯類はこのチャネルの電流がほとんど無く、他の動物種において心室筋の再分極予備力を低下させたモデルを作出することの必要性が浮上した。国内においても、再分極予備力を低下させた房室ブロック犬モデルの作出は試みられてきたが、作出や維持に長期間を要することや検出力の点において限界も指摘されている。最近、ゲノム編集技術により ES 細胞が確立されておらず遺伝子改変が困難であったウサギ、ブタ、サルにおいてノックアウト動物の作製が報告されたことから、このゲノム編集技術を利用して再分極予備力が低下したモデル動物を作製するという着想に至った。

### 2. 研究の目的

薬剤の開発において、安全性評価の重要な項目として心電図 QT 間隔に及ぼす影響(薬剤誘発性 QT 延長症候群)が挙げられており、世界的なハーモナイゼーションとして検討しなければならない現況にある。

様々な動物種の特性を利用して評価することが非臨床試験で行われているが、より不整脈発症の危険性に対する検出力の高い評価方法が熱望されている。薬剤の IKr チャネル遮断作用による QT 間隔の延長は、心室筋の再分極予備力が低下した際により顕著に出現し、重篤な不整脈の発症に至ると考えられている。そこで、本研究では心室筋における再分極を担うもう1つのイオンチャネルである IKs をゲノム編集技術によりノックアウトして再分極予備力が低下したモデル動物を作製し、その有用性を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究では、ウサギを用いて心室筋における再分極過程を担うイオンチャネルの1つで遅延整流性カリウムチャネルの活性化が遅いタイプである IKs を、ゲノム編集技術(CRISPR-Cas9)により Cas9mRNA と sgRNA を受精卵に導入する方法でノックアウトして、再分極予備力を低下させたモデル動物を作製する。モデル動物としての有用性については、安静時における QT 間隔を中心とした心電学的特性を明らかにするとともに、薬剤の安全性試験で陽性対照とされている遅延整流性カリウムチャネルの活性化が速いタイプである IKr の遮断作用を有する薬剤を投与して、QT 間隔に及ぼす影響と催不整脈性について用量依存性と時間依存性の観点から検討を加える。モデル動物の開発段階においては、麻酔下の実験で薬剤の影響を評価するが、遺伝子レベルにおいてモデル動物として確立された段階では、テレメトリー法を利用した無麻酔・無拘束下における評価を実施する。

モデル動物の作製にゲノム編集の最新ツールとして注目されている、CRISPR/Cas9 システムを用いてウサギで IKs の責任遺伝子である KCNQ1 をノックアウトした動物の作製を行う。CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムでは、Cas9 タンパク質(DNA 切断酵素)と、ヒト U6 ポリメラーゼ III プロモーターで発現されたガイド RNA ベクターを共発現させ、特定の標的 DNA 配列を切断する。3'末端にプロトスペーサー近接モチーフ(PAM-配列 NGG)が存在すると、Cas9 が DNA 二本鎖を解離させ、ガイド RNA によってターゲット配列を認識して両方の鎖を切断することになる。

ノックアウト動物の作製に必要なコンストラクトの設計や作製に関しては、この分野で既に実績をあげている藤井渉先生(東京大学)に助言をもらい、実際に目的の RNA を受精卵に導入する実験においては、角田茂先生(東京大学)にこちらも指導して頂いた。本研究では、RNA 誘導型人工ヌクレアーゼである RGEN (RNA guided endonuclease) を採用する予定である。RGEN は、バクテリアの獲得免疫システム

である CRISPR/Cas システム由来で、ガイド RNA (gRNA : guide RNA) と Cas9 エンドヌクレアーゼ (タンパク質) の二つの異なる分子が、標的 DNA 配列の認識と DNA 二本鎖切断の働きをそれぞれ別々に担う特徴がある。従来型人工ヌクレアーゼに比べて RGEN は設計が比較的容易であり、複数箇所の同時ゲノム編集が容易に行える新たなゲノム編集法として注目されている。また、研究の効率を上げる意味では、RGEN を用いたゲノム編集に必要な gRNA を希望の標的遺伝子に対して設計し、ゲノム編集目的に応じ Cas9 および gRNA 発現プラスミドベクター、合成 RNA およびタンパク質 (Cas9 エンドヌクレアーゼ) として作製して提供してもらえるサービスも行われていることから、このようなサービスの利用も考慮した

出産された動物に関しては、以下の心電学的検査を実施した。

心臓の電気現象に関して体表面から心電図記録を行い、基本的な測定項目の解析を実施する。中でも QT 間隔に関しては慎重に検討を行う。心電図記録と解析には現有の設備を使用する。さらに、再分極過程をより詳細に検討するために単相性活動電位と心電図の同時記録も行い、心筋活動電位持続時間と心電図 QT 間隔との関連性を測定する。

上記の記録解析を行うとともに、遺伝子のノックアウトが機能的にも反映されていることを確認する目的で、IKs の遮断薬として知られている chromanol 293B を投与し、QT 間隔に影響を及ぼす影響について検討を加える。その上で、薬剤誘発性 QT 延長症候群の陽性対照薬である IKr を遮断する薬剤 (E-4031, d-sotalol, dofetilide など) を投与して、QT 間隔に及ぼす影響と催不整脈性に関して実験を行う。麻酔下の実験において、これらの薬剤に対する時間依存性と用量依存性に関して詳細に検討を加える。

一方、QT 間隔の延長や催不整脈性のメカニズムを検討するために、心室における再分極過程の貫壁性のばらつきについて単極誘導心電図を心室筋から記録し、活動電位持続時間に相当すると考えられている Activation-Recovery interval を測定することにより調べた。

#### 4. 研究成果

ゲノム編集技術により IKs チャネルをノックアウトし心室の再分極予備力の低下が実証され、このモデル動物により薬剤による QT 間隔の延長と催不整脈作用の評価が可能になれば、創薬における安全性薬理試験の非臨床試験において有用なモデル動物になることは間違いない。本研究は国内外の諸研究の中でも重要な一翼を担うものであり、安全性薬理試験は獣医師が担う重要

な社会的領域でもあることから、その成果は学術的に非常に卓越したものとなるのみならず社会的貢献も多大なものとなることが期待された。また、本研究の成果は、薬剤開発における心電図 QT 間隔の評価を確立のみならず心疾患の病態解明へ向けて貴重な情報を提供する上でも有用であり意義深いことであると考えられた。

しかしながら、ゲノム編集技術を用いてウサギにおいても数匹の変異個体が得られたものの、心電図学的に安静時には顕著な変化は認められなかった。そして、これらの動物について、IKr チャネル遮断薬の E-4031 を麻酔下で投与し心電図における QT 間隔に及ぼす影響を検討したが、顕著な延長を認めることができず、TdP といった不整脈も誘発されなかった。導入された変異がチャネル機能に大きな影響を及ぼすものではなかったものと想定された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
桑原正貴 (KUWAHARA, MASAYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科 (農学

部)・教授

研究者番号：30205273

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )