

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18330

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いたin vivoゲノム編集による遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel gene therapy method via CRISPR/Cas9 mediated in vivo genome editing

研究代表者

今野 歩 (Konno, Ayumu)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40509048

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CRISPR/Cas9システムを介した遺伝子ノックアウトを、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた脳内への高効率な遺伝子導入により実施することにより、脊髄小脳失調症1型の新規遺伝子治療法の開発を目指した。化膿連鎖球菌由来のSpCas9や黄色ブドウ球菌由来のSaCas9を検討したが、疾患モデルマウスにおいて治療効果を確認することはできなかった。現在、この原因がCas9の低発現や遺伝子ノックアウトの効率の低さにあると考え、種々の効率化を目指しさらなる検討を重ねている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a novel gene therapy method for spinocerebellar ataxia type 1 with CRISPR/Cas9 mediated in vivo genome editing using a gene delivery by adeno-associated virus vector. Although we examined SpCas9 and SaCas9 for in vivo knockout, we could not observe the amelioration of an ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. Further investigations for higher efficiencies of a gene expression and/or a gene editing are needed.

研究分野：神経科学

キーワード：遺伝子治療 アデノ随伴ウイルスベクター CRISPR/Cas9 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

遺伝性脊髄小脳失調症 (SCA) は、進行性の運動失調を呈する特定疾患であり、有効な治療法はない。研究代表者の所属研究室では、以前から SCA に関する様々な研究を実施していた。特に、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を得意とし、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療研究を実施してきた (Torashima et al., EMBO Reports 2008; Saida et al., Gene Therapy 2014 等)。また、近年はレンチウイルスと比較して、広い範囲に強力な遺伝子導入が可能であるアデノ随伴ウイルス血清型 9 (AAV9) による発現系を、研究代表者自身が新規に立ち上げ、様々な経路から中枢神経系の広範囲に外来遺伝子を導入する技術の開発 (Huda et al., 2014, Molecular Therapy - MCD) や、SCA に対する遺伝子治療研究 (Konno et al., Cerebellum 2014) などの実績をあげていた。

一方、近年ゲノム編集の技術が急速に進歩してきている。特に、CRISPR/Cas9 システムは、ターゲットとするゲノム配列に対応する 17~20 塩基のガイド RNA を設計するだけで、簡便かつ高効率にゲノム編集を行うことができることから、急速に利用が広がっている。

2. 研究の目的

このような背景から、研究代表者は、ゲノム編集技術と AAV9 による高効率な遺伝子導入技術を組み合わせることにより、in vivo で特定の遺伝子をノックアウト (KO) することができるのではないかと考えた。特に、本研究では、遺伝性脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) の原因遺伝子である ATXN1 を KO のターゲットとすることにより、SCA1 の根本治療法の開発を目指し研究を実施した。

3. 研究の方法

SCA1 の病態は、異常伸長したグルタミン鎖 (ポリグルタミン鎖; CAG リピートの翻訳産物) を含む Ataxin-1 タンパク質が細胞内に蓄積していくことにより生じる。In vivo KO では、CAG リピートよりも前の領域にダブルストランドブレイクを起こし、ストップコドンの出現を狙い、CAG リピートのグルタミン鎖への翻訳を阻止する。ターゲットとなる領域で、オフターゲット効果が少ないと考えられる配列は 5 カ所あり、いずれの場所においても 1、2 塩基の挿入や欠失が起これば、フレームシフトによりストップコドンが出現する。このようなゲノム編集を実現するために、Cas9 と sgRNA をそれぞれ搭載する AAV9 をマウスの小脳に同時投与した。in vivo KO の検証にはプルキンエ細胞でのみ GFP を発現する L7-GFP マウスを用い、治療実験ではポリグルタミン鎖をもつ Ataxin-1 を発現する SCA1 の疾患モデルマウスを用いた。モデルマスの治療効果の検証はマウスの運動失調を定量的に評価することのできる Rotarod により実施した。

4. 研究成果

(1) in vivo KO の検証

生きたマウスの脳内で AAV を介した遺伝子の KO が可能であるかを検証するために、プルキンエ細胞特異的に GFP を発現したトランスジェニックマウスを対象とした GFP の KO 実験を実施した。Cas9 のみを発現する AAV を投与した場合、GFP の蛍光が失われることはなかったが、GFP 遺伝子をターゲットとしたガイド RNA (sgRNA) を Cas9 と同時に発現した場合のみ、GFP 蛍光の消失が確認された (図 1)。

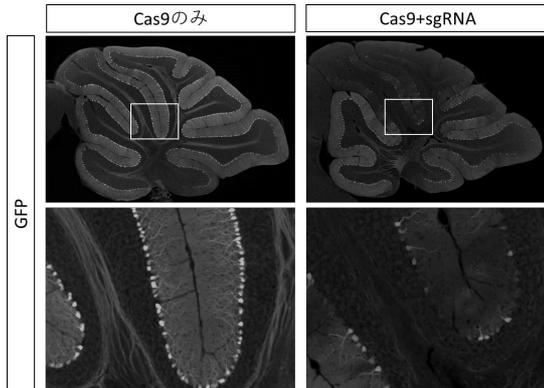


図 1 プルキンエ細胞特異的に GFP を発現しているマウスに対して、GFP の in vivo KO を実施した。GFP に対する sgRNA を同時に発現した場合のみ、GFP の蛍光が消失していることが確認できた。

(2) SCA1 モデルマウスに対する検討

GFP マウスにおいて in vivo KO が実施可能であることが検証できたため、SCA1 モデルマウスにおける検討に移行した。まず、SCA1 の原因遺伝子である ATXN1 をノックアウトするための適切な gRNA 配列を HEK293T を用いて同定した。同定した gRNA 配列と Cas9 を発現する AAV を作成し、SCA1 モデルマウス小脳に投与し、Rotarod によって、経時的に運動失調の進行を計測した (図 2)。

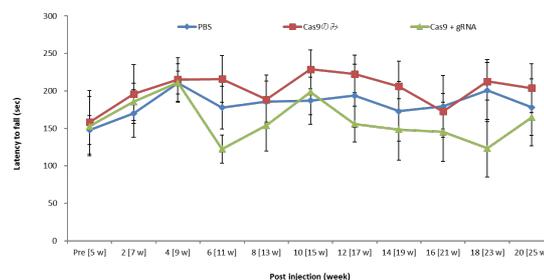


図 2 SCA1 モデルマウスに対して、AAV を投与後、Rotarod の成績を追跡した。

AAV 投与後 20 週後まで経過を追ったが、ATXN1 をターゲットとした sgRNA と Cas9 を両方発現した群 (図 2 における緑の折れ線グラフ) に期待したような運動失調の改善効果は認められなかった。

(3) SaCas9 を用いた検討

先の検討では Cas9 として最初期に報告されていた化膿連鎖球菌由来の SpCas9 を用いていた。SpCas9 は遺伝子サイズが大きく、プ

口モーターと SpCas9 のみで、AAV ベクターのパッケージング限界に極めて近いサイズとなってしまう。このため、発現を安定化させるための WPRE 配列等を付加できないことから、SpCas9 の発現量が低いことが予想された。実際、免疫染色で SpCas9 の発現を確認したところ、極めて発現量が低い事が明らかとなった。このため、本研究期間中に新規に報告された遺伝子サイズの小さい黄色ブドウ球菌由来の SaCas9 (Ran et al., Nature, 2015) を使用した方法に移行した。SaCas9 は SpCas9 と PAM 配列が異なるため、最適な gRNA の再選定を行い、再度 AAV ベクターを作成した。これを用いて SCA モデルマウスを対象とした in vivo KO による遺伝子治療を試みたが、SaCas9 を用いた場合でも、治療効果が認められなかった。現在、遺伝子導入法の改良や、トリプル CRISPR 法 (Sunagawa et al., 2016) などの導入により、ゲノム編集効率を上げる事などを検討中である。

(4)関連研究における成果

in vivo KO による脊髄小脳失調症 1 型の遺伝子治療においては前述の通りこれまでの所大きな成果は得られていない。しかしながら、同時並行で進めていた AAV による遺伝子導入手法の開発に関しては種々の成果を得ることができた。例えば、AAV に最適な短い遺伝子サイズの細胞種特異的プロモーターの開発や特性解析(発表論文、 、 、 、) や、これら細胞種特異的プロモーターを搭載した AAV を用いた研究(発表論文、 、 、 、) などである。また、近年開発された血液脳関門を高効率に突破できる AAV バリエーションである AAV-PHP.B (Deverman et al., 2016) に関する研究も始めており(発表論文、) この手法を用いた静脈注射による in vivo KO 手法に関する研究も進みつつある。これら成果と今回の研究から得られている知見を組み合わせることにより、より発展的な手法として、全脳的な in vivo KO による遺伝子治療を目指していきたい。

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 13 件)

Ogawa Y, Kakumoto K, Yoshida T, Kuwako KI, Miyazaki T, Yamaguchi J, Konno A, Hata J, Uchiyama Y, Hirai H, Watanabe M, Darnell RB, Okano H, Okano HJ. (2018) Elavl3 is essential for the maintenance of Purkinje neuron axons. Sci Rep. 8(1):2722. doi: 10.1038/s41598-018-21130-5. 査読有 Matsuzaki Y, Konno A, Mochizuki R, Shinohara Y, Nitta K, Okada Y, Hirai H (2018) Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B

capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain. Neuroscience Letters, 665:182-188. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.049. 査読有

Takahashi N, Shuvaev AN, Konno A, Matsuzaki Y, Watanabe M, Hirai H. (2017) Regulatory connection between the expression level of classical protein kinase C and pruning of climbing fibers from cerebellar Purkinje cells. Journal of Neurochemistry, 143(6):660-670, doi: 10.1111/jnc.14239. 査読有 Nitta K, Matsuzaki Y, Konno A, Hirai H. (2017) Minimal Purkinje cell-specific PCP2/L7 promoter virally available for rodents and non-human primates. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, Volume 6, Pages 159-170, doi: https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.07.006 査読有

Harada K, Ito M, Wang X, Tanaka M, Wongso D, Konno A, Hirai H, Hirase H, Tsuboi T, Kitaguchi T. (2017) Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. Scientific Reports. 7(1):7351. doi: 10.1038/s41598-017-07820-6 査読有 Shinohara Y, Ohtani T, Konno A, Hirai H. (2017) Viral Vector-Based Evaluation of Regulatory Regions in the Neuron-Specific Enolase (NSE) Promoter in Mouse Cerebellum In Vivo. Cerebellum, 16(5-6):913-922, doi: 10.1007/s12311-017-0866-5 Matsuzaki Y, Konno A, Mukai R, Honda F, Hirato M, Yoshimoto Y, Hirai H (2017) Transduction Profile of the Marmoset Central Nervous System Using Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors. Molecular Neurobiology: 54(3):1745-1758. doi: 10.1007/s12035-016-9777-6, 査読有

Huda F, Fan Y, Suzuki M, Konno A, Matsuzaki Y, Takahashi N, Chan JK, Hirai H (2016) Fusion of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells with "Degenerating" Cerebellar Neurons in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Model Mice. PLoS ONE 11(11): e0164202. doi:10.1371/journal.pone.0164202 査読有

Arsenault J, Gholizadeh S, Niibori Y, Pacey LK, Halder SK, Koxhioni E, Konno A, Hirai H, Hampson DR (2016) FMRP Expression Levels in Mouse CNS Neurons

Determine Behavioral Phenotype. Human Gene Therapy. 27(12):982-996. doi: 10.1089/hum.2016.090. 査読有
Shinohara Y †, Konno A †, Takahashi N, Matsuzaki Y, Kishi S, Hirai H (2016) Viral Vector-Based Dissection of Marmoset GFAP Promoter in Mouse and Marmoset Brains. PLoS ONE 11:e0162023. † Contributed equally to this work doi: 10.1371/journal.pone.0162023 査読有
Sato M, Seki T, Konno A, Hirai H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Katsuki H (2016) Fluorescent-based evaluation of chaperone-mediated autophagy and microautophagy activities in cultured cells. Genes to Cells. 21(8):861-73. doi: 10.1111/gtc.12390. 査読有
Sawada Y, Konno A, Nagaoka J, Hirai H (2016) Inflammation-induced reversible switch of the neuron-specific enolase promoter from Purkinje neurons to Bergmann glia. Scientific Reports. 6, Article number: 27758 doi: 10.1038/srep27758 査読有
Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H (2016) Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. Nature Communications 7, Article number: 11100 doi: 10.1038/ncomms11100 査読有

〔学会発表〕(計6件)

今野 歩、アデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入を介したリピート病モデル動物の作出と治療法の開発、2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017年
今野 歩、In vivo evaluation of the shortened-WPRE in the cerebellum、第40回日本神経科学大会、2017年
Ayumu Konno、"Generation of a marmoset model of spinocerebellar ataxia type 3 via AAV9 vector-mediated gene transfer"、Neuroscience2016、2016年
今野 歩、Optimization of the neuron-specific enolase promoter for AAV vectors : NSE プロモーターの短鎖化、第39回日本神経科学大会、2016年
今野 歩、Generation of animal models of spinocerebellar ataxia by AAV9-mediated gene delivery、第93回日本生理学会大会、2016年
今野歩、A marmoset model of

spinocerebellar ataxia type 3 generated using AAV vectors、第38回日本神経科学大会、2015年

〔その他〕
ホームページ等
<http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 歩 (KONNO, Ayumu)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：40509048