

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07047

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた新たなレット症候群の治療法開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for Rett syndrome using genome editing technology

研究代表者

岸 憲幸 (Kishi, Noriyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：30594882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体上のMECP2遺伝子の変異によって引き起こされる神経発達障害、レット症候群に対する新たな治療戦略として、不活性化しているX染色体上にある野生型MECP2遺伝子の再活性化の可能性を追求する研究を行った。まずこの研究に必要な評価系のマウスES細胞の作製を行った。一方のMECP2遺伝子を破壊し、もう一方のMECP2遺伝子に蛍光タンパク質GFPを融合させたメスのES細胞を作製した。このES細胞を使うと、EGFPの発現の有無で、野生型のMECP2遺伝子の発現をモニターすることができ、不活性化した野生型MECP2の再活性化を促すような薬剤の開発への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レット症候群は女兒における知的障害の原因としてはダウン症に次いで2番目に多い原因になっているが、現在のところ、根本的な治療法が確立していない。近年、マウスモデルの研究結果を根拠にインスリン様成長因子IGF1を使った臨床試験が行われたが、ヒト患者においては効果を示さなかった。本研究で提案している不活性化しているX染色体上にある正常なMECP2遺伝子の再活性化による治療戦略は、全く異なる新しいアプローチであり、急速な進歩をとげるゲノム編集技術と組み合わせることにより、従来にはない新しい治療法を開発する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：I investigated a possibility of a new therapeutic strategy for a neurodevelopmental disorder, Rett syndrome, which is caused by mutations of the MECP2 gene on X chromosome, by re-activation of wild-type MECP2 on an inactivated X chromosome. For this purpose, I generated a mouse female ES cell line to monitor MeCP2 expression. The ES cell line has non-functional MeCP2 on one X chromosome, and MeCP2-GFP fusion gene on another X chromosome. MeCP2 expression can be monitored by GFP expression in this ES cell line. Therefore, we can investigate whether inactivated MeCP2 gene can be re-activated with genome editing technology, using this monitoring ES cell line.

研究分野：神経発生学

キーワード：レット症候群 MECP2 ゲノム編集技術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レット症候群 (Rett syndrome) は 1966 年にオーストリアの医師 Andreas Rett によって報告された女兒の神経発達障害で、脳の成長の遅れ、知的障害、自閉症特有の無意味な手の動き、言語習得の欠如、呼吸異常、てんかんなどの多彩な症状を呈する。1 万から 2 万人の女兒あたり 1 人の罹患率で、女兒の知的障害の原因としてはダウン症候群に次いで二番目に多い原因となっているが、現在のところ根本的な治療法は確立されていない。

1999 年にレット症候群の原因として X 染色体上にある転写抑制因子をコードする *methyl CpG binding protein 2* (*MECP2*) 遺伝子の変異が同定され、それ以降、レット症候群の分子レベルの病態解析が急速に進んだ。2001 年には *Mecp2* 変異マウスが作製され、中枢神経系での *Mecp2* 遺伝子の欠損が表現型を引き起こしていることが明らかになり、中枢神経系での *Mecp2* 遺伝子の機能解明が精力的に行われた。特に、*Mecp2* 遺伝子が転写抑制因子をコードしていることから、表現型と関連する MeCP2 標的遺伝子の探索が盛んに行われた。

それらの研究成果の中で、神経栄養因子 BDNF の欠損により *Mecp2* 変異マウスの表現型が悪化し、逆に過剰発現させることにより表現型の一部が回復されたことにより、レット症候群への治療効果が期待された。しかしながら、BDNF そのものでは血液脳関門を通過することができないため、BDNF と近い作用をもち、血液脳関門を通過することができるインスリン様成長因子 IGF1 を使った臨床試験が 2012 年から 2018 年まで米国において行われた。IGF1 の安全性は確認されたものの、ほぼ治療効果がないことが示され、多数の標的遺伝子の制御に関わる MeCP2 変異に対する治療への限界を示す結果となった。

そこで申請者は、レット症候群患者がヘテロ接合体であることに注目し、不活性化した X 染色体上にある野生型の *MECP2* 遺伝子を再活性化させることにより、レット症候群を治療しようという治療戦略に注目した。レット症候群のほとんどの患者は女性で、*MECP2* 遺伝子についてヘテロ接合体である。女性の場合、X 染色体を 2 つ持っているが、発生過程においてランダムな不活性化が生じ、どちらかの X 染色体からの遺伝子発現が抑制されている。つまり女性のレット症候群の患者の場合、野生型の MeCP2 を発現している細胞と変異型の MeCP2 を発現している細胞がモザイク状に存在しているわけであり、変異型の MeCP2 を発現している細胞において、不活性化している X 染色体から野生型の *MECP2* 遺伝子を再活性化して発現させることができれば、レット症候群を根本から治療することができるわけである。

本研究課題においては、この治療戦略を基礎医学研究の立場から検証を行い、その可能性を目指すものである。

2. 研究の目的

前述のような状況を踏まえ、レット症候群患者が女性のヘテロ接合体であることに注目し、不活性化した X 染色体上にある野生型の *MECP2* 遺伝子を活性化させることによる治療戦略の基礎医学的な研究を提案した。マウスモデルにおいては、オスのヘミ接合体マウス (*Mecp2* ^{-/y}) がモデルマウスとして使われているが (X 染色体が 1 つしかないため変異型 *Mecp2* 遺伝子のみ) ヒトにおいては *MECP2* 遺伝子に変異を持つ男性は胎生致死と考えられており、患者はヘテロ接合体の女性 (*MECP2* +/-) がほとんどである (X 染色体を 2 つ持つため、野生型と変異型 *MECP2* 遺伝子を持っている)。レット症候群女性患者においては、ランダムな X 染色体の不活性化により、正常な MeCP2 が発現している細胞と、発現していない細胞がモザイク状に存在している。つまり、正常な *MECP2* 遺伝子が不活性化している細胞でその正常 *MECP2* 遺伝子を再活性化できれば、MeCP2 の機能を回復することは理論上可能である。

問題は染色体全体が不活性化している X 染色体の中で、どのように特定の遺伝子のみを再活性化させるかであるが、近年ゲノム編集技術と呼ばれる任意の DNA 塩基配列を修飾する技術の進歩により、技術的に不可能ではなくなりつつある。ゲノム編集技術を用いて *MECP2* 遺伝子プロモーター領域の塩基配列に結合するドメインと、転写活性化ドメインを組み合わせた人工転写活性化因子を導入することにより、不活性化している正常な MeCP2 蛋白を発現させることができれば、レット症候群の原因そのものを解決することになる (図 1)。

本研究計画では、*MECP2* +/- ニューロンに、ゲノム編集技術を使って作製した人工転写活性化因子を導入し、不活性化している正常な *MECP2* 遺伝子を再活性化させるという基盤的な研究を通じて、将来のレット症候群治療に向けたトランスレーショナルな研究を目指した。

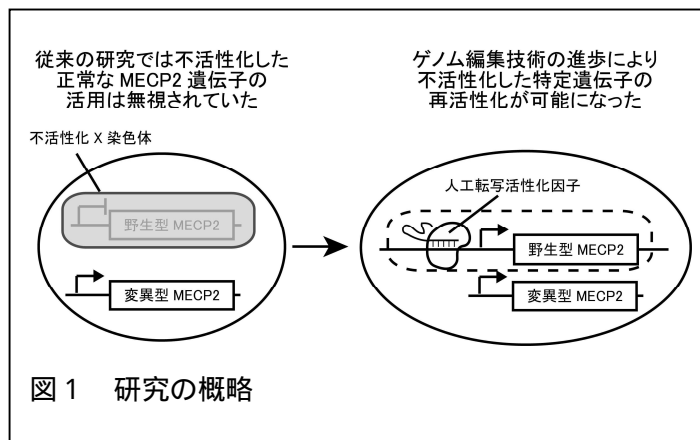
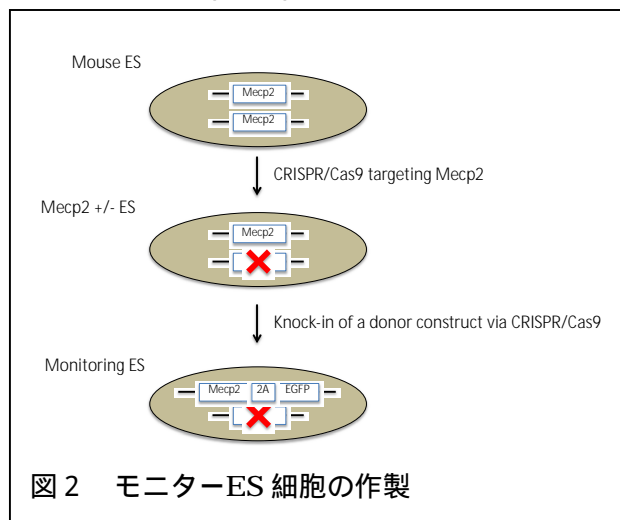


図 1 研究の概略

3. 研究の方法

Mecp2 遺伝子の再活性化を評価する細胞の作製を目指した。メスのマウス ES 細胞 BR6 細胞 (*Mecp2* +/-) に対して、ゲノム編集技術を用いて 2 つある *Mecp2* 遺伝子のうち、1 つは破壊し、もう 1 つについては *Mecp2* 遺伝子の翻訳終止コドンのところに、自己プロセシング性ペプチド 2A 配列と蛍光蛋白 GFP 遺伝子を挿入した ES 細胞株を樹立を目指した (図 2)。

2 つの遺伝子改変を同時に行うのは効率的ではないため、第一段階として一方の *Mecp2* 遺伝子の破壊を行った。*Mecp2* 遺伝子には幾つか機能ドメインが分かっているが、MBD ドメインと呼ばれるメチル化した CpG 配列に結合する部位を標的に CRISPR/Cas9 コンストラクトを作製し、BR6 細胞に導入した。2 回実験を繰り返し、一方の *Mecp2* 遺伝子のみが破壊された ES 細胞株を単離した。第二段階として単離した *Mecp2* +/- ES 細胞に対して *Mecp2* 遺伝子の終止コドン付近に double strand break を生じさせるための CRISPR/Cas9 コンストラクトと、ノックインさせるための GFP 遺伝子を含むドナーベクターを導入し、*Mecp2*-GFP 融合遺伝子の作製を行った。



4. 研究成果

(1) ガイド RNA のデザイン

Mecp2 遺伝子の発現をモニターするマウス ES 細胞株を作製するにあたり、2 種類の *Mecp2* 遺伝子を標的にしたガイド RNA を CRISPR DESIGN というソフトを利用しデザインした。1 つは *Mecp2* 遺伝子の機能を破壊するもので、*Mecp2* 遺伝子がコードする転写抑制因子の機能を喪失させるためにメチル化した CpG 配列に結合する MBD ドメインに設計した。もう 1 つは *Mecp2* 遺伝子と蛍光蛋白 GFP の融合遺伝子を作製するためのもので、*Mecp2* 遺伝子の終止コドン付近に設計した。

(2) *Mecp2* +/- ES 細胞株の樹立

一回の CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で、モニター ES 細胞を作製するのは困難なため、まず第一段階として、*Mecp2* +/- ES 細胞株の樹立を目指した。*Mecp2* はゲノム上のメチル化した CpG 配列に結合する転写抑制因子であり、ゲノム上のメチル化した CpG 配列に結合する MBD ドメインを破壊されると、転写抑制因子としての機能が完全に喪失することが知られており、この MBD ドメイン付近を標的にしてガイド RNA を設計した。当初、3 種類のガイド RNA を設計したが、予備実験としてマウス ES 細胞に導入して、それぞれのガイド RNA の変異効率を解析し、最終的に 1 つに絞った。最も変異効率が高いガイド RNA を使って、独立に 12 回、マウス ES 細胞に CRISPR/Cas9 コンストラクトを導入し、それぞれ半分を変異解析に使い、半分を凍結ストックとして保存した。変異解析から *Mecp2* 遺伝子の完全機能を喪失する変異を含んだバッチを特定し、その凍結ストックを起眠し、1 細胞の ES 細胞からコロニーを形成するような細胞密度で播種し、シングルコロニーを 12 個単離、増殖させ、半分の細胞を変異解析に使い、半分の細胞を凍結ストック作製のために使用した。その結果、TF#09-Plate#08 というクローンの *Mecp2* 遺伝子の塩基配列を確認したところ、約 50% は 1 塩基挿入の変異、残り 50% は野生型 *Mecp2* であることを確認し、*Mecp2* +/- の ES 細胞株の樹立に成功した (図 3、赤の下線はガイド RNA の配列、赤の G が挿入された塩基)。

野生型: 6 クローン中 4 クローン
 CCTTCAGCCCACCATCTGCAGAGCCAGCAGAGGCAGGCAA
 1 塩基挿入: 6 クローン中 2 クローン
 CCTTCAGCCCACCATCTGCAGAGCCAG**G**CAGAGGCAGGCAA

図 3 TD#09-Plate#08 ES 細胞株の遺伝子変異

(3) モニター細胞の作製

上記で単離した *Mecp2* +/- ES 細胞に対して、*Mecp2* 遺伝子の終止コドン付近に double strand break を生じさせるための CRISPR/Cas9 コンストラクトと、ノックインさせるための GFP 遺伝子を含むドナーベクターを両方導入し、*Mecp2*-GFP 融合遺伝子の作製を試みた。ノックインドナーベクターは、5' 側と 3' 側に 1 kb のホモロジーアームと、自己切断ペプチド 2A と GFP 遺伝子を含み、ノックインされれば内在性の *Mecp2* 遺伝子と同じ読み枠で挿入され、翻訳の際に MeCP2 蛋白と 2A ペプチド、GFP 蛋白が 1 つの翻訳産物として産生され、2A ペプチドが切断されることにより、MeCP2 蛋白と GFP 蛋白が発現する (図 4A、5HA: 5' ホモロジーアーム、3HA: 3' ホモロジーアーム、青の矢印は検出用の PCR プライマーの位置)。

トランスフェクションした10個のES細胞を解析したところ、2サンプルにおいてドナーベクターが *Mecp2* 遺伝子座にノックインされた場合に検出されるPCR産物を検出した(図4B、電気泳動の写真、赤の矢頭はノックインされた場合にPCRによって検出されることが予想されるPCR産物)。今後、ゲノムサブマップ解析によりこの結果を確認すると共に、*Mecp2* 遺伝子座以外に非特異的に挿入されないか確認する予定である。このモニターES細胞が樹立できれば、*Mecp2* +/-細胞において、不活性化した野生型 *Mecp2* 遺伝子の再活性化をGFPの蛍光としてモニターでき、*Mecp2* 遺伝子の再活性化を促す薬剤のスクリーニングへの応用が期待できる。

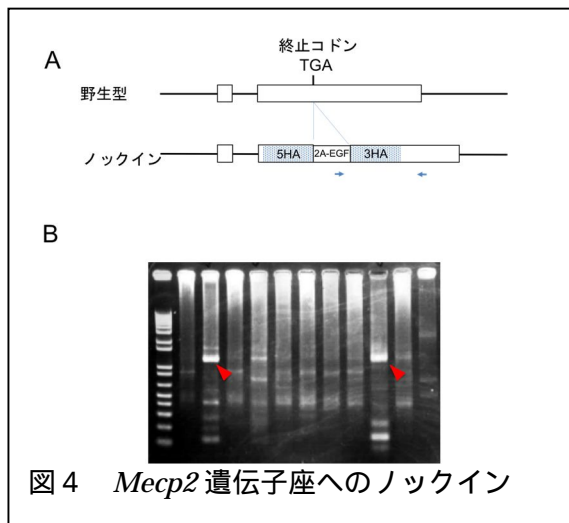


図4 *Mecp2* 遺伝子座へのノックイン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Okano H, Kishi N: Investigation of Brain Science and Neurological/Psychiatric Disorders Using Genetically Modified Non-Human Primates. *Curr Opin Neurobiol* 50: 1-6, 2018, 査読有

DOI: 10.1038/s41598-018-37990-w

岸 憲幸: レット症候群の病態における NF-κB シグナル伝達系の関与. *神経化学* 56: 15-21, 2017, 査読有

<http://www.neurochemistry.jp/mumeaabph-54/>

〔学会発表〕(計 4件)

岸 憲幸: レット症候群モデルマーマセットの作製と解析. 発生細胞生物学シンポジウム, 大阪, 2018

岸 憲幸: 齧歯類および霊長類モデルを用いたレット症候群の病態解析. ConBio2017, 神戸, 2017.

岸 憲幸: レット症候群モデルマーマセットの作製と解析. レット症候群国際シンポジウム 2017 in Kobe, 神戸, 2017.

岸 憲幸: モデル動物を用いたレット症候群の病態解析. 第59回日本神経化学会, 福岡, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。