

令和元年6月18日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08642

研究課題名(和文) ヒト疾患モデルマーモセットを用いたゲノム編集による遺伝子修復治療技術の確立

研究課題名(英文) Improvements in genome editing technologies for treating a marmoset model of human inherited blood disorder

研究代表者

三谷 幸之介 (Mitani, Kohnosuke)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10270901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：疾患モデルマーモセットの原因遺伝子であるIL2RG遺伝子エクソン3のDNA変異部位の近辺を標的とするCRISPRタンパク質とガイドRNAを電気穿孔法で、ドナーDNAをAAVベクターとして導入することによって、ヒトCD34陽性造血幹前駆細胞において、38%という高効率で相同組換え修復を達成した。これらの細胞から作った造血コロニーでは約20%であった。マーモセット造血コロニーでは約10%であった。

修復用ドナーDNAのランダムな染色体部位への組込みを防ぐためのネガティブ選択法として、iCaspase9自殺遺伝子をコードする修復用ドナーAAVベクターを産生した。今後、条件の至適化が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患モデルマーモセットの原因遺伝子であるIL2RG遺伝子エクソン3のDNA変異部位の近辺を標的とする、効率の良いCRISPRと標的配列の同定と、AAVベクターのデザインに成功した。そして実際にin vitroで、ヒトとマーモセットでの造血幹前駆細胞での遺伝子修復に成功した。まだ治療レベルから低く数倍の効率の改善が望まれるが、一度達成されれば世界初の霊長類を用いたゲノム編集治療の治療効果ならびに安全性の解析を行うことが可能となる。また、修復用ドナーDNAのランダムな染色体部位への組込みを防ぐためのネガティブ選択法も、方法論の確率まであと一步の所に到達している。

研究成果の概要(英文)：With the goal of establishing a strategy for safe and efficient genome editing therapy in a marmoset model of immunodeficiency, we identified the optimal combination of Cas protein and gRNA targeting near the mutation site in the IL2RG gene. The resultant CRISPR complex was delivered together with a donor AAV vector for homology-directed repair at the mutation site in CD34 hematopoietic progenitor cells. Gene repair via gene editing is expected to knock-in the Venus reporter gene precisely into the mutated exon 2 of the locus. The gene repair efficiency in the cell population was about 40%. When the efficiency was measured in more primitive colony-forming progenitors on methylcellulose, the efficacy was about 20% and 10% in human and marmoset cells, respectively. We also designed a novel negative selection reporter using the iCaspase 9 gene in order to avoid the integration of the donor AAV vector at undesired random chromosomal sites.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：遺伝子治療 ゲノム編集 免疫不全症 ウイルスベクター 疾患モデルマーモセット

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、ゲノム編集法を応用して変異遺伝子を正常な DNA 配列に正確に修復する、遺伝病の理想的な治療ストラテジーに向けた技術の確立である。遺伝子治療はこれまでに多様な疾患で臨床試験が成功し、2012 年にヨーロッパにおいて初めて遺伝子治療薬が承認されるに至った。その一方、治療用のウイルスベクターが染色体上のがん遺伝子を活性化して生じた白血病も報告され、従来の cDNA を過剰発現する方法より安全な方法も望まれている。また、優性遺伝病の治療は、遺伝子修復をしないと根治は不可能である。しかし、哺乳類細胞においては相同組換えの効率が著しく低いことが、遺伝子修復治療を実現する上での障害であった。

本研究ではまず「効率性」を追求し、多様なウイルスベクターを駆使することによって、臨床応用が可能な高効率での遺伝子修復を目指す(目的 1)。近年、遺伝子修復の効率を上げる 2 つの方法が報告されている。1) 修復の鋳型となるドナー DNA のウイルスベクターを用いた導入と、2) 人工ヌクレアーゼによる標的染色体配列の切断、である。1) に関しては、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) や私達が独自に開発したヘルパーウイルス依存型アデノウイルスベクター (HDAdV) を用いると非常に高頻度に遺伝子修復できることを、私達や他のグループが報告している。2) に関しては、CRISPR-Cas9 などの人工ヌクレアーゼで任意の標的染色体配列に二本鎖 DNA 切断 (DSB) を導入することで、切断部位の遺伝子修復活性が桁違いに上昇する事が示されてきた。これまでに私達はこの 2 つの方法を組み合わせることで高効率化に成功した。そこで本研究では、DNA 導入法を至適化することで血液細胞における高効率化を達成する。

一方、臨床応用においては、「安全性」の確保が最重要課題である。そこで、以下の 2 点について安全性を改善する。1) 人工ヌクレアーゼには、標的配列以外の配列を誤認・切断して変異を入れるいわゆるオフターゲット切断のリスクがある。人工ヌクレアーゼは切断効率が高く、DNA 修復のエラーにより変異が入り切断不可能になるまでターゲットもしくはオフターゲット配列を切り続けることが原因である。そこで、切断酵素である Cas9 の活性を必要最小限なレベルで制御すれば、オフターゲット切断が劇的に減ることが期待される。2) 修復用ドナー DNA がランダムな染色体部位へ組み込まれた際には、ほぼ 100% の頻度で染色体異常を誘発することを、私達は明らかにした。すなわち、修復 DNA のランダムな部位への組込みを除く手段が必要である。これらの課題に対して、私たちは「目的 2」で解決の手段を提唱し、マーマーモセットの系で実証する。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子編集治療の実用化に向け、「効率性」と「安全性」の両方を満たす方法論の開発を目指す。またその至適化された条件を用いて、ヒトへ応用する一步前の段階として、ヒト疾患モデルマーマーモセット細胞を用いた実験によって、「実用性」を明らかにする。

「効率性」については、安定に効率よく人工ヌクレアーゼと修復用ドナー DNA とを細胞に導入する方法を、ウイルスベクターを中心に至適化する。また、「安全性」について、オフターゲット切断を最小限にするための制御可能型人工ヌクレアーゼ Cas9 の構築と、修復用 DNA のランダムな染色体部位への組込みを防ぐための新規ネガティブ選択法の開発を行う。こうして得られる成果の「実用性」を明らかにする目的で、免疫不全モデルマーマーモセット細胞を用いて実験を行う。本研究計画の終了時点で十分高い効率と安全性を示す結果が得られたら、本研究の発展形として、遺伝子修復細胞をマーマーモセットの個体に戻す、実際の遺伝子修復治療実験を計画する。最終的には、5 年以内を目処に、私達の有するユニークなモデルである免疫不全マーマーモセットの遺伝子修復治療の、世界で最初の成功例を目指す。

3. 研究の方法

「標的遺伝子座」: 本研究では、1) インターロイキン 2 受容体 鎖 (IL2RG) 遺伝子座を標的とする。IL2RG は、佐々木らが作製した、重症複合免疫不全症マーマーモセットで変異が導入されている遺伝子座で、本研究の治療標的である。

「標的細胞」: 比較的培養が容易な線維芽細胞と ES 細胞とで諸条件を検討しながら、本来の標的細胞である血液細胞で改めて「効率性」と「安全性」とを検討する。

「目的 1: 遺伝子修復の効率性」

主にウイルスベクターの特性を利用することによって、至適な方法を各細胞種で系統的に比較検討する。人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集による遺伝子修復は、人工ヌクレアーゼ

(Cas9+ guide RNA) と修復の鋳型となるドナーDNA とが必要である。治療目的を考えた場合、細胞を痛めずに高い効率でこれらを細胞に導入する必要がある。それには、エレクトロポレーションやリポフェクションなどの方法よりも、ウイルスベクターが望ましい。

人工ヌクレアーゼの発現は短期間での強発現が理想的である。そこで、私達が開発した高い DNA 導入効率と低い細胞毒性を兼ね備える HDAdV を用いる。従来の、plasmid DNA や in vitro で転写した mRNA のトランスフェクション法と効率を比較検討する。標的は IL2RG 遺伝子座として、各細胞種での至適な CRISPR 発現法を検討する。一方、修復用ドナーDNA の導入法は、効率が高く核内で安定に保たれる方法が望ましい。従って、IL2RG 遺伝子座を修復するドナーDNA を搭載する AAV ベクターを構築・産生して、至適化した CRISPR 発現法と組み合わせる比較・検討を行う。目標は、従来の遺伝子治療法との比較で、DNA 導入細胞の 10% とする。

「目的 2 : 遺伝子修復の安全化」

ランダムな組み込みを除く手段として、従来、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子などを使ったネガティブ選択が使われてきた。しかし、治療応用を考え、サイズが小さく免疫応答の問題がない shRNA を利用した新規のネガティブ選択法を開発する。私達は既に、ヒト ES/iPS 細胞の増殖に關与する RRP-12 (ribosomal RNA processing 12) 遺伝子を標的とした shRNA を用いたネガティブ選択が有用であることを示した。そこで、RRP-12 や他の標的遺伝子に対する shRNA を何種かデザインして、HPRT 標的のドナーDNA を搭載するベクターにクローニングして、ランダムな組み込みがどの程度減少するかを検討する。

一方、Cas9 の活性をより厳密に制御してオフターゲット切断を最小限にするために、合成抗菌剤トリメトプリム (TMP) の添加によって蛋白質の安定を制御できる大腸菌 DHFR 遺伝子断片を Cas9 に融合した制御可能 Cas9 (ddCas9) を作製して、TMP の存在・非存在下で遺伝子修復の効率を比較する。

安全性を目的とするこれらのストラテジーを、「目的 1」で至適化するドナーDNA 導入法並びに人工ヌクレアーゼ発現法と組み合わせる。さらに、CIRCLE-seq 法によって通常の Cas9 と ddCas9 を用いた場合の変異導入頻度の違いを、deep sequence によって検討し、ddCas9 法の有効性を検証する。もし、ddCas9 や shRNA ネガティブ選択法が期待ほど機能しない場合には、他グループより報告のある様々な Cas9 制御法などを取り入れてオフターゲット切断の抑制を試み、「目的 3」の実現性の検証に向けて研究を進める。

「目的 3 : IL2RG 変異マーマーモセット細胞を用いた実用性の検証」

「目的 1」と「目的 2」で至適化した条件を元に、IL2RG 欠損マーマーモセット由来の血液細胞ならびに造血幹細胞において、治療レベルの効率で遺伝子修復が可能かを検討する。修復した造血細胞における IL2RG 遺伝子の発現と機能の回復も検証する。血液細胞においても、目標は従来の遺伝子治療法との比較で、DNA 導入細胞の 10% とする。

本プロジェクトは、連携研究者の佐々木より、正常及び遺伝子ノックアウトマーマーモセットの DNA、細胞や、一連の実験法のノウハウの提供を受ける。埼玉医大においては、非常勤実験補助員 (研究歴 7 年と 4 年) によって、DNA コンストラクト作りと細胞培養を行う。助教の太田 (連携研究者) と三谷が分担して、ウイルスベクターの産生と感染実験を行う。

4 . 研究成果

「目的 1 : ゲノム編集の効率化」

CRISPR を発現する様々なウイルスベクターなどのプラスミド DNA は完成し、一部は DNA レベルで血液系の培養細胞 (K562) で活性を検討した。その一方で、多様なドナー用 AAV ベクターDNA も構築した。また、現在入手可能な唯一のマーマーモセット由来細胞株であるマーマーモセットの ES 細胞を理研細胞バンクより入手した。この細胞の培養に必要なフィーダー細胞が、遺伝子導入を妨げる。しかし、工夫することによって 3 継代はフィーダー細胞なしで培養可能であった。

先ず、この目的のために樹立した、ゲノム編集を蛍光の発光 (GFP) で安易に測定できる血液系のヒト培養細胞 (K562 細胞) を用いて、標的となる IL2RG 遺伝子エクソン 3 の DNA 変異部位の近辺を標的とする SpCas9 や Cpf1 などの様々な CRISPR タンパク質の変異体とガイド RNA と合わせて、最も切断活性の高い組み合わせを同定した。SpCas9 タンパク質とガイド RNA を in vitro で直接混合して作る RNP 複合体と、蛍光遺伝子を含んだ修復用ドナーDNA をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて K562 細胞に導入すると、切断活性の高い CRISPR の組み合わせで、細胞を選択することなく全細胞の約 90% という高効率で遺伝子の組み

換えが検出できた。AAV ベクターに関しては、K562 細胞を用いて至適な血清型を検討した。AAV1, AAV6, AAV6 の変異体 (AAV6m と記す)、AAV-DJ を一つずつ、もしくは混合して出来る polyploid と呼ばれる血清型で検討したところ、AAV6m が最も高いゲノム編集効率を示した。

それをさらにヒト CD34 陽性造血幹前駆細胞に適応した。電気穿孔法で Cas9 とガイド RNA とを複合体の形で導入し、直後に遺伝子修復用のドナー DNA として、IL2RG 遺伝子座の相同 DNA 配列に挟まれた Venus レポーター遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターを用いて導入した。その結果、38%の高効率で標的 IL2RG 遺伝子座に Venus 遺伝子が組み込まれた。これらの細胞で造血コロニーアッセイを行い PCR により遺伝子修復の割合を確認すると、相同組み換えが約 20%で検出された。次にマーマセット CD34 陽性細胞で同様の実験を行なったところ、Venus 陽性細胞は約 10%であった。

「目的 2 : ゲノム編集の安全化」

遺伝子修復の安全性を高める方法として、1) ゲノムワイドなオフターゲット切断部位の同定と、2) ネガティブ選択法によって修復用ドナー DNA のランダムな部位への組み込みを除く方法を、検討した。

1) についてはゲノムワイドなオフターゲット切断部位を検出するために、CIRCLE-seq 法を導入した。K562 細胞から抽出したゲノム DNA を用いて、超音波破砕機で平均 300bp に断片化したゲノム DNA の末端を酵素で修復し、ライゲーションを行うことでゲノム配列由来の環状 DNA のライブラリーを作製した。その環状 DNA ライブラリーに SpCas9 と IL2RG 遺伝子をターゲットとするガイド RNA の RNP 複合体を加えることにより、目的配列とオフターゲット配列を含む環状 DNA が切断される。切断された DNA にイルミナ社次世代シーケンサーで解析するためのアダプターを付着して HiSeq X10 でシーケンスを行い、いくつかの候補部位を同定した。

2) については、私達は既にヒト ES/iPS 細胞に関しては、増殖に關与する RRP-12 遺伝子を標的とした shRNA を用いたネガティブ選択が有用であることを示した。様々な血清型をスクリーニングし直して、AAV-DJ と呼ばれる血清型が非常に高い効率でヒト iPS 細胞に遺伝子を導入することを見出した。一方、この shRNA が血液細胞で働くかについてはまだ検証出来ていないが、別の候補標的遺伝子として、BRD4 遺伝子に対する shRNA 発現カセットを搭載した、IL2RG 遺伝子領域の相同配列を持つ修復用ドナー AAV ベクターを構築した。さらに、iCaspase9 自殺遺伝子を利用する技術の開発を行い、この遺伝子をコードする修復用ドナー AAV ベクターを産生した。現在のところ選択効果がそれほど顕著に見られず、更なる条件の至適化が必要だと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 三谷幸之介、ゲノム編集技術の導入による遺伝子治療の革命、医薬ジャーナル、査読無、54 巻、2018、107-110
DOI: 10.20837/1201801107
- 三谷幸之介、ゲノム編集の臨床応用の概要、ファルマシア、査読無、54 巻、2018、118-122
DOI: 10.20837/1201801107

〔学会発表〕(計 2 件)

三谷幸之介、ゲノム編集技術の臨床応用に向けて、21 世紀の医療とテクノロジーの展望シンポジウム (UCLA-Japan シンポジウム)、2018
三谷幸之介、ゲノム編集技術のヒト臨床応用の現状、日本ゲノム編集学会 第 3 回大会、2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

該当せず

6．研究組織

該当せず