

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15477

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いた神経変性疾患の根本的遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of gene therapy against neurodegenerative diseases using CRISPR/Cas9-based genome editing

研究代表者

平井 宏和 (Hirai, Hirokazu)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70291086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9システムと細胞種特異的アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター発現系を組み合わせ、生体脳内において特定の細胞群から疾患遺伝子を取り除く技術を確立することを目的とした。まずAAVベクターに搭載可能なニューロン特異的プロモーターとアストロサイトプロモーター、小脳プルキンエ細胞特異的L7-6プロモーターを開発して論文発表した。さらにプルキンエ細胞特異的発現AAVベクターを用いて、脳の発達異常原因遺伝子を、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術によってノックアウトできるか検討した。その結果、小脳全域の約3分の2のプルキンエ細胞において、原因遺伝子をノックアウトすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to establish a technique that allows elimination of a disease-causing gene from specific cell populations in the brain, using adeno-associated virus (AAV) vectors in combination with CRISPR/Cas9 system. Initially, we characterized neuron-specific, astrocyte-specific and cerebellar Purkinje cell-specific promoters available for AAV vector-mediated transgene expression. The results were published in 3 papers. Then, using the AAV vectors, we examined whether a gene responsible for developmental defects of the brain could be knocked out from Purkinje cells by CRISPR/Cas9 system. The results showed successful removal of the gene from around two thirds of Purkinje cells.

研究分野：神経生理学、神経科学

キーワード：小脳 プルキンエ細胞 細胞種特異的プロモーター CRISPR/Cas9 ゲノム編集 AAV ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

(1) CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 システムを用いると極めて効率的にゲノムを編集することが可能であり、2011年の報告以来、世界中でノックアウトやノックインマウス作成に爆発的に用いられはじめている。

(2) AAV ベクター

AAV ベクターは径 20 nm と小さく、脳実質内を拡散して広い領域への遺伝子発現が可能である。本研究者らは AAV9 ベクターをマウス及びマーモセットに髄注、静注、あるいは小脳皮質へ投与し、大脳～脳幹・小脳～脊髄へ広く効率的に外来遺伝子を発現させることに成功した(Mol Ther Methods Clin Dev. 2014)。

(3) 細胞種特異的プロモーター

本研究者らは種々の細胞種特異的プロモーターを開発して来た。とくにコンパクトで強力なプルキンエ細胞特異的プロモーターは極めて優れており、このプロモーターを用いた研究成果がいくつもの一流誌に掲載された(J Neurosci 2013, Neuron 2013, Science 2014)。また改良型神経細胞特異的プロモーター(J Neurosci Methods 2014)、アストロサイト特異的プロモーター、抑制性ニューロン特異的プロモーター、運動ニューロン特異的プロモーターの開発も行っていた。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 システムと細胞種特異的アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター発現系を組み合わせ、生体脳内において特定の神経細胞群やグリア細胞など細胞種特異的に特定の遺伝子を取り除く技術を確認する。またこの技術を用いて、遺伝性神経変性疾患モデル動物の神経細胞から、ゲノム変異部分を直接ノックアウトする「究極の遺伝子治療」を行い、神経変性を抑制し、その結果、症状の出現、進行を抑えることを目指す。

3. 研究の方法

(1) GFP 発現トランスジェニックマウスにおいて、小脳プルキンエ細胞、グリア細胞、抑制性ニューロンなど細胞種特異的な GFP 発現のノックアウトができることを検証する。

(2) 本技術を用いて、SCA1 モデルマウスのゲノムから変異 Ataxin-1 遺伝子を、細胞種特異的、かつ効率的にノックアウトすることを試みる。これにより進行性の病態が緩和されるのか、行動解析(ロータロッド等)、免疫組織、パッチクランプ等で詳細に調べる。

4. 研究成果

(1) 細胞種特異的プロモーター

AAV ベクターに搭載可能な細胞種特異的プロモーターをスクリーニングし、細胞種特

異性を失わず、かつプロモーター活性を保つ領域を明らかにした。

ニューロン特異的プロモーターとアストロサイトプロモーター、小脳プルキンエ細胞特異的 L7-6 プロモーターを開発して論文発表した(発表論文, ,)

(2) AAV ベクターと CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ノックアウト

小脳プルキンエ細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニック(L7-GFP)マウスの GFP 遺伝子を編集し、GFP タンパク質の発現抑制を試みた。その結果、明らかに多くのプルキンエ細胞において GFP 発現を欠損させることに成功した。

続いて SCA1 モデルマウスに、変異 Ataxin-1 に対する gRNA と SpCas9 を発現させてゲノム編集を行い、変異 Ataxin-1 タンパク質の産生を阻害することを試み、効果を Rotarod によって追跡した。しかしながら、明らかな治療効果は確認できなかった。SpCas9 は遺伝子サイズが大きく、プロモーターと 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、SpCas9 の発現量が極めて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、発現が極めて少ないことがわかった。

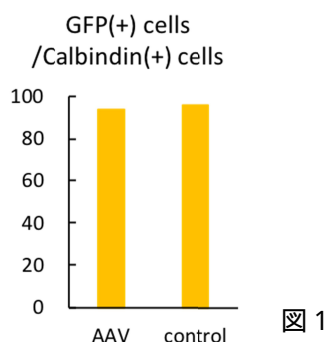
Ataxin-1 のノックアウトは困難と考え、遺伝子変異による発達障害(自閉症)の原因遺伝子 MeCP2 をターゲットとした。CRISPR/Cas9 システムで MeCP2 をノックアウトするため、AAV ベクターを以下の 2 つに分けた。

TRE 制御下で SpCas9 を発現するベクター U6 プロモーター制御下で MeCP2 をターゲットとした gRNA 及び、プルキンエ細胞特異的 L7-6 プロモーター制御下で GFP と tTA を発現するベクター

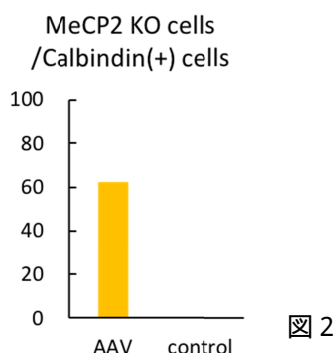
AAV のカプシドは血液脳関門を高効率で透過する PHP.eB を用いた。2 つのベクターをミックスし、成熟後の野生型マウスの静脈内に投与した。コントロールとして、SpCas9 を発現するベクターを除いたもの(のベクターのみ)を用いた。4 週後に灌流固定し、小脳切片を作成した。切片は抗 GFP 抗体、抗 MeCP2 抗体、抗カルビンディン抗体を用いて 3 重染色し、共焦点レーザー顕微鏡にてプルキンエ細胞の MeCP2 を観察した。その結果、のベクターのみを投与したものでは、すべてのプルキンエ細胞の核内に MeCP2 が存在しているのが確認された。これに対し、との両方のベクターを投与したマウスのプルキンエ細胞では、全てではないものの多くで MeCP2 が欠損しているのが観察された。

カルビンディンでラベルされたプルキンエ細胞のうち、GFP を発現しているもの、す

なわち gRNA を発現しているプルキンエ細胞の割合は と の両方のベクターを投与したものでは 93.7% (n=3 マウス) であり、のみ投与したコントロールでは 96.1% (n=1 マウス) であった (図 1)。このことから、AAV ベクターを静脈投与したほぼ全てのプルキンエ細胞にウイルスベクターが感染し gRNA を発現していることがわかった。



またカルビンدينでラベルされたプルキンエ細胞の中で、MeCP2 がノックアウトされている割合を 3 匹のマウスで調べたところ 62.1% で、コントロールマウスでは 0% であった (図 2)。



このように、CRISPR/Cas9 システムと血液脳関門透過型 AAV ベクターを用いて、細胞種特異的に高効率で特定の遺伝子をノックアウトすることに成功した。

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 6 件)

Yoichiro Shinohara, Toshinori Ohtani, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Viral vector-based evaluation of regulatory regions in the neuron-specific enolase (NSE) promoter in mouse cerebellum in vivo, *The Cerebellum*, 査読有, 16 巻, 2017, 913-922

DOI : 10.1007/s12311-017-0866-5

Kazuki Harada, Motoki Ito, Xiaowen Wang, Mika Tanaka, Devina Wongso, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Hajime

Hirase, Takashi Tsuboi, Tetsuya Kitaguchi, Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging, *Scientific Reports*, 査読有, 7 巻, 2017, 7351

DOI : 10.1038/s41598-017-07820-6

Keisuke Nitta, Yasunori Matsuzaki, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Minimal Purkinje cell-specific PCP2/L7 promoter virally available for rodents and non-human primates, *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 査読有, 6 巻, 2017, 159-170

DOI : 10.1016/j.omtm.2017.07.006

Nobutaka Takahashi, Anton N. Shuvaev, Ayumu Konno, Yasunori Matsuzaki, Masashi Watanabe, Hirokazu Hirai, Regulatory connection between the expression level of classical protein kinase C and pruning of climbing fibers from cerebellar Purkinje cells, *Journal of Neurochemistry*, 査読有, 143 巻, 2017, 660-670

DOI : 10.1111/jnc.14239

Yasunori Matsuzaki, Ayumu Konno, Ryuta Mochizuki, Yoichiro Shinohara, Keisuke Nitta, Yukihiro Okada, Hirokazu Hirai, Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain, *Neuroscience Letters*, 査読有, 665 巻, 2018, 182-188

DOI : 10.1016/j.neulet.2017.11.049

Yuki Ogawa, Kyoko Kakumoto, Tetsu Yoshida, Ken-ichiro Kuwako, Taisuke Miyazaki, Junji Yamaguchi, Ayumu Konno, Junichi Hata, Yasuo Uchiyama, Hirokazu Hirai, Masahiko Watanabe, Robert B. Darnell, Hideyuki Okano, Hirotaka James Okano, Elavl3 is essential for the maintenance of Purkinje neuron axons, *Scientific Reports*, 査読有, 8 巻, 2018, 2722

DOI : 10.1038/s41598-018-21130-5

Yoichiro Shinohara, Ayumu Konno, Nobutaka Takahashi, Yasunori Matsuzaki, Shoji Kishi, Hirokazu Hirai, Viral vector-based dissection of marmoset GFAP promoter in mouse and marmoset brains, *PLoS One*, 査読有, 11 巻, 2016, e0162023

DOI : 10.1371/journal.pone.0162023

[学会発表](計 6 件)

今野 歩, 渡邊 将, 星野 千秋, 篠原 洋一郎, 松崎 泰教, 平井 宏和, アデ

ノ随伴ウイルスによる遺伝子導入を介したリポ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), 2017.12.6、神戸

Ayumu Konno, Kazuma Hachisu, Hirokazu Hirai, In vivo evaluation of the shortened-WPRE in the cerebellum, 第40回日本神経科学大会, 2017.7.20, 神戸

Chiaki Hoshino, Masashi Watanabe, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, AAV9 vector-mediated production of mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 and electrophysiological analysis of that mouse, 第40回日本神経科学大会, 2017.7.20, 神戸

Nobutake Hosoi, Shuvaev N Anton, Hirokazu Hirai, Low concentration of a GABA_B receptor agonist improves motor performance in spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) model mice, 第40回日本神経科学大会, 2017.7.20, 神戸

Nobutake Hosoi, Masayuki Shichida, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Pros and cons of an AAV double infection method combined with the Tet system :An experimental study, Neuroscience 2017 (国際学会), 2017.11.11, ワシントン D.C. (アメリカ)

Masashi Watanabe, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Impaired synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses in AAV vector-based mouse model of spinocerebellar ataxia type 3, 第39回日本神経科学大会, 2016.7.20, 横浜

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学大学院医学系研究科脳神経再生医学分野ホームページ

<http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

赤色 cAMP 可視化蛍光タンパク質センサーの開発

<http://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/to pics/files/20170810pressrelease.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 宏和 (HIRAI, Hirokazu)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70291086

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

細井 延武 (HOSOI, Nobutake)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90543570

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

(4)研究協力者

松崎 泰教 (MATSUZAKI, Yasunori)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50738200