

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19393

研究課題名(和文) in vivoゲノム編集による長期的生物学的ペースメーカーの作成

研究課題名(英文) Pacemaker activity generated by in vivo genome editing

研究代表者

井原 健介 (IHARA, Kensuke)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：50770210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：徐脈性不整脈に対する機械的ペースメーカーによる治療は確立しており広く行われているが、その植え込みには手術侵襲・合併症リスクを伴う。また、その電池寿命のため手術を定期的に繰り返さなくてはならず、デバイスコストも生じる。これらのリスクを克服するため、我々は恒久的な効果が期待できるゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9を応用し、本研究の結果、生体内で生物学的ペースメーカーを作成する手法を開発した。その中で、より安定的なペースメーカー活動維持のための課題も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の心筋細胞においてCRISPR/Cas9を導入しゲノム編集を行うことで、非ペースメーカー細胞でもペースメーカー活動を誘導できることを初めて示した研究である。

高齢化社会において、徐脈性不整脈に対する機械的ペースメーカー治療は植え込み件数・交換件数ともに増え続け、その合併症リスク・デバイスコストに対する対応は社会的に急務である。その解決策として機械式ペースメーカーの改良だけでなく、全く違う治療アプローチの可能性を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：The current main therapy for bradycardia is electrical pacemaker implantation which has many problems due to its surgical procedure and device cost. To overcome them, one of the previously explored alternative therapy was biological pacemaker, however, its effect was transient so far. The purpose of this study is to generate permanently functional biological pacemaker utilizing genome editing tool CRISPR/Cas9, with which permanent effect can be expected.

We constructed CRISPR/Cas9 for Kcnj2 gene, of which gene knockout cause pacemaker activity, and injected it into the mouse heart muscle directly. CRISPR-injected hearts showed edited genome and pacemaker activity 1 month after injection. However, 6 months after injection, although genome editing was maintained, no pacemaker activity was observed. Finally, CRISPR/Cas9 for Kcnj2 can generate pacemaker activity in vivo, however, there are still hurdles to overcome for long term maintenance of pacemaker activity with this approach.

研究分野：循環器内科学、心臓電気生理学

キーワード：生物学的ペースメーカー ゲノム編集

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

1. 研究開始当初の背景

徐脈性不整脈に対するペースメーカー治療は、現在の医療では徐脈に対する唯一の治療法として確立されており、世界中広く施行され本邦でも年間約4万件の植え込み術と約2万件の交換術が施行されている(Circ J.2013;77:249)。

しかし、手術侵襲を伴い、また体内に異物を留置するという行為は合併症リスクを生じ、患者背景によっては施行が困難なこともありうる。またペースメーカーは電池寿命が存在し、定期的な手術リスク、デバイスコストから逃れられない。デバイス・技術が発達した最近の報告でもペースメーカー留置術では約5-10%の術中・術後合併症を生じ、さらに低侵襲と言われている交換術であっても約5%の合併症が生じ、稀ではあるが術関連死亡も生じている(Eur Heart J. 2014;35:1186)。さらに異物を体内に留置することにより、感染リスクが生じ、一度デバイス感染を生じると死亡率約10%と致命的となり、そのリスクはデバイスが体内に留置されている限り存在しうる(J Am Coll Cardiol.2007;49:1851)。

そのようなリスクを克服するため従来の機械的ペースメーカーではなく、主に遺伝子治療や細胞治療を用いた生物学的ペースメーカーの開発が試みられているが、その臨床応用にはまだ大きな障害がある。現状、アデノウイルスベクターを用いた *in vivo* の Tbx18 遺伝子導入は最も有望視される治療法の一つではあるが(Nat Biotechnol.2013;31:54)、それを含めいずれの治療法も一時的に *in vivo* でペースメーカー活動が得られても長期的にペースメーカー活動を維持できず、一時的ペースメーカーの代用にしかなり得ないという問題を抱えている。

一方で、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集という新たな技術が出現し、特に遺伝子のノックアウトに関しては、設計したCRISPR/Cas9のみの導入で高率にゲノム改変が得られる。この技術を *in vivo* で用いれば改変された生体内ゲノムはその後長期にわたり維持され、その効果は理論上“恒久的”であり長期的な薬物投与にとって代わると考えられている。効果が“恒久的”という特徴は上記のごとく生物学的ペースメーカーを作成するにあたって非常に合目的で、特にこの場合、心筋全体の均一なゲノム編集は必要なく心筋組織の一部細胞のみでゲノム編集できればよいため、徐脈性不整脈は *in vivo* ゲノム編集による疾患治療標的としてさらに都合がよいと考えられる。これらの背景から、この技術を生物学的ペースメーカー作成に応用し、“恒久的”生物学的ペースメーカーの作成することを着想した。

2. 研究の目的

本研究では proof-of-concept としてマウスにおいて CRISPR/Cas9 による Kcnj2 遺伝子の *in vivo* ゲノム編集を行い、生物学的ペースメーカーの作成が可能であることを証明し、それが長期的に維持されることを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では過去の報告ですでにノックダウンすることにより心筋細胞がペースメーカー細胞化することが証明されている Kcnj2(Nature.2002.419;132)を標的遺伝子として CRISPR を設計し全ての実験を行った。AAV 使用時は SaCas9 を、それ以外の vector 使用時は SpCas9 を使用した。

- (1) *in vitro* において新生仔マウス単離心筋細胞に CRISPR を搭載したアデノウイルスベクター(Ad-CRISPR-GFP)を投与して、ゲノム編集の有無と pacemaker 活動を確認した。
- (2) CRISPR を搭載した plasmid(pCRISPR-GFP)もしくはアデノ随伴ウイルスベクター(AAV-CRISPR)をマウスにおいて心筋注射による *in vivo* ゲノム編集の有無、効率を確認した。
- (3) 遺伝子導入を行ったマウスの摘出灌流心の完全房室ブロックモデルで光学マッピングを併用しつつ生物学的ペースメーカー活動の機能評価を行った。
- (4) (3)に関して長期的効果を評価した。

4. 研究成果

- (1) Kcnj2 を標的としたゲノム編集でペースメーカー活動が誘導できることを確認するため、新生仔マウス単離心筋細胞に Ad-CRISPR-GFP を感染させたところ、GFP 発現細胞にて有意に自動能の亢進をみとめた(図1)。
- (2) 当初は非ウイルス性遺伝子導入を目指し pCRISPR-GFP を用いて遺伝子導入効率および *in vivo* ゲノム編集効率をマウス心筋注射モデルで検討した。DNA 単体、カチオン性脂質やポリカチオンを用いた共導入を検討したところ、DNA 単体の直接投与で最も効率よく心筋細胞での GFP 発現・*in vivo* ゲノム編集をみとめ、DNA 単体心筋直接注射を行った心臓でペースメーカー活動の評価を行った。2週間後では40%のマウスでペースメーカー活動のみとめられたが、6か月後ではペースメーカー活動は全く見られなかった。組織学的評価を行ったところ、2週間後時点では GFP 陽性細胞は確認できたが6か月後には確認できず注射部位周囲に生じた炎症・線維化により遺伝子導入細胞が置換され消失したと考えられた。

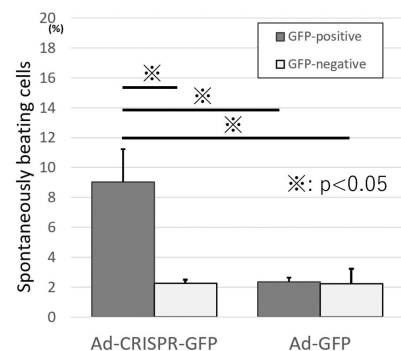


図1: CRISPRは新生仔マウス心筋細胞の自動能を亢進させる

- (3) ペースメーカーカ活動発現率が低いこと、長期効果を維持できないことを考慮し、pCRISPR-GFP による非ウイルス性遺伝子導入ではなく、ヒトでも使用可能なウイルスベクターである AAV を用いたウイルス性遺伝子導入による *in vivo* ゲノム編集を行うこととした。pCRISPR-GFP と比較して AAV-GFP による遺伝子導入効率の確認では GFP 発現細胞数は劇的に改善した。*in vivo* ゲノム編集効率も飛躍的に向上し(図 2)、投与後 1 カ月後における評価では投与全例においてペースメーカーカ活動が確認された(図 3)。

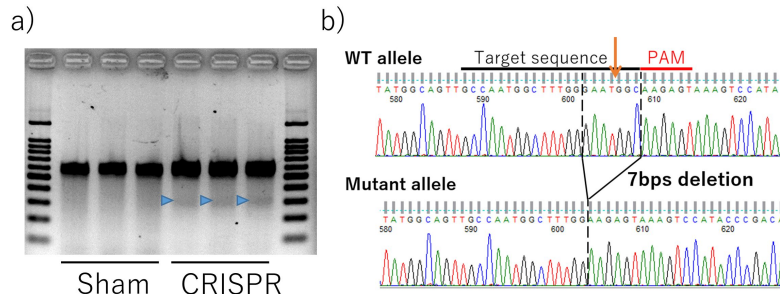


図2: AAV-CRISPR心筋注射後の心臓から抽出したゲノムDNAを用いた Cell I アッセイ(a)とシーケンス(b)による *in vivo* ゲノム編集の確認

- (4) CRISPR を用いて生物学的ペースメーカーカ作成を行う最大の動機はその効果の恒久性にあり、長期的にペースメーカーカ活動を評価したところ、AAV-CRISPR 投与 6 カ月後では、*in vivo* ゲノム編集 (*Kcnj2* *in vivo* ノックアウト)は維持されていたが、いずれのマウスにおいてもペースメーカーカ活動は確認できなかった。長期的な *Kcnj2* ノックアウトが心筋細胞の電氣的興奮性を変化させてしまった可能性が考えられた。本研究の結果として、CRISPR を用いた生物学的ペースメーカーカは作成可能であることを証明することはできたが、“恒久的”生物学的ペースメーカーカ作成を目的とした標的遺伝子として *Kcnj2* は不適当であったと結論した。今後の CRISPR を用いた生物学的ペースメーカーカ作成の課題として、本研究のような *in vivo* gene knockoutではなく、ペースメーカーカ遺伝子のノックイン戦略が必要と考えられ、そのための技術開発が重要であると考えられた。

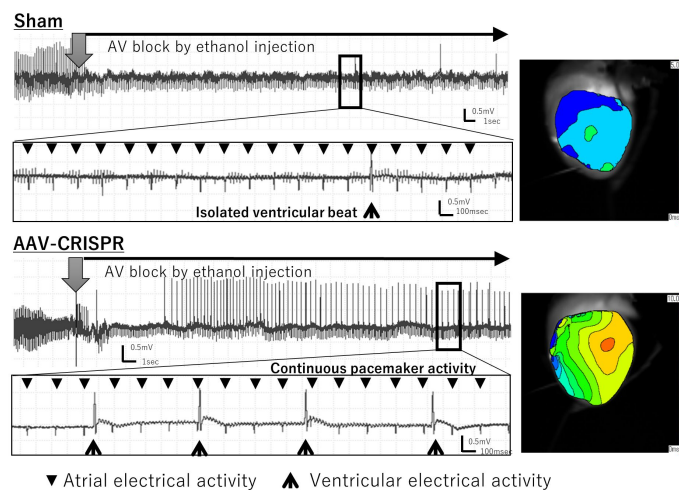


図3: 灌流心を用いた光学マッピングと CRISPRにより発現したペースメーカーカ活動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Ihara K, Sasano T, Yamazoe M, Furukawa T. Pacemaker activity generated by CRISPR/Cas9 based genome editing for *Kcnj2*. The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research. 奈良. 2018年9月

Ihara K, Sasano T, Takahashi K, Furukawa T. Pacemaker activity generated by *in vivo* genome editing. The 10th Asia-pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. 2017. Sep. Yokohama. Japan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：古川哲史
ローマ字氏名：FURUKAWA, tetsushi

研究協力者氏名：黒川洵子
ローマ字氏名：KUROKAWA, junko

研究協力者氏名：笹野哲郎
ローマ字氏名：SASANO, tetsuo

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。