

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09458

研究課題名(和文) 優性遺伝性網膜ジストロフィ iPS細胞を用いた遺伝子編集治療モデルの検討

研究課題名(英文) Gene editing treatment model using autosomal dominant retinal dystrophy iPS cell

研究代表者

村上 晶 (Murakami, Akira)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：90157743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性遺伝性(AD)網膜変性疾患(IRD)治療開発を目的として、GUCY2D遺伝子によるAD錐体杆体ジストロフィ患者由来iPS細胞の遺伝子編集を行い、優性阻害を起すアレルの遺伝子発現を特異的に抑制しうるモデルを作製した。病因変異を編集することなく、別の多型配列を利用しアレル特異的にフレームシフト欠損を導入することができた。この方法を応用しうる遺伝子異常をもつ症例を探索するために、130遺伝子についてIRD180症例のターゲットシーケンシング解析を行った。GUCY2D、RHO、CRX、PRPH2、RP1、SNRNP200、RP1L1、PRPF8遺伝子に優性阻害を起す変異を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

錐体ジストロフィに代表される遺伝性網膜変性の原因は遺伝子異常であり、ほとんど確立された治療法はない。病因となっている遺伝子機能の不足を補い代替する遺伝子治療が一部の疾患で有望な成果が得られている。しかし、常染色体優性遺伝を示すものの一部は遺伝子異常により網膜細胞に有害な転写産物ができているためこの方法は無効である。このような病態に対して患者血液細胞由来のiPS細胞を用いて正常な遺伝子の機能を損なうことなく、有害な働きをする遺伝子のみを働かなくするように遺伝子編集をおこなう方法を考案しモデルを作成した。また、多数の患者さんのゲノム解析を行い、この技術が応用しうる疾患遺伝子の候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：To develop effective gene therapy method for autosomal dominant inherited retinal degenerations (ADIRD) which caused dominant-negative effects (DNE) by abnormal gene, we have created iPS cell lines from a patient with autosomal dominant cone rod dystrophy caused by the GUCY2D gene variant(R838C). We developed the method for allele specific gene editing using CRISPER Cas9 system and made a frame shift deletion in the pathological allele specifically in the iPS cell from the patient.

We introduced NGS with a custom target panel of 130 genes for the molecular diagnosis of IRD and isolated the pathological variants which were presumed having DNE in GUCY2D RHO, PRPH2, CRX, RP1, RP1L1, SNRNP200 and PRPF8 gene. We are now attempting to apply the gene editing method for these variants and suppress DNE

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 黄斑ジストロフィ 錐体ジストロフィ 優性遺伝 遺伝子編集 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

遺伝性網膜変性疾患 (Inherited retinal degeneration: IRD) の多くは、生後から成人期に発症し生涯にわたり進行する疾患群である。それぞれは稀な疾患ではあるがほとんどは有効な治療が確立されておらず、先進国での視覚障害の原因として大きな比率を占めつつある。我が国においても、視覚障害による身体障害者手帳申請登録をもとに行われている推計で、IRD の代表疾患である網膜色素変性が緑内障について、原因疾患として 2 番目に多いものとなっている¹⁾。網膜色素変性は、網膜視細胞のなかでも杆体細胞 (暗所で優位に働き眼底の黄斑には少なく、黄斑周囲から中間周辺部にかけて高い密度で分布する) の機能障害が先行し夜盲と視野狭窄が現れ、明所で働く錐体細胞の機能障害は遅れて現れることが典型的である。一方、IRD のなかで錐体ジストロフィ (CD)、錐体杆体ジストロフィ (CRD)、黄斑ジストロフィ (MD) は、錐体の分布密度が高い黄斑の形態の異常をともなうことが多く、視力障害や色覚異常が先行する。ほとんどは単一遺伝子疾患で、遺伝的多様性をもつ疾患群であり、網膜以外の疾患をともなう症候性の IRD を含めると 270 以上の遺伝子が原因とされている²⁾。遺伝子治療は IRD の治療として最も有望で期待されるもの一つである。ウイルスベクターを用いた遺伝子補充療法が常染色体劣性 (AR) あるいは X 連鎖性 (XL) をしめす疾患の一部に対して臨床応用されている。一方、常染色体優性遺伝 (AD) をとる IRD の場合、1) 変異や構造異常をもつアレルの遺伝子の機能低下を正常のアレルではカバーし切れず生体の機能障害や細胞死を招くハプロ不全と、2) dominant-negative (優性阻害) により病的遺伝子産物が正常遺伝子の機能を阻害するものが主な病態と考えられている。2) ではゲノムの原因遺伝子の発現を抑制したうえで、遺伝子補充療法をおこなうことが計画されている。

2. 研究の目的

優性阻害により IRD をきたす病因アレルの遺伝子発現のみを遺伝子編集によって抑制する治療が可能かを検討する。

3. 研究の方法

AD をとる CD・CRD のひとつに、GUANYLATE CYCLASE 2D (*GUCY2D*) の変異でおこる Cone-Rod Dystrophy 6 (CRD6) がある。CRD としては比較的頻度が高く *GUCY2D* エクソン 13 のコドン 838 (CGC) 近傍に変異が比較的集中している³⁾。*GUCY2D* 遺伝子内のヘテロ接合バリエーションが ADCD、ADCRD (OMIM 601777 and 600977) の原因となる一方で両アレルの異常が生後まもなくから発症する網膜変性症 Leber 先天盲 (OMIM 204000) の原因であることは遺伝学的によく解析されており、家系内で欠失や null 変異をヘテロ接合もつものは眼症状がない。*GUCY2D* は membrane bound retinal guanylyl cyclase-1 protein (RetGC-1) をエンコードしており、錐体と杆体に発現しているが、より優位に錐体外節に発現している。先行研究により、このバリエーションを含む 18bp 塩基からなる塩基配列は他の角膜疾患をきたす *TGFBI* のバリエーションが存在するホットスポットと同一であることが観察されている。従って、この部位をターゲットした特異性をもった遺伝子編集は技術的に困難であると推定される。しかし、疾患の原因となるバリエーションの近傍で存在する一塩基多型 (SNP) が複数同定されている。病因となるバリエーションと同一アレルに存在する SNP が確認できれば、この SNP を gRNA の標的にすることで、変異型のアレルのみを CRISPR/Cas9 の標的とし、非相同組換えによって *GUCY2D* 変異体の発現を抑制する変異を導入することが可能と考えた。

(1) *GUCY2D* 遺伝子編集 iPS 細胞の作成

我々の研究で *GUCY2D* に R838C バリエーションを有する症例の induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞が作成されている。この細胞では、c.154G>T の SNP がヘテロ接合体で検出され、これを Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-CRISPR-associated protein 9 (Cas9) システムを用いて遺伝子編集を行い病的アレルのみの発現を抑制するモデルを作成した。gRNA、Cas9、ピューロマイシン耐性遺伝子を発現するプラスミド PX459_V2 (Plasmid #62988 Addgene) を用いて、ターゲットとする部位の DNA 配列を挿入し PX459_V2_g*GUCY2D* を作製⁴⁾、エレクトロポレーション法で iPS 細胞に導入した。遺伝子編集をうけた iPS 細胞の取得を、薬剤耐性選択クローニングを行い、細胞のゲノム解析を行った。目的とする未成熟停止コドンの挿入が得られた iPS 細胞から網膜オルガイドを作成し神経網膜細胞へと分化させ視細胞に特異的に遺伝子発現の解析を行った。

(2) ADRP, ADCD, ADCRD 症例について、カスタム作成した網膜変性疾患遺伝子解析パネルを用いて遺伝子解析を行い、優性阻害が起こすバリエーションの探索を行い、新たな遺伝子編集モデルの検討をおこなった。解析は主に次世代シーケンサー Ion Torrent™ system を用いて、IRD の原因となる 130 遺伝子の解析を行った。

4. 研究成果

(1) PX459_V2_g*GUCY2D* を発現するプラスミドを取り込んだ細胞株をクローニングし、ゲノムの配列解析を行った。親株では c.154G>T の SNP がヘテロ接合で認められる (図 1A)。この SNP を含む 20 塩基を標的配列と矢印の箇所で Cas9 による切断が生じさせ、非相同組換えによってこの前後に編集をおこなった細胞株を選択した。ターゲットとした SNP を含む部分ゲノム

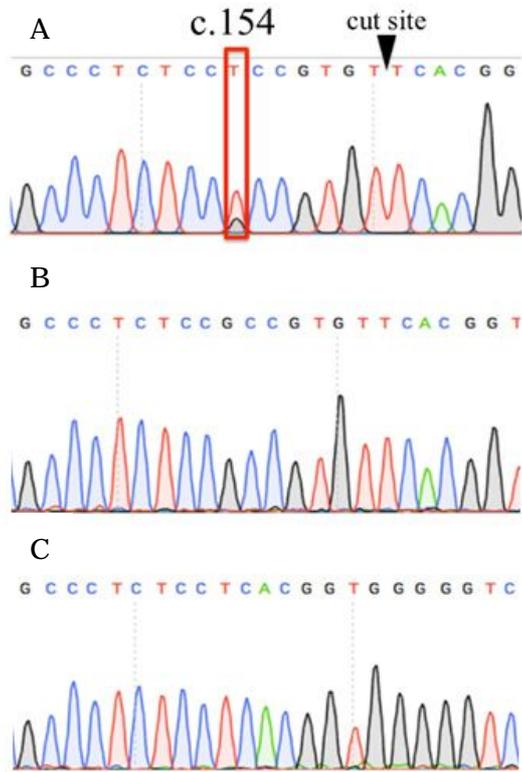


図1 *GUCY2D* c.154G>T 近傍の塩基配列

を鋳型とする PCR 産物のクローニングを行い、塩基配列解析を行った。c.154_G をもつプラスミッドクローンでは遺伝子編集をうけておらず正常の *GUCY2D* の塩基配列が確認された(図1B)、変異型アレルのプラスミッドクローンでは c.154_T の配列が確認され Cas9 の切断部位付近で7塩基の欠失が認められ、この欠失によりリーディングフレームのシフトが生じる未成熟終止コドンが確認された。同様の確認を行い複数のクローンを分離し、これらの細胞から、網膜オルガノイド作成を開始した。

定量化 RT-PCR 解析, RNA シークエンス法など用いて遺伝子発現をおこなう計画を実施するため *GUCY2D* 変異をもたないコントロール iPS 細胞を網膜細胞に分化させたのち、予備的におこなった解析では、*GUCY2D* の発現までには長期に培養を維持する必要がある、安定して発現量を解析することが困難であった。一連の網膜オルガノイドの作成、機能解析を安定して行うための研究基盤の整備に時間を要している。近年、網膜オルガノイドを用いた single cell RNA 解析の報告が相次いでおり、研究協力者とともに *GUCY2D* 編集モデルの再解析を行う予定である。

(2) ADRP,ADCD,ADCRD 症例の遺伝子解析と原因バリエーションの同定をおこな

った。

RP, CD,CRD の原因遺伝子のなかで、前述の概念実証が可能な遺伝子バリエーションの探索を開始した。180 症例の IRD の解析を行い、遺伝形式として AD をとると推定される原因遺伝子のバリエーションをもつ 22 症例(18 家系)が同定された⁵。その内訳は、新たに *GUCY2D* (2)、*RHO* (3)、*PRPH2* (3)、*CRX* (3)、*RP1* (3)、*RP1LI* (2)、*SNRNP200* (1)、*PRPF8* (1)であった(括弧内家数)。このうち約 30%は優性阻害によるものと推定された。新たに同定された *GUCY2D* のバリエーションは c.2512C>T (p.R838C)と c.2513G>A (p.R838H)とが検出され、コドン 838 近傍の SNP の解析を行ったが、病因バリエーションのアレルを区別する SNP は coding 領域には検出されなかった。今後、イントロン内の SNP の解析を行う予定である。

参考文献

1. Morizane Y, Morimoto N, Fujiwara A, Kawasaki R, Yamashita H, Ogura Y, et al : Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn J Ophthalmol*63:26-33.2019
2. Hamel CP. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis.* 2007 Feb 1;2:7. doi: 10.1186/1750-1172-2-7. PMID: 17270046; PMCID: PMC1808442
3. Weigell-Weber M, Fokstuen S, Török B, Niemeyer G, Schinzel A, Hergersberg M. Codons 837 and 838 in the Retinal Guanylate Cyclase Gene on Chromosome 17p: Hot Spots for Mutations in Autosomal Dominant Cone-Rod Dystrophy? *Arch Ophthalmol.* 2000;118(2):300. doi:10.1001/archophth.118.2.300
4. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281-308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. Epub 2013 Oct 24. 10.1038/nprot.2013.143
5. Nishiguchi KM, Kunikata H, Fujita K, Hashimoto K, Koyanagi Y, Akiyama M, Ikeda Y, Momozawa Y, Sonoda KH, Murakami A, Wada Y, Nakazawa T: Association of *CRX* enotypes and retinal phenotypes confounded by variable expressivity and electronegative electroretinogram. *Clin Exp Ophthalmol* 48: 644-657, 2020, doi: 10.1111/ceo.13743.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwagawa T, Aihara Y, Umutoni D, Baba Y, Murakami A, Miyado K, Watanabe S. .	4. 巻 61
2. 論文標題 Cd9 Protects Photoreceptors from Injury and Potentiates Edn2 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.61.3.7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高 丹、平方寿彬、村上 晶
2. 発表標題 CRX遺伝子バリエントが認められた黄斑ジストロフィ
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上 晶
2. 発表標題 眼科遺伝学 分子遺伝学と難治性眼疾患治療への展開
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	新井 英介 (Arai Eisuke) (60568210)	順天堂大学・医学部・非常勤助教 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	渡邊 すみ子 (Watanabe Sumiko) (60240735)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関