

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15288

研究課題名(和文) ゲノム編集治療の安全化に向けた修復用DNAのオフターゲット組込みの制御

研究課題名(英文) The regulation of off-target insertion of donor DNA in therapeutic genome editing

研究代表者

新田 洋久(Nitta, Hirohisa)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：60808690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子修復治療技術の長期的な効率性と安全性の評価のためにマーマセットを用いることを目標として、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子修復治療技術を確立させた。ゲノム編集技術を用いたドナー配列の相同組み換え効率は目標値を達成し、未分化性も維持されていることが確認できた。CIRCLE-seq法を用いてオフターゲット領域を確認したが、遺伝子機能を欠損させる領域は検出できなかった。安全な遺伝子修復治療技術の開発として、ドナー配列に新しい自殺遺伝子*iCaspase9*を組み込むことにより、ドナー配列が目的と異なる部位に挿入することを抑制させることが可能であると確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術を用いて正しい位置に正常遺伝子(ドナー配列)を導入して、変異遺伝子を正常遺伝子に置き換える遺伝子修復治療が可能となった。常染色体優性遺伝病の治療は遺伝子修復治療のみ治療効果が期待できるが、CRISPRが標的以外の類似配列を切断するオフターゲット変異、ドナー配列の標的領域以外への挿入などの安全性の問題点がある。本研究では、長期的な効率性と安全性の評価のためにマーマセットを用いることを目標として遺伝子修復治療技術を確立させた。同時に、ドナー配列に新しい自殺遺伝子を組み込むことにより安全な遺伝子修復治療技術の開発を行なった。これらの成果は遺伝子修復治療技術の発展に結びつく。

研究成果の概要(英文)：In order to carry out safe therapeutic genome editing, an attempt was made to establish a highly efficient and safe technique using human hematopoietic stem cells for therapeutic genome editing using X-linked severe combined immunodeficiency marmoset. As a result, it was confirmed that the homologous recombination efficiency reached the target value and the undifferentiated state was maintained. The off-target sites were confirmed by using the CIRCLE-seq method, but the sites at which the gene function was lost could not be detected. At the same time, I attempted to develop a technique for removing cells in which the donor sequence was inserted at a site different from the target. Suicide gene *iCaspase9* incorporated into the donor sequence reduced the rate of cells with non-homologous recombination.

研究分野：遺伝学

キーワード：遺伝子修復治療 遺伝子治療 ゲノム編集 造血幹細胞 CIRCLE-seq *iCaspase9*

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集はゲノム DNA を容易に切断して配列を変換できる技術だが、外来遺伝子 DNA を同時に細胞内に導入すると高効率で目的の場所に挿入もしくは置換できる。この技術を用いて、変異遺伝子を正常遺伝子に置き換える遺伝子修復治療が可能となった。ゲノム上の正しい位置に外来遺伝子を導入することにより、がん遺伝子の異常発現を回避できると期待されている。そして、病因遺伝子のドミナントネガティブ型の変異により疾患を引き起こすような、常染色体優性遺伝病は遺伝子修復治療によってのみ治療効果が期待できる。

遺伝子修復治療における安全性の問題点は以下の点があげられる。

CRISPR が標的配列以外の類似配列を誤認して切断するオフターゲット変異の危険性

それ以上の頻度で正常遺伝子 (ドナー配列) が標的以外の部位に挿入されてしまう危険性

特にドナー配列の問題はオフターゲット変異の問題と比較して一般に認識されていないが、この問題を解決することは遺伝子修復治療技術の発展に欠かせないことだと考えられる。

例えばアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを治療目的でマウスの静脈に注入すると、全肝細胞の 20% という高頻度で AAV のゲノムがランダムに組み込まれてしまう。

また、最終的な効率性と安全性の評価はモデル動物としてマウスが用いられることが多いが、寿命が短いために長期的な評価は難しい。遺伝子修復治療をヒトに応用するためには、さらに安全性を改善する技術の開発と、長期的な治療効果の評価方法が必要である。

### 2. 研究の目的

世界初の霊長類モデル動物での遺伝子修復治療技術を目指し、遺伝子修復の安全性を改善する新技術を開発することを目的とする。

実験動物中央研究所との共同研究により X 連鎖重症複合免疫不全症モデルマーマモセット (*IL2RG* 遺伝子ノックアウトマーマモセット) を用いて、世界初となる霊長類の遺伝子修復治療を行う。そのために、ヒトおよびマーマモセットの造血幹細胞を用いて高効率で安全性の高い遺伝子修復治療の技術を確立させる試みを行う。

同時に、安全な遺伝子修復を行うためにドナー配列が目的と異なる部位に挿入された細胞を除去する技術を開発することにより、遺伝子修復治療技術を発展させる。

### 3. 研究の方法

#### 1、ヒトの造血幹細胞を用いた、CRISPR とドナー配列の検証

正常配列を効率良く安定に組み換えるためには、ゲノム編集技術を用いて変異部位近傍を効率良く切断することと、感染効率の良いウイルスベクターを用いてドナー配列を細胞内に導入することが必要である。

予備実験で、レポーター遺伝子を組み込んだ K562 細胞を用いて CRISPR の切断効率の測定を行い、目標部位のゲノム DNA を切断する CRISPR タンパク質、ヒト・マーマモセット共通のガイド RNA の組み合わせの中から切断効率の良いものを決定した。CRISPR タンパク質 SpCas9 を用いた組み合わせが最も切断効率が高かった。さらに AAV ベクターを用いて Venus レポーター遺伝子を含んだドナー配列を CRISPR プラスミド (SpCas9 とガイド RNA) と共に野生株 K562 細胞に導入して 3 週間培養して組み換え効率を測定した。切断効率の高い CRISPR はドナー配列の組換え効率も高く、約 30% の細胞で相同組み換えを達成した。

本研究では、ヒト造血幹前駆細胞 (CD34 陽性細胞) を用いて *IL2RG* 領域のゲノム編集を行い、ドナー DNA を用いてその部位の遺伝子修復を行った。CD34 陽性細胞に電気穿孔法で CRISPR を RNP (Ribonucleoprotein) の形で導入して、直後に AAV ベクターを用いて Venus レポーター遺伝子を含むドナー DNA を感染させた。15 日間培養して相同組み換えが起きた細胞を Venus 陽性細胞の割合で測定した。

それと並行して、安全性を確認するためのオフターゲット変異の確認を行った。CIRCLE-seq 法は断片化したゲノム DNA を環状にして、CRISPR タンパク質を試験管内で反応させることにより切断部位を同定する手法である。大規模シーケンスすることによりゲノムワイドに切断部位を同定できる。この手法を用いて、オフターゲット変異ががん抑制遺伝子や造血に必要な遺伝子を破壊していないか確認した。

#### 2、自殺遺伝子を用いた遺伝子修復の安全性向上

遺伝子修復治療における安全性の改善を行うために、ドナー配列に自殺遺伝子を組み込むことによって染色体上のランダムな位置に挿入されてしまった細胞を除外することを目指した。ドナー配列による標的部位での相同組み換えが想定通りに起これば自殺遺伝子は細胞のゲノムに組み込まれることはない。しかし、標的部位以外に非相同末端結合でドナー配列全体が組み込まれた場合には自殺遺伝子が活性化し、細胞死を誘導できるようになる。AAV ベクターは 4.7 キロ塩基対までの長さの配列しか運ぶことができないので、長いドナー配列を利用するために自殺遺伝子の配列はできる限り短いものを選ぶ必要がある。新規の自殺遺伝子の候補として、アポトーシス誘導遺伝子 *iCaspase-9* を選択した。Venus レポーター遺伝子と *iCaspase-9* 遺伝子を組み込んだドナー配列を AAV ベクターに挿入し、K562 細胞に CRISPR と共に導入して遺伝子修復を行った。 *iCaspase-9* は AP20187 というダイマライザーを加えると活性を持つので、薬剤を加えた後

に6日間培養して非相同組み換えが起きた細胞を Venus 陽性細胞の割合で測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1、ヒトの造血幹細胞を用いた、CRISPR とドナー配列の検証

ヒト造血幹前駆細胞 (CD34 陽性細胞) を用いた遺伝子修復の効率は、CRISPR とドナー配列の導入後に 15 日間培養してから相同組み換えが起きた細胞を Venus 陽性細胞の割合で測定すると 38%だった (図 1)。造血幹細胞コロニーアッセイ (CFU アッセイ) を行い、遺伝子修復を行った CD34 陽性細胞と野生型 CD34 陽性細胞で未分化性を確認したところ、大きな変化は見られなかった。CFU アッセイのコロニーからゲノム DNA を抽出して遺伝子修復の割合を確認すると、相同組み換えが 40%、挿入欠失が 16%、野生型が 44%だった。結果としてヒト造血幹前駆細胞への相同組み換えの効率は目標値を達成し、未分化性も維持されていることが確認できた。

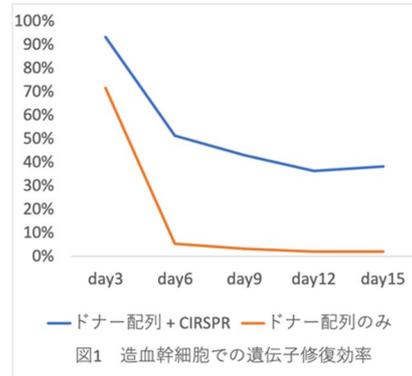


図1 造血幹細胞での遺伝子修復効率

ゲノム編集によるオフターゲット効果の検証では、CIRCLE-seq 法を用いてゲノムワイドにオフターゲット領域の検出を行い、*UTRN*、*NEURL1*、*ABHD2*、*TAZ*などの遺伝子のイントロン中にオフターゲット領域の候補を検出した。遺伝子機能を欠損させうるオフターゲット領域は検出できなかったため、用いたガイド RNA 配列は *IL2RG* 遺伝子ノックアウトマーカーモセットの遺伝子修復治療に安全に用いることが可能であると確認できた。

##### 2、自殺遺伝子を用いた遺伝子修復の安全性向上

自殺遺伝子 *iCaspase9* が組み込みこまれたドナー配列を CRISPR タンパク質と共に K562 細胞に導入し、AP20187 を加えた条件と加えない条件で6日後の Venus 陽性細胞の割合を比較した。その結果、AP20187 を加えた条件では陽性細胞は 9%、加えない条件では 20%だった (図 2)。以上のことから、*iCaspase9* 遺伝子組み込みドナー配列を用いることにより、非相同組み換えが起こった細胞の割合を低下させることが可能であることが確認できた。

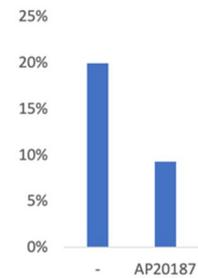


図2 *iCaspase9*による細胞死誘導

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----