

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19599

研究課題名（和文）モザイク状体性遺伝子変異に起因する血管奇形動物モデルの開発

研究課題名（英文）Development of animal vascular malformation model with somatic mosaicism

研究代表者

岡崎 睦（OKAZAKI, MUTSUMI）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50311618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：体表・軟部組織の血管奇形の病態解析、治療的介入方法の開発のため、「Creリコンビナーゼの作用時期調整」、「複数のLoxP配列を用いた確率論的な変異遺伝子の組み換え」、「ゲノム編集」を組み合わせて用いたシステムのデザインを進め、pUC19ベクターにクローニングしたマウスゲノム配列上に、クローニング作業を進めた。また、in vivoでマウスの血管内皮細胞のゲノムを編集する方法として、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)に着目し、野生型の状態で血管内皮細胞に最大の指向性を有するカプシドを明らかにし、指向性にかかわる部位にバリエーション配列を導入するための改変カプシドプラスミドを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体表・軟部組織の血管奇形は、従来、血管腫として呼ばれていた疾患群であり、特に広範な病変を有する症例においては整容的、機能的障害に加えて疼痛、出血などの症状を呈することから終生にわたって、外科的治療や血管内治療を繰り返す必要があり、既存の治療には限界がある。本研究によって開発した技術は、実際の症例に即した動物モデルを作成し、変異を有する病変内のゲノムを修復する、新しい治療開発を進める礎となる。

研究成果の概要（英文）：An inducible genome editing system, composed of multiple LoxP sequences, cis-Cre recombinase, and CRISPR/Cas9 sequences was constructed on C57BL/6 wildtype mouse Rosa26 locus cloned on pUC19 vector for the development of soft tissue vascular malformation animal models. In order to make a new Adenovirus Associated Vector (AAV) capsid optimized for the gene delivery to murine endothelial cells in vivo, transduction efficiency of 9 known AAV serotypes was assessed in a new in vitro tissue transduction model. For the AAV5, a best backbone capsid selected by our analysis, revised peptide display capsid was prepared for the future directed evolution.

研究分野：形成外科

キーワード：血管奇形 遺伝子治療 ゲノム編集 動物モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体表・軟部組織の血管奇形は、従来、血管腫として呼ばれていた疾患群であり、外観・整容的な面で患者の QOL を損なうのみならず、運動障害、機能障害の原因となる。凝固障害を伴う出血を呈する症例においては致命的機転を来すこともある重篤な病態である。特に広範な病変を有する症例においては整容的、機能的障害に加えて疼痛、出血などの症状を呈することから終生にわたって、外科的治療や血管内治療を繰り返す必要があり、厚生労働省の指定難病として診断・治療法の最適化が図られているが、既存の治療には限界がある。対して、この 20 年間にわたり、臨床症例・家系のゲノム解析により、低流量血管奇形における TIE2 の活性化突然変異 (Vikkula et al. Cell 1996;87:1181-90)、一部の毛細血管奇形動静脈奇形症候群における RASA1 遺伝子の突然変異 (Eerola et al. Am J Hum Genet. 2003;73:1240-9)、より近年では Sturge-Weber 症候群における GNAQ の体性遺伝子変異 (NEJM 2013; 368:1971-9) など、病因と考えられる遺伝子異常が数多く指摘されるようになってきた。次世代シーケンス技術の発展とともに、今後より多くの病因変異が同定されていくことが期待されるが、現在までのところ遺伝子異常と表現型との関連・病態生理をつなぐよい動物モデルがない。

### 2. 研究の目的

本研究では、体表・軟部組織の血管奇形の病態生理を再現する動物モデルを開発し、同時に独自に開発を進める「アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた生体内ゲノム編集法」によって、体性突然変異を原因とする血管奇形の変異遺伝子を修復し、難治性病態の治療を図る治療的介入方法を開発、局在性の病変内の細胞・組織の突然変異を修復することによって、周囲健常組織に対する障害なく、根治性の高い治療を提供しうる革新的な治療的介入法開発の礎を築くことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 発生過程から遺伝子異常をもった血管奇形動物モデルの開発

本研究では、体表・軟部組織の血管奇形 (Vascular Malformation) の病態解析、治療的介入方法の開発を目的として、「モザイク状に体性遺伝子変異を発現する動物モデル」の作成を目指した。これを進めるために、「Cre リコンビナーゼの作用時期調整」、「複数の LoxP 配列を用いた確率的な変異遺伝子の組み換え」、さらに「CRISPR/Cas9 によるゲノム編集」を組み合わせ用いたシステムのデザインを進めた。

#### 2) in vivo で血管内皮細胞のゲノム編集を行うための AAV の開発

in vivo で血管内皮細胞へのゲノム編集を行い動物モデルを作成し、変異を有する細胞の変異を修復する手段を確立するため、CAG プロモーター下に GFP を発現する 9 種類の AAV (AAV1/2/3/4/5/6/8/9/DJ) を作成し、24well プレートに組織培養したマウス鼠径部由来動静脈組織に感染実験を行い、血管内皮細胞における GFP 発現を調べた。

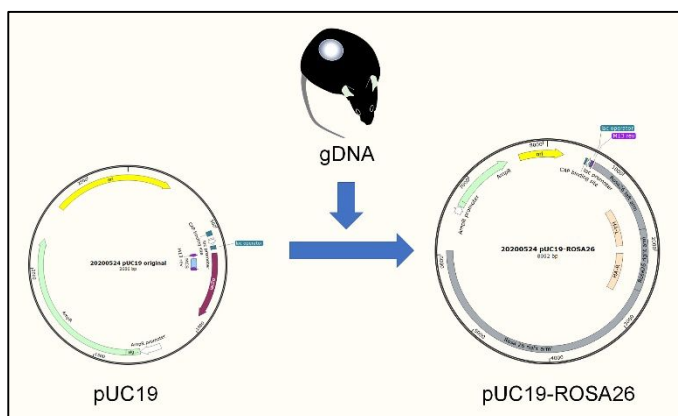
#### 3) 定方向進化による指向性の最適化を行うための改変 AAV5 カプシドプラスミドの作成

AAV1/2/3/4/5/6/8/9/DJ の中で最大の遺伝子導入効率を有する AAV5 の血管内皮細胞に対する指向性の更なる向上を目して定方向進化法によるカプシド改変を進めるために、AAV の指向性にかかわるヘパリン結合領域にペプチドディスプレイ配列を組み込むため、AAV5 カプシドプラスミドの mutagenesis を行った。

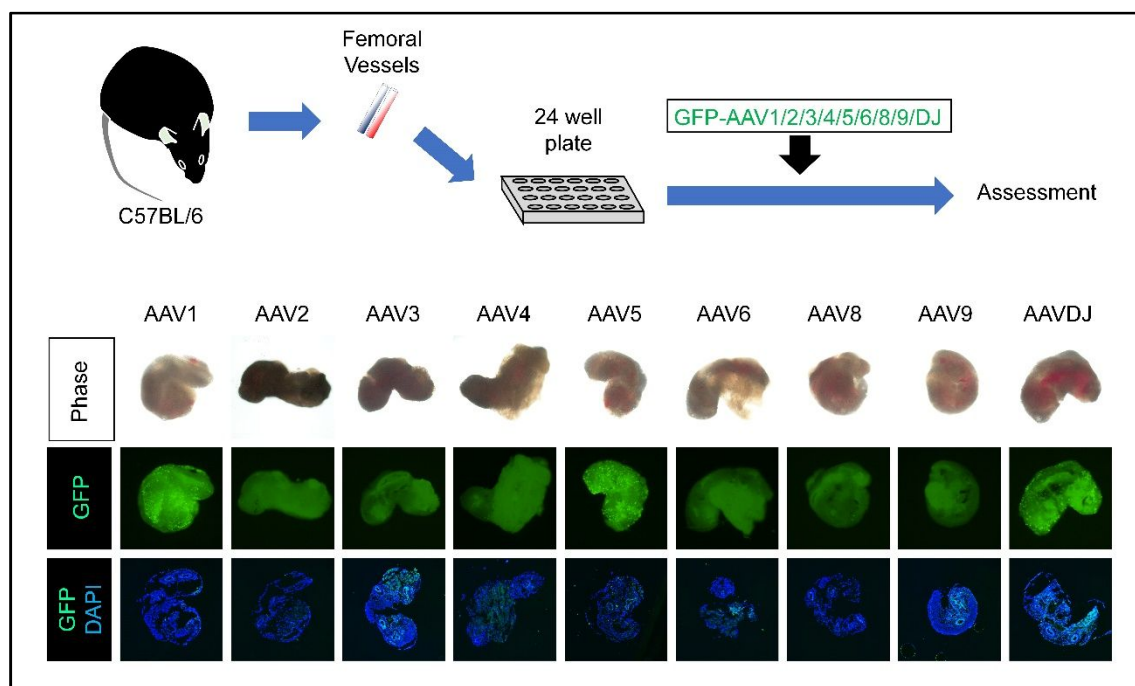
4) 効率のよい定方向進化法を進めていくためには、高いバリエーションを有するウイルスライブラリが必要となる。ランダム化したオリゴ配列をウイルスカプシドバックボーンプラスミドに挿入し、大腸菌に形質転換する、一連の操作について最適化を進めた。バックボーンプラスミドの制限酵素処理法、プラスミド回収法、ランダム化したオリゴ配列の作成法、バックボーンプラスミドとランダム化オリゴ配列のライゲーション酵素と反応条件、ライゲーション産物の抽出法、形質転換する大腸菌株、について検討を行った。

#### 4. 研究成果

1) 野生型マウス組織からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として、全身の細胞で普遍的に発現を得やすい Rosa26 遺伝子座領域を PCR 増幅した上で、代表的なクローニングベクターである pUC19 ベクターにクローニングした。同遺伝子配列中に、tet-O プロモーター、Cre-loxP 配列、CRISPR/Cas9 配列を組み合わせた配列の最適化・クローニング作業を進めている（下図）。



2) in vivo で血管内皮細胞へのゲノム編集を行い動物モデルを作成し、変異を有する細胞の変異を修復する手段を確立するため、in vivo において血管内皮細胞へ最大限の遺伝子導入効率を達するアデノ随伴ウイルスベクターの開発に着手した。まず、既存の AAV カプシドの中で組織としての構造をもった血管内皮細胞に対して最大の遺伝子導入効率を有する AAV を選択するため、CAG プロモーター下に GFP を発現する 9 種類の AAV (AAV1/2/3/4/5/6/8/9/DJ) を作成した。24well プレートに組織培養したマウス鼠径部由来動静脈組織に感染実験を行い、血管内皮細胞における GFP 発現を調べた結果、AAV5 が最大の遺伝子導入効率を有していることを明らかにした（下図）。



3) AAV5 配列のヘパリン結合領域に 3 段階の mutagenesis を行い、SfiI による制限酵素処理を行うことによってランダム化したペプチドディスプレイ配列をクローニングすることができる改変 AAV5 カプシドプラスミドを作成し、シーケンスを確認した（下図）。in vivo 定方向進化用の改変 AAV カプシドプラスミドが完成した。

|             |   |
|-------------|---|
| AAV5オリジナル配列 | CAGATGGCCA/CCAACAACCAGAGCTCCACCAC <b>TGCCCCCGCGACCGGCACGTAC</b> /AACCTCCAGG             |
| Primer 1    | <b>CCAACAACCAGAGCGGCCAAAGAGGCCATGCCCCGCGACCGGCACGTAC</b>                                |
| Mut後1       | CAGATGGCCA/CCAACAACCAGA GCGGCCAAAGAGGCCATGCCCCGCG <b>ACCGGCACGTAC/AACCTCC</b>  AGG      |
| Primer 2    | <b>GCGGCCAAAGAGGCCAAGGCCAAGCGGCCACCGGCACGTACAACCTCC</b>                                 |
| Mut後2       | CAGATGGCCA/CCAACAACCAGA GCGGCCAAAGAGGCCAAGGCCAAG <b>GCGGCCACCGGCACGTAC/AACCTCC</b>  AGG |
| Primer 3    | <b>CCAGAGCGGCCAGAGAGGCCAAGGCCAGGCGGCCACCGGCA</b>  |
| FINAL       | CAGATGGCCA/CCAACAACCAGAGCGGCCAGAGAGGCCAAGGCCAG <b>GCGGCCACCGGCACGTAC/AACCTCCAGG</b>     |

4) 各プロセスを最適化することによって、文献的に記載のある以上の効率で、大腸菌への形質転換を行うことが可能となった。作成されたライブラリにおいて、ランダム化配列のバリエーションが保持されていることを確認した（加藤基，栗田昌和，岡崎睦、第 28 回日本形成外科学会基礎学術集会）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>加藤 基, 栗田 昌和, 岡崎 睦                           |
| 2. 発表標題<br>高いバリエーションを有するアデノ随伴ウイルスカプシドライブラリプラスミド作成法の最適化 |
| 3. 学会等名<br>第28回日本形成外科学会基礎学術集会                          |
| 4. 発表年<br>2019年～2020年                                  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 栗田 昌和<br><br>(KURITA MASAKAZU)<br><br>(20424111) | 東京大学・医学部附属病院・助教<br><br><br><br>(12601) |    |