

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06476

研究課題名(和文) ゲノム編集用一体型アデノベクターとヒト型マウスの開発による遺伝子治療モデルの構築

研究課題名(英文) Development of CRISPR/Cas9-based gene therapy mouse models using all-in-one adenovirus knock-in vectors

研究代表者

中西 友子 (Nakanishi, Tomoko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10344863

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)：先天性代謝異常症は100以上あり、いずれも未だ難治の疾患である。我々は、アデノウイルスベクター(AdV)の搭載可能DNA量が他のウイルスベクターと比較して大きい特徴を活かし、先天性代謝異常の一つであるフェニルケトン尿症(PKU)を標的として、Cas9 nickaseとガイドRNA、ドナーDNAを搭載したトリプル一体型AdVや、ドナーDNAをAdVから切り離すことが可能な切出し型AdVなど独自のノックイン治療AdVを開発した。また、これらのAdVをPKU新生仔マウスに接種することで、肝臓でのin vivoノックインが可能なシステムを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ノックイン治療モデルでよく使われているアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、搭載可能DNAが4kbと小さく、大きなSpCas9遺伝子や4kbを超えるドナーDNAを利用することができない。一方、アデノウイルスベクター(AdV)は最大8kbまで搭載可能であり、我々は複数のガイドRNAを同時に発現させるAdVの作製に成功している。これらの長所を活かしたノックイン治療ベクターやモデルシステムは、代謝異常疾患のみならず様々な遺伝病にも利用可能であり、がん治療やiPSを用いた再生医療など多くの分野への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Phenylketonuria (PKU), caused by recessively inherited phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency, is one of the most common inborn errors of metabolism and results in hyperphenylalaninemia. Adenoviral vectors (AdV) can hold large amount of foreign DNA compared to other viral vectors. Taking advantage of this property, we have developed a triple all-in-one AdV carrying all components necessary for knock-in, such as Cas9 nuclease, guide RNAs, and donor DNA that can target PAH. We also designed an excision-type AdV that can separate the donor DNA from the AdV. By inoculating these AdVs to PKU neonatal mice, we established an in vivo knock-in system in liver.

研究分野：ウイルス学、発生工学

キーワード：ゲノム編集 アデノウイルスベクター フェニルケトン尿症 ヒト型 CRISPR/Cas9 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

先天性代謝異常症には 100 以上の疾患があり、これらの疾患では生命の維持に必須なアミノ酸や糖を始めとした物質の代謝が行えない。そのため、子どもの発達を阻害し命に関わる病気であるが、一部の疾患で食事の対症療法、骨髄・肝移植、遺伝子治療が効果を上げているのみであり、いずれの治療法にも多くの課題が残されている。我々はこれまでに、先天性代謝異常症の中でも頻度が高いフェニルケトン尿症 (PKU) を標的として、非増殖型アデノウイルスベクター (AdV) を利用して正常遺伝子を強制発現させることで治療モデル系を構築している [1] が、治療効果は数週間であり治療には不十分であった。

CRISPR/Cas9 技術は、標的となるゲノムの部位に DNA 2 本鎖切断を起こすことで様々な遺伝子を編集できるものであり、遺伝性疾患の根治につながる治療法として期待が寄せられている。我々は、複数のガイド RNA や Cas9 酵素を発現する AdV を独自に開発し、AdV を静脈内投与すると 90% 以上の肝臓細胞に AdV が感染する特徴を活かし、マウス肝臓で遺伝子破壊やノックインが可能であることを見出ししてきた。本研究では、アデノウイルスベクター (AdV) の搭載可能 DNA 量が他のウイルスベクターと比較して大きいことを利用して、安全で効率の良い遺伝子治療用ベクター開発のための技術基盤を構築することで、ヒトへの応用の可能性を探る。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 では、標的と近い配列をもつ部位においても 2 本鎖切断が起こるオフターゲット効果の存在が、この技術をヒトへ応用する際のボトルネックの一つになっている。また、Cas9 遺伝子が大きく治療用のドナー DNA など同一のウイルスベクターに搭載することが難しいため、複数ベクターを共感染させる必要があり、非効率なゲノム編集の要因の一つとなっている。

最近我々は DNA の搭載可能量を更に増やした AdV の開発に成功し (特願 2018-179274) この技術を利用して、すでに、Cas9 の変異体である Cas9 nickase と 2 つのガイド RNA を用いてきわめて近接した両鎖にニックを入れるダブルニックング切断を行う安全で独自性の高いアデノベクターを開発している (基本技術 特願 2014-242914) 。本研究では、PKU の原因遺伝子である変異 Pah 遺伝子を正常に戻すために、Cas9 酵素、ガイド RNA、ドナー DNA を搭載する一体型 AdV を開発し、PKU モデルマウスに接種することで、マウス肝臓における *in vivo* 遺伝病治療モデルシステムを構築することを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) アデノベクターの作製と精製

一体型アデノベクターの開発に向けて、きわめて近接した両鎖にニックを入れるダブルニックング切断を行う安全で独自性の高いアデノベクターとして、Cas9 酵素や複数のガイド RNA を同時に発現するベクターを開発した [2-4] 。一体型アデノベクターは、Cas9 の発現を抑制した改良 293 細胞を用いて作製した。常法に従い、コスミド DNA を改良 293 細胞にトランスフェクションしたのち 96 穴プレートに播種しクローンを得た。アデノゲノムの構造を確認した後、正常なものをスケールアップし、培養細胞の感染に使用した。マウスへのアデノベクター投与には、塩化セシウムの 2 回の密度勾配遠心法により、精製したものをを用いた。力価は rVT 法により測定した [5] 。

(2) PKU マウスの凍結受精卵の作製

PKU モデルマウスは自治医科大学 久米晃啓教授より供与いただき、普通の固形餌 (MF) で飼育を行った。PKU マウスのオスは妊孕性があるが、メスは妊孕性がない。そこで、PKU マウスの新生仔を効率よく得るために、PKU マウスのオスとメスの配偶子を用いて体外受精を行い PKU マウスの受精卵を凍結保存した。PKU マウスの新生仔を実際に使用する際には、凍結受精卵を融解し偽妊娠マウスに移植することで、出生日の同じ PKU マウスを得た。

(3) マウスへのアデノベクターの接種と解析

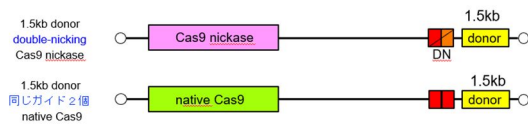
アデノベクターは、 4×10^8 pfu を PKU モデルマウスの新生仔の顔面静脈より投与した。6 週令で尾静脈より採血し、血中フェニルアラニン濃度を測定した。9 週令で再度 8×10^8 pfu を接種した後、全採血により再度血中フェニルアラニン濃度を測定するとともに、肝臓よりゲノム DNA を精製して PCR によりノックイン効率を解析した。

4. 研究成果

(1) トリプル型アデノベクターの開発

AAV ベクターは、搭載可能 DNA 量が 4.5kb であるため、遺伝病のノックイン治療のために必要な Cas9 酵素と gRNA/ドナーDNA を単一のベクターに搭載することができない。一方、アデノベクターは最大 8kb まで搭載することが可能である。そこで、ノックインに必要な要素をすべて搭載した一体型アデノベクター(図1)を作製するために、E3 領域の欠失を伸長させ、gRNA の U6 プロモーターの長さを短くした(REF)短縮 U6 プロモーターを作製した。ドナーDNA としては、正常なエクソン7をノックインできる約 1.5kb の断片を用いてコスミドの構築を行った。しかし、作製したアデノベクターでは gRNA 部分が欠失したことから、アデノベクターの作製効率を上げるために Cas9 の発現を抑制する 293 細胞株を新たに作製した。この細胞株を使用することにより、Cas9 nickase と gRNA, ドナーDNA を単一のベクターに搭載したトリプル型のアデノベクターを欠失なく作製することに成功した(特願 JP 2020-549209, US 17/279,330)。Cas9 を搭載したトリプル型は作製することができなかった。Cas9 nickase を搭載したアデノベクターを PKU 新生仔マウスに接種したところ、血中フェニルアラニン血症の改善は見られず、肝臓細胞ゲノムにおいてアデノベクターの末端側のノックインは認められたものの反対側のノックインは検出されなかった。

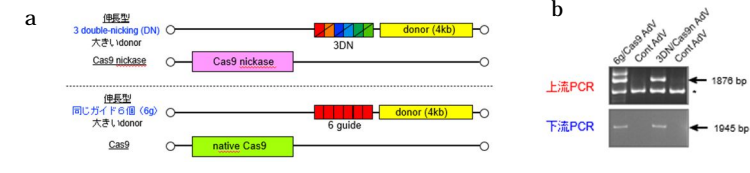
図1



(2) 伸長型/切出し型ドナーDNA を搭載した共感染型アデノベクターの開発

トリプル型アデノベクターのノックイン効率が低かったことから、ドナーDNA を 1.5kb から 4kb に伸長させた。これに伴い、ガイドRNA とドナーDNA を搭載したアデノベクターと Cas9/Cas9

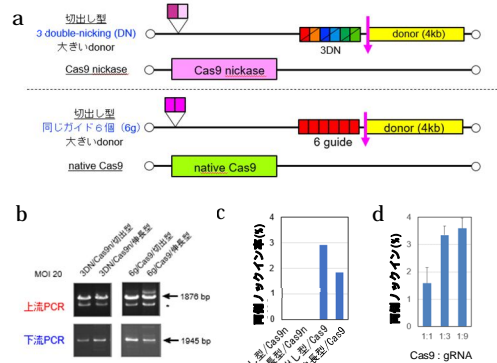
図2



nickase を搭載したアデノベクター(図2a)の2つのベクターを共感染させるノックインシステムの構築を進めた。また、ノックイン効率を培養細胞で簡単に解析できるように、HepG2 細胞にドナーDNA の標的となる PKU マウスの Pah 遺伝子の一部を導入した細胞株を作製した。この細胞株を用いて、4kb のドナーDNA と Cas9/Cas9 nickase を用いた際のノックイン効率を比較したところ、Cas9 を用いた場合の方が効率が高く(図2b)、両側ノックインは Cas9 で認められた。しかしトリプル型と同様にアデノベクターの末端側より反対側のノックイン効率が低かったため、ドナーDNA の末端がフリーである方がノックイン効率が高いと考え、ドナーDNA のアデノベクターの末端から遠い方の端をガイド RNA で切断できる切出し型アデノベクターを作製した(図3a)。

このベクターには、ドナーDNA とゲノムおよびベクターを切断できる多重ガイド RNA が搭載されており、Cas9/Cas9 nickase 発現アデノベクターと共感染させたところ、Cas9 を用いた切出し型アデノベクターにおいて、両側ノックインの効率が高いことが明らかとなった(図3b,c)。また、切出し型アデノベクターと Cas9 発現アデノベクターの比は 3 : 1 が良いことが分かった(図3d)。

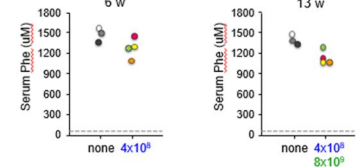
図3



(3) 切出し型アデノベクターの PKU マウスへの投与

切出し型アデノベクターと Cas9 アデノベクターは、精製後に 3 : 1 の比で混ぜ、新生仔 0 日目の PKU マウスの顔面静脈から接種した。コントロールとして、アデノベクターを接種していないマウスを同腹で飼育した。6 週令で、血中フェニルアラニン (Phe) 濃度を測定したところ、接種群において減少が認められた。これらのマウスに 9 週令でさらにアデノベクターを接種した後、13 週令で血中 Phe を測定した結果、アデノベクターを接種していないマウスと比較して約 3 割の減少が認められた。また、肝臓細胞からゲノム DNA を精製して相同組換え効率を解析したところ、相同組換えが検出され、肝臓細胞の約 1% で両側ノックインが起きていた。その際、Indel の効率は約 20% であった。現在投稿準備中である。

図4



1. Nagasaki Y, Matsubara Y, Takano H, et al. Reversal of hypopigmentation in phenylketonuria mice by adenovirus-mediated gene transfer. *Pediatr Res.* 1999, 45:465-473.
2. Nakanishi T, Maekawa A, Suzuki M, et al. Construction of adenovirus vectors simultaneously expressing four multiplex, double-nicking guide RNAs of CRISPR/Cas9 and in vivo genome editing. *Sci Rep.* 2021, 11:3961.
3. Nakanishi T, Maekawa A, Tabata H, et al. Highly multiplex guide RNA expression units of CRISPR/Cas9 were completely stable using cosmid amplification in a novel polygonal structure. *J Gene Med.* 2019, 21:e3115.
4. Kato Y, Tabata H, Sato K, Nakamura M, Saito I, Nakanishi T. Adenovirus Vectors Expressing Eight Multiplex Guide RNAs of CRISPR/Cas9 Efficiently Disrupted Diverse Hepatitis B Virus Gene Derived from Heterogeneous Patient. *Int J Mol Sci.* 2021, 22. 10570.
5. Pei Z, Kondo S, Kanegae Y, Saito I. Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: application to vector titration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 41:945-950.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kato Y, Tabata H, Sato K, Nakamura M, Saito I, Nakanishi T	4. 巻 22
2. 論文標題 Multiplex Guide RNAs of CRISPR/Cas9 Efficiently Disrupted Diverse Hepatitis B Virus Gene Derived from Heterogeneous Patient.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 10570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910570	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 -

1. 著者名 1.Nakanishi T, Maekawa A, Suzuki M, Tabata H, Sato K, Mori M, Saito I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Construction of adenovirus vectors simultaneously expressing four multiplex, double-nicking guide RNAs of CRISPR/Cas9 and in vivo genome editing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83259-0.	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 -

1. 著者名 Nakanishi T, Maekawa A, Tabata H, Yoshioka T, Pei Z, Sato K, Mori M, Kato M, Saito I	4. 巻 21
2. 論文標題 Highly multiplex guide RNA expression units of CRISPR/Cas9 were completely stable using cosmid amplification in a novel polygonal structure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Gene Medicine	6. 最初と最後の頁 e3115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgm.3115	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西友子、中村真理子、山地恵、大庭俊一、大石智一、原川晃子、川田学、斎藤泉
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集アデノベクターの開発とフェニルケトン尿症マウス治療モデルの構築
3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西友子, 田畑裕貴, 岡田只士, 布施涼子, 中村真理子, 大石智一, 大庭俊一, 原川晃子, 川田学, 斎藤泉
2. 発表標題 ゲノム編集用アデノベクターの開発とフェニルケトン尿症マウス治療モデルへの応用
3. 学会等名 第67回 日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kise S, Okada T, Nagao C, Iijima A, Nakanishi T, Saito I, Yasuda K, Sakaki T
2. 発表標題 Development of recombinant adenoviral vectors for the treatment of rickets
3. 学会等名 ISAJ Symposium-2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Nakanishi, Hiroataka Tabata, Mariko Nakamura, Ryoko Fuse and Izumu Saito
2. 発表標題 All-in-one adenovirus vectors expressing both highly multiplex double-nicking guide RNAs and Cas9 nickase for genome editing therapy
3. 学会等名 第25回 日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西 友子、中原 知美、清野 透、古川 洋一、斎藤 泉
2. 発表標題 8個のダブルニッキングガイドRNAとCas9 nickaseを同時発現する一体型アデノウイルスベクターの開発
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 新規ウイルスベクターおよびその製造方法 と使用方法	発明者 中西友子、斎藤泉	権利者 公益財団法人 微生物化学研究会
産業財産権の種類、番号 特許、JP 2020-549209	出願年 2021年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 新規ウイルスベクター及びその製造方法と使用方法	発明者 斎藤泉、中西友子	権利者 微生物化学研究会
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-121668	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 新規ウイルスベクター及びその製造方法と使用方法	発明者 斎藤泉、中西友子	権利者 微生物化学研究会
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/037255	出願年 2019年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 HPV陽性がん又はHPV陽前がん病変遺伝子治療用医薬組成物、及び組換えアデノウイルスベクター	発明者 清野透、中原知美、 中西友子、斎藤泉	権利者 順天堂、国立がん センター、微生物化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-014899	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

順天堂大学疾患モデル研究センター https://research-center.juntendo.ac.jp/shikkan_model/disclosure/support/

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	斎藤 泉 (Saito Izumu) (70158913)	順天堂・順天堂大学医学部生理学第二講座・客員教授 (72801)	削除：2020年3月9日

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
---------	---------