

令和 7 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K19448

研究課題名（和文）新規のゲノム編集技術をもちいたダウン症候群の革新的遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文）Development of gene-based therapeutic approach for Down syndrome using novel genome editing technology

研究代表者

北畠 康司（Kitabatake, Yasuji）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80506494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ダウン症候群は代表的な小児遺伝性疾患である。申請者らはこれまでに、ダウン症神経発生異常を引き起こす原因遺伝子としてDYRK1Aを同定した。そこでダウン症における遺伝子治療法の開発を目的として、CRISPR-Cas3とアレル特異的SNPを組み合わせることにより、このDYRK1Aのコピー数補正を行った。DYRK1A遺伝子近傍にアレル特異的SNPを見出し、これを認識できるcrRNAを作成してCRISPR-Cas3を作用させたところ、DYRK1A発現量が低下し、表現型も改善することができた。したがってこのシステムがin vitroで有効であることが判明し、今後in vivoでの検討に移ることとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症候群は700人に1人と高い発症頻度であり、知的障害をもたらす遺伝性疾患では最多である。さらに50年前にはダウン症者の平均寿命は約3歳であったにもかかわらず、医療の進歩により現在では約60歳であり、この50年間で50年以上伸びた。この急激な変化により、これまで気付かれなかった成人期の認知障害が近年大きな問題として浮かび上がってきているがその研究はまったく進まず治療法もない。本研究課題においてえられる成果は、これまで皆無であったダウン症の遺伝子治療への道を拓くものであり、臨床医療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Down syndrome is a representative pediatric genetic disorder. The applicants have previously identified DYRK1A as a causative gene responsible for neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome. To develop a gene therapy for Down syndrome, they employed a combination of CRISPR-Cas3 and allele-specific SNPs to correct the copy number of DYRK1A. An allele-specific SNP located near the DYRK1A gene was identified, and a crRNA capable of recognizing this SNP was designed. Application of CRISPR-Cas3 led to a reduction in DYRK1A expression and subsequent improvement of the phenotype. Thus, the system has been shown to be effective in vitro, and further investigations in vivo are planned.

研究分野：小児科学

キーワード：ダウン症候群 iPS細胞 ゲノム編集 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

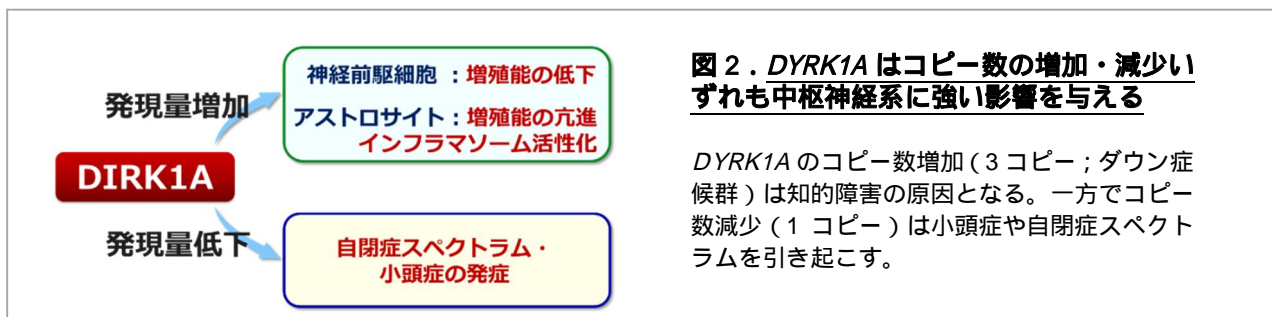
ダウン症候群は 21 番染色体のトリソミーによって引き起こされる代表的な遺伝性疾患である。小児期より知的障害を、成人期には認知障害をほぼ必発するがその病態メカニズムは不明で、治療法はない。ダウン症者の剖検脳ではニューロンの数が大幅に減少し、またアストロサイトの数がほぼ 2 倍に増加していることが明らかとなっており、これが神経病態の発症メカニズムの中心であり、かつ重要な治療標的であると考えられている。

申請者らはこれまで、疾患特異的 iPS 細胞とゲノム編集技術を組み合わせダウン症の中枢神経病態の解析を行ってきた。緻密かつ多彩な“isogenic iPS 細胞パネル”を樹立し、ニューロン・アストロサイトへ分化誘導を行って神経病態の解析を進めてきた。

健常アストロサイトは本来、神経細胞への保護作用をもっており、両者を共培養すると神経細胞のアポトーシスが抑制される。しかしダウン症アストロサイトではこの保護作用が消失するばかりか、神経細胞に過剰なアポトーシスを誘導してしまう。そのメカニズムの詳細を調べてみると、ダウン症アストロサイトでは自然免疫の重要な鍵を握る“NLRP3 インフラマソーム”の活性が著しく上昇していることが分かった。これにより IL-1、IL-18 等のサイトカインが過剰に分泌され、神経炎症が亢進することで神経細胞のアポトーシスが促進されてしまうのである。さらに重要なことに、NLRP3 の発現量増加をもたらす責任遺伝子として、21 番染色体上の *DYRK1A* を同定することに成功した。セリンスレオニンキナーゼである *DYRK1A* は、NF-κB 経路の刺激を介して NLRP3 の発現を促すのである。すでに *DYRK1A* の遺伝子数だけを 2 コピーに正常化させ、それ以外は 21 トリソミーを保ったアストロサイトとの共培養では、神経細胞における変性細胞死が消失することも証明しており、この *DYRK1A* が新たな創薬開発のターゲットになると強く期待される (図 1)。



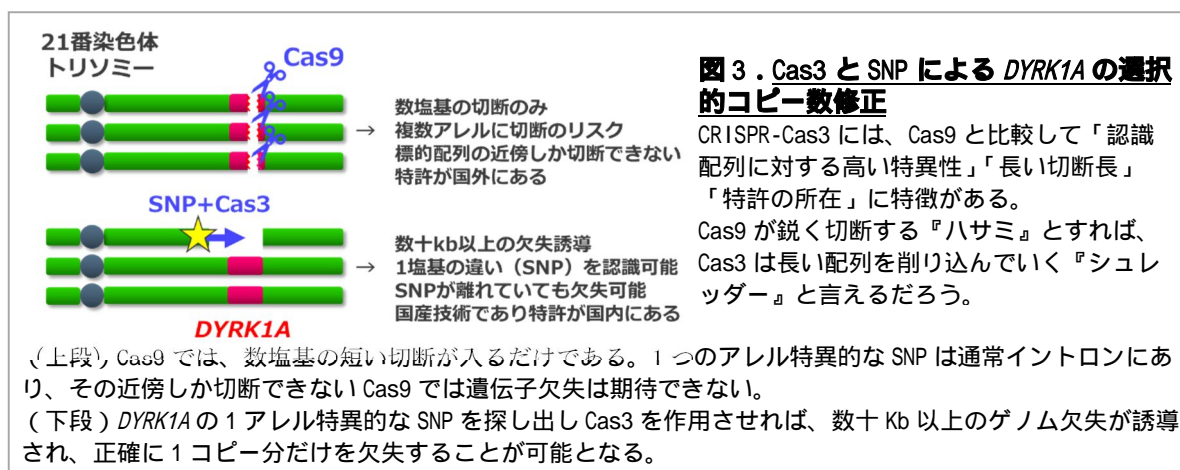
この *DYRK1A* の活性抑制を治療法開発につなげるためには、まず化合物による阻害が考えられるが、*DYRK1A* 変異によるコピー数減少は、小頭症や自閉症スペクトラムの発症につながるものが数多く症例報告されている。つまり *DYRK1A* は、活性の過剰亢進 (21 トリソミー、3 コピー) では知的障害を、過剰低下 (遺伝子変異、1 コピー) では小頭症や発達障害を引き起こすという‘諸刃の剣’であり、*DYRK1A* 阻害薬をもちいた安易な活性抑制は、治療法としてリスクが高いといえる。臨床応用を考えるには、*DYRK1A* の遺伝子コピー数の正確な修正による活性制御が必須となる (図 2)。



近年ゲノム編集技術が大きな注目を集めているが、CRISPR-Cas9 をもちいて *DYRK1A* の遺伝子改変を行っても、数塩基の DNA 切断が入るだけであるため、一般的には相同組換えが必要である。しかしヒト体内で相同組換えを導入するのは実用的といえない。また 3 つの *DYRK1A* アレルのうち、複数のアレルに切断が入ってしまう可能性が高いなど、治療法とはなりがたい。

2. 研究の目的

DYRK1A の正確なコピー数補正を可能にする手段として、3つのアレルのうちの1つに特異的な SNP に注目した。そのような SNP はほとんどがイントロン内にあるため、標的配列近くを数塩基切断するだけの Cas9 では遺伝子の機能欠失に至らない。一方、2019年に真下らが開発した新規の国産ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 には、認識配列から上流に向かってゲノム配列を大きく削り込み、(数塩基の切断しか行わない Cas9 とは異なり)最大数十 kb の大規模欠失を引き起こすという重要な特徴がある³。しかも Cas9 に比較して特異性が高く1塩基の違いも認識可能である。DYRK1A の1アレルだけがもつ SNP に対して Cas3 を作用させれば、正確な1コピー欠失が可能ではないだろうか(図3)。



そこで本研究課題では、『CRISPR-Cas3 のゲノム欠失作用とアレル特異的 SNP を組み合わせることによって、DYRK1A の選択的コピー数修正』を行い、ダウン症候群における初めての遺伝子治療法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) の樹立

iPSC は、健康な個人ならびにトリソミー21の患者から採取された末梢血単核細胞に OCT4、SOX2、KLF4、および c-MYC をコードするセンダイウイルス (SeV) ベクターを導入することによって樹立。誘導された iPSC は、マイトマイシン C で不活化されたマウス胚線維芽細胞 (MEF) をフィーダーとし、D-MEM/Ham's F12、KnockOut Serum Replacement、L-alanyl-L-glutamine、MEM 非必須アミノ酸溶液、2-mercaptoethanol、basic fibroblast growth factor (bFGF) を含むヒト胚性幹細胞 (hES) 培地を用いて培養を行った。さらに単一コロニーを単離・拡大した後、iMatrix-511 silk でコーティングされたディッシュ上で StemFit AK02N 培地を用いて培養した。SeV の除去には、siRNA L527 をトランスフェクションし、抗 SeV-NP 抗体を用いた免疫染色によって確認を行った。iPSC の多能性は、未分化マーカーである OCT3/4 および SSEA4 の免疫染色によって評価した。

corrected-disomy 21 (cDi21) 株は、Tri21 iPSC 株から染色体除去技術を用いて、染色体 21 の1コピーを人工的に除去することによって作製した。

SNP 解析

SNP データベースをもとに、DYRK1A 遺伝子の領域を PCR によって増幅。プライマー Forward (F) と Reverse1 (R1) を用いた PCR では、ターゲットされたアレルと非ターゲットのアレルで異なるサイズのバンド (3.2kb と 2.6kb) が検出される。非ターゲットのアレルの PCR 産物 (2.6kb) は、ゲル電気泳動後にゲルから抽出キットを用いて分離。ターゲットアレルの PCR 産物は、プライマー F と、挿入配列をターゲットする Reverse2 (R2) プライマーを用いて PCR を行うことで得た。各 PCR 産物について Sanger シーケンスを行い、SNP の位置における特定の塩基 (G または T) の数を数えることによって、各アレルの SNP の型とアレルを特定。

CRISPR-Cas3 システムを用いた DYRK1A のゲノム編集

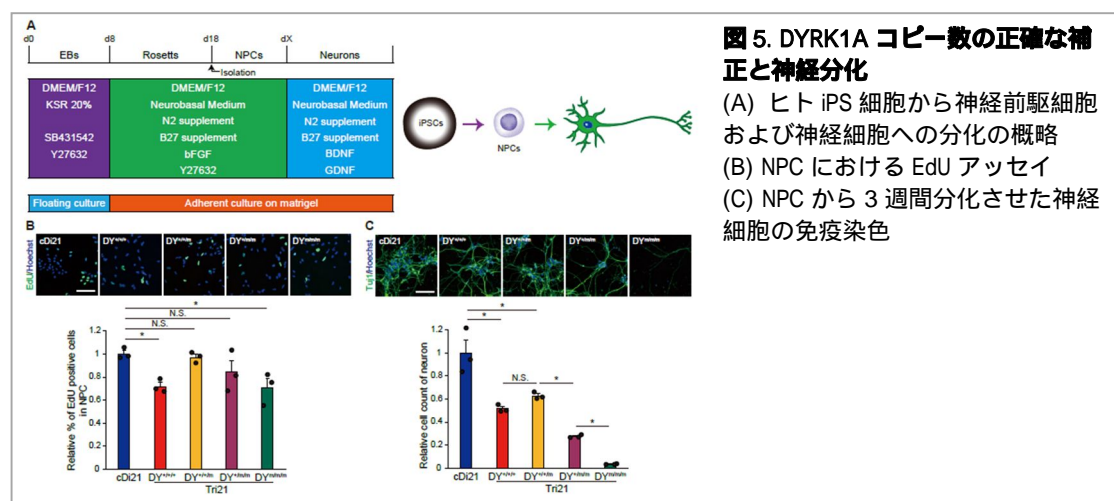
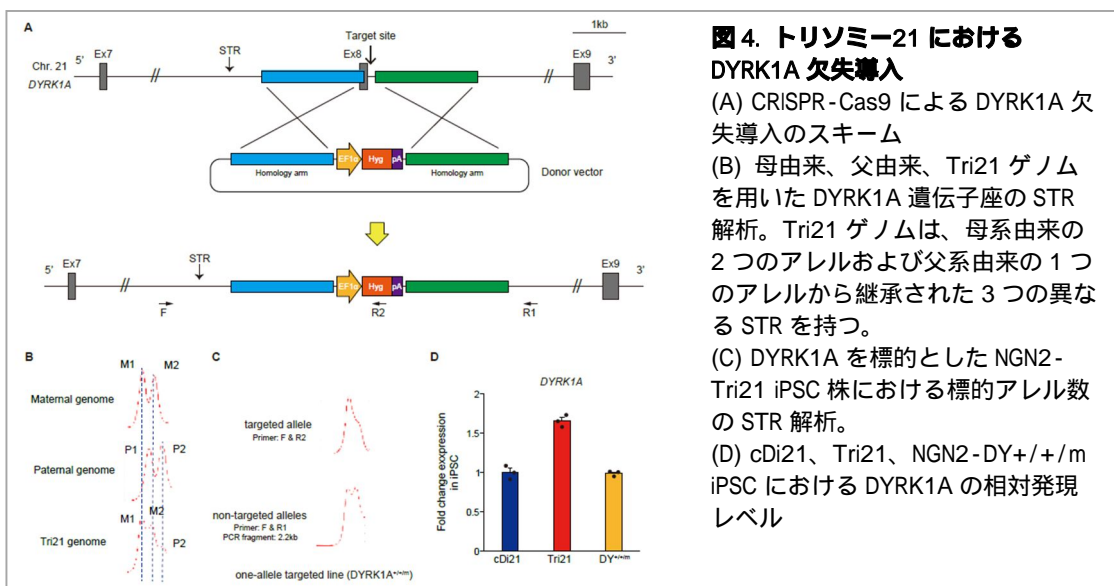
DYRK1A 遺伝子のコピー数補正には、human codon-optimized type I-E CRISPR-Cas3 システムを使用した。crRNA については、DYRK1A 遺伝子のエクソン 4 から約 450 塩基対下流にある SNP を含む領域を、PAM 配列 (5'-AAG) に隣接する seed region として、+5 の位置に G (crRNA(G)) あるいは T (crRNA(T)) を持つアレルを認識するように設計した。設計した crRNA をコードするベクター (pBS-U6-crRNA-empty vector) と、CRISPR-Cas3 システムを構成する複数のサブユニット (Cas3, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas11 をコード) をコードするベクター

(pPV-EF1a-2xNLS-Cse2-Cas6-Cas3-iPA vector, pPV-EF1a-2xNLS-Cas7-Cas5-Cse1-iPA) を、Tri21#1 アストロサイトに Lipofectamine Stem を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間からピューロマイシンを 2 日間加えて細胞選択を行った。編集後のゲノム DNA に対してゲノム PCR が行い、PCR 産物量の比較を行った。

4. 研究成果

DYRK1A のコピー数補正により神経細胞死が抑制される

DYRK1A の発現量と表現型の変化について調べるため、CRISPR-Cas9 をもちいてダウン症 iPS 細胞 (Tri21) へのゲノム編集を行い、*DYRK1A* のコピー数のみが 0, 1 または 2 コピーへと欠失誘導され、他の 21 番染色体上の遺伝子はトリソミー状態を維持している DY+/+/m、DY+/m/m、DYm/m/m iPS 細胞を樹立した (図 4)。これを神経細胞・アストロサイトへと分化誘導することで、*DYRK1A* のコピー数とアストロサイトの増殖活性とのあいだに正の相関があること、また *DYRK1A* 遺伝子コピー数が過剰 (3 コピー、DY+/+/+) であっても不足 (1 コピーまたは 0 コピー、DY+/m/m または DYm/m/m) であっても、神経前駆細胞 (NPCs) の増殖と生存性が低下することが示されており、*DYRK1A* の正確な発現量が適切な神経細胞およびグリア細胞数の維持に不可欠であることが示唆された (図 5)。

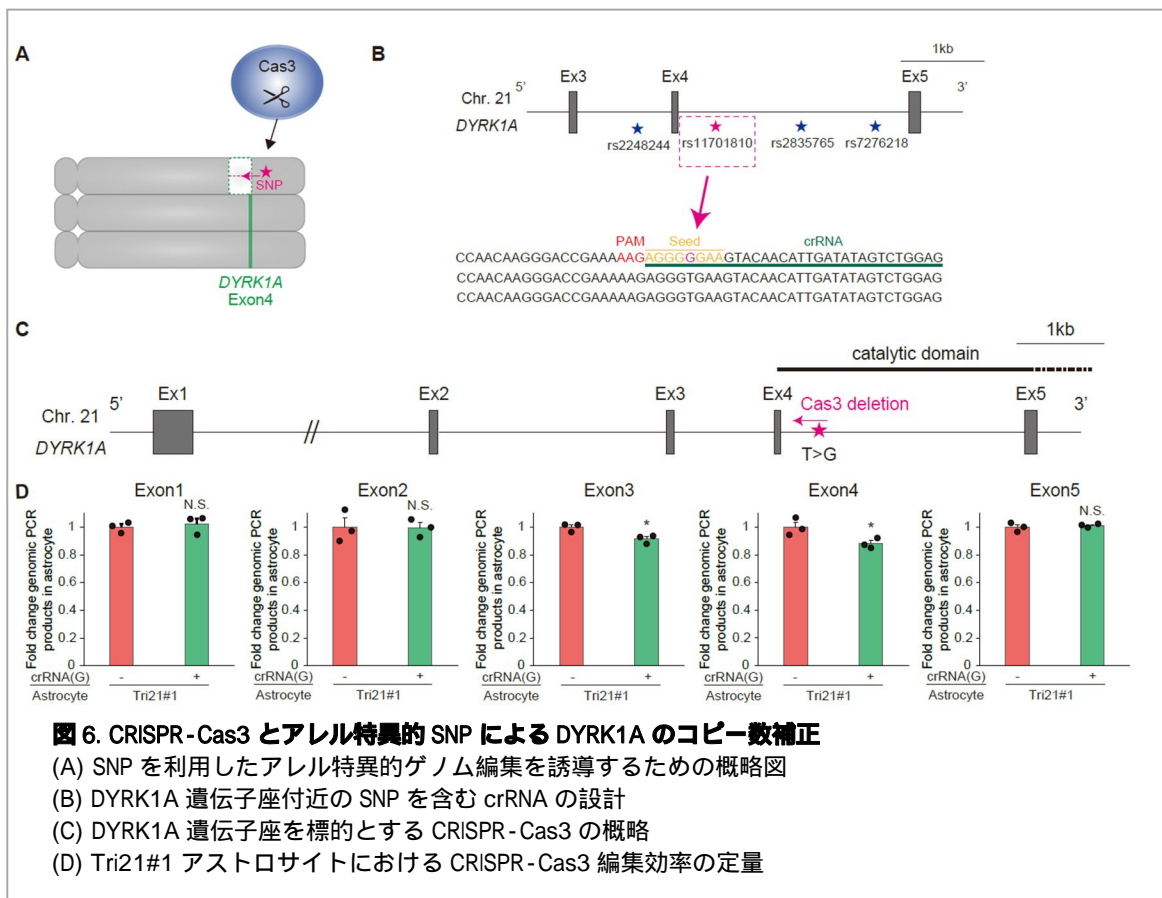


CRISPR-Cas3 システムとアレル特異的 SNP の組み合わせによる *DYRK1A* の遺伝子量補正

患者 (Tri21#1) およびその両親から得たゲノム DNA の解析により、Tri21#1 株は父親由来のコピーを 1 つ、母親由来のコピーを 2 つ持つことが判明した。イントロン内にわずかな塩基置換が認められたが、エクソンおよびその周辺には認められなかった。

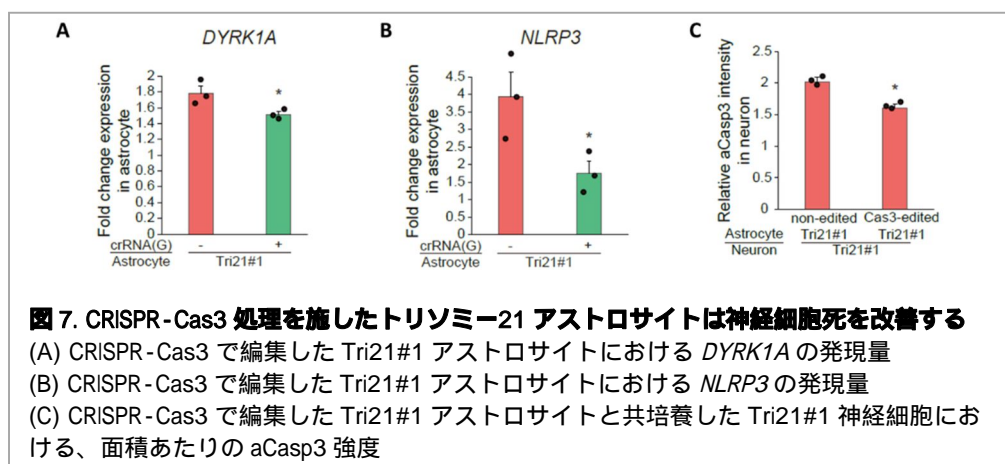
重要なエクソンの欠失を導入するため、このイントロン内のアレル特異的 SNP を標的としたヒトコドン最適化型の I-E 型 CRISPR-Cas3 技術を適用した (Fig. 6A)。CRISPR RNA (crRNA) のガイド配列は、エクソン 4 の約 450 塩基下流に位置する SNP (rs1170810、母親由来アレルの 1 つに存在) を含むように設計され、5' -AAG プロトSpacer隣接モチーフ (PAM; +5 位に G) 隣

接のシード領域内に配置された(Fig. 6B, C) アレル特異的 SNP を標的とする crRNA (crRNA(G)) および CRISPR-Cas3 発現ベクターを Tri21#1 アストロサイトに導入した。ゲノム DNA の定量 PCR により、CRISPR-Cas3 処理後にはエクソン 3 および 4 の DNA 量が有意に減少していた(エクソン 3 : 標的部から 2931 bp、未削除ゲノムの 91.5% ; エクソン 4 : 標的部から 573 bp、未削除ゲノムの 88.1%)。一方、エクソン 1, 2, 5 (62350 bp, 100% ; 8450 bp, 99.4% ; -4721bp, 0%) には変化が見られず、CRISPR-Cas3 による広範かつ一方向性のゲノム削除が証明された(Fig. 6D)。



CRISPR-Cas3 システムによる *DYRK1A* の遺伝子量補正は、神経アポトーシスを効果的に抑制する

CRISPR-Cas3 によるゲノム編集により Tri21 アストロサイトの *DYRK1A* 転写は減少し(Fig. 7A)、*NLRP3* 発現も有意に抑制された(Fig. 7B)。注目すべきことに、Cas3 編集を施した Tri21 アストロサイトと共培養した神経細胞では、非編集アストロサイトと共培養した場合に比べてアポトーシス性細胞死が有意に抑制された(Fig. 7C)。以上の結果から、アレル特異的 SNP と CRISPR-Cas3 システムの組み合わせによるアストロサイトでの *DYRK1A* 遺伝子量補正は、神経アポトーシスを効率的に抑制することが示された。



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

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