

令和元年6月25日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15093

研究課題名(和文) ヘルペスウイルスLATmiRNAを利用したCRISPRCasシステムと遺伝子治療

研究課題名(英文) LATmiRNA

研究代表者

岡田 尚巳 (Okada, Takashi)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：00326828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CRISPR-Cas9システム発現系を改変し標的遺伝子発現を特異的に抑制するCRISPR interference (CRISPRi)を応用して、本研究の標的疾患としていた脊髄小脳変性症6型(SCA6)の責任遺伝子CACNA1Aの発現を特異的に抑制する発現系を構築した。また同発現系を申請者らが開発した無毒化したヘルペスウイルス(HSV)ベクターに搭載した組換えCRISPRi-HSVベクターを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、これまでに医療応用が難しかったHSVベクターを無毒化することで、CRISPR技術との融合を可能にした点である。HSVベクターは遺伝子治療ベクターとして研究開発されるようになり久しいが、それにも拘わらずその応用範囲が極めて限定的であったのは、その高い細胞障害性が原因であった。申請者らが開発した無毒化HSVベクターは、細胞障害性を完全に排除しているため、安全かつ効率的にCRISPR-Cas9システムを神経細胞に導入することができる。本技術が確立すれば、これまで根治が不可能であった脊髄小脳失調症6型(SCA6)などの神経変性疾患に対する治療技術の有力な選択肢の一つとなり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a method for gene knockdown of CACNA1A which is the responsible gene for spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) using CRISPR interference (CRISPRi) technology. We also engineered non-toxic herpes simplex virus-based (HSV) vectors encoding the CACNA1A-CRISPRi expression system. Our results would help develop for non-toxic HSV vector-mediated SCA6 therapy.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：HSVベクター CRISPR-Cas SCA6

1. 研究開始当初の背景

近年、我々はHSVにコードされる immediate-early 遺伝子発現を除去することでHSVベクターの無毒化に成功した (Miyagawa *et al.*, PNAS 2015)。当該技術の開発によりHSVベクターは非常に汎用性の高い安全なベクターシステムとなった (PCT/US 2014/047068)。また我々は同無毒化HSVベクターにおける恒常的転写活性領域としてLATを同定している。申請者はその発現様式や発現されるRNAのサイズの類似性から、同ベクターのLAT領域にコードされているmiRNA発現をCRISPR-Cas9システムの標的DNAを決定する因子 single guide RNA (sgRNA) 発現系にそのまま利用できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、無毒化HSVベクターに現在ゲノム編集技術として注目を集めているCRISPR-Cas9システムを導入することで、恒常的に疾患原因遺伝子発現を抑制しつつ、同時に治療遺伝子を供給するという新しい形の遺伝子治療法を開発することである。具体的には、標的疾患としてSCA6を設定し、その原因遺伝子を標的としたsgRNAをデザインした。デザインされたsgRNAを無毒化HSVベクターのLAT miRNAと置換した。また同時にsgRNAと複合体を形成するCas9と正常型のSCA原因タンパク質の供給する発現系についても一つの無毒化HSVベクター内に搭載し、SCA変異遺伝子を標的としたCRISPR-Cas9システム搭載無毒化HSVベクターを作成した。以上により本研究では、変異遺伝子制御と治療遺伝子補充を両立するシステムの構築と機能の検証を目的とした。

3. 研究の方法

① CACNA1A 遺伝子を標的としたCRISPR-dCas9システムの構築

本申請で使用するCRISPR-Cas9システムに関しては安全性の観点から、ヌクレアーゼ活性が欠損しているCas9 (dCas9)を用いた遺伝子発現干渉法であるCRISPR interference (CRISPRi) (Larson *et al.*, Nature protocol, 2013)を採用した。本研究の標的疾患であるSCA6の責任遺伝子CACNA1A遺伝子についてsgRNAをデザインし、これを用いてsgRNA発現系を構築する。また一方で、dCAS9発現カセットを作製し、これら発現系の機能性を*in vitro*培養系で評価した。

② 変異型CACNA1A遺伝子を標的としたCRISPR-dCas9無毒化HSVベクターの開発

我々は無毒化HSVベクターにおける恒常的転写活性領域としてLAT、神経細胞特異的転写活性領域としてTerminal repeat (TR) 近傍領域を同定している (Miyagawa *et al.*, PNAS, 2015)。よって本領域にCRISPR技術に必要なdCAS9及びsgRNA発現カセットを導入し、組換え無毒化HSVベクターを開発した。

③ *in vitro*, *in vivo*におけるCRISPR-dCas9無毒化HSVベクターの機能評価

作製したCRISPR-dCas9無毒化HSVベクターを培養細胞に対して導入し、その遺伝子発現を顕微鏡観察及びレポーター解析等にて検証した。また同様にマウス及び標的疾患モデルマウスに対して投与試験を行い、その安全性、機能性を評価した。

4. 研究成果

① CACNA1A 遺伝子を標的としたCRISPR-dCas9システムの構築

CRISPRi法におけるsgRNAはsgRNA配列デザインツールであるCRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp>) 利用し、抑制効率が良いとされる標的遺伝子の5' UTR領域についてデザインを行い、計4種類作製した(#1-4、図1右グラフ)。また同様に、コントロールとして、哺乳類細胞用プロモーターとして広く利用されているCMVプロモーターを標的としたsgRNAについてもデザインした(#1-5、図1左グラフ)。以上、デザインしたsgRNAを発

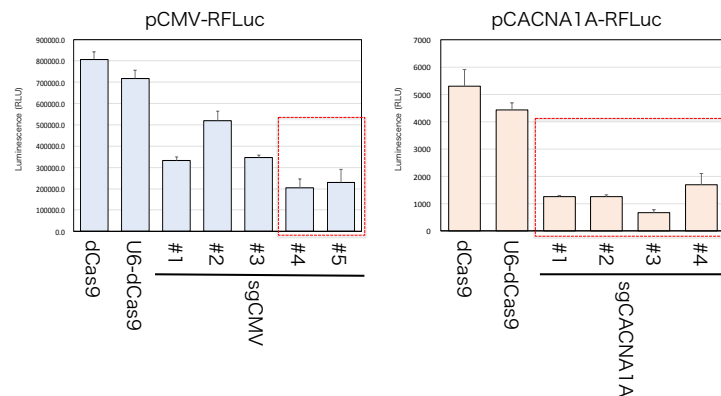


図1. CRISPRi発現系の評価

現ベクターに組み込み、CACNA1A 遺伝子発現抑制効果についてレポーター解析を行い、評価を行った(図1)。具体的には、まずCACNA1A 遺伝子5' UTR領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーター発現プラスミドを構築した。これをデザインしたsgRNA発現プラスミドと同時に培養細胞に遺伝子導入し、CACNA1A 遺伝子発現抑制効果を検証した。その結果、デザインしたCACNA1A 遺伝子5' UTR領域標的sgRNAはコントロールと比較し、有意に

CACNA1A 遺伝子 5' UTR の転写活性を抑制することが確認された。一方、CMV プロモーター標的 sgRNA についても、その転写活性を抑制するものがあることが確認された。以上の結果から、CRISPR-dCas9 システムにより、sgRNA 依存的に転写活性を抑制することができることが明らかとなった。

② 変異型 CACNA1A 遺伝子を標的とした CRISPR-dCas9 無毒化 HSV ベクターの開発

CACNA1A 遺伝子発現抑制に使用する CRISPR-dCas9 システム発現コンストラクトは極めてサイズが大きく、通常の方法での HSV ゲノムへの遺伝子組み換えは困難であると考えられた。そこで本研究では、部位特異的遺伝子組換えシステムである Gateway technology (Ptashne, 1992) を利用した。同システムを用いて CRISPR-Cas9 発現カセットの無毒化 HSV ベクターへの組み込みを行うために、まず上記で評価した CACNA1A 遺伝子 5' UTR 領域標的 sgRNA 発現カセット、dCas9 及びレポーター遺伝子 (青色蛍光タンパク質 BFP) 発現カセットを Gateway technology のシャトルベクターである pENTR プラスミドにクローニングし、All-in-one シャトルベクターを構築した。一方で、無毒化 HSV ゲノムに Gateway technology の組換え配列である attR1-attR2 に挿入した無毒化 HSV-GW を作製した。組換え配列は無毒化 HSV ゲノム上で恒常的に転写活性が高い LAT 領域、あるいは神経特異的に転写活性が高い TR 領域に挿入された。同システムを利用し、LAT 領域、TR 領域それぞれに対して CRISPRi カセットを組み込んだ CRISPRi-LATHSV 及び CRISPRi-TRHSV を構築した。

③ *in vitro*, *in vivo*における CRISPR-dCas9 無毒化 HSV ベクターの機能評価

CRISPRi-HSV ベクターの機能評価を行うために、*in vitro*における発現解析を実施した。研究開始当初、マウス神経細胞モデルとして Neuro2A 細胞を選択したが、実験を進める中で、本細胞における CACNA1A 遺伝子発現量は神経分化誘導時においても著しく低いことが判明した。そのため、遺伝子発現変動を評価するには適切ではないと判断し、マウス小脳初代培養系樹立を試み、発現・機能解析を行った。また並行して *in vivo*における機能評価系の構築にも着手した。マウス小脳に対する無毒化 HSV を用いた遺伝子導入が可能か調べるために、マウス小脳に対するレポーター遺伝子搭載無毒化 HSV の投与試験を行った。さらに、導入遺伝子の発現確認及び細胞毒性について評価を行う準備を整えた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件) ※査読有

- 1) Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018 Nov 1;11:180-190. doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.015. eCollection 2018 Dec 14.
- 2) Artusi S, Miyagawa Y, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC. Herpes Simplex Virus Vectors for Gene Transfer to the Central Nervous System. *Diseases*. 2018 Aug 14;6(3). pii: E74. doi: 10.3390/diseases6030074.
- 3) Verlengia G*, Miyagawa Y* (*Equal contribution), Ingusci S, Cohen JB, Simonato M, Glorioso JC. Engineered HSV vector achieves safe long-term transgene expression in the central nervous system. *Sci Rep*, 2017 May 4;7(1):1507. doi: 10.1038/s41598-017-01635-1.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Tamaoka A, Okada T. Refinements of rAAV8 purification protocol with chromatography technology. The ASGCT 21st annual meeting (シカゴ), 2018
- 2) Kuroda S, Miyagawa Y, Adachi K, Yamamoto M, Kinoh H, Cohen J. B, Glorioso J. C, Suzuki H, Yoshida H, Okada T. Enhancement of non-toxic HSV vector production and function by chemical compound treatment. 第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 ポスター発表 (東京), 2018
- 3) Miyagawa Y, Verlengia G, Simonato M, Cohen J. B, Glorioso J. C. Persistent transduction of CNS neurons by a non-toxic herpes simplex virus-based vector. The 23th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy (岡山), 2017
- 4) Kuroda S, Miyagawa Y, Adachi K, Yamamoto M, Cohen J. B, Glorioso J. C, Suzuki H, Uchida E, Okada T. Effect of culture conditions on efficient production of non-toxic herpes simplex virus-based vectors using a novel producer cell line. The 23th Annual Meeting of the Japan Society of Gene and Cell Therapy (岡山), 2017
- 5) Miyagawa Y, Verlengia G, Simonato M, Cohen J. B, Glorioso J. C. Deletion of virion host shut off protein promotes neural-specific transgene expression by a non-cytotoxic herpes simplex virus-based vector. 第 39 回日本分子生物学会 (横浜),

2016

- 6) Kuroda S, Miyagawa Y, Adachi K, Yamamoto M, Cohen J. B, Glorioso J. C, Suzuki H, Uchida E, Okada T. Protocol optimization for high-yield production of a non-toxic herpes simplex virus-based vector using a novel producer cell line. 第 39 回日本分子生物学会 (横浜) , 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 宮川 世志幸

ローマ字氏名 : Yoshiyuki Miyagawa

所属研究機関名 : 日本医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 講師

研究者番号 (8 桁) : 90415604

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。