

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06040

研究課題名(和文) in vivoゲノム編集効率の最適化と疾患モデル動物遺伝子治療への応用

研究課題名(英文) In vivo genome editing efficiency optimization and its application to gene therapy in animal models of disease

研究代表者

三浦 浩美 (Miura, Hiromi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：90599523

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)：近年急速に発展してきたゲノム編集技術は、ヒト遺伝性疾患の原因遺伝子そのものを修復する遺伝子治療を可能とすることから、疾患ごとに特定の臓器を標的としたin vivoゲノム編集技術の開発が今後の重要な課題となってくるものと考えられる。その際に、標的臓器へのゲノム編集関連分子のデリバリー効率やin vivoゲノム編集効率の向上が成功の鍵となりうる。本研究では、申請者が独自に開発したin vivoゲノム編集効率評価系モデルマウスを活用し、in vivoデリバリー系の最適条件の検討を行うとともに、今回独自に作製した疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療への応用を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により確立した評価系モデルマウスは、本研究で用いた物理的な遺伝子導入法のみならず、様々な遺伝子デリバリーツール(生物学的、化学的な遺伝子導入方法)の評価に利用できる可能性がある。遺伝子治療を行う上での問題となっている遺伝子デリバリー系は、今後様々な新手法が次々に開発されてくることが期待されるが、それらにおけるデリバリー効率のみならず、臓器・組織特異性等を検証する上でも極めて有用なモデルマウスとなりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：Genome editing technology, which has developed rapidly in recent years, can be applied to gene therapy for repairing the causative genes of human genetic diseases. Therefore, the development of in vivo genome editing technology targeting specific organs for each disease is expected to be an important task. The key to success in this process might be to improve the delivery efficiency of genome editing components to target organs and to improve in vivo genome editing efficiency. In this study, I utilized the mouse model for evaluation of in vivo genome editing efficiency, which was originally developed by us, to determine the optimal conditions for the in vivo delivery system. I also tried to apply it to gene therapy using the disease mouse models originally created in this project.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：in vivoゲノム編集 遺伝子治療 遺伝子デリバリー系 ハイドロダイナミクス法 ヒト型疾患モデルマウス

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

従来の遺伝子治療は、正常遺伝子発現ベクター等を導入して機能欠損遺伝子の働きを補う補充療法が主であった。しかし補充療法は、発現が一過性であるため定期的に投与しなければならない、ベクターがゲノムの不特定領域に挿入されることによる癌化の可能性等の問題点もあることから、多くの遺伝子治療は探索的な状況に留まっていた。

近年開発されたゲノム編集技術の一つである CRISPR 系は、自在なゲノム改変を可能とするポテンシャルを有し疾患の原因変異の正確な修復も可能であることから、上述した問題点を解決しうる遺伝子治療の新たなツールとして大きく注目されていた。既に動物モデルを用いた実験では、ジストロフィン異常症や遺伝性高チロシン血症など、いくつかの遺伝性疾患を対象とした成功例も報告されてきており(Alexis et al. Cell 2017)、近年ではヒト胚を用いた肥大型心筋症の原因遺伝子修復の報告もされた(Hong et al. Nature 2017)。従来法よりも効果的であることが明らかであるものの、治療への応用には CRISPR 遺伝子改変効率の更なる改善(David et al. Nat Med. 2015)のみならず、目的の核酸(DNA/RNA)を如何に効率良く患部の細胞に届けるかに関する遺伝子デリバリー法の効率改善等が遺伝子治療成功の鍵を握ると考えられた(Hao et al. Nat Rev. 2017)。しかしながら、目的臓器・組織のどの程度の細胞で遺伝子が正確に修復されるのかについて、その遺伝子治療効率を *in vivo* で簡便に評価できるモデル系については国内外ともに報告されていなかった。

そのような中、申請者は、遺伝子治療の効率を簡便・可視的に評価できるモデルマウスの開発を進めていた。具体的には、これまでに申請者が作製した“全身で強く安定した eGFP 蛍光を示す” eGFP トランスジェニック(Tg)マウス(Ohtsuka et al. Nuc. Acids Res. 2010)に由来し、eGFP 蛍光で *in vivo* の遺伝子治療効率を簡便に確認できるマウス系統である。そのために、まず eGFP Tg マウスの eGFP 遺伝子の一部を破壊した eGFP Tg マウスを作製し、このマウスの受精卵に CRISPR 系による遺伝子修復を施すことで、eGFP 遺伝子が正確に修復されること、及びそれによる蛍光回復が生じることを確認した。また、*in vivo* 遺伝子治療への応用を目指し、eGFP Tg マウスの筋肉に *in vivo* エレクトロポレーション法を施して CRISPR 関連核酸を導入することによっても、GFP 蛍光発現により遺伝子修復の有無を確認することができた。よって本マウス系統は、GFP 蛍光の回復を指標とした様々な遺伝子デリバリー法やゲノム編集法の効率評価に利用できると期待され、それによって得られた最適条件を元に、より効率の良い遺伝子治療法を開発していきたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に開発した *in vivo* 遺伝子治療効率評価系モデルマウスを用いて、複数の CRISPR 関連試薬のデリバリー系を用いた遺伝子修復条件の検討と、そこで得られた最適条件を疾患モデルマウスの遺伝子治療に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、疾患モデルマウスの遺伝子治療(研究開始当初は、肝疾患としてフェニルケトン尿症、筋疾患としてジストロフィン異常症、皮膚疾患として劣性栄養障害性表皮水泡症、または白皮症の疾患を対象としていた)を目指し、まずは独自に開発した評価系モデルマウスを用いて、対象臓器(肝臓、筋肉、および皮膚)における遺伝子デリバリー効率、及び遺伝子修復効率の遺伝子導入条件の検討を行った。また得られた条件を元に、実際の疾患モデルマウスを用いて、遺伝子治療効果の検討を行った。近年の CRISPR 系を用いた遺伝子治療の試みは、主に高い導入効率を有するウイルスベクターを用いた *in vivo* 生体内への直接導入や、*ex vivo* 操作を介した細胞への導入・移植による報告が大半を占めているが、ウイルスベクターによる癌化の可能性や培養による変異蓄積の可能性、更にウイルス投与による免疫反応の惹起等が懸念されている。そのた

め本研究では、より簡便、且つ上述した問題点を回避しうる、物理的な方法(エレクトロポレーション法やハイドロダイナミクス法)を介した導入法に注目し実験を進める。具体的には、以下5点について明らかにした。(1) *in vivo* 遺伝子治療評価系モデルマウスを用いた各臓器への遺伝子デリバリー条件の検討、(2)評価系モデルマウスを用いたハイドロダイナミクス法による肝臓でのゲノム編集の評価、(3)遺伝子治療研究に有用な疾患モデル動物の作製、(4)フェニルケトン尿症モデルマウスを用いた遺伝子治療の検討、(5)アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子デリバリー法の確立と評価系モデルマウスを用いた検証、を行った。

4. 研究成果

(1) *in vivo* 遺伝子治療評価系モデルマウスを用いた各臓器への遺伝子デリバリー条件の検討

申請者が独自に開発した *in vivo* 遺伝子治療評価系モデルマウスを用いて、まずは各標的臓器(肝臓、筋肉、皮膚)への物理的な遺伝子導入方法の検討を行った。具体的には、筋肉と皮膚に関しては、エレクトロポレーション法、肝臓に関してはハイドロダイナミクス法を試みた。

筋肉に関しては、これまでエレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入が可能

であることは確認済みであったが、その条件を足がかりとして、より効率良く核酸を導入するための条件検討を行った。その際に、NEPA21 または CUY21EDIT のエレクトロポレーター、2種類の電極(CUY568-4 および CUY567-0.5)、電圧/電流、核酸濃度などの条件を変更しながら検討を進めた。その結果、いずれのエレクトロポレーター、電極を用いた場合でも導入効率等に大きな差は認められず、特に定電流設定が可能な CUY21EDIT のエレクトロポレーターに関しては、100mA~300mA 間で差がないことが分かった(図1 参照)。

皮膚は生体のバリア機能を果たすことから、も遺伝子導入が非常に難しい臓器であることが知られている。そこで本研究では、野生型マウスを用いた蛍光遺伝子発現ベクターを用いて皮膚への導入条件の検討を行った。当初の計画では、既報の情報(Wenbo et al. PNAS 2017)を元に、背表皮及び尾表皮への遺伝子導入を行う予定であったが、常に同じ条件で注入することが難しく、特に背側の皮膚の場合は筋層に導入されてしまうことが多かった(図2A)。そこで次に、皮膚層が主であり筋層が殆どない耳を標的として遺伝子導入を試みることとした。その結果、比較的安定して皮膚に遺伝子導入できることが分かったものの、注入可能な溶液量が極めて少なく広範囲に注入することが困難であったため、かなり限局された箇所でのみ GFP 蛍光が確認された(図2B)。いずれの方法においても手技的な要素が大きく影響することが分かった。

上記実験と並行して、*in vivo* 遺伝子治療評価系モデルマウスを用いて、導入が比較的簡便な卵管上皮と肝臓への CRISPR 関連核酸の導入を行った。その結果、いずれの組織においても高い再現性で核酸溶液を導入することができた。また、用いるガイド RNA を変えることによって(Cr1 もしくは Cr6 : Miura et al. Mol. Ther. Nucleic Acids 2021)、NHEJ 修復または HDR 修復のど

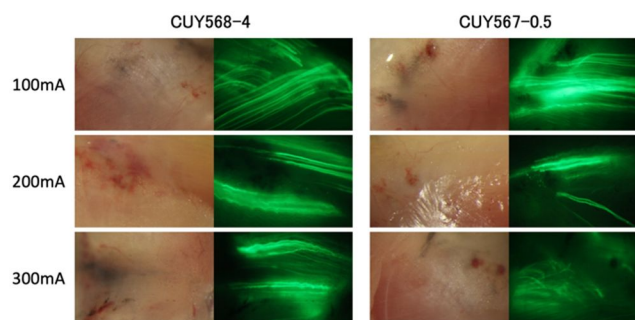


図1：筋肉への *In vivo* エレクトロポレーション

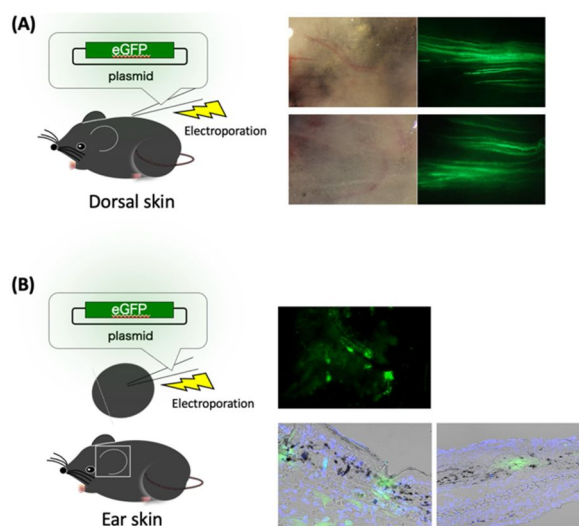


図2：皮膚への *In vivo* エレクトロポレーション
eGFP発現ベクターを用いて皮膚への *in vivo* エレクトロポレーションを行った。背側の皮膚における組織片では、主に筋層に導入されてしまうが(A)、耳の皮膚では、組織片やその切片からも分かるように、皮膚に導入されていることが確認できる(B)

これらの修復系により遺伝子修復されたかを評価することもできた(図3参照)。更に、ゲノム編集酵素(Cas9)をプラスミドDNAではなくタンパク質として導入することで、*in vivo*ゲノム編集効率が向上することを示唆する予備的な結果も得られた。ハイドロダイナミクス法においては、肝臓の全ての葉に安定して比較的均一に試薬の導入が可能であったため、その比較解析の容易さから、以降の実験では肝臓を標的とした疾患に焦点を当てて進めることとした。

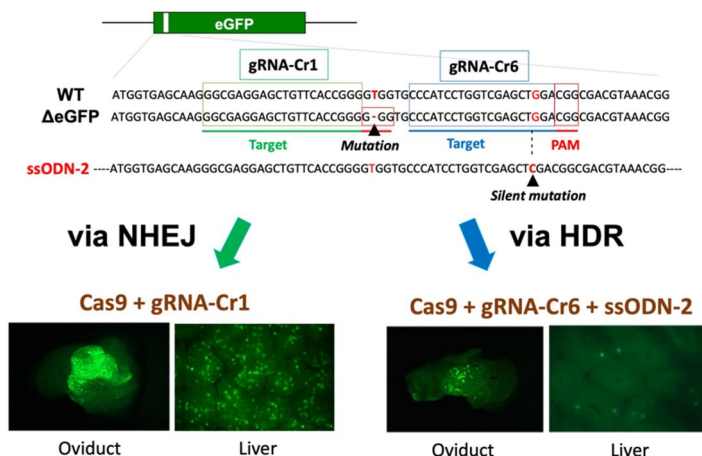


図3 : NHEJ経路を介したindel導入やHDR経路を介したssODNノックインの検出

(2) 評価系モデルマウスを用いたハイドロダイナミクス法による肝臓でのゲノム編集の評価

ゲノム編集評価系マウスを用いて、ハイドロダイナミクス法による肝臓ゲノム編集効率の定量的評価を行なった。このマウスでは、蛍光遺伝子発現を指標にゲノム編集効率を評価できるが、今回、その評価を行う上で以下の3通りの解析法を用いた。1)組織そのものを蛍光実体顕微鏡を用いて撮影し、画角内における蛍光スポット数を算出、2)凍結組織切片を作製し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光発現細胞の割合を算出、3)肝細胞を単離してフローサイトメトリー解析を行うことによりGFP陽性細胞の割合を算出、である。1)では、Cas9発現プラスミドDNAではなくCas9タンパク質(5 μ g/ml)を用いることで最大のゲノム編集効果が得られることが明らかとなった。2)の解析では、蛍光陽性細胞の割合はプラスミドDNAで約5%であり、タンパク質で約8%であった。3)のフローサイトメトリー解析(Cas9タンパク質を使用)では、4.6%の肝細胞がGFP陽性であった。これらの解析では、ゲノム編集後に読み枠が回復したGFP遺伝子を有する細胞のみしか蛍光を発しない。そこで次に、読み枠が回復しなかったものも含めたゲノム編集アレル全体の頻度を定量するために、次世代シーケンスを行なった。その結果、5 μ g/mlのCas9タンパク質を用いてハイドロダイナミクス法による肝臓のゲノム編集実験を行った場合、蛍光を発しない細胞も含めて約17%の肝細胞がゲノム編集されることが推定された。尚、ここまでの結果は、Mol. Ther. Nucleic Acids (2021)に報告した。

(3) 遺伝子治療研究に有用な疾患モデル動物の作製

上記(1)および(2)の実験と並行して、独自の遺伝子改変動物作製方法である*i*-GONAD法を用いて、遺伝子治療法開発に有用になる疾患モデルマウスの作製を試みた。具体的には、毛色(皮膚)疾患の1つとして色素欠損(アルビノ)の評価系モデル、および肝疾患モデルとしてヒト型変異を有するフェニルケトン尿症(PKU)のモデルマウスの確立を行った。

色素欠損評価系モデルに関しては、まずはC57BL/6J系統の妊娠雌マウスの卵管に、チロシナーゼ遺伝子領域を標的としたガイドRNA(AACTTCATGGGTTTCAACTG[CGG(PAM)])をCas9タンパク質と共に導入した。得られた産仔のうち色素を有しないマウス個体(F0)を得た。チロシナーゼ遺伝子の標的領域の塩基配列を調べた結果、得られた産仔の全て(全5匹)において何らかの変異が導入されていることが確認された。更に、得られたアルビノマウスのうち2系統のみ選出し、評価系モデルマウスと交配を行った。その結果、いずれの系統からもチロシナーゼ遺伝子領域に変異を有し、かつ評価系モデルマウスとしてeGFP遺伝子を持つ個体を得られたが、系統の樹立が容易であった系統(チロシナーゼ遺伝子領域に3bpの欠損を有するもの)を使用することとした。今回作製したアルビノ評価系マウスは、eGFP蛍光回復を指標にしつつ、変異チロシナーゼ遺伝子の遺伝子治療の評価を行うことができると期待される。また色素がないことにより、視覚的に尾静脈が容易に確認できるため、新たなアルビノ評価系マウスを用いることで上述した

ハイドロダイナミクス法の成功率が向上することも期待される。

フェニルケトン尿症(PKU)のモデルマウスについては、日本人や東アジア人に特有の変異である2種類の独立した系統(R111X[エキソン3に有する変異]とR413P[エキソン12に有する変異])の樹立を試みた。尚、Pah-R413Pマウスに関しては、点変異とともに周辺の配列もヒト由来の配列に置き換えたデザインとした。それにより、得られた実験結果をそのまま臨床実験に利用できる可能性が期待される。各ヒト型変異を有するssDNA(両端に55塩基ずつの相同領域を有する)と標的領域に対するcrRNA/tracrRNAを準備し、Cas9タンパク質と共にC57BL/6J妊娠雌マウスの卵管に導入することで個体の作出を試みた。変異アリルを有する個体を選別後、F1個体の作出、およびF1同士の交配によるホモ個体の作出に成功した。作製したPKUマウスについては、ホモ個体において血中のフェニルアラニン濃度の有意な上昇、毛色の変化(薄い焦茶色を呈する)、血漿中のL-Phe濃度の上昇、などのPKU様の表現型を示すことが確認された。また上記実験と並行して、作出した2系統を交配することによる複合ヘテロ接合体(PKU-R111X/R413P)の作出も行い、以下の新たな遺伝子治療法の検討に用いることとした。

(4) フェニルケトン尿症モデルマウスを用いた遺伝子治療の検討

実際のヒトPKUでは、上記実験で作出した複合ヘテロ接合体マウスと同様の変異アレルを持つ患者さんがいることが知られている。そこで本実験では、相同染色体を利用した複合ヘテロ接合体の遺伝子治療に挑戦することとした。その治療戦略としては、対立遺伝子交換(AE)と相同組み換え修復(IHR)による正常遺伝子の構築を試みた。これらの方法では、正常遺伝子構築のために、正常型の配列を有する修復用ドナーDNAを必要としないため、これまでの遺伝子治療における1つの問題点(ドナーDNAが意図しないゲノム領域に挿入されてしまう危険性)を回避できるものと期待される。そこでまず、本遺伝子治療戦略がうまく動くか否かの検討を行った。各遺伝子修復が誘導されるように設計したゲノム編集試薬を、ハイドロダイナミクス法により複合ヘテロ接合体マウスに導入し、1-3ヶ月後に解析を行った。その結果、いずれの修復系を用いた場合も毛色の回復が見られなかったものの、肝臓から抽出したmRNAを用いてRT-PCRを行ったところ、野生型のPah mRNAが存在することが明らかとなった。

(5) アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子デリバリー法の確立と評価系モデルマウスを用いた検証

上述した実験において表現型の回復が確認できなかった原因の一つとして、ハイドロダイナミクス法によるゲノム編集試薬の送達効率の低さの問題が考えられた。そこで次に、よりデリバリー効率が高いと考えられるアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いることを計画し、まずAAV送達系を所属研究室にて立ち上げることとした。予備実験として、GFP遺伝子を含むAAV粒子をAAVpro293T細胞により調製し、293細胞に添加した。その結果、力価依存的にGFP陽性細胞を確認することができた。次に、マウス個体の肝臓における*in vivo*ゲノム編集効率を評価するために、上述の評価系モデルマウスを用いて検証した。具体的には、肝臓指向性の高いAAV8(SaCas9とgRNAを発現するカセットを有する)を調製後、それを評価系モデルマウスの腹腔内に投与した。投与後10日目に、肝臓を含む各種臓器を採取してeGFP蛍光を確認した。その結果、ハイドロダイナミクス法を用いた時よりも肝臓において非常に強いeGFP蛍光を確認できた。また同時に、肝臓以外の臓器においてはGFP蛍光が殆ど確認できなかったことが分かり、評価系モデルマウスは臓器選択性を確認する上でも極めて有用であることが示唆された。今後、本デリバリー系を用いて上記疾患モデルマウスへの遺伝子治療に挑戦したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohtsuka Masato, Imafuku Jurai, Hori Shuho, Kurosaki Aki, Nakamura Ayaka, Nakahara Tsubasa, Yahata Takashi, Bhat Kolari, Papastefan Steven T, Nakagawa So, Quadros Rolan M, Miura Hiromi, Gurumurthy Channabasavaiah B.	4. 巻 -
2. 論文標題 Delivering mRNAs to mouse tissues using the SEND system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.01.28.522652	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Miura Hiromi, Imafuku Jurai, Kurosaki Aki, Sato Masahiro, Ma Yongjie, Zhang Guisheng, Mizutani Akiko, Kamimura Kenya, Gurumurthy Channabasavaiah B., Liu Dexi, Ohtsuka Masato	4. 巻 24
2. 論文標題 Novel reporter mouse models useful for evaluating in vivo gene editing and for optimization of methods of delivering genome editing tools	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 325 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.03.003	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiromi Miura
2. 発表標題 CRISPring mouse made easy.
3. 学会等名 45th International Mammalian Genome Conference (IMGC2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦浩美
2. 発表標題 in vivoゲノム編集の評価やデリバリー法の最適化に有用なレポーターマウス
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会 フォーラム(2F-14 Bioresource of the year 2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦浩美、今福樹来、黒崎亜希、大塚正人
2. 発表標題 独自の in vivo ゲノム編集評価系レポーターマウスの汎用性の拡張を目指した研究
3. 学会等名 第7回日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦浩美、今福樹来、黒崎亜希、水谷晃子、上村顕也、佐藤正宏、Dexi Liu、大塚正人
2. 発表標題 In vivo ゲノム編集評価系レポーターマウスにおける有用性の検証とその特性について
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromi Miura
2. 発表標題 Development of targeted transgenic technologies before and after the CRISPR era.
3. 学会等名 The 16th Transgenic Technology Meeting (TT2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦浩美
2. 発表標題 皮膚への遺伝子導入系の開発と、老化抑制遺伝子導入による皮膚若返りの試み
3. 学会等名 第15回加齢皮膚医学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H Miura, CB Gurumurthy, M Ohtsuka
2. 発表標題 Development of a reporter mouse model suitable for evaluation of in vivo genome editing efficiency
3. 学会等名 2018 Cold Spring Harbor meeting: Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 浩美、佐藤 正宏、水谷 晃子、大塚 正人
2. 発表標題 ゲノム編集効率評価系モデルマウスの開発と評価
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔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