

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670168

研究課題名(和文)ゲノム編集法の応用によるヒト血液幹細胞遺伝子治療モデルの開発

研究課題名(英文)Genome editing tool for gene therapy in human hematopoietic stem cells

研究代表者

小柳 義夫 (Koyanagi, Yoshio)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80215417

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)：Cas9 nucleasesを使ってguide RNA (sgRNA)誘導性homology directed repair (HDR)経路による両アリル遺伝子座位へのDNA組換え実験の効率化にヒトT細胞で成功した。その標的遺伝子としてHIV複製に關与するLEDGF蛋白質をコードするPSIP1遺伝子を試み、導入蛍光蛋白質の輝度の選別により効率よく組換え反応を誘導できることがわかった。ヒト血液幹細胞ならびにT細胞へ遺伝子構築を実現化する試みとして、HIV遺伝子そのものを標的とするゲウいうsノム編集技術開発を試みた。その結果TALENの利用により遺伝子除去効率がきわめて優れていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The Cas9 nucleases from the *Streptococcus pyogenes*, directed by a chimeric guide RNA (sgRNA) to any genomic locus followed by a 5' -NGG protospaceradjacent motif (PAM), are robust tools for inducing targeted double-stranded DNA breaks (DSBs) in human cells. The RNA-guided endonuclease (RGEN) was applied for human T cells, and then the system created recombinant cells. DSBs induce homology-directed repair (HDR). From the HDR pathway, site-directed insertion (knock-in, KI) was induced by provision of homologous donor construct and the RGENs significantly promote efficient its site-specific insertion in PSIP1 gene. We created to develop an efficient homozygous KI system via fluorescent gene transduction. We also developed an efficient TALEN-genome editing system to remove HIV proviral DNA.

研究分野：ウイルス

キーワード：ゲノム編集 遺伝子治療 CRISPR TALEN 血液幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

近年、種々の細胞内遺伝子の改変が可能なゲノム編集法が生まれた。それは、塩基配列特異的結合ドメインを融合させた人工ヌクレアーゼである zinc finger nuclease (ZFN) や transcription activator-like effector nuclease (TALEN)、そして、外来病原体に対する細菌の獲得免疫分子である clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/ CRISPR-associated (Cas) という塩基配列特異的 DNA 切断酵素群が発見され、これらの改良が急速に進んだからであった(Science 341:833, 2013)。われわれは type II CRISPR/Cas9 法によりヒト T 細胞内の HIV プロウイルス DNA の染色体からの切り出しが可能であることを見出し、潜伏プロウイルス除去による HIV 根治療法への応用研究をはじめていた(Sci Rep. 3:2510, 2013)。一方、先天性免疫不全症である X-SCID 患者の骨髄細胞へのレトロウイルスベクターをつかったコモンガンマ鎖遺伝子の導入治療が 2000 年にフランスではじまり、その劇的な治療効果から脚光を浴びた(Science 288:669, 2000)。しかし、その後染色体への異所性のベクターDNA の組込みによる内在性発がん遺伝子の活性化が原因の白血病症例が報じられたことより、この治療法の本邦への導入は見送られていた。すなわちレトロウイルスによる遺伝子治療には、安全な染色体部位への遺伝子挿入法の確立が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究は、CRISPR/Cas9 系により培養ヒト細胞内の特定染色体遺伝子に変異・修復が可能なゲノム編集法を、遺伝子導入が困難なヒト血液幹細胞でも行えるようにすることを目的として、研究を開始した。一方、コモンガンマ鎖遺伝子の遺伝子治療法として、申請者が目的として記載したコモンガンマ鎖遺伝子部位への特異的導入の導入実験を開始した 2014 年中旬に、ZFN を使って血液幹細胞の  $\gamma$ c 部位への特異的遺伝子挿入法が報告された(Nature 510:235, 2014)。そこで、CRISPR/Cas9 系ゲノム編集法を特定の染色体部位への遺伝子置換技術に改良し、ヒト細胞への遺伝子治療法としての利用性を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト血液細胞におけるゲノム編集法

これまでの DNA トランスフェクション法に加え、mRNA トランスフェクション法あるいはレンチウイルスベクターによる血液細胞への遺伝子導入系の確立を行った。

#### (2) Cas9 変異体 nickase をつかったヒト遺伝子置換法

培養ヒト血液細胞の特定の遺伝子座位に外来マーカー 遺伝子 を挿入置換する実験を行った。マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子

を使った。

#### (3) ヒト血液細胞における遺伝子破壊部位の修復

挿入置換したヒト血液細胞の遺伝子部位に、本来の遺伝子 DNA フラグメントと CRISPR/Cas9 法を同時に導入し、組換え置換させ、短期薬剤選択後に、この細胞における遺伝子発現の回復をウエスタン法により評価した。

### 4. 研究成果

CRISPR 法を使って homology directed repair (HDR) 経路による両アリル遺伝子座位への DNA 組換え実験の効率化に CD4+ T 細胞 (MT-4 細胞ならびに Jurkat 細胞) で成功した。その標的遺伝子として、まず、HIV 複製に関与する LEDGF 蛋白質をコードする *PSIP1* 遺伝子を試み、導入蛍光遺伝子の発現量の高い細胞をセルソータで選別する方法により効率よく組換え反応が生じた細胞を得ることができた。図 1 は非トランスフェクション細胞 (unTF) と両アリル遺伝子座位への DNA 組換え実験を行った MT-4 細胞 (左) ならびに Jurkat (右) における LEDGF 蛋白質 (上のパネル) と alpha-tubulin 蛋白質の発現をウエスタン法による検出を示している。H5 と H8 は MT-4 細胞に L4 と L6 は Jurkat 細胞に CRISPR 法を使って homology directed repair (HDR) 経路による両アリル遺伝子座位への DNA 組換えをおこなった細胞であり、75K の分子量である全長 LEDGF 蛋白質は消失し、約 60K の truncation form の LEDGF 蛋白質は維持された。そして、次にその外来遺伝子を本来の内在性遺伝子に復帰あるいは単一塩基置換させる遺伝子改修法を開発した (投稿準備中)。なお、改修遺伝子の発現はウエスタン法により確認した。また、ゲノム編集法を利用した HDR 組換え法により、HIV プロウイルス特異的に lactose operon (LacO) 反復配列を挿入する手法を確立した。そして、その細胞に green fluorescent protein (GFP) 融合 LacI を発現させ、蛍光顕微鏡により GFP 凝集像が見出され、すなわち生細胞における HIV プロウイルスの動態追跡が可能であることをわかった。一方、ヒト血液幹細胞ならびに T 細胞へ遺伝子構築を実現化する試みとして、HIV 遺伝子そのものを標的とするゲノム編集技術開発を試みた。その結果、まず TALEN の利用により、以前われわれが報告した CRISPR 法 (Sci Rep 3:2510, 2013) よりも、遺伝子除去効率がきわめて優れていることがわかった (Ebina *et al.* 2015)。図 2A は TALEN の単一の導入により細胞染色体に組込まれた HIV プロウイルスを除去できることを隣接配列特異的な PCR 法により示したものである。図 2B は HIV-1 DNA の定量 PCR 法により除去量を示している。また、CRISPR 法により HIV 蛋白質をコードするウイルス遺伝子座位を標的として、HIV の複製を抑制しうる独自のレンチウイルスベクターを開発し

た (Ueda *et al.* 2015, 印刷中)。以上の結果から、遺伝子改修法として CRISPR/Cas9 法がきわめて有用であることがわかった。具体的に血液細胞、特に血液幹細胞への遺伝子治療法の施行が可能な技術展開への実験を行っている。

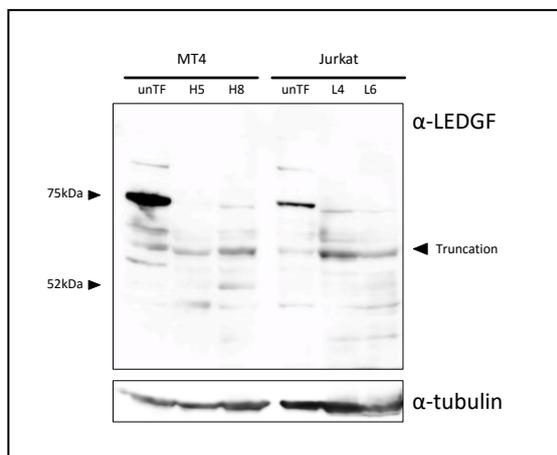


図 1. ウェスタン法による LEDGF 蛋白質の検出

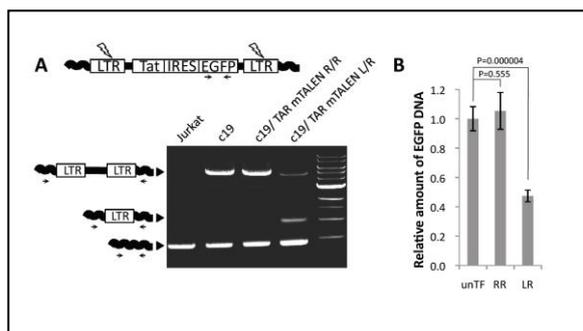


図 2. TALEN による細胞染色体に組み込まれた HIV プロウイルスの除去

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

(1) Sato K, Takeuchi SJ, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, Takaori-Kondo A, Hu WS, Aihara K, Ito M, An DS, Pathak VK, Koyanagi Y. APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mice. *PLoS Pathogens* 査読有 10:e1004453, 2014, 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1004453.

(2) Ikeda H, de Boer RJ, Sato K, Morita S, Misawa N, Koyanagi Y, Aihara K, Iwami S. Improving the estimation of the death rate of infected cells from time course data during the acute phase of virus infections:

application to acute HIV-1 infection in a humanized mouse model. *Theor. Biol. Med. Model.* 査読有 11:22, 2014, doi: 10.1186/1742-4682-11-22.

(3) Kobayashi T, Koizumi Y, Takeuchi J, Misawa N, Kimura Y, Morita S, Aihara K, Koyanagi Y, Iwami S, Sato K. Quantification of deaminase activity-dependent and -independent restriction of HIV-1 replication mediated by APOBEC3F and APOBEC3G through experimental-mathematical investigation. *J. Virol.* 査読有 88:5881-5887, 2014, doi: 10.1128/JVI.00062-14.

(4) 蝦名博貴、小柳義夫、ゲノム編集技術を用いたエイズ根治療法の可能性 今すぐ始めるゲノム編集 実験医学別冊、査読無 羊土社, pp. 21, 2014.

(5) 蝦名博貴、小柳義夫、ゲノム編集とエイズ治療、医学のあゆみ、査読無 252 巻、p.189-193, 2015.

(6) Yamada E, Yoshikawa R, Nakano Y, Misawa N, Koyanagi Y, Sato K. Impacts of humanized mouse models on the investigation of HIV-1 infection: Illuminating the roles of viral accessory proteins in vivo. *Viruses* 査読有 7, 1373-1390, 2015, doi: 10.3390/v7031373.

(7) Ebina, H, Kanemura Y, Misawa N, Sakuma T, Kobayashi T, Yamamoto T, Koyanagi Y. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One* 査読有 e0120047, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0120047.

(8) Iwami S, Sato K, Morita S, Inaba H, Kobayashi T, Takeuchi, J.S., Kimura, Y., Misawa, N, Ren F, Iwasa Y, Aihara K. and Koyanagi Y. Pandemic HIV-1 Vpu overcomes intrinsic herd immunity mediated by tetherin. *Sci. Rep.* 査読有 5:12256, 2015, doi: 10.1038/srep12256.

(9) Ebina H, Gee P, Koyanagi Y. Perspectives of genome-editing technologies 1 for HIV therapy. *Curr. HIV Res.* 14,2-8, 2016. DOI: 10.2174/1570162X13666150807105718.

(10) Sato K, Kobayashi T, Misawa N, Yoshikawa R, Takeuchi, JS, Miura T, Okamoto M, Yasunaga J, Matsuoka M, Ito M, Miyazawa T, Koyanagi Y. Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. *Sci. Rep.* 査読有 5, 14040, 2015, doi: 10.1038/srep14040.

(11) Yoshikawa R, Izumi T, Yamada E, Nakano Y, Misawa N, Ren F, Carpenter M A, Ikeda T, Münk C, Harris RS, Miyazawa T, Koyanagi Y and Sato K. A naturally

occurring domestic cat APOBEC3 variant confers resistance to FIV infection. *J Virol*, 査読有 90, 474-85, 2015, doi: 10.1128/JVI.02612-15.

(12) Takeuchi JS, Ren F, Yoshikawa R, Yamada E, Nakano Y, Kobayashi T, Matsuda K, Izumi T, Misawa N, Shintaku Y, Wetzel KS, Collman RG, Tanaka H, Hirsch VM, Koyanagi Y, Sato K. Coevolutionary dynamics between tribe Cercopithecini tetherins and their lentiviruses. *Sci Rep* 査読有 5, 16021, 2015. doi: 10.1038/srep16021.

(13) Suzuki Y, Chin WX, Han QE, Ichiyama K, Lee CH, Eyo WZ, Ebina E, Takahashi H, Takahashi C, Tan BH, Hishiki T, Ohba K, Matsuyama T, Koyanagi Y, Tan YJ, Sawasaki T, Chu JJH, Vasudevan SG, Sano K, Yamamoto N. Characterization of RyDEN (C19orf66) as an interferon-stimulated cellular inhibitor against dengue virus replication. *PLoS Pathogens* 査読有 12:e1005357, 2016. doi: 10.1371/journal.ppat.1005357

(14) Yoshikawa R, Nakano Y, Yamada E, Izumi T, Misawa N, Koyanagi Y, Sato K. Species-specific differences in the ability of feline lentiviral Vif to degrade feline APOBEC3 proteins. *Microbiol Immunol*. 査読有 60, 272-9, 2016. doi: 10.1111/1348-0421.12371.

(15) Ikeda H, Nakaoka S, de Boer RJ, Morita S, Misawa N, Koyanagi Y, Aihara K, Sato K, Iwami S Quantifying the effect of Vpu on the promotion of HIV-1 replication in the humanized mouse model. *Retrovirology*. 査読有 13:23, 2016. doi: 10.1186/s12977-016-0252-2.

(16) Yoshikawa R, Izumi T, Nakano Y, Yamada E, Moriwaki M, Misawa N, Ren F, Kobayashi T, Koyanagi Y, Sato K. Small ruminant lentiviral Vif proteins commonly utilize cyclophilin A, an evolutionary and structurally conserved protein, to degrade ovine and caprine APOBEC3 proteins. *Microbiol Immunol*. 査読有 2016 May 19. doi: 10.1111/1348-0421.12387.

(17) Ueda S, Hirotaka Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Koyanagi Y, Insufficient anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system for full viral replication. *Microbiol Immunol*,印刷中.

[学会発表] (計 9 件)

①Koyanagi Y, Misawa N, Sato K, Ebina H, HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka, 18-19 June, 2014.

② Koyanagi Y.: Genome-editing technologies for HIV proviral DNA, JSPS Core-to-Core Program 1st International Symposium on Virus Infections and Host Responses, Kyoto 2015年1月27日.

③ Koyanagi Y. and Ebina H.: Genome-editing technologies for excision of HIV provirus. The U.S-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Taipei, 2015年1月29日.

④Koyanagi Y., Ebina H., Sakuma T. and Yamamoto T.: Genome-editing technologies for excision of HIV proviral DNA, Palm Springs Symposium on HIV/AIDS, 2015年3月7日.

⑤蝦名博貴、上田修平、三沢尚子、金村優香、小柳義夫:ゲノム編集法の HIV 感染症治療への有用性, 第 62 回日本実験動物学会総会シンポジウム(招待講演)、京都、2015年5月28日.

⑥ Koyanagi, Y. and Sato K.: Host restriction factors for HIV infection, IFOM-KU Joint Symposium (シンポジウム), Kyoto, 2015年10月6日.

⑦蝦名博貴、上田修平、三沢尚子、金村優香、小柳義夫: Application of genome editing technologies in HIV research, 第38回日本分子生物学会シンポジウム(招待講演)、神戸、2015年12月3日.

⑧上田修平、蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫: RGN 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製抑制, 第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月4日.

⑨小柳 義夫、佐藤佳、蝦名博貴: HIV 感染抑制のための細胞性分子標的, 北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会「感染・免疫・炎症・発癌」、札幌. 2015年12月18日.

[図書] (計 1 件)

①Koyanagi Y, Selective infection of CD4+ memory T cells in “Humanized mice for HIV research ” . Poluektova L, Garcia-Martinez V, Koyanagi Y, Manz M, Tager A, ed. Springer, 2014, 255-264.

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/KoyanagiHP/>

nagiHP/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 義夫 (KOYANAGI, Yoshio)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80215417