

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：87122

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15393

研究課題名(和文)人工ヌクレアーゼを用いた原発性免疫不全症に対する新規遺伝子変異修復療法の開発

研究課題名(英文) Development of new gene-repair therapy for primary immunodeficiencies with artificial nuclease

研究代表者

原 寿郎 (HARA, Toshiro)

地方独立行政法人福岡市立病院機構福岡市立こども病院(臨床研究部)・臨床研究部・院長

研究者番号：40150445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：正常ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を用いたコロニーアッセイにおいて、ターゲット遺伝子領域で特異的なDNAの2本鎖切断を起こす人工ヌクレアーゼであるCRISPR-Cas9を用いた遺伝子ターゲティングを試みた。標的遺伝子配列特異的なガイドRNAをin vitroで合成して、このガイドRNAとCas9タンパク質をエレクトロポレーション法にて、アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターと共に導入することで、遺伝子ターゲティングを認めた。この導入法は、臨床応用に適した新規遺伝子変異修復法となり得るものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To examine the possibility of using gene therapy for primary immunodeficiencies, we constructed a helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid vector to serve as a donor template, and a sequence-specific gRNA for double strand breaks. Human cord blood CD34 positive cells were infected with the hybrid vector and electroporated with gRNA and Cas9 protein. This delivery method can be a new gene-repair therapy for clinical application.

研究分野：小児科学

キーワード：遺伝子治療 人工ヌクレアーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性免疫不全症候群は、先天的に免疫系のいずれかの部分に欠陥がある疾患である。感染に対する抵抗力の低下のため感染を繰り返す。原発性免疫不全症のひとつである Bruton 型無ガンマグロブリン血症 (XLA) は、X 染色体長腕に位置する Bruton's tyrosine kinase (BTK) 遺伝子変異によって生じる B 細胞の分化障害が原因である。グロブリンの定期的補充にも関わらず感染症を繰り返し、呼吸不全やエンテロウイルス脳炎、敗血症、消化器癌などにより死亡する場合がある。Btk 変異を有する骨髄細胞を致死放射線照射マウスに移植する際、正常骨髄細胞を 0.5% 混入させるだけで 60% のマウスが免疫グロブリン産生能を回復することから、遺伝子修復された細胞がわずかであっても、B 細胞の増殖優位性により治癒する可能性がある。従って、遺伝子治療のターゲットの疾患になり得る。

(2) 原発性免疫不全症 (X 連鎖重症複合免疫不全症: X-SCID、ADA 欠損症など) に対する遺伝子治療は既に行われているが、治療効果を得られた報告があった一方、レトロウイルスベクターを用いた X-SCID の遺伝子治療では、リンパ性白血病が発症したことから、その安全性が大きな問題となった。現在の“遺伝子治療”は、正規の遺伝子の場所に関係なく付加的に遺伝子を導入する方法であり、変異遺伝子そのものの修復は効率、安全性の観点から未だ行われていない。

(3) 人工ヌクレアーゼのひとつである CRISPR-Cas9 システムは、ゲノム中で任意の切断したい領域を切断できる遺伝子改変技術である。CRISPR-Cas9 システムとドナーベクターをともに用いることで、相同組換え修復による遺伝子改変の効率の向上が期待できる。

(4) ウイルスベクターの中でアデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターは、造血幹細胞に対する高い遺伝子導入効率、大きな遺伝子の挿入が可能、高力価のベクターの調整が比較的容易、といったアデノウイルスベクターの長所と、最も効率良く標的遺伝子に組み込みをおこすというアデノ随伴ウイルスベクターの長所を兼ね備えている。

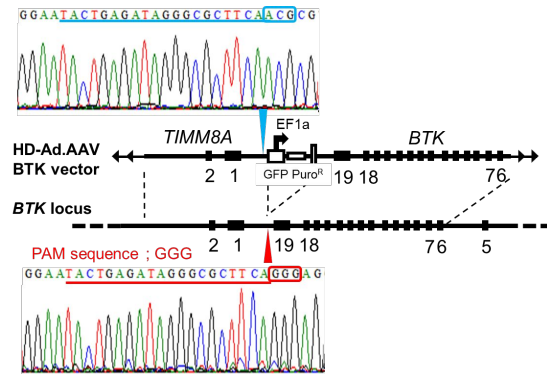
2. 研究の目的

我々は、過去の研究において、アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターを用いた正常ヒト血液細胞株ならびに臍帯血由来造血幹細胞での BTK 遺伝子ターゲティングに成功した。しかし、その頻度は十分ではなかったため、本研究では、人工ヌクレアーゼを用いることで、治療効果を得られると推測される頻度を目指し、様々な導入方法を検討

することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 既に作製済のアデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターに対応する BTK 遺伝子配列特異的 DNA 切断を引き起こす、人工ヌクレアーゼである CRISPR-Cas9 プラスミドを作製した (図 1)。



Without this function of the PAM, Cas9 never be able to cleave HD-Ad.AAV BTK vector.

(図 1) アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターならびに CRISPR-Cas9 における認識部位

(2) CRISPR-Cas9 は、ガイド RNA と Cas9 タンパク質の二つの異なる分子で構成される。標的遺伝子配列特異的なガイド RNA を *in vitro* で合成して、このガイド RNA と Cas9 タンパク質をエレクトロポレーション法にて正常ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に導入を行った。

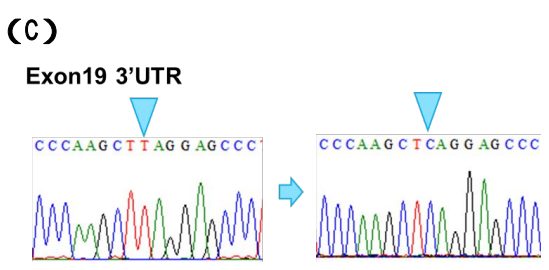
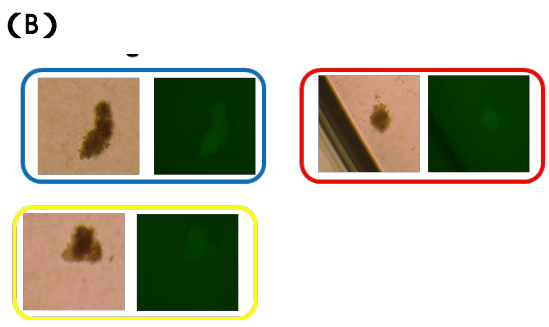
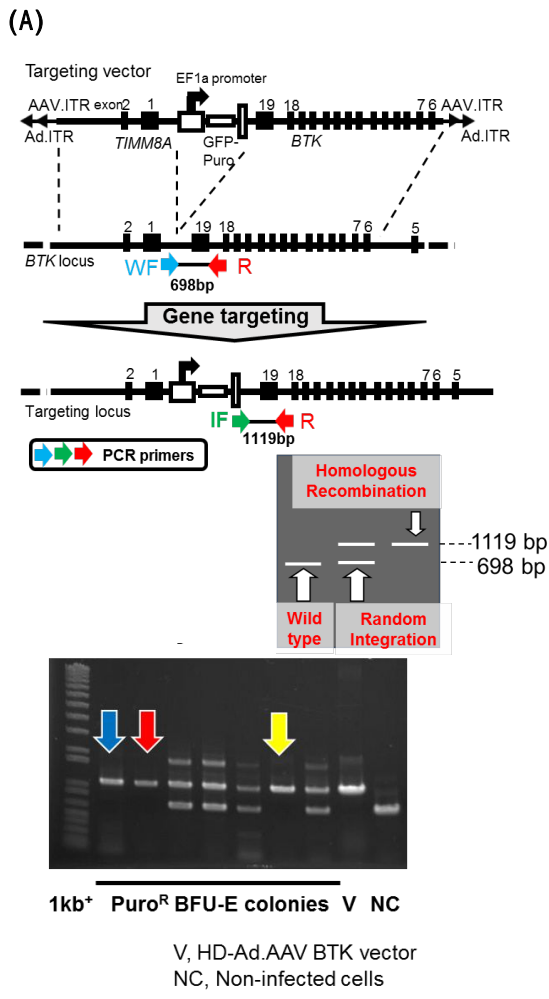
(3) 導入を行った細胞を用いて、コロニーアッセイを行い、各コロニーの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いたコロニーアッセイ

正常ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いたコロニーアッセイにおいて、原因遺伝子である BTK 遺伝子を標的として、アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターとターゲット遺伝子領域で特異的な DNA の 2 本鎖切断を起こす人工ヌクレアーゼである CRISPR-Cas9 発現プラスミドを導入した。

この導入した細胞をピューロマイシンにて薬剤選択による、シングルセルクローニングを行った。得られたクローンより DNA を抽出し、PCR 法による遺伝子ターゲティングの確認を行った結果、図 2A に示す通り、遺伝子ターゲティングを認めた。コロニーの写真を図 2B に示す。各コロニーの DNA シークエンスを行い、ウイルスベクター由来の一塩基多型に置換されていることを確認した (図 2C)。



(図 2)(A) PCR 法による遺伝子ターゲティングのスクリーニング。矢印で示したクローンで遺伝子ターゲティングを認めた。(B) 遺伝子ターゲティングを認めた BFU-E コロニー。(C) 得られたコロニーの DNA シークエンス。ウイルスベクター由来の一塩基多型に置換されていることを確認した。

(2) CRISPR-Cas9 の導入法の変更
 (1)で、遺伝子ターゲティングを認めたが、CRISPR-Cas9 発現プラスミドは、CD34 陽性細胞に対して細胞毒性が強く、導入時に多くの細胞死を伴った。このことを改善するため、CRISPR-Cas9 の導入法を再検討した。CRISPR-Cas9 は、ガイド RNA と Cas9 タンパク質の二つの異なる分子で構成される。標的遺伝子配列特異的なガイド RNA を in vitro で合成して、このガイド RNA と Cas9 タンパク質をエレクトロポレーション法にて正常ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に導入を行った。結果、プラスミドに比べて、細胞毒性を低く抑えることができた。

(3) 小分子化合物を用いた遺伝子ターゲティング
 さらに遺伝子ターゲティング効率の改善のため、CRISPR-Cas9 と同時に用いることで、遺伝子ターゲティング効率の上昇が報告されている小分子化合物、数種類を加えた実験を行った。結果、そのうちのひとつの小分子化合物を加えると、効率の上昇を認めた。CRISPR-Cas9 のオフターゲット効果を調べることで安全性の評価を行った。

5. 主な発表論文等
 [雑誌論文](計1件)
 Yamamoto H, Ishimura M, Ochiai M, Takada H, Kusuhara K, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Mitani K, Hara T:
 "BTK gene targeting by homologous recombination using a helper-dependent adenovirus/adenovirus hybrid vector" Gene Therapy 23. 205-213 (2016), 査読有
 DOI: 10.1038/gt.2015.91

[学会発表](計3件)
 高田英俊、Gene Therapy for PID, The 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research, 2015 年

山元裕之、BTK gene targeting by homologous recombination using a helper-dependent adenovirus/adenovirus hybrid vector、第 27 回福岡国際母子総合研究シンポジウム、2016 年

Yamamoto H, BTK Gene Targeting by Homologous Recombination Using a Helper-Dependent Adenovirus/Adeno-Associated Virus Hybrid Vector and CRISPR/Cas9 System, The 8th JSH International Symposium, 2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 寿郎 (HARA, Toshiro)
地方独立行政法人福岡市立病院機構
福岡市立こども病院 (臨床研究部)・
臨床研究部・院長
研究者番号 : 40150445

(2) 研究分担者

高田 英俊 (TAKADA, Hidetoshi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号 : 70294931

山元 裕之 (YAMAMOTO, Hiroyuki)
九州大学・環境発達医学研究センター・
特任助教
研究者番号 : 00710170