

令和元年6月13日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19653

研究課題名(和文) 原発性免疫不全症に対する非特異的な遺伝子改変を抑制した新規遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new gene therapy for primary immunodeficiencies by suppressing non-specific genetic modifications

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の可能性の検討のため、標的遺伝子配列特異的なガイドRNAの合成とアデノ随伴ウイルスベクターの作製を行った。小分子化合物を含む培地中のヒト臍帯血由来CD34陽性細胞に、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、アデノ随伴ウイルスベクターと共に導入した。この導入法は、非特異的な遺伝子改変を抑制した新規遺伝子治療法となり得るものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術による原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の基礎研究は、重症複合免疫不全症などを中心に既に行われているが、無ガンマグロブリン血症を対象とした研究の論文報告はまだない。無ガンマグロブリン血症に対する非特異的な遺伝子改変を抑制した新規遺伝子治療法の研究は、将来の新たな安全な治療法の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To examine the possibility of using gene therapy for primary immunodeficiencies, we constructed an adeno-associated virus vector to serve as a donor template, and a sequence-specific gRNA for double strand breaks. Human cord blood CD34 positive cells with a small molecule were infected with the vector and electroporated with gRNA and Cas9 protein. This delivery method can be a new gene therapy by suppressing non-specific genetic modifications.

研究分野：分子生物学

キーワード：原発性免疫不全症 ウイルスベクター 遺伝子治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)現在の“遺伝子治療”は何らかの手段で正規の遺伝子の場所に関係なく遺伝子を付加的に導入する方法が大部分であり、変異遺伝子自体を修復する遺伝子修復治療は世界的にも開発途上である。

(2)原発性免疫不全症に対する遺伝子治療はレトロ・レンチウイルスベクターを用いた報告が多数存在するが、治療後に一部で生じたベクターの非特異的な組込みによる発癌が特に問題となっている。また一方、近年、CRISPR-Cas9 システムをはじめとする人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子変異の修復を行った研究報告もあるが、人工ヌクレアーゼの非特異的な DNA の切断による、非特異的な遺伝子改変が問題となっている。こうした背景から、非特異的な遺伝子改変を抑制したより安全な新規の遺伝子治療法の開発が望まれている。

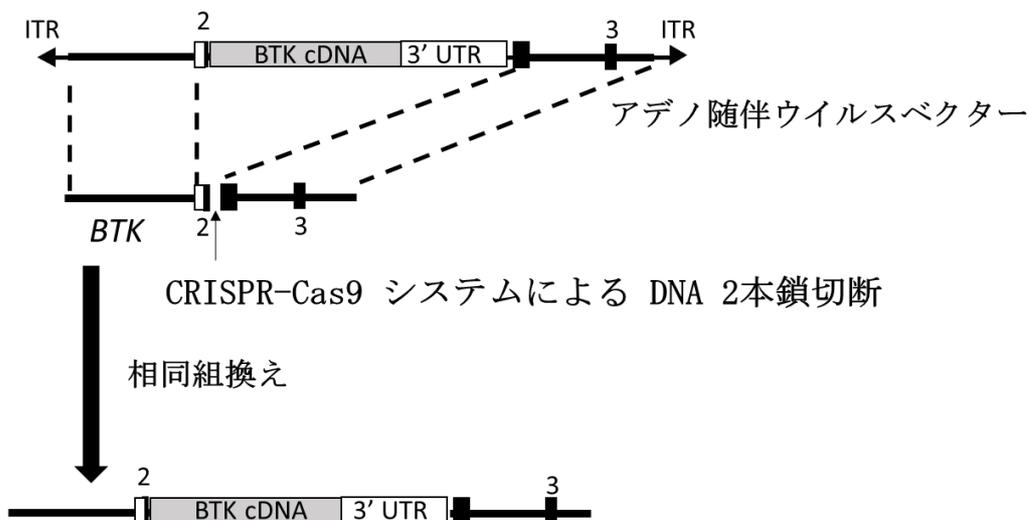
(3)本研究では、原発性免疫不全症の中で頻度が高い無ガンマグロブリン血症を対象に研究を行う。無ガンマグロブリン血症は、X 染色体に存在する Bruton Tyrosine Kinase 遺伝子の変異により B 細胞系の分化障害を来す原発性免疫不全症である。本疾患では、造血幹細胞の一部で変異遺伝子を修復し、かつそれが増殖優位性を獲得できれば、分化障害を回復できる可能性がある。

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。本研究では、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、非特異的な遺伝子改変を抑制したより安全な新規の遺伝子治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

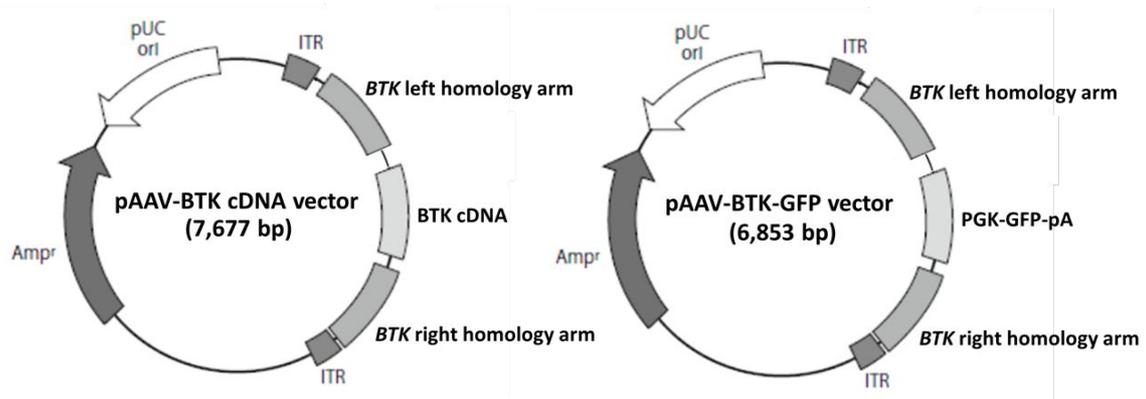
(1)過去の報告を参考に、図 1 に示す通り、ヒト *BTK* 遺伝子のエクソン 2 をターゲットとするアデノ随伴ウイルスベクターと CRISPR-Cas9 システムのガイド RNA をデザインした。



【図 1】アデノ随伴ウイルスベクターによる組換え

(2) *in vitro* transcription 反応によりガイド RNA を合成した。

(3)タカラバイオ社製 pAAV-CMV Vector をもとに、図 2 に示すプラスミド 2 種類を作製した。



【図2】作製したプラスミド

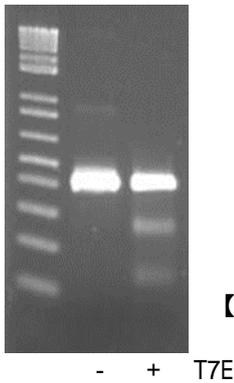
(4) タカラバイオ社製 AAVpro Helper Free System を用いて、アデノ随伴ウイルスベクターを大量作製した。

4. 研究成果

(1) CRISPR-Cas9 システムの評価

血液細胞である K562 細胞に、合成したガイド RNA と Cas9 タンパク質をトランスフェクションした。3 日後、細胞より DNA を抽出した。標的領域を PCR にて増幅後、T7 エンドヌクレアーゼを使用するミスマッチ切断アッセイにて、切断活性を評価した。

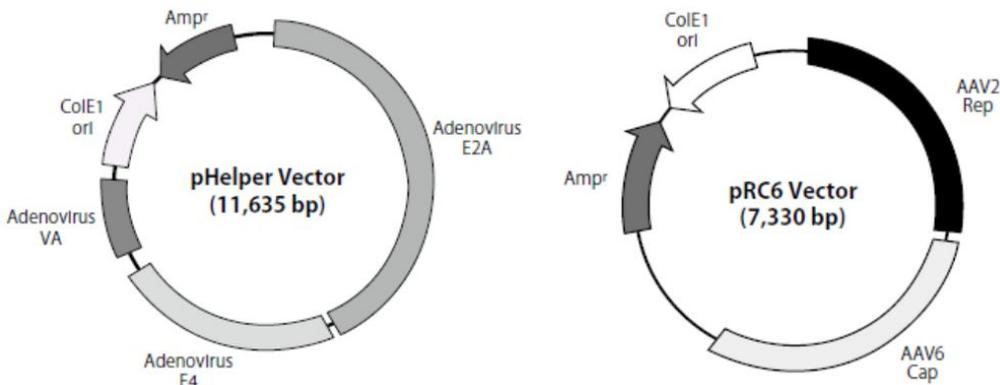
図 3 に示す通り、標的領域での DNA の 2 本鎖切断を確認した。



【図3】切断活性の評価

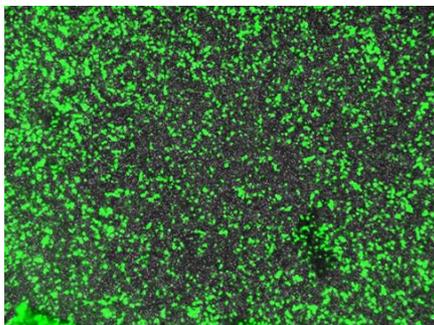
(2) アデノ随伴ウイルスベクターの作製

293T 細胞に図 2 のプラスミド (pAAV-BTK-GFP vector)、ならびに図 4 に示すプラスミド、計 3 種類のプラスミドをトランスフェクションした。



【図4】アデノ随伴ウイルスベクターの作製に用いたプラスミド (タカラバイオ社)

図 5 に示す通り、GFP タンパク質の発現を確認した。



【図 5】トランスフェクションを行った 293T 細胞

293T 細胞を回収して、図 6 に示す通り、密度勾配超遠心法によるウイルス精製を行った。



【図 6】密度勾配超遠心法によるウイルス精製

回収したウイルスの力価をリアルタイム PCR 法にて測定した。

(3) アデノ随伴ウイルスベクターと CRISPR-Cas9 の導入を行った、小分子化合物を含む培地中のヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の遺伝子配列を確認の上、正常タンパク質の発現を確認した。

5. 主な発表論文等

特になし

6. 研究組織

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。