

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04036

研究課題名（和文）脳ゲノム編集機構の分子解析及び新技術開発

研究課題名（英文）Molecular analysis of genome-editing mechanism in brain and development of novel genome-editing technology

研究代表者

鈴木 啓一郎（Suzuki, Keiichiro）

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：70433654

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,400,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞内の遺伝子変異により引き起こされる数多くの遺伝性神経疾患に対して、現在では有効な治療法は存在していない。本研究では生体内の大部分を占める非分裂神経細胞におけるゲノム編集技術の原理の一端を解明した。本技術を基に、様々な疾患変異を任意の配列に置換できる、より自由度の高い新規のゲノム編集技術「SATI法」法の開発に成功し、実際に遺伝性疾患であるプロジェリア症候群モデルマウスが示す早老症状の回復効果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、神経細胞におけるゲノム編集技術の分子機構の一端が明らかになり、様々なタイプの遺伝子変異を脳だけでなく様々な臓器で修復できるSATI法の開発に成功した。今後本技術がさらに改良されることで、早老症のみならず他の神経や筋肉や網膜など様々な組織や全身に異常を持つ難治性遺伝病に対し、その原因となる異常遺伝子を病変部位で直接修復する医療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：A radical treatment method for most of inherited neuronal diseases has not been developed yet. In this study, we elucidated the molecular mechanism of genome editing in brain. Based on the mechanism, we have developed novel genome-editing method "SATI" that can repair many kinds of mutations in vivo. Using this method, we treated an HGPS premature mouse model carrying a dominant point mutation and demonstrated amelioration of aging-related phenotypes in multiple organs and extension of lifespan.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集 神経 HITI法 SATI法 プロジェリア症候群

### 1. 研究開始当初の背景

近年、CRISPR-Cas9 に代表されるゲノムの標的配列のみを特異的に切断するタンパク質『人工ヌクレアーゼ』が登場し、標的遺伝子の破壊（遺伝子ノックアウト）や遺伝子挿入（遺伝子ノックイン）など、ゲノム配列を改変する『ゲノム編集』が様々な細胞種・生物種で可能となった。特に遺伝子ノックイン技術は標的配列を自由自在に改変することができる汎用性の高い技術であり、遺伝子変異を体内で直接修復する治療への応用も期待されるようになった。しかしながら、既存の遺伝子ノックイン技術は『相同組換え (HDR; Homology-directed repair)』と呼ばれる細胞が持つ DNA 修復経路を利用しており、原理的に高い細胞分裂活性を必要とするため、生理的に細胞分裂を行っていない神経細胞を含むほとんどの生体内の細胞『非分裂細胞』への応用は非常に困難であった。

こういった背景の中、研究代表者が発表した非相同末端結合 (NHEJ; Non-homologous end joining) 機構と呼ばれる別の DNA 修復経路と CRISPR-Cas9 を利用した生体内非分裂細胞への遺伝子ノックイン技術「Homology-Independent Targeted Integration (HITI)」は、これまで困難であった生きたマウスの脳・筋肉など非分裂細胞にて標的ゲノム配列を自由に改変する世界初の技術であった。本技術の登場により、生体内の病変部位で疾患変異を直接修復することが可能となり、実際に遺伝性疾患である網膜色素変性症モデルラットの視覚機能障害の治療効果が得られた (Suzuki et al, *Nature* 2016)。

しかしながら、既存の HITI 法では、任意の配列をゲノム標的部に挿入することはできても、原因変異を取り除く事は出来ないという大きな問題点があり、治療可能な標的は遺伝子の一部が欠落している欠失変異のみであった。また、ゲノム編集効率が低いことから遺伝性疾患モデルに対しては長期的に十分な治療効果が得られていなかった。つまり現状のゲノム編集技術では、遺伝性神経疾患患者に対する医療応用には不十分であると考えた。

### 2. 研究の目的

ゲノム編集技術は、細胞が元来から備える、ゲノム DNA の二本鎖切断 (DSB; Double-strand break) を修復する機構 (DSB 修復機構) を利用していることが知られている。しかしながら、哺乳動物細胞の DSB 修復機構及びゲノム編集技術は、分裂する培養細胞でのみ研究が進んでおり、培養が困難であるという理由から、生体内の大部分を構成する非分裂細胞では、それらの分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、培養神経細胞を用いてゲノム編集機構を明らかにし、この知見を基に新規脳ゲノム編集技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 非分裂細胞であるマウス胎児脳由来の神経細胞を培養し、神経細胞特異的に発現する *Tubb3* 遺伝子の下流に GFP 遺伝子のノックインを試みる。本研究では、様々なデザインの遺伝子ノックインカセット及び人工切断酵素を用い、神経細胞において、どのようなメカニズムでゲノム編集が起こるかを検討した。

(2) (1) で得られた知見を基に、どの DSB 修復経路を利用すれば効率のよい遺伝子ノックインが可能になるかを検討し、新規脳ゲノム編集技術を開発する。開発したゲノム編集技術を用い、遺伝子疾患モデルマウスのゲノム

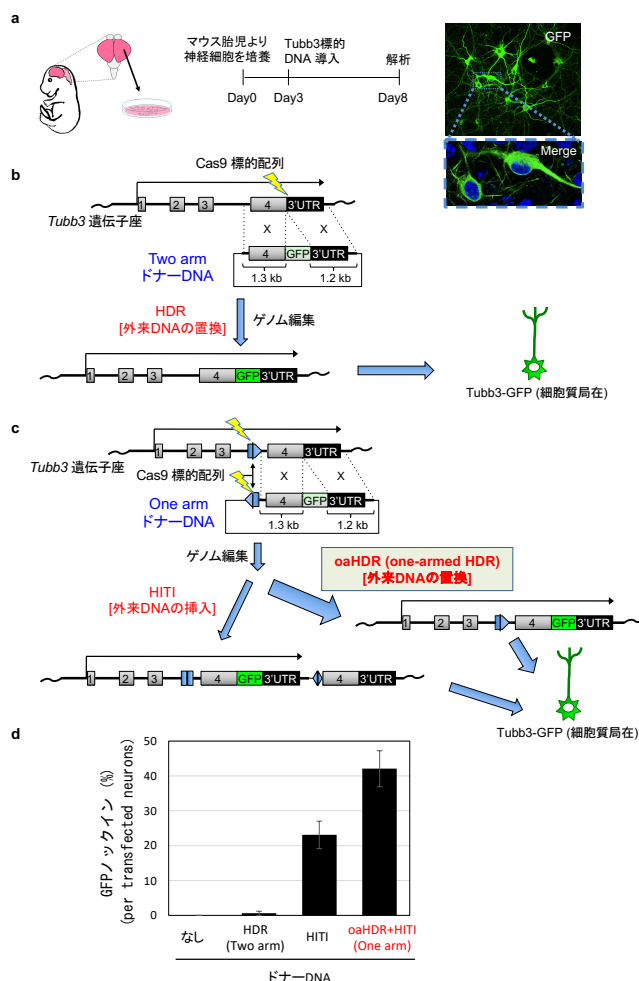


図1 培養神経細胞を用いた新規ゲノム編集技術の開発

a. マウス胎児より神経細胞を単離し、ディッシュ上で培養する。培養3日目に様々なゲノム編集用DNAを導入し、培養8日目にノックインされたGFPの発現を確認する。GFPは神経細胞特異的に発現する *Tubb3* 遺伝子の下流にノックインされ、正確にノックインされれば細胞質に発現する。  
 b. 通常のHDR方法。染色体の標的配列をCRISPR-Cas9で切断し、切断部位の両側に相同配列をもたせたTwo-armedドナーDNAを導入する。  
 c. 予備実験結果で発見した新規のゲノム編集機構『One-armed HDR (oaHDR)』。染色体の標的配列を切断し、切断部位の片側に相同配列をもたせたOne-armedドナーDNAを導入する。さらにドナーDNAを切断する。本来はHITIによる挿入(左)を想定していたが、実際には新規の相同組換え (oaHDR) 経路による挿入(右)が起こった。  
 d. 様々なドナーDNAを用いたノックイン効率の比較。

編集治療を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ゲノム中の相同部位に対してドナーDNAの片側のみ相同配列 (one arm) を持たせ、ゲノム標的部位とドナーDNAを細胞内で同時に切断することで、外来遺伝子が標的遺伝子に置換される方法を新規発見し、「one-armed HDR (oaHDR)」と名付けた (図1)。

(2) 更に当該方法を利用した新規脳ゲノム編集技術「intercellular linearized Single homology Arm donor mediated intron-Targeting Integration (SATI) 法」を開発し、脳以外の全身の細胞組織にも適用できることを示した。本技術を用いることで、既存の技術では治療法の存在しない優性変異を持ち全身で異常な老化症状を示す早老症ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 (プロジェリア症候群) モデルマウスに対し、複数の組織や臓器で同時にゲノム編集を行い、全身性のゲノム編集治療に成功した (図2)。

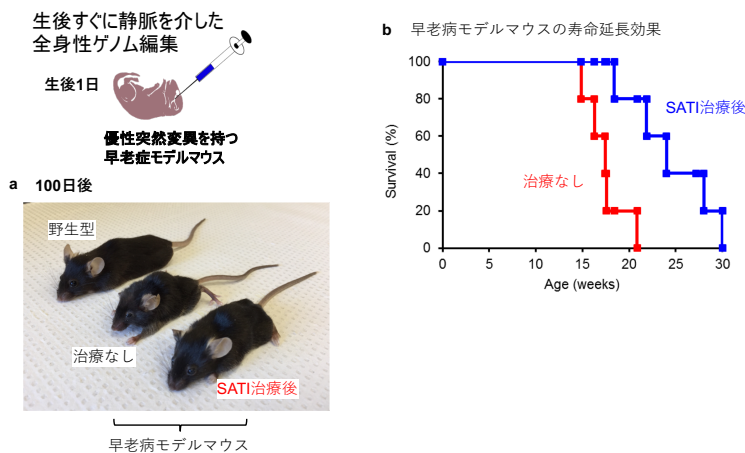


図2 SATI法を用いた早老症モデルマウスの全身性ゲノム編集治療

AAV-SATIを生後1日のプロジェリア症候群モデルマウスに静脈注射することで、体重の増加 (a) や寿命の1.5倍程度の延長効果 (b) が見られる。

今後本技術を基にさらに改良することで、早老症のみならず他の神経や筋肉や網膜など様々な組織や全身に異常を持つ難治性遺伝病に対し、その原因となる異常遺伝子を病変部位で直接修復するゲノム編集治療技術が確立し、根治可能な革新的医療技術としての応用が期待される。

#### <引用文献>

Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, J. E., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R.D., Qu, J., Jiang, T., Fu, X., Jafari, M., Esteban, C.R., Berggren, T., Lajara, J., Nuñez, E., Guillen, P., Campistol, J.M., Matsuzaki, F., Liu, G.H., Magistretti, P., Zhang, K., Callaway, E.M., Zhang, K. and Izpisua Belmonte, J.C. *In vivo* genome editing via CRISPR-Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 540, 144-149, (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki, K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., ... and Izpisua Belmonte, J.C. (他23名)	4. 巻 29
2. 論文標題 Precise in vivo genome editing via single homology arm donor mediated intron-targeting gene integration for genetic disease correction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Research	6. 最初と最後の頁 804-819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41422-019-0213-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 11件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 鈴木 啓一郎
2. 発表標題 Development of in vivo genome editing technologies
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 啓一郎
2. 発表標題 HITI法を用いた生体内ゲノム編集技術の開発と治療応用
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Development of in vivo genome editing technologies and application for genome-editing therapy
3. 学会等名 第4回日本ゲノム編集学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Development of novel in vivo genome editing method “HITI” and applications for animal models
3. 学会等名 10th workshop on Innovative Mouse Models (IMM2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 啓一郎
2. 発表標題 生体内ゲノム編集技術HITI法の開発と治療応用
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Development of in vivo genome-editing technologies and application for genome-editing therapy
3. 学会等名 18th Surugadai International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Manipulation of genomic mutation using genome-editing technology
3. 学会等名 ACEM/JEMS 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Development of in vivo genome editing technologies and application for genome-editing therapy
3. 学会等名 Frontiers in Genome Engineering 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Development of targeted gene knock-in method in non-dividing cells
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Genome-editing therapy via HITI (Homology-Independent Targeting Integration) method
3. 学会等名 第24回日本遺伝子細胞治療学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 啓一郎
2. 発表標題 生体内ゲノム編集技術の開発とゲノム編集治療技術の確立
3. 学会等名 化学工学会 第50会秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 COMPOSITIONS AND METHODS FOR IN VIVO GENE EDITING	発明者 J. C. I. BELMONTE, K. SUZUKI, 他2名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、No. 62/890,542	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

あらゆる組織の難治性遺伝病を治療可能に！？全身性ゲノム編集治療技術『SATI』を開発 <a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190826_2">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190826_2</a>
---

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			
米国	Salk Institute for Biological Studies	University of Texas Southwestern	University of California, San Diego	
中国	Chinese Academy of Sciences	BGI-Shenzhen		