

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09395

研究課題名(和文) 網膜疾患関連遺伝子の機能解析のための新規CRISPR-Cas9ベクターの開発

研究課題名(英文) Development of a novel CRISPR-Cas9 vector for functional analysis of retinal disease-related genes

研究代表者

藤田 幸輔 (Fujita, Kosuke)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80708115

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)：本研究は、ゲノム編集に必要な各パーツを小型化することにより1つのアデノ随伴ウイルス(AAV)上に搭載したAll-in-one AAVベクターを作製し、網膜細胞を対象に効率的な遺伝子機能解析を可能にする技術開発を目的とした。

開発したAll-in-one ゲノム編集AAVベクターを用いて、網膜変性モデルマウスに対して、ゲノム編集による病因変異への治療効果を検討した。その結果、マウス視細胞の病因変異がおよそ10%正常に修復され、従来の遺伝子治療と同程度にまで視力が回復したことが示された。本研究は効率的な遺伝子機能解析の大幅な効率化とともに、遺伝子治療への応用も期待できるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性は、本邦での中途失明原因の第2位の遺伝性神経変性疾患である。アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた遺伝子補充療法の有効性が示されているものの、同治療の適応範囲は狭く、日本人網膜変性患者の数%しか治療対象にならない。本研究で開発したAll-in-one AAVベクターを用いたゲノム編集技術ならば、ほぼすべての変異を治療できる可能性がある。本研究により、効率的なゲノム修復ができるようになった場合、治療不可能であった遺伝子変異に対する治療が可能となる。これにより、従来では治療不可能であった遺伝子変異に対する遺伝子治療への道が拓かれた。

研究成果の概要(英文)：Based on the miniaturization of each part required for genome editing, we developed a single AAV platform that can locally replace mutant sequences with wild-type counterparts. In blind mice, the mutation replacement rescued approximately 10% of photoreceptors, resulting in increased visual acuity to approximately 60% of controls. Surprisingly, these effects were comparable to recovery mediated by photoreceptor-targeted gene supplementation. This strategy paves the way for the treatment of hereditary disorders caused by mutations in larger genes where traditional gene replacement therapies are not currently feasible.

研究分野：眼科学

キーワード：アデノ随伴ウイルス ゲノム編集 網膜 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、次々と眼疾患に関連する遺伝子が同定されている。一方で、それらの遺伝子の機能解析が進まず、多くの遺伝子においてそれらがどのように病態に関与するか不明のままである。その重要な要因として、これまで遺伝子の *in vivo* での機能解析が哺乳類では難しく、多大な時間を要していたことが挙げられる。しかし、最近開発されたゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9 システム) と AAV を用いると、簡便に特定の網膜細胞のターゲット遺伝子を不活化することができる。しかし、AAV を用いた場合、ターゲット細胞や組織により遺伝子導入効率にばらつきがある。そのため、組織中で実際ゲノム編集された細胞のみが蛍光蛋白などにより可視化できれば、それらの細胞を対象に効率的に機能解析を行える。そのためには、CRISPR-Cas9 システムと蛍光蛋白遺伝子の両方を同一の AAV ベクターに搭載した All-in-one AAV ベクターを作製する必要がある。しかし、開発の最大の障壁は、AAV に搭載可能なインサートサイズの制約 (約 4500 bp まで) である。最も一般的に用いられている CRISPR-Cas9 と蛍光蛋白遺伝子を用いた場合のインサートサイズは合計 6250 bps である。本研究では、インサートを小型化することにより網膜神経節細胞、視細胞、網膜色素上皮細胞でゲノム編集可能な All-in-one AAV ベクターの開発を目指す。

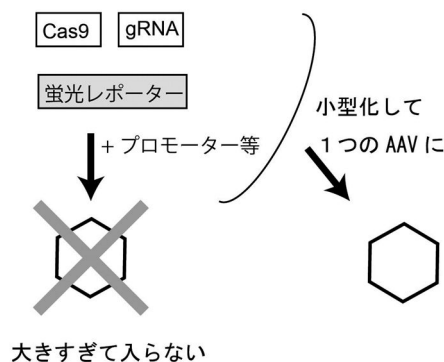


図1 all-in-one AAV ベクターの開発

2. 研究の目的

本研究の目的は、CRISPR-Cas9 システムのパーツと蛍光蛋白遺伝子を小型化することにより All-in-one AAV ベクターを作製し、網膜細胞を対象に効率的な遺伝子機能解析を可能にする技術開発である。具体的には、ベクターの3つの構成要素 (Cas9 遺伝子、蛍光蛋白遺伝子、プロモーター) の小型化を試みる。U6 プロモーター、gRNA、PolyA など他の構成要素のサイズを考慮すると、3つの構成要素で合計 4100 bp 以内に収める必要があることになる。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 システムと蛍光蛋白遺伝子を小型化することにより All-in-one AAV ベクターを作製し、網膜神経節細胞、視細胞、ミュラー細胞を対象にその有用性を検証した。具体的には、(1) gRNA の設計とゲノム編集効率の検証、(2) all-in-one AAV ベクターの作製、(3) マウス網膜でのゲノム編集効果の評価の3つのステップで実験をすすめた。

(1) gRNA の設計とゲノム編集効率の検証

用いる Cas9 の種類に対応した gRNA をオンラインツール (<http://www.rgenome.net/>) により設計し、それを組み込んだプラスミドベクターを作製した。gRNA は1遺伝子あたり4~5種類程度設計した。作製したプラスミドベクターは培養細胞に導入して、T7E1 アッセイにより切断効率を評価した。

(2) all-in-one AAV ベクターの作製

プロモーター配列の小型化を行った。網膜視細胞特異的な最小プロモーターを作製するために GRK1 遺伝子のプロモーター領域に着目し、転写因子結合配列の解析を行うとともに、各生物で保存性の高い領域を選択した。候補配列の下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を配置した AAV レポーターを作製し、マウス網膜に投与して、GFP 発現によりプロモーター活性を評価した。視細胞以外の網膜細胞においても同様にプロモーターを設計して評価を行った。Cas9 については、小型の SaCas9 を採用し、これらを組み込んだ all-in-one AAV ベクターを作製した。

(3) マウス網膜でのゲノム編集効果の評価

作製した All-in-one AAV ベクターを生後6週から12週のマウスの網膜下あるいは硝子体内に注射することにより遺伝子導入した。ゲノム編集効果を評価する方法として、網膜ゲノム解析、ウェスタンブロット、RT-PCR、免疫組織学的解析に加えて、網膜機能の測定などを行って評価した。all-in-one AAV ベクターのゲノム編集効果を評価するモデルとして、全盲の網膜変性モデルマウスをもちいてゲノム編集を用いた治療を行い、評価した。

4. 研究成果

All-in-one ゲノム編集 AAV ベクターを用いて、網膜色素変性の病因となる遺伝子変異をより効率的に修復できる遺伝子治療ツールの開発を行った。

網膜色素変性は、本邦の失明原因の第 2 位の有効な治療法がない遺伝性網膜変性疾患である。アデノ随伴ウイルス (AAV) を使って病因遺伝子の正常コピーを病的網膜細胞に補填する遺伝子治療 (遺伝子補充療法) の有効性が示されているが、同治療の適応範囲は狭く、日本人患者では最大数%以下しか治療できない。そこで、ゲノム編集による治療ベクターの開発を行った。*Gnat1* および *Pde6c* 遺伝子変異を原因として、杆体および錐体視細胞機能を欠損した全盲網膜変性マウスをモデルとして、*Gnat1* 遺伝子変異をゲノム編集により修復する治療を行った。

(1) gRNA の設計とゲノム編集効率の検証

杆体視細胞トランスデューションである *Gnat1* 遺伝子変異のゲノム編集治療のために最適な gRNA の選択を行った。変異箇所の上流と下流のそれぞれに 3 つの候補 gRNA を設計し、T7E1 アッセイにより、ゲノム編集に用いる gRNA を選択した。

(2) all-in-one AAV ベクターの作製

all-in-one AAV ベクターを作製するための技術開発を行った。ゲノムの切断に必要な Cas9 については小型の SaCas9 を採用し、それを発現させるプロモーターについては視細胞特異的に発現する長さ 93bp というごく小型のプロモーターを同定した。さらに正常配列を挿入するゲノム修復機構にマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を利用することで、変異を正常配列に置換する遺伝子治療の単一 AAV ベクター化に成功した。

(3) マウス網膜でのゲノム編集効果の評価

開発したゲノム編集遺伝子治療 AAV ベクターを成体の全盲網膜変性のマウスに投与し、治療効果について検討した。編集の判定のためにゲノム解析、RNA 解析、タンパク質解析を行い、電気生理 (ERG、fVEP、pVEP)、行動学 (視運動反射、恐怖条件付け実験) により視力と治療効果を判定した。その結果、ゲノム配列上の病因変異の約 10% の正常化で (図 3)、光感度が 10,000 倍改善し (図 4)、視力の回復が実証され、従来の遺伝子補充療法と同等の治療効果を示した。

ゲノム編集はゲノム局所を治療対象とするため、病因遺伝子の大きさに関わらず、ほぼすべての変異を治療できる。これにより、従来では治療不可能であった遺伝子変異に対する遺伝子治療への道が拓かれた。

<引用文献>

Nishiguchi KM, Fujita K *et al.* Single AAV-mediated mutation replacement genome editing in limited number of photoreceptors restores vision in mice. *Nat Commun.* 2020;11(1):482.

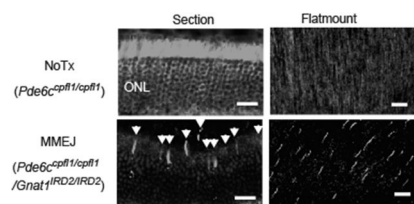


図 3 ゲノム編集効率の評価。免疫染色 (上)、ゲノム (下左) と mRNA (下右)、いずれも 10% 程度の正常化が認められた。(Nishiguchi、Fujita ら 2020 より改変)

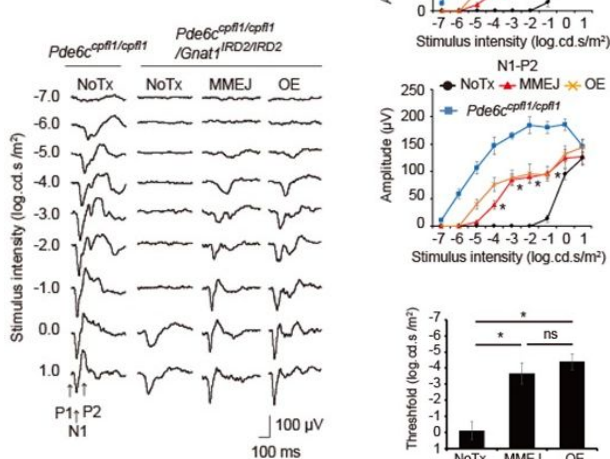


図 4 ゲノム編集による治療効果 (VEP)。治療により光感度が 10,000 倍改善した。(Nishiguchi、Fujita ら 2020 より改変)

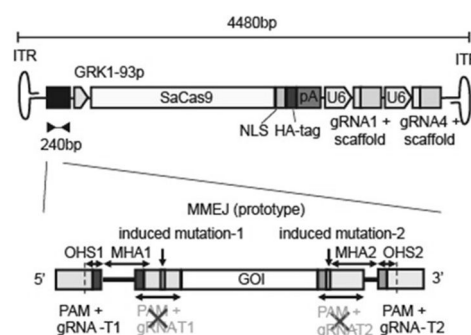


図 2 治療用 all-in-one AAV ベクターの設計 (Nishiguchi、Fujita ら 2020 より改変)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Fujita Kosuke, Nishiguchi Koji M., Sato Kota, Nakagawa Yurika, Nakazawa Toru | 4. 巻 521 |
| 2. 論文標題 In vivo imaging of the light response in mouse retinal ganglion cells based on a neuronal activity-dependent promoter | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 471 ~ 477 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.155 | 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 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Nishiguchi Koji M., Fujita Kosuke, Miya Fuyuki, Katayama Shota, Nakazawa Toru | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Single AAV-mediated mutation replacement genome editing in limited number of photoreceptors restores vision in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 482 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-14181-3 | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|--|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 中澤 徹 (Nakazawa Toru) (30361075) | 東北大学・医学系研究科・教授 (11301) | |
| 研究分担者 | 西口 康二 (Nishiguchi Koji) (30447825) | 名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|