

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15882

研究課題名（和文）in vivoゲノム編集を応用した次世代型生物学的ペースメーカーの作成

研究課題名（英文）Generation of biological pacemaker by in vivo genome editing

研究代表者

井原 健介（Ihara, Kensuke）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：50770210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：現代医療では徐脈性不整脈に対する治療として機械的ペースメーカー治療が行われているが、手術侵襲が必要で合併症のリスクが存在する。本研究ではゲノム編集技術を応用して、静脈注射で心臓の特定の細胞群を生体内で生物学的ペースメーカー細胞化する技術の開発を目指した。現時点ではマウス心臓において作成された生物学的ペースメーカーでは十分なペースメーカー活動を得られておらず更なる検討が必要だが、その作成過程において静脈注射により目的の遺伝子を生体内の目的の細胞に導入し特異的に発現させる技術の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた“静脈注射により目的の遺伝子を生体内の目的の細胞に導入し発現させる技術”は本研究の標的である心臓だけでなく、他臓器にも応用可能な普遍的な技術でありその発展性は大きい。さらに生物学的ペースメーカーのような疾患治療などの医療応用だけでなく、様々な生物学的実験に応用が可能であり、今後の基礎研究に寄与する意義のある成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：In the current medical therapy, electrical pacemaker is the only treatment for bradycardia, however, it requires the surgery to implant or exchange which is accompanied by the risk of serious complications. The purpose of this study was to develop the novel technology of noninvasive in situ generation of biological pacemaker utilizing in vivo genome editing. So far, the generated biological pacemaker in this study have not exhibited sufficient pacemaker activity to maintain the murine heart function, and the further study will be required. Finally, we successfully established the novel technique to induce the highly cell type-specific expression of gene of interest by inserting its DNA sequence to the target site on genomic DNA in vivo with intravenous injection, which can be applied to the various organ and cells other than the heart.

研究分野：循環器内科学

キーワード：生物学的ペースメーカー ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

心臓刺激伝導系は、洞結節から生じた電気興奮を心房筋・心室筋に伝える伝導路であり、心拍数を維持するだけでなく、心筋部位ごとに至適タイミングで電気興奮を伝えることにより心臓全体の協調運動(同期性収縮)を維持し、効率的な心拍出を司る重要な特殊心筋細胞群である。

一方、機械的ペースメーカー治療は、現代の医療において徐脈性不整脈に対する唯一の治療法であり本邦だけでも年間約 40,000 件の新規植え込み術が行われているが、デバイス・技術が発達した近年の報告でもペースメーカー留置術では約 5-10%の術中・術後合併症を生じ、さらに低侵襲と言われていた交換術であっても約 5%の合併症が見られ、術関連死亡やデバイス感染による死亡も問題となっている(Eur Heart J.2014;35:1186, J Am Coll Cardiol. 2007; 49:1851)。さらにペースメーカーによる人工的電気興奮は刺激伝導系を介さないため、心室個々の部位に正しいタイミングで刺激が伝わらず、心室全体としての協調運動が障害され、心室非同期性収縮が生じ心機能低下を起こす(J Am Coll Cardiol 2002;39:1258)。

これら機械的ペースメーカーの手術手技リスク・体内異物感染リスクを克服するため、遺伝子治療や細胞治療を用いた生物学的ペースメーカーの研究が行われている。ペースメーカー細胞誘導遺伝子(Tbx18(Nat Biotechnol.2013;31:54))やペースメーカー遺伝子(Hcn2, Hcn4(Circulation.2003;107:1106))の遺伝子導入などが報告されているが、今まで報告された治療法は導入方法の問題でいずれも一時的なペースメーカー活動しか得られず、さらに手術ではないが侵襲的手技である心筋注射が必要で、心室非同期性収縮の問題も機械的ペースメーカーと同様に解決できていない。

一方で、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術が出現し(Science.2013;339:819, Science.2013;339:823)、遺伝子治療における利点として永続的な作用が期待されている。我々はアデノ随伴ウイルスベクター(AAV9)と CRISPR/Cas9 を組み合わせ、マウス心筋で in vivo ゲノム編集による *Kcnj2* 遺伝子のノックアウトを誘導し生物学的ペースメーカーを作成してきた。しかし、*Kcnj2* のノックアウトではペースメーカー活動で得られる心拍数が遅いこと、催不整脈性の懸念があること、結局侵襲的な心筋注射手技が必要で心室非同期性収縮を生じることなどが未解決のまま残されていた。

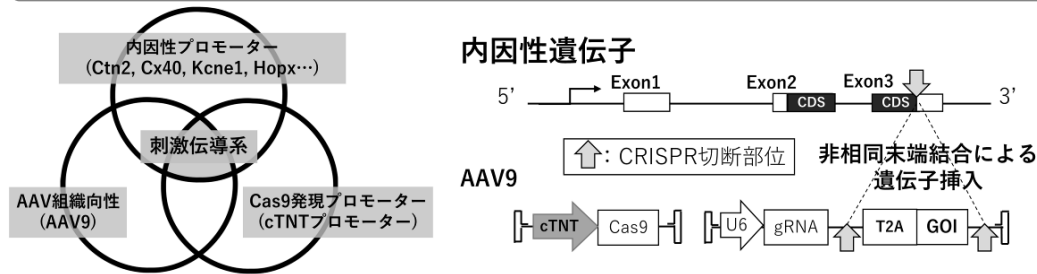
従来の in vivo ゲノム編集では、非分裂細胞である心筋細胞において相同組換えを用いた一般的な遺伝子挿入方法は行えず、非相同末端結合を介した遺伝子のノックアウトしか行えなかったが、非相同末端結合による遺伝子挿入法が開発され、非分裂細胞である心筋細胞でも CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子挿入が可能となった(Nature 2016;540:144)。そこでこの技術をさらに発展させ、ペースメーカー遺伝子を心臓刺激伝導系細胞に特異的に発現している内因性遺伝子(Ctn2, Cx40, Kcne1, Hopx 遺伝子など(J Mol Cell Cardiol. 2007;42:946, Circ Arrhythm Electrophysiol. 2010;3:186))の遺伝子座に挿入することにより、刺激伝導系細胞特異的にペースメーカー遺伝子を発現させることを着想した。徐脈性不整脈患者の心臓において刺激伝導系細胞を、この技術により生物学的ペースメーカーに転換することができれば、静脈注射で非侵襲的に、かつ刺激伝導系を介した生理的興奮伝播様式が得られ、心室非同期性収縮を生じることがなく永続的な作用を持つ次世代の生物学的ペースメーカーを作成でき、機体的ペースメーカーの問題点を抜本的に解決する革新的な治療法となりうる。

2. 研究の目的

本研究では CRISPR/Cas9 を用いた非相同末端結合による遺伝子挿入を基盤に、心筋親和性の高いアデノ随伴ウイルスベクター(AAV9)の組織向性と、心筋特異的プロモーター(cTNT プロモーター)、

心筋細胞群内で刺激伝導系細胞に特異的に発現している内因性遺伝子(Ctn2, Cx40, Kcne1, Hopx 遺伝子など)を組み合わせ、高度に特異化された刺激伝導系細胞へのターゲティングをマウスへの静脈注射によって実現すること(図 1)、そしてその結果として心臓刺激伝導系細胞の生物学的ペースメーカ化を実現し革新的な徐脈性不整脈治療法の proof of concept を示すことを目的とした。

図 1：組織特異的AAVおよびプロモーターを組み合わせた刺激伝導系特異的遺伝子発現誘導法



3. 研究の方法

in vitro での非相同末端結合を用いた遺伝子挿入の評価

刺激伝導系に比較的特異性に発現すると言われる Cntn2, Cx40, Kcne1, Hopx 遺伝子の翻訳開始点および翻訳終止点の配列情報をもとに、SpCas9 および SaCas9 を用いた CRISPR/Cas9 を設計し、in vitro で T7E1 assay にて切断活性を検討した。得られた CRISPR/Cas9 を蛍光タンパク質(mcherry)遺伝子を含む挿入配列(テンプレート)と共に neuro2A 細胞へ導入し非相同末端結合による遺伝子導入の効率を評価した。

in vivo での非相同末端結合を用いた遺伝子挿入の評価

In vitro で遺伝子発現誘導が見られた CRISPR とテンプレート(mcherry 遺伝子)を AAV 化し in vivo 実験を行った。マウスに経静脈的に投与後、PCR での組織特異的な遺伝子挿入確認を行った。本システムではもし、逆方向にテンプレートが挿入されてしまっても、CRISPR/Cas9 により再切断され、順方向に挿入されるまで再切断が繰り返されるように設計されている。また、非相同末端結合においてはその接合部に塩基の欠損・挿入が生じることが知られている。それらに関して、in vivo におけるテンプレートの挿入方向や接合部の塩基欠損・挿入の有無について検討した。

また蛍光実体顕微鏡を用いて観察し、mcherry 陽性細胞を確認した。

心臓の電気興奮伝播に重要な Cx40 分子は心房及び刺激伝導系細胞に特異的に発現し心室筋には発現しないため、Cx40 を刺激伝導系細胞のマーカーとして抗 Cx40 抗体と抗 mcherry 抗体で免疫組織染色を行った。

in vivo での非相同末端結合を用いたペースメーカ遺伝子挿入

テンプレートとして mcherry の代わりにペースメーカ遺伝子(Hcn4, Tbx18)を用いて、と同様の検討を行った。また、体表心電図、植込み型心電図を用いた異所性心房調律の評価、ex vivo で完全房室ブロックを作成することによるペースメーカ活動の評価を行った。

4. 研究成果

in vivo ゲノム編集技術を応用した細胞特異的な遺伝子発現誘導法の確立

設計した CRISPR/Cas9 について切断活性を評価したところ、最終的に Cntn2 遺伝子の翻訳終了点を標的とした CRISPR/Cas9 で良好な切断活性が確認された。得られた CRISPR/Cas9 およびテンプレートとして mcherry 遺伝子を用いて遺伝子導入効率を in vitro で評価したところ、Cntn2 遺伝子座に挿入した mcherry 遺伝子が内因性のプロモーターによって発現可能であることが確認できた。

得られた CRISPR/Cas9 を用いてテンプレートと共に AAV ベクターを作成しマウスに投与したところ、PCR での評価では心臓特異的にゲノム DNA 上の標的部位へのテンプレートの挿入が in vivo で達成されていることが確認され、さらに高率に in frame で目的通り挿入されていることが確認された。

蛍光実体顕微鏡での観察では、心内膜面に mcherry 陽性細胞が散在している様子を確認することが可能であった。また免疫組織染色では Cx40 陽性細胞は心室心内膜面に存在し、mcherry 陽性細胞も Cx40 陽性細胞と一致して観察された(図 2)。加えて、Cx40 陽性細胞以外(刺激伝導系細胞以外)には mcherry の発現は見られず、極めて特異的に刺激伝導系細胞への外来遺伝子発現誘導がなされていることが証明された。また、これらの遺伝子発現誘導は遺伝子導入 3 か月後でも同様に維持されていた。

これら検討により、目的の遺伝子を刺激伝導系細胞特異的に経静脈的に発現誘導を行うシステムを確立することができた。

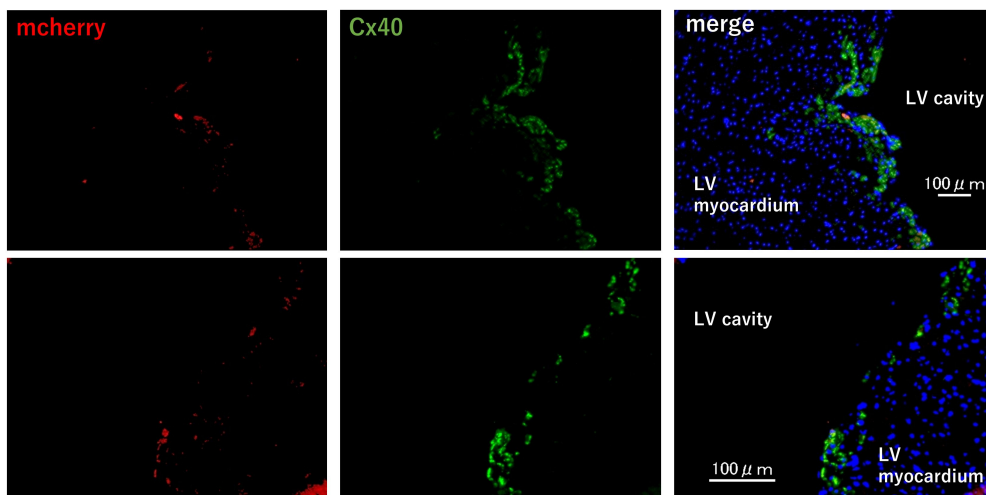


図 2：免疫組織染色による挿入遺伝子の刺激伝導系特異的発現の観察。

刺激伝導系細胞特異的なペースメーカー遺伝子発現誘導による生物学的ペースメーカーの作成

この技術を用いて、ペースメーカー遺伝子である Tbx18 および Hcn4 を搭載した AAV ベクターを作成し、in vivo で投与実験を行った。mcherry 遺伝子を用いた検討と同様に、どちらの遺伝子も標的部位への挿入に成功し、刺激伝導系細胞特異的な発現を確認できた。

導入したペースメーカー遺伝子が実際に機能しているか、刺激伝導系細胞をペースメーカー細胞化できているかを検討するため、体表面心電図、テレメトリ心電図、灌流心での心臓電気生理学的検査を施行したが、体表面心電図、テレメトリ心電図では明らかなペースメーカー活動・異索性心房調律は確認できなかった。遺伝子導入し 1 か月から 3 か月のマウス心臓を摘出し、ex vivo で完全房室ブロックを作成したところ、両遺伝子ともに明らかなペースメーカー調律の出現を確認することができなかった。

刺激伝導系細胞への外来遺伝子・ペースメーカー遺伝子の特異的発現誘導がなされているが、有意なペースメーカー活動発現に至らない理由として、遺伝子導入効率が低い、内因性プロモーター(Cntn2 プロモーター)による遺伝子発現では不十分などが考えられ、更なる検討が必要と考えられた。

本研究の成果まとめ

マウスにおいて in vivo ゲノム編集技術を応用した細胞特異的な遺伝子発現誘導法を確立した。この技術はマウスを用いた動物実験などで、目的の細胞のみに目的の遺伝子を発現させる実験技術として応用発展可能であり、心臓以外、刺激伝導系細胞以外でも応用可能な非常にフレキシブルな技術であり活用が見込まれる。

さらに、本研究でも検討している生物学的ペースメーカー作成のような遺伝子治療目的・医療目的にも応用できる技術である。生物学的ペースメーカーへの応用は更なる検討が必要であるが、他臓器・他疾患の治療へも応用が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1 . 発表者名 Ihara K, Sasano T, Kentaro T, Yamazoe M, Furukawa T.
2 . 発表標題 Pannexin-1 Contributes to Maintenance of Cardiac Function against Acute Pressure-overload and Rapid Ventricular Pacing.
3 . 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan.
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Ihara K, Sasano T, Yamazoe M, Furukawa T.
2 . 発表標題 Intolerance to Rapid Ventricular Pacing and Coronary Hypoplasty in Pannexin-1 Knockout Mouse Heart.
3 . 学会等名 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ihara K, Sasano T, Yamazoe M, Furukawa T.
2 . 発表標題 Intolerance to Rapid Ventricular Pacing in Pannexin-1 Knockout Mouse Heart.
3 . 学会等名 The 11th Asia-pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. 2018. Oct. Taipei, Taiwan. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Chiba R, Yamazoe M, Ihara K, Komuro H, Nagai A, Furukawa T, Sasano T.
2 . 発表標題 Local Injection of Charged Hydroxyapatite Nanoparticle Attenuates the Myocardial Injury in Murine Myocardial Infarction Model.
3 . 学会等名 The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Ihara K, Sasano T, Yamazoe M, Furukawa T.
2. 発表標題 Pacemaker activity generated by CRISPR/Cas9 based genome editing for Kcnj2.
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ihara K, Sasano T, Yamazoe M, Furukawa T.
2. 発表標題 Intolerance to Rapid Ventricular Pacing and Coronary Insufficiency in Pannexin-1 Knockout Mouse Heart.
3. 学会等名 第65回日本不整脈心電学会学術大会.
4. 発表年 2018年

〔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

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