

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07354

研究課題名(和文) 家族性アミロイドポリニューロパチーのエクソンヒト化モデルを用いた遺伝子治療実験

研究課題名(英文) Gene therapy for FAP using TTR exon-humanized mouse

研究代表者

李 正花 (Li, Zhenghua)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・客員准教授

研究者番号：80398239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：家族性アミロイドポリニューロパチーに対する遺伝子治療法の検証のため、エクソンだけヒトの配列でイントロンはマウスの配列である野生型TTRエクソンヒト化マウスを作製した。ついで、この受精卵を用いて点突然変異を導入し、変異型TTRエクソンヒト化マウスを作製した。このエクソンヒト化遺伝子は、マウスTtrと全く同じ発現パターンであること、血清のヒトTTRの量はマウスTTRとほぼ同等であることが分かった。ヒトTTR遺伝子を破壊するため、AAV-gRNA-TTR-SaCas9ベクターを作製し、これをハイドロダイナミック法を用いてエクソンヒト化マウスに注入した。その結果、8匹中3匹で約50%の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい治療法の開発には、ヒトでの遺伝子発現パターンを再現し、ヒト疾患の病態を忠実に反映するマウスモデルが必要であるが意外に困難である。ここで開発したTTR エクソンヒト化マウスでは、これらの問題点を克服することができ、学術的な意義は大きい。ここでのターゲット遺伝子はTTRであり小さく、通常のプラスミドベクターで目的を達成できたが、より大きな遺伝子の場合、コスミッドベクターや人工細菌染色体等を用いればよく、それにより多くの遺伝子のエクソンヒト化マウスを作製できる道を開くことができ、それを新しい治療法、殊に遺伝子治療法、の開発と検証に応用できるため社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：To make an ideal mouse model for a human genetic disease, familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), we first produced a wild-type TTR exon-humanized mouse (TtrhV30exon) in which only mouse exons, but not introns, were replaced with human corresponding exons, using genome editing technology. Then, we produced a mutant TTR exon-humanized mouse (TtrhM30exon) using fertilized eggs of TtrhV30exon. These TTR exon-humanized mice showed completely normal TTR expression patterns, in terms of serum TTR level, spatial-specificity, and temporal-specificity. We then injected 50 µg of AAV-gRNA-TTR-SaCas9 containing gRNA into exon-humanized mice using hydrodynamic tail vein injection. In 3 out of 8 mice, serum TTR levels decreased to 50%. These exon-humanized mice will be useful for verifying a new way of treatment for FAP.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：家族性アミロイドポリニューロパチー トランスサイレチン 優性遺伝病 CRISPR/Cas9 遺伝子治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来の遺伝子治療の主な対象疾患は、遺伝子に機能喪失型変異が生じ、正常な遺伝子産物が減少することにより発症する劣性遺伝病であった。機能獲得型変異やドミナントネガティブ変異による優性遺伝病では、変異タンパクの存在そのものが発症原因であり、正常遺伝子をいくら導入しても、変異遺伝子を破壊しない限り治療できないからである。家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は、トランスサイレチン(TTR)遺伝子の点突然変異(例:30番目のValがMetに置換したVal30Met)により引き起こされる典型的なヒト優性遺伝病である。治療法としては、肝臓移植やTTRの安定化剤が開発されてきたが、期待するほどの効果は上がっていない。2018年7月に、低分子干渉RNA(siRNA)やアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を用いると、肝臓内でのTTR遺伝子の発現量が75-80%低下し、末梢神経障害も有意に改善することが報告された。そこで申請者らは、高頻度に遺伝子を破壊できるCRISPR/Cas9法を用いて、肝臓内の変異TTR遺伝子を破壊するという新しい概念の遺伝子治療が可能ではないかと考えた。この検証のために、イントロンはマウスのままで、エクソン部分のみをヒト遺伝子で置換したエクソンヒト化マウスの開発を試み成功した。本研究では、本モデルマウスの肝臓においてヒトTTR遺伝子を破壊し、治療が可能かどうかを試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エクソンヒト化マウスを用いて、肝臓におけるヒトTTR遺伝子をCRISPR/Cas9法を用いて破壊し、発現レベルを低下させ、治療できるかどうかを検証することである。申請者らは、これまでにマウスTTR遺伝子の翻訳開始コドン部位に、ヒト正常TTR(hV30) open reading frame (orf)及びヒト変異TTR(hM30) orfを挿入したマウス($Ttr^{hV30orf/hV30orf}$ 及び $Ttr^{hM30orf/hM30orf}$)の作製に成功した。そして、ヒトの患者(ほとんどがヘテロ接合体)と同様の遺伝子型、つまり $Ttr^{hV30orf/hM30orf}$ を持つ系統も作製した。しかしながら、本系統では、マウスTtr遺伝子の翻訳開始コドン付近にヒトTTR orfを挿入しているため、転写レベルも低下し、血中のヒトTTRレベルが7 μ g/ml前後とヒト正常値である140 μ g/ml前後と比較し、約5%に過ぎず、治療効果を検証するには発現レベルが低すぎることが問題であった。そこで、マウスTtr遺伝子のゲノム構造を保ったまま、ヒトTTRを発現させるため、イントロン部分はマウスのままで、エクソン部分だけをヒトの正常配列で置換した遺伝子を構築し、これとCRISPR/Cas9法を用いてES細胞で相同組換えを行い、エクソンヒト化マウス($Ttr^{hV30exon}$)を作製することに成功した。このマウスでは、血中ヒトTTRレベルが150-180 μ g/mlと、マウスTTRの140 μ g/mlとほぼ同等の発現を示すことが分かった。このマウスの受精卵とCRISPR/Cas9法を用いて一塩基置換を導入し、ValをMetに置換したマウス($Ttr^{hM30exon}$)も作製し、そして $Ttr^{hV30exon}$ と $Ttr^{hM30exon}$ を交配して、 $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ を得て実験に使用する。このような遺伝子ヒト化マウスを用いて、初めて遺伝子破壊による治療実験の検証が可能であり、ヒトでの遺伝子破壊による治療に向けての基礎データを提供できると考えられる。

3. 研究の方法

本研究は、以下に記すようなステップで行う。

(1) 野生型ヘテロ $Ttr^{+/hV30exon}$ からのホモ $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ の作製と増産

ヘテロの $Ttr^{+/hV30exon}$ はすでに樹立しているのので、交配により野生型ホモマウス $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ を多数得る。

(2) 野生型ホモ $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ のから変異型ヘテロ $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスの作製

野生型ホモメスマウス $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ の過剰排卵により得られた卵子と、野生型ホモオスマウスの精子を用いての体外受精により、多数の $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ の受精卵を得る。受精卵に、crRNA, tracrRNA, Cas9 mRNA, single strand DNA (ssDNA)を、すでに確立されている電気穿孔法にて導入する。注入後の受精卵は、仮親の卵管に移植し、産子を得る。生まれたマウスのジェノタイピングを行い、 $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスを選別する。

(3) $Ttr^{hM30exon/hM30exon}$ の増産

遺伝子治療実験には、ヒト患者と同じ遺伝子型を持つ $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスを使用する予定である。上記2) で得られた $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスを交配しただけでは、その 1/2 しか $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスにならないので、効率が悪い。そこで、まずは $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスの交配により $Ttr^{hM30exon/hM30exon}$ を多数得る。

(4) ヒト患者と同じ遺伝子型を持つ $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスの増産

$Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ と $Ttr^{hM30exon/hM30exon}$ の卵子および精子を用いて体外受精を行うと、全てが $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ の遺伝子型となる。これにより $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスを増産する。

(5) $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスを用いての遺伝子治療実験

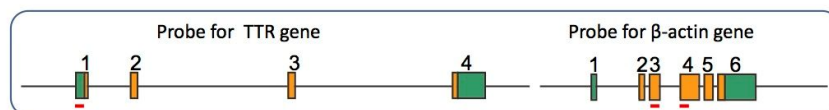
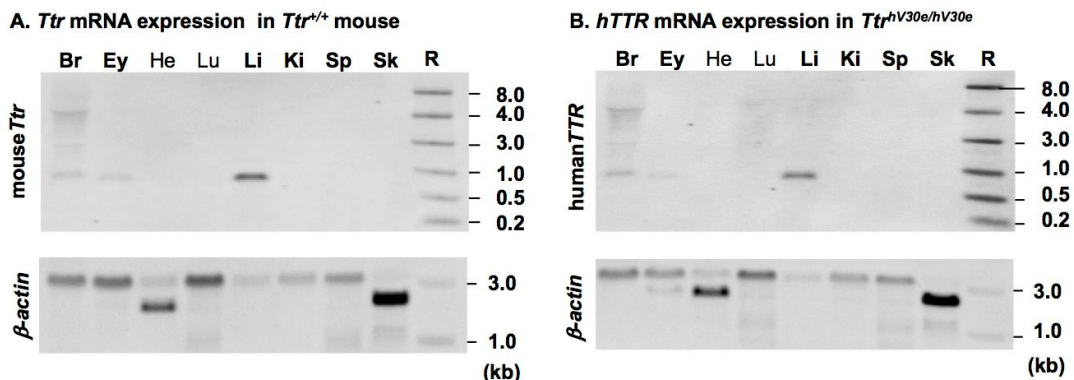
TTR 遺伝子の変異部位をターゲットにした配列 (変異型の TGAATCCAAATGTCCTCTGATGG) を含む pX330 を構築する。ハイドロダイナミック法(Liu et al. Gene Ther 6:1258-66, 1999)、つまりマウス体重の 1/10 量の DNA 溶液 (体重が 20g なら、2ml) (pX330 50ug 含む) を 5-7 秒以内に、6 週齢のマウスの尾静脈から注入することでヒト TTR 遺伝子を破壊する。この方法では最大 80% 程度の肝細胞に遺伝子導入できることが示されている(Lewis et al. Nature Genet 32:107-108, 2002)。注入後マウスは速やかに回復するので、必要に応じて 2 回目を行う。

(6) 遺伝子破壊の程度の解析

血中 TTR 濃度: 3 ヶ月齢、6 ヶ月齢の時点で、血清中のヒト TTR を ELISA 法で測定する。これにより TTR 遺伝子がどの程度破壊されたかが推定でき、遺伝子破壊による治療の可能性を明らかにする。

4. 研究成果

FAP 患者に対する過去の肝臓移植による治療では、移植後の正常な肝臓から産生される野生型 TTR が、意外にもアミロイド沈着を起こし、十分な治療効果が上がらないことが分かった。そこ



Br, brain; Ey, eye; He, heart; Lu, lung; Li, liver; Ki, kidney; Sp, spleen; Sk, skeletal muscle; R, RNA marker 2

図 1. hTTR exon-humanized 遺伝子の発現パターン

で、遺伝子治療では、変異遺伝子だけでなく、野生型遺伝子も含めて標的とし、血中 TTR レベを 20%以下にすることが治療目標となっている。本研究により、次のような成果が得られた。

- (1) すでに作製していた野生型エクソンヒト化ヘテロマウス ($Ttr^{+/hV30exon}$) の凍結胚からマウスを回復させ、交配により野生型ホモ $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ の作製と増産を行ない、十分な数の凍結胚を保存した。また、 $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ を用いノザンプロット法で発現を見た所、マウス Ttr と全く同じ組織で発現し、発現比率も同じであることが分かった (図1)。さらに血清のヒト TTR の量を ELASA で測定したところ、マウス TTR とほぼ同等であることが分かった (図2)。

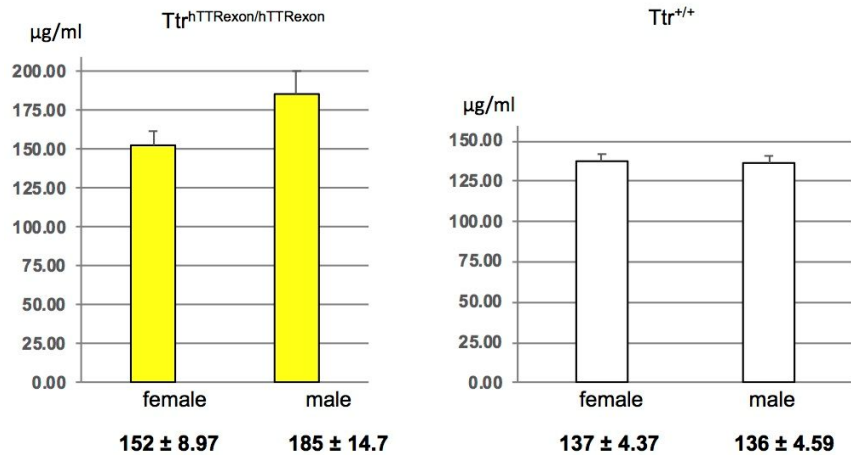


図2. 血清TTR量

- (2) 野生型ホモ $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ の受精卵を用いて CRISPR/Cas9 法により点突然変異を導入し、ヘテロマウス ($Ttr^{hV30exon/hM30exon}$) を作製した。そして $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ の交配による $Ttr^{hM30exon/hM30exon}$ の作製と増産を行ない、十分な数の凍結胚を保存した。
- (3) $Ttr^{hV30exon/hV30exon}$ と $Ttr^{hM30exon/hM30exon}$ の交配による $Ttr^{hV30exon/hM30exon}$ マウスの作製と増産を行ない、十分な数の凍結胚を保存した。
- (4) Hydrodynamic tail vein injection (HTVI) 用に調整したプラスミド (*pLIVE-fresnoRFP*) を HTVI 用の試薬 (TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solution, TaKaRa Bio, Cat No. V5340) をプロトコールに従い尾静脈より注射した。24 時間後にマウスの肝臓を単離し蛍光を観察したところ、ほぼすべての肝細胞で蛍光が観察され (図3) HTVI 法を確立した。

- (5) ヒト TTR 遺伝子を破壊するため、SaCas9 を含む市販の AAV-Guide-it-1 vector を元に 5 種類の gRNA を組み込んだベクターを作製し、もっとも高い活性を示す gRNA ex2-T3 (GAC ACC TGG GAG CCA TTT GCC T [CTGGGT]) ([]内は PAM 配列) を組み込んだ AAV-gRNA-TTRex2-T3--SaCas9 を選別した。そして、この 50 µg Hydrodynamic tail vein injection 法を用いてプラスミドのまま $Ttr^{hM30exon/hM30exon}$ に注入した。その結果、8 匹中 3 匹で約 50%の低下が認められた。AAV ベクターを用いることによりやもっと高率に破壊できることが示唆された。

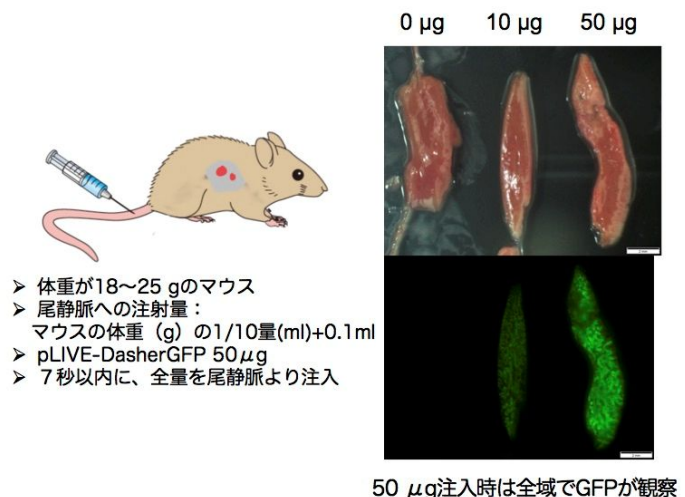


図3. Hydrodynamic tail vein injection

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Li Zhenghua, Kanazashi Hideki, Tokashiki Yoshimi, Fujikawa Rie, Okagaki Ayaka, Katoh Sho, Kojima Kenta, Haruna Kyoko, Matsushita Naoko, Ishikawa Tomo-o, Chen Hong, Yamamura Kenichi	4. 巻 599
2. 論文標題 TTR exon-humanized mouse optimal for verifying new therapies for FAP	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 69~74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.02.035	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

1. 著者名 Li Zhenghua, Yamamura Kenichi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Dissecting pathophysiology of a human dominantly inherited disease, familial amyloidotic polyneuropathy, by using genetically engineered mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frigid Zone Medicine	6. 最初と最後の頁 ~
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李正花、金指英樹、加藤洋教、渡嘉敷佳美、藤川理恵、岡垣郁香、加藤翔、小島健太、春名享子、松下直子、熊ノ郷晴子、品川真吾、石川智夫、山村研一
2. 発表標題 エクソンヒト化による治療法開発に最適なFAPモデルマウスの開
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	山村 研一 (Yamamura Kenichi) (90115197)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・客員教授 (17401)	

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			
中国	Harbin Medical University			