

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23988

研究課題名(和文) 合成生物学的アプローチによる心不全に対する次世代遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Development of Next-Generation Gene Therapy for Heart Failure Through Synthetic Biology Approach

研究代表者

東邦 康智 (Higashikuni, Yasutomi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10586481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、合成生物学的アプローチを用いて、心不全の次世代遺伝子治療を開発した。具体的には、ゲノムスケールのプール型表現型スクリーニングにより、心不全に対する新規治療因子を同定した。また、細胞の種類や状態に合わせて導入遺伝子の発現量を適切な治療域に自律的に調整する新規遺伝子発現基盤技術を開発した。新規治療因子と新規遺伝子発現基盤技術を組み合わせて、心不全の次世代遺伝子治療技術を完成させた。心筋細胞を用いた実験により、その治療効果を確認した。以上の研究成果は、細胞レベルの個別化医療を実現し、心不全の根本的解決につながることを期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会である我が国では、心不全の罹患率及び死亡率が急増しており、根本的解決につながる治療法の開発が急務である。心不全の病態は、様々な細胞や生体物質が構成する生物学的ネットワーク全体の偏移である。よって、その根本的解決には適切な因子を、適切な時期に、適切な量を、適切な細胞で発現させる必要がある。

本研究では、以上の問題点を解決する心不全の次世代遺伝子治療を開発した。この次世代遺伝子治療は細胞レベルの個別化医療を可能にし、現在の治療戦略よりも効果的かつ副作用の少ない心不全治療を提供することが期待できる。さらに、本研究は合成遺伝子回路を用いた遺伝子治療開発の標準化手法を提供する。

研究成果の概要(英文)：We developed an innovative gene therapy that enables cardiomyocytes to express therapeutic microRNAs with spatiotemporal precision. We performed massively parallel combinatorial phenotypic screening of microRNAs. We identified the combination of microRNAs that synergistically protect cardiomyocytes against pathological stressors. We developed synthetic gene circuits that consist of a logic gate to discriminate cell-types and pathological conditions, a closed-loop circuit that fine-tunes gene expression levels based on the intensity of pathological stress, and a drug-inducible regulation system. When we delivered synthetic gene circuits harboring therapeutic microRNAs into cardiomyocytes, protective effects against pathological stressors were observed only under intended conditions. Our next-generation gene therapy would realize precision medicine at the cellular level for the treatment of heart failure and provide more efficient and safe therapeutic platforms than current therapies.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 遺伝子治療 合成遺伝子回路 表現型スクリーニング microRNA 合成生物学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会である我が国では、心不全の罹患率及び死亡率が急増しており、心不全パンデミックが危惧されている。近年、様々な治療薬が開発されているが、心不全の根本的解決につながる治療法はなく、新たな治療法の開発が急務である。その試みの一つとして、目的遺伝子を心筋細胞へ直接導入する遺伝子治療が試みられてきた。しかし、大きな治療効果を認めた例はない。

心不全の病態は、様々な細胞における様々な生体物質の相互作用により構成される生物学的ネットワーク全体の偏移である。よって、治療対象の非特異的で単純な過剰発現や抑制では解決困難であることが予想される。実際、多くの生体物質はその発現する時期や細胞種、発現量によって全く異なる効果を示す。よって、適切な因子を、適切な時期に、適切な量を、適切な細胞で発現させる必要がある。さらに、心不全の病態に大きな影響を与える治療標的群が明らかではない現状がある。これらの課題は、遺伝子治療のみならず、薬物治療にもあてはまる課題である。

近年、ゲノムスケールのプール型表現型スクリーニングが簡便に行えるようになり、様々な条件下での直接的な効果の評価に基づいた治療因子の同定が可能となった¹⁾。また、合成生物学の発展により、合成遺伝子回路を用いて治療因子発現の自律的な調整を可能にする試みがなされている²⁾。これらの技術は、現在の遺伝子治療の問題点を解決する技術基盤となりうる。

以上から、合成生物学的アプローチは次世代の心不全遺伝子治療開発に非常に有効な手法となることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来の心不全治療及び遺伝子治療の問題点を解決し、心不全の次世代遺伝子治療を開発することである。具体的には、ゲノムスケールのプール型表現型スクリーニングにより、心不全の病態生理に関与する様々な病的ストレスに対する共通の心筋細胞保護因子の同定を行う¹⁾。また、合成生物学的手法により、細胞の種類や状態に合わせて導入遺伝子の発現量を適切な治療域に自律的に調整する新規遺伝子発現プラットフォームを開発する²⁾。以上を組み合わせることで、細胞レベルの個別化医療を実現し、心不全の根本的解決を目指す。

3. 研究の方法

(1) ゲノム・スケールのプール型表現型スクリーニングによる新規心筋細胞保護因子の同定

様々な病的ストレスに共通する心筋細胞保護因子を同定するため、心筋細胞の細胞株 (HL-1) を使用し、microRNA (miRNA) 及び全ゲノムを対象としたプール型表現型スクリーニングを行った。指標として細胞の生存を使用し、病的ストレスとして酸化ストレス、低酸素ストレス、カテコラミン・ストレスを用いた。ライブラリーとして、miRNAライブラリー、miRNAの組み合わせライブラリー、CRISPRi gRNAライブラリー、及びCRISPRa gRNAライブラリーを用いた。CRISPRスクリーニングに際しては、dCas9-KRABまたはdCas9-VPRを発現する細胞株を樹立した。得られた候補は、HL-1細胞株、ラット新生児心筋細胞を用いて、Cell viability assayにより確認実験を行った。

(2) 病的ストレス感受性遺伝子プロモーターの同定

心筋細胞において感受性及び特異性の高いストレス応答性遺伝子プロモーターを同定するため、転写因子結合配列データベースに基づき作成した合成遺伝子プロモーターライブラリーを使用して、プール型表現型スクリーニングを行った。得られた候補は、蛍光蛋白質発現を指標に確認実験を行った。

(3) 論理ゲートを用いた合成遺伝子回路の設計・作成・機能評価

心筋細胞特異的遺伝子プロモーター及びストレス感受性遺伝子プロモーターと論理ゲート構造を用いて、病的な心筋細胞特異的かつ病的ストレス依存性の遺伝子発現を示す合成遺伝子回路を作成した。合成遺伝子回路は合計3つの転写ユニットで構成される。目的遺伝子として蛍光蛋白質を使用して、合成遺伝子回路の挙動を検証した。

(4) 薬物による遺伝子発現制御機構を組み込んだ合成遺伝子回路の設計・作成・機能評価

(3) で作成した合成遺伝子回路に、薬物感受性の遺伝子プロモーターや転写制御因子を組み込んで、一時的な発現オン及び一時的な発現オフ、の機能をそれぞれ付加した合成遺伝子回路を作成した。目的遺伝子として蛍光蛋白質を使用して、様々なデザイン的最適化を行った。

(5) 心不全に対する新規遺伝子治療の有効性の評価

(1) で同定した心筋細胞保護治療因子と (3) 及び (4) で作成した合成遺伝子回路を組み合わせ、心不全に対する新規遺伝子治療を設計及び作成した。HL-1 心筋細胞株を用いた cell viability assay により、その有効性を確認した。

4. 研究成果

(1) ゲノム・スケールのプール型表現型スクリーニングによる新規心筋細胞保護因子の同定

miRNA 及びその組み合わせスクリーニング、CRISPRi スクリーニング及び CRISPRa スクリーニングを行った(図1)。各スクリーニングの結果において、統計学的に有意な因子の中から、心筋細胞保護作用の強度に基づき抽出した上位の候補を抽出した。HL-1 心筋細胞株における確認実験を行ったところ、すべてのスクリーニングで得られた候補因子群の中で、miR-222 と miR-455 の組み合わせが最も強い心筋細胞保護作用を示した。ラット新生児心筋細胞を用いた実験及びゼブラフィッシュを用いた実験でも、miR-222 と miR-455 の組み合わせは相乗的で強い心筋細胞保護作用を示した。ラット新生児心筋細胞を用いた RNA-seq 解析では、ミトコンドリア関連遺伝子への介入がその相乗効果の機序として強く示唆された。

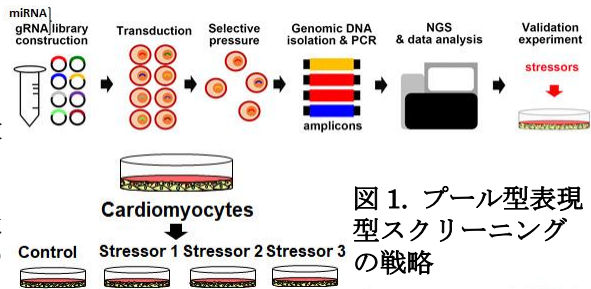


図1. プール型表現型スクリーニングの戦略

心不全は多因子性疾患であり、単一の治療因子のみでは根本的解決にはつながらないことが予想される。一方で、複雑な生物学的ネットワークの中で、どの治療因子の組み合わせが最も有効であるかを推測することは困難である。さらに、膨大な数となる組み合わせをすべてアレイ型スクリーニングで検証することは膨大な時間とコストが必要となる。

近年、この問題を解決するために、簡便に無数の組み合わせのライブラリーを作成するクローニング技術とプール型スクリーニング技術を組み合わせ「超並列組み合わせスクリーニング」技術が開発された。細菌や酵母の培養系と異なり、哺乳類細胞の培養系においては細胞数の問題から事前に使用する因子を抽出しておく必要があるという限界があるが、現在非常に有効な技術として主になんがん研究で用いられている。

心不全の治療因子探索においては、実験系の構築が難しいことから同手法が用いられることがなかった。さらに、心不全治療に有効な治療因子の組み合わせを探索する研究もおこなわれていない。本研究では多くの条件検討を行って実験条件の最適化に成功した。また、この実験手法を用いて、実際に心不全治療に非常に有効となりうる治療因子の組み合わせを同定することに成功した。今後、様々な目的に応じて事前に抽出する因子群を変えることで、心不全研究への幅広い応用が期待できる。

臨床応用に向けては、我々が同定した治療因子の組み合わせが強力な心保護作用を発揮する機序の解明が重要であり、現在その解析を進めている。

(2) 病的ストレス感受性遺伝子プロモーターの同定

HL-1 細胞株を用いた表現型スクリーニングにおいて、統計的に有意な合成遺伝子プロモーターの中から、シグナル強度に基づき上位候補を抽出した(図2)。その結果、高いストレス感受性と特異性を有する合成遺伝子プロモーターである pHF37 を同定した。ラット新生児心筋細胞においてもストレス感受性を確認しており、心筋細胞における普遍的なストレス・センサーとして期待される。

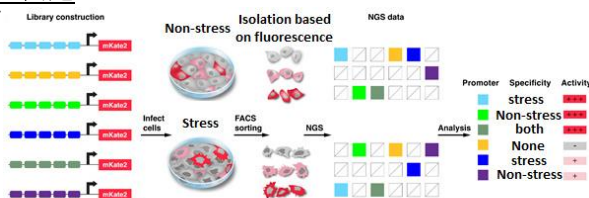


図2. 合成遺伝子プロモーターライブラリー・スクリーニングの戦略

従来の研究により、様々な心不全マーカーが同定されてきた。一方で遺伝子治療を想定した場合、使用する心不全センサーは高い感度・特異度が要求される。現在、オミックス解析などの導入により、心不全センサーの候補の抽出が可能となっている。しかし一方で、オミックス解析による状態の把握から、センサーの感度及び特異度を予測することは困難である。特に遺伝子プロモーターをセンサーとして用いる場合、その活性とオミックス解析で検出される結果は相関しないことも多い。例えば、本研究では心不全マーカーとして用いられる BNP の遺伝子プロモーターの病的ストレス感受性を検証したが、その感受性は非常に低く、治療応用に足る感度を有していなかった。

以上の問題点を解決するため、本研究では転写因子結合配列情報を用いて合成遺伝子プロモーターライブラリーを作成し、プール型表現型スクリーニングにより直接的に心不全センサーの同定を行った。将来的な臨床応用の観点から、副作用のリスクを抑制するために特異度を優先させるスクリーニングをおこなった。その結果、スクリーニングで抽出された多くの候補合成遺伝子プロモーターはその感度が弱かったが、pHF37 という非常に感度の高い合成遺伝子プロモーターの同定に成功した。本研究の成果は、これまで単純な治療因子の過剰発現を主とする心不全の遺伝子治療開発において、その発現調節を実現できる可能性を示唆する。

今後は動物実験によりその有効性を確認する必要がある。現在、生体内イメージング技術を用いて、その検証を行っている。

(3) 論理ゲートを用いた合成遺伝子回路の設計・作成・機能評価

pHF37 合成遺伝子プロモーターと心筋細胞特異的遺伝子プロモーター(cTnT プロモーター)の

下流に分割した転写因子を配した転写ユニットを作成した。分割した転写因子は自然に融合する構造になっており、両方のプロモーターが活性化した場合のみ、その活性度に応じて転写因子が生成される。同転写因子が活性化するプロモーターの下流に目的遺伝子を置くことで、同遺伝子の発現が病的ストレス依存性に心筋細胞のみで発現する仕組みである。よって、合計3つの転写ユニットを使用した(図3)。3' UTRに制御因子を挿入することで、ストレス感受性及び特異性の高い合成遺伝子回路を作成することに成功した。

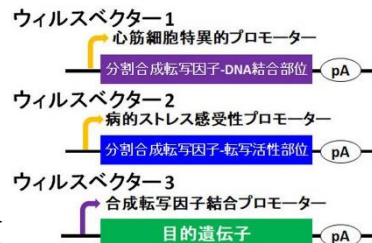


図3. 合成遺伝子回路のデザイン

細胞レベルの個別化医療を実現するには、疾患特異的センサーを用いる必要がある。しかし、そのセンサーは病的ストレス感受性と細胞特異性の両方を有している必要があり、両者を兼ね備えた単一のセンサーを開発することは現実的に困難である。

近年、合成生物学的手法により、多変量解析を可能にする生物学的センサーの開発が行われている。本研究では、人工合成した転写因子を組み合わせることでそれを実現した。さらに、現在報告されている様々な生物学的センサーはまだ proof-of-concept の段階であり、その多くは特異性が低く高いバックグラウンドを有している。本研究ではバックグラウンドを低く抑える技術の開発に成功した。本研究で開発した技術及びその成果は、遺伝子治療に多変量解析技術の導入が可能であることを証明するものである。

今後、臨床応用に向けて、生体内における合成遺伝子回路の挙動の検証が必要である。現在、生体内イメージング技術を用いた検証実験を進めている。

(4) 薬物による遺伝子発現制御機構を組み込んだ合成遺伝子回路の設計・作成・機能評価

生体外からの合成遺伝子回路の制御を可能にするため、エリスロマイシン感受性 DNA 結合蛋白質及びドキシサイクリン感受性 DNA 結合蛋白質を改変して、オン・スイッチ及びオフ・スイッチを作成した。(3)で作成した合成遺伝子回路に組み込むことで、比較的特異性の高いスイッチを作成することに成功した。

遺伝子治療の問題点の一つは、一度生体内へ導入するとそれを制御する手段がないことである。多くの遺伝子治療は長期的な効果が期待される。これは同時に、一度有害事象が生じた場合、それを解決することが困難であることを意味している。

以上の問題点を解決するため、本研究では生体外からの遺伝子発現制御を可能にする薬物感受性スイッチを合成遺伝子回路に組み込んだ。その結果、細胞実験レベルでは目的とする挙動を得ることに成功した。将来的な臨床応用の観点から、臨床で現実的に長期的な使用が可能な薬剤を選択した。本研究の成果は、生体外から制御が可能な心不全遺伝子治療が実現可能であることを示唆する。

今後、臨床応用に向けて、生体内における合成遺伝子回路の挙動の検証が必要である。現在、生体内イメージング技術を用いた検証実験を進めている。

(5) 心不全に対する新規遺伝子治療の有効性の評価

(3)及び(4)で作成した合成遺伝子回路の目的遺伝子として、miR-222 + miR-455 を導入して、低酸素ストレス下における新規遺伝子治療の効果の評価を行った。その結果、合成遺伝子回路のすべてのパーツが導入された心筋細胞においてのみ、心保護効果を認めた。オン・スイッチ回路ではエリスロマイシンが存在する場合のみ心筋細胞保護作用を示した。さらに、オフ・スイッチ回路ではドキシサイクリン非存在下では心筋細胞保護作用を有するが、ドキシサイクリン存在下ではその効果は抑制された。以上より、細胞実験レベルにおいて、新規遺伝子治療が有効であることが明らかとなった。

合成遺伝子回路を用いた遺伝子治療には、その遺伝子発現活性が治療効果発現に十分であり得るか、という問題がある。実際、これまで報告されている合成遺伝子回路は、意図する挙動は示すものの、そのオン・オフ時の遺伝子発現の差は小さく、臨床応用には難しいものがほとんどである。本研究では、感度の高い遺伝子プロモーターを用いるとともに、バックグラウンドを低く抑える制御技術を組み合わせることで、ストレス応答における遺伝子発現の幅を大きくすることに成功した。そして、本研究で開発した技術が、実際に本研究で同定した治療因子がその効果を発揮するに足る発現量を誘導できることを証明した。

今後、動物実験における有効性の評価が必要である。まず、合成遺伝子回路の生体内挙動を確認した後、治療効果の検証を行う予定である。

<引用文献>

1. Higashikuni Y, Lu TK. Advancing CRISPR-Based Programmable Platforms beyond Genome Editing in Mammalian Cells. ACS Synth Biol, 2019;8:2607-2619.
2. Higashikuni Y, Chen WC, Lu TK. Advancing therapeutic applications of synthetic gene circuits. Curr Opin Biotechnol, 2017;47:133-141.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Yasutomi Higashikuni, Timothy K Lu	4. 巻 8
2. 論文標題 Advancing CRISPR-Based Programmable Platforms beyond Genome Editing in Mammalian Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2607-2619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.9b00297	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 該当する

1. 著者名 東邦 康智	4. 巻 69
2. 論文標題 次世代循環器病治療プラットフォーム開発の展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 麻酔	6. 最初と最後の頁 S146-S155
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 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasutomi Higashikuni
2. 発表標題 Next-Generation Gene Therapy for Heart Failure
3. 学会等名 84th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東邦 康智
2. 発表標題 次世代循環器病治療プラットフォーム開発の展望
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第67回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部附属病院 循環器内科
<https://cardiovasc.m.u-tokyo.ac.jp/>

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	Massachusetts General Hospital	Massachusetts Institute of Technology	