

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03559

研究課題名(和文) miR依存ゲノム編集システムをコードした脳腫瘍治療用組換えウイルスの創出

研究課題名(英文) Development of GBM-therapeutic recombinant viruses that encodes miR-dependent genome-editing system.

研究代表者

近藤 亨 (Kondo, Toru)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30270573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞(NSC)等の正常細胞で発現しグリオブラストーマ(GBM)幹細胞(GIC)で発現消失するマイクロRNA(miR)の相補配列をCas9下に組み込んだ新規ゲノム編集発現カセットとGIC機能因子に対するガイドRNA(gRNA)発現カセットを組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)を作製した。本AAVがNSCに影響なくGICを傷害することを試験管内実験により確認した。更に、本AAVを尾静脈投与したGIC脳移植担癌マウスの生存期間の優位な延長と抗腫瘍効果を確認した。本研究によりmiRの発現依存的にGBMを傷害する新規ゲノム編集AAVを創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、細胞(種)やその状況に発現変化するmiRを用いて任意の標的細胞で外来遺伝子の発現制御が可能であることを証明した。同様の方法を用いることによりmiRにより制御を受ける全ての細胞を対象とした様々な研究への応用が可能である。更に、今回作製したmiRの発現逆依存的にGIC機能因子をゲノム編集するAAVは、GBMと適用可能な他の悪性腫瘍に対する新規遺伝子治療用ウイルスとなる可能性が高く、その社会的意義は非常に大きい。

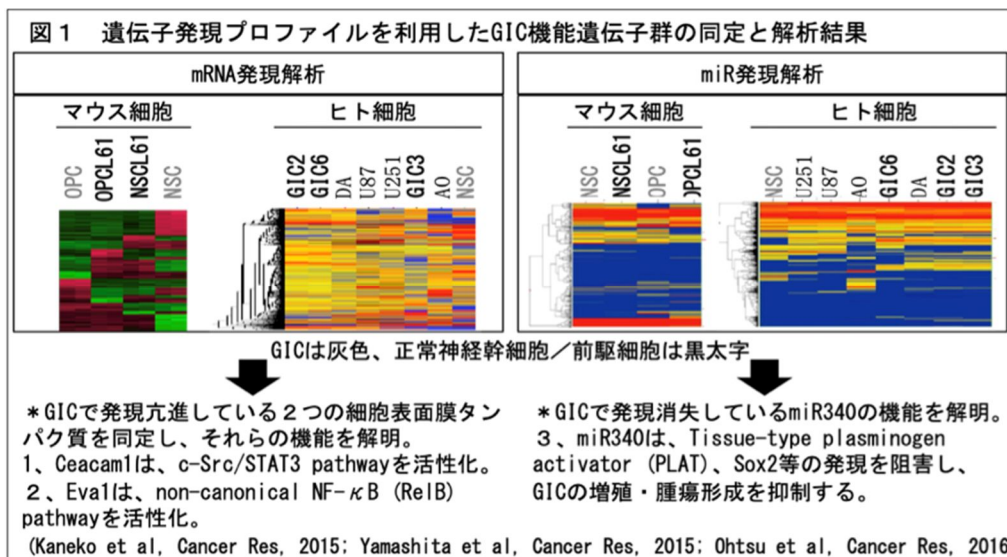
研究成果の概要(英文)：We successfully generated novel adeno-associated virus (AAV) that encodes the expression cassettes of both Cas9 with complementary sequence of microRNA (miR), which is expressed in non-tumor cells including neural stem cells (NSC) but not in glioblastoma (GBM) stem cells (GICs), and guide RNA for a GIC functional factor. We found that this AAV killed GICs but not NSCs in culture. We confirmed that the intravenously injected AAV prevented GIC tumorigenesis in GIC-transplanted mice and extended their survival. Thus, we succeeded to generate the novel genome-edited AAV that specifically kills GBM in a miR expression-dependent manner.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：脳腫瘍 ゲノム編集 マイクロRNA 組換えウイルス 癌幹細胞

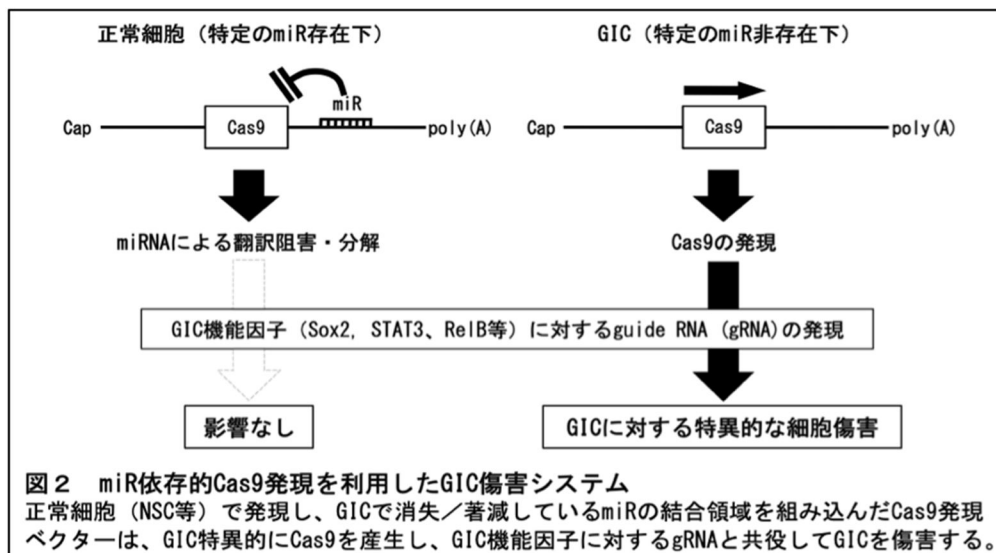
1. 研究開始当初の背景

申請者らは、GICの発生メカニズムの解析・性状解析・特異的因子の同定を目的として、人工マウスGIC、ヒトGBMから樹立した腫瘍形成能を保持したヒトGIC、正常神経系細胞（NSCとオリゴデンドロサイト前駆細胞）の遺伝子発現プロファイルの比較解析から抽出したGIC特異的に発現が亢進・減少している遺伝子群の解析結果を報告してきた（図1）。



しかし、これら遺伝子群は非中枢神経系の正常細胞（免疫細胞等）に発現していることが判明し、直接的な治療標的としては副作用の懸念が残る。このため、より安全性の高い標的因子の同定や新しい発想によるGIC根絶法の開発が必要と考えられた。

一方で申請者らは、Cas9 を利用したゲノム編集法を用いて、特定の遺伝子欠損の作製や非活性型プロモーターを活性化するエピゲノム編集法の開発を進めてきた。そこで、Cas9 ゲノム編集法とGIC研究の成果を融合し、NSCを含む様々な正常細胞で発現し、GICで消失/著減しているmiRの制御下でCas9を発現するシステムとGIC機能因子に対するgRNAを組合せたGICを特異的に傷害するmiR依存ゲノム編集ベクターシステムの開発を考案した（図2）。現在、有効な複数のシステム構築を進めている。



2. 研究の目的

がん幹細胞は腫瘍形成と再発の原因細胞であり、その性状解析から同定された因子群を標的とした新たながん治療法の開発が進められている。しかし、殆どの標的候補因子は正常細胞（正常組織幹細胞を含む）においても発現が観られ、これら候補因子単体を標的とした治療法には安全性に疑問が残る。申請者らは、NSCを含む様々な正常細胞で発現しGICで消失/著減しているmiRの制御下でCas9を発現するシステムとGICの機能・維持に重要な働きを担っている機能因子に対するgRNAを組合せ、GIC特異的に細胞傷害を誘導する安全性の高い新規ベクターシステムを開発している。本申請課題研究では、本ベクターシステムを組み込んだ組換えレンチウイルスを作製し、（1）複数のGICと様々な正常細胞に対する毒性試験、（2）GICを移植した担が

んマウスに対する抗腫瘍効果の検討実験、(3)本システムのGBM以外の脳腫瘍への適用可能性について検討し、臨床研究へ応用可能な安全性と有効性を兼ね備えた新規抗GBM組換えウイルスの創出を目標とする。

3. 研究の方法

(1)正常NSCで発現しGICで発現消失している2種類のmiRの相補配列(CS)をCas9遺伝子下に挿入したCas9発現カセットとGIC機能因子(Sox2等)に対するsgRNA発現カセットを組み込んだウイルスベクターを構築する。

(2)miR発現逆依存的にGIC因子をゲノム編集するウイルスをNSCおよびGICに感染させて、細胞に対する効果を検討する。検討方法は、細胞分化、増殖、細胞死である。

(3)GICを脳移植した担癌マウスにGICを特異的に傷害するゲノム編集ウイルスを感染させて、抗腫瘍効果を検討する。検討方法は、脳腫瘍サイズ、腫瘍の病理像、生存期間である。

4. 研究成果

(1)miR発現逆依存的にゲノム編集するレンチウイルスベクターおよびAAVの構築

2種類のmiR-CSをspCas9下に挿入した発現カセットとSox2等のsgRNA発現カセットを共に組み込んだ1パッケージレンチウイルスベクターを作製した。本ベクターをGICにトランスフェクションした結果、標的遺伝子のノックアウト(KO)と細胞増殖阻害を確認した。しかし、本ゲノム編集システムを搭載したレンチウイルスの調整を試みたが、調整できなかった。この原因は、作製したベクターサイズがレンチウイルスのパッケージングサイズの上限いっぱいであったためと考えられる。そこで、ゲノム編集システムを2つのAAVに分けて共感染によりゲノム編集を行う2ベクターシステムを構築した。2種類のAAVをGICに共感染させてその効果を検討したところ、本AAVが標的遺伝子をKOし、GICの増殖を抑制することを確認した。

(2)miR発現逆依存的にゲノム編集するAAVの試験管内抗腫瘍効果の確認

miR発現逆依存的に生体内の腫瘍細胞にゲノム編集を行う場合、2種類のウイルスが共感染する確率は低い。そこで新たにsaCas9を用いた1パッケージのmiR発現逆依存的にゲノム編集するAAVを構築した。本AAVを調整しGICに感染させてその効果を検討したところ、標的遺伝子のKOと細胞増殖阻害を確認した。更に、本AAVを感染させたGICを脳に移植したマウスでは、腫瘍形成が抑制され、その生存期間が優位に延長することを確認した。

(3)miR発現逆依存的にゲノム編集するAAVの生体内抗腫瘍効果の確認

miR発現逆依存的にゲノム編集するAAVをGBMに対する新規遺伝子治療法とするために、免疫不全マウス脳に移植したGIC腫瘍に感染可能なAAVキャプシドの同定を試みた結果、既存のキャプシドの組み合わせが有効であることを発見した。このキャプシドを纏ったmiR発現逆依存ゲノム編集AAVをGIC脳腫瘍マウスに尾静脈投与した結果、抗腫瘍と生存期間の延長を確認した(図3)。

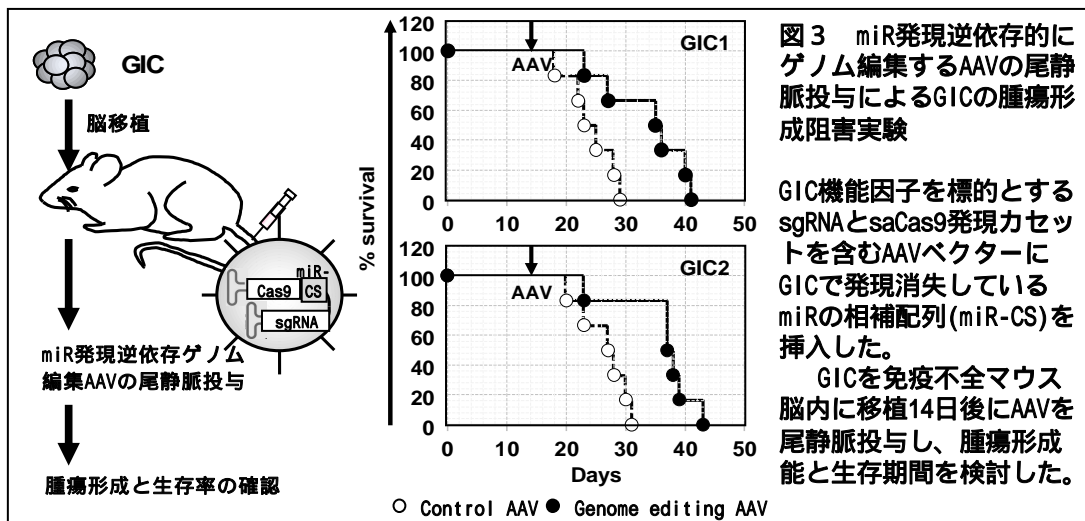


図3 miR発現逆依存的にゲノム編集するAAVの尾静脈投与によるGICの腫瘍形成阻害実験

GIC機能因子を標的とするsgRNAとsaCas9発現カセットを含むAAVベクターにGICで発現消失しているmiRの相補配列(miR-CS)を挿入した。

GICを免疫不全マウス脳内に移植14日後にAAVを尾静脈投与し、腫瘍形成能と生存期間を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kondo Toru | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Glioblastoma-initiating cell heterogeneity generated by the cell-of-origin, genetic/epigenetic mutation and microenvironment | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Seminars in Cancer Biology | 6. 最初と最後の頁 176-183 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcancer.2020.12.003 | 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 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Kondo Toru | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Selective eradication of pluripotent stem cells by inhibiting DHODH activity. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells | 6. 最初と最後の頁 33-42 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3290 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Al-Akashi Z, Zujur D, Kamiya D, Kato T, Kondo T, Ikeya M. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Selective Vulnerability of Human-Induced Pluripotent Stem Cells to Dihydroorotate Dehydrogenase | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Front. Cell. Dev. Biol. | 6. 最初と最後の頁 1089945 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1089945 | 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 - |

〔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 Toru Kondo |
| 2. 発表標題 Novel genome-editing AAVs that selectively eradicate glioblastoma-initiating cells |
| 3. 学会等名 6th European Congress on Neurology and Brain Disorders（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toru Kondo |
| 2. 発表標題 Novel genome-editing AAVs that selectively eradicate glioblastoma-initiating cells |
| 3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
| | |