

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08195

研究課題名(和文)異なるゲノム編集機序評価に基づくSly病に対するゲノム編集治療法の最適化

研究課題名(英文) Study of genome editing therapy for Sly disease based on different genome editing mechanisms

研究代表者

鐘ヶ江 裕美 (Kanegae, Yumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：80251453

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、静止期細胞で効率の悪い相同組換えに依存しないゲノム修復法であるHITI法とPITCh法についてアデノウイルスベクター(Adv)を用いて試みることを目的とする。まず安全性を高めるために「細胞特異的・高度短期間Cas9発現システム」を構築した。また、Sly病モデルマウスGUSB遺伝子のゲノム編集が可能であることを示した。ついで、AAVS1領域などに安全にGUSB遺伝子発現単位を挿入する系についても検討し、HR法はPITCh法よりも2倍、HITI法よりも17倍効率的に挿入可能であることを示した。本研究成果は遺伝病へのゲノム編集治療法の改良に有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来のゲノム編集治療法で問題であった修復効率を向上させるためのHITI法やPITCh法によるゲノム修復が増殖期の細胞ではHR法よりは劣っていたものの可能であることを明らかにした。今後はiPS細胞から誘導する肝臓細胞を用いて体細胞の殆どをしめる静止期細胞での修復効率について検討を進めていく。また、レンチウイルスベクターには劣るものの、Advを用いてAAVS1などのセーフ・ハーバー領域にCAGプロモーターなど強力なプロモーターを用いて治療用遺伝子を高効率に導入可能であったことから、今後のex vivo遺伝子治療の安全性の向上に寄与できる結果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Genome editing is expected to be the ultimate gene therapy but remaining problems that sufficient therapeutic effects cannot be obtained due to low genome editing efficiency. Therefore, the HITI method and the PITCh method have been reported. At first, I succeeded in constructing a "cell-specific high-efficient and short-term Cas9 expression system". It was also confirmed that editing by the HR method can be performed efficiently in the model mouse GUSB gene. Considering future gene therapy, I also developed a system that safely inserts the gene expression unit into the AAVS1 region. In the study using HuH-7 cells, it was shown that the HR method was able to insert the target expression unit 2 times more efficiently than the PITCh method and 17 times more efficiently than the HITI method. In the future, I plan to compare the insertion-efficiency with these methods using induces liver cells from iPS cells. I believe that this research will be useful for genome editing therapy.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：ゲノム編集 アデノウイルスベクター Sly病

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、既に欧米を中心として臨床試験が始められており、有用性が示唆されている。また、ゲノム編集技術の1つである ZFN を用いたムコ多糖症(MPS)II 型(ハンター症候群)に対してベクターを直接投与する *in vivo* ゲノム編集治療が試みられ、low dose では有効性の判断が難しかったものの有害事象の報告もなく、high dose の結果が待たれていた。一方で、これまでの知見から以下のような改良の必要性が指摘されていた。(i) ゲノム編集効率、特にゲノム修復効率は低いため、正しい配列に置換したゲノムから発現する目的タンパク質の発現量が治療に不十分であること (ii) ゲノム修復は細胞分裂に伴って行われる事象であるため、静止期にある体細胞での効率が低いこと (iii) 例えば iPS 細胞のような未分化な細胞では、逆に速やかなゲノム修復が起こるためゲノム編集効率が低いとことであった。

研究代表者は、アデノウイルスベクター(AdV)による CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術の改良を進めてきた。ゲノム編集では off target が問題であり、Cas9 の持続的な高度発現は off target 誘導のトリガーとなる。そこで、鐘ヶ江らは部位特異的組換え酵素 Cre により AdV ゲノムから切り出された環状 DNA 分子上で初めて Cas9 が発現する様に設計した「短期間・高発現 Cas9 発現システム」の構築に成功していた。AdV は一過性発現ベクターであるが、数ヶ月安定に保持されるベクターゲノムから Cas9 は発現し続けることが知られていた。一方、Cre により切り出された環状分子の安定性は数日間しかないことを示した。しかし、先の「問い」である修復効率の上昇には更なる手法との組み合わせが必要であった。

2. 研究の目的

ゲノム編集による遺伝子治療は、究極の遺伝子治療法として期待されているが、危惧されている off target だけでなく、低いゲノム編集効率により十分な治療効果が得られない問題も指摘されている。そこで、体細胞のほとんどを占める静止期細胞では効率の悪い相同組換えに依存しないゲノム編集機序に立脚した HITI (homology-independent targeted integration) 法、PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) 法を遺伝子導入効率の高いアデノウイルスベクター(AdV)を用いて試みることに本研究の目的である。

対象疾患としては、 α -glucuronidase 異常によりムコ多糖が蓄積し重篤な症状を示すことが知られているムコ多糖症 VII 型(Sly 病)を選んだ。Sly 病は、ケラタン硫酸を除くグルコサミノグリカン(GAG)を分解する酵素の1つである α -glucuronidase に異常があり GAG が蓄積し、低身長、関節拘縮、心臓弁膜症、胎児水腫、中枢神

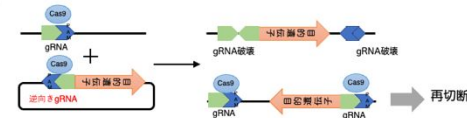
1) HR法 (相同組み換え応用)



2) PITCh法 (マイクロホモロジー応用)



3) HITI法 (NHEJ応用)



経症状など多様な症状を示す。発症頻度は250,000人に1人と極めて希少疾患であるが、胎児期死亡の多い可能性もあり、みかけの患者数が少ない可能性がある。酵素補充療法は行われておらず、遺伝子治療による治療が待たれている疾患の1つである。本研究成果はSly病だけでなく、他の遺伝病へのゲノム編集治療法にも有用であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 副反応を最小化するゲノム編集治療法の開発

AdVの導入効率が極めて高い肝臓細胞へのゲノム編集治療を考慮して、肝細胞がん由来のHuH-7細胞を用いて、従来のCas9発現AdVと「短期間・高発現Cas9発現AdVシステム」のゲノム編集効率を比較検討した。具体的には、B型肝炎ウイルス(HBV)ゲノムを例として、HBVゲノム切断効率を同じgRNAを搭載したAdVと両システムのCas9発現AdVを同時感染することで比較した。また、「短期間・高発現Cas9発現AdVシステム」を更に発展し、Cas9を肝臓細胞特異的プロモーターから発現する「細胞特異的短期間・高発現Cas9発現システム」も構築した。また、AdVで危惧されている炎症反応を最小限にすることが知られているEF1プロモーターからCas9を発現する「低炎症型Cas9高度発現AdV」を構築した。

(2) GUSB遺伝子コード領域におけるゲノム編集治療法の検討

Sly病モデルマウス初代細胞を用いて点変異GUSB遺伝子の修復効率について、Cas9発現AdVを用いたHR法により試みた

(3) セーフ・ハーバー部位であるヒトAAVS1へのノックイン効率の比較

HuH-7細胞を用いて、Cas9発現AdVを用いたHR法とHITI法及びPITCh法のゲノム挿入効率比較を行った。具体的には、ドナープラスミドとしてもちいるため、CAGプロモーターからGFPとPuromycin耐性遺伝子を2A配列で結合し同時に発現する様に(GFP-Puro)マーカー遺伝子発現単位を設計した。次に、AAVS1上の同じ標的配列を認識するようにHR法、HITI法、PITCh法の標的配列および相同領域をGFP-Puroの両端に結合し各々の方法に対応するドナープラスミドとした。各々のドナープラスミドをHuH-7細胞にトランスフェクションにて導入後、翌日にCas9発現AdVとAAVS1の標的配列を認識するgRNA搭載AdVを感染し、GFPをマーカーにGFP発現細胞の評価を行った。また、Puromycinを添加し、シングルアイソレーションを行い、GFP発現細胞の発現持続を確認した。

4. 研究成果

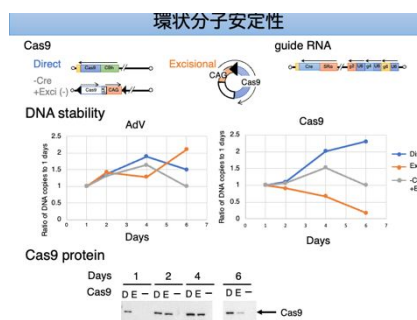
(1) 副反応を最小化するゲノム編集治療法の開発

AdVによる炎症を最小限に留める「低炎症型AdV」のCas9の作製と肝臓細胞特異的に高度にCas9を発現する「肝臓細胞特異的短期間Cas9発現システム」構築を行った。

AdVは*in vivo*へ投与した時に強い免疫原性を示すことが問題であったが、申請者らはその原因が挿入した外来プロモーターに近接するウイルスタンパク質pIXのリーク発現であり、このpIXのリーク発現はEF1プロモーターにより抑制されることを報告してきた。そこで、本研究ではEF1

プロモーターから Cas9 を発現する「低炎症型 Cas9 高度発現 AdV」を作製した。Cas9 発現 AdV の作製は困難であることが報告されており、特に強力な EF1 プロモーターから Cas9 を発現するため、当初作製が困難であったが、導入 DNA 量などの検討を加えた結果、力価は従来よりも低いものの作製に成功した。

しかし、実際に治療に用いることを考えると、off target を最小化することが重要であり、高度に Cas9 を発現するものの、Cas9 の発現持続時間は可能な限り短時間とすることが望ましい。そこで、申請者の独創的なシステムである「切り出し発現 AdV システム」と細胞特異的プロモーターを組み合わせ「細胞特異的短期間 Cas9 発現システム」を構築した。例として、ゲノム編集治療の主要な標的臓器の一つである肝臓に注目し、肝臓細胞特異的プロモーターであるアルブミンプロモーターから Cre を発現する AdV と Cre 依存的に肝臓細胞でのみ生成する環状分子から Cas9 または Nickase Cas9 を発現する AdV を感染する系の検討を行った。その結果、肝臓細胞特異的かつ高度に Cas9 が発現し、効率的なゲノム編集が可能であったことを確認した。



(2) GUSB 遺伝子コード領域におけるゲノム編集治療法の検討

Nickase Cas9 を用いて、変異塩基の存在する exon 上流の intron と変異塩基下流に guide RNA を 4 つ設計し、AdV によるゲノム編集を行った。その結果、約 10%の効率で正常な配列を持つ exon が確認された。

(3) セーフ・ハーバー部位であるヒト AAVS1 へのノックイン効率の比較

HuH-7 細胞を用いて肝臓細胞の AAVS1 サイトへのゲノム編集効率について検討した。マーカー遺伝子として挿入した GFP 発現細胞数から、HR 法は PITCh 法よりも 2 倍、HITI 法よりも 17 倍効率的に目的発現単位を挿入可能であることが示された。しかし HuH-7 細胞はがん細胞であるため HR が活発に行われている細胞であることを考えると、今後静止期細胞で検討を行うことが必須であると考えた。そこで、iPS 細胞から肝臓細胞分化誘導する方法について検討し、発現プロファイルから成熟肝臓細胞が誘導されていたことを確認した。そこで今後は本細胞を用いた検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamasaki Manabu, Matsuda Norie, Matoba Kazuaki, Kondo Saki, Kanegae Yumi, Saito Izumu, Nomoto Akio	4. 巻 306
2. 論文標題 Acetophenone 4-nitrophenylhydrazone inhibits Hepatitis B virus replication by modulating capsid assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198565 ~ 198565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2021.198565	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 Nagamoto Sayaka, Agawa Miyuki, Tsuchitani Emi, Akimoto Kazunori, Matsushima Saki Kondo, Kanegae Yumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Short term but highly efficient Cas9 expression mediated by excisional system using adenovirus vector and Cre	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 242369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03803-w	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 Imaizumi Yuta, Yoshida Saishu, Kanegae Yumi, Eto Ken, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 113
2. 論文標題 Enforced dual specificity tyrosine regulated kinase 2 expression by adenovirus mediated gene transfer inhibits tumor growth and metastasis of colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 960 ~ 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15247	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 Hamura Ryoga, Shirai Yoshihiro, Shimada Yohta, Saito Nobuhiro, Taniai Tomohiko, Horiuchi Takashi, Takada Naoki, Kanegae Yumi, Ikegami Toru, Ohashi Toya, Yanaga Katsuhiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Suppression of lysosomal acid alpha glucosidase impacts the modulation of transcription factor EB translocation in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2335 ~ 2348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14921	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 鐘ヶ江 裕美	4. 巻 54
2. 論文標題 ゲノム編集の機序	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 274-279
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 -

1. 著者名 1.D. Mostafa, A. Takahashi, A. Yanagiya, T. Yamaguchi, T. Abe, T. Kureha, K. Kuba, Y. Kanegae, Furuta, T. Yamamoto, T. Suzuki.	4. 巻 17
2. 論文標題 Essential functions of the CNOT7/8 catalytic subunits of the CCR4-NOT complex in mRNA regulation and cell viability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA Biol	6. 最初と最後の頁 403-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15476286.2019.1709747	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

〔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 阿川 美幸, 小泉 美優, 葛巻 直子, 成田 年, 馬目 佳信, 岡野 栄之, 鐘ヶ江 裕美
2. 発表標題 アデノウイルスベクターを用いた短期間・高効率運動神経誘導および濃縮法の開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小澤 敬也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 240
3. 書名 いま、本格化する 遺伝子治療	

〔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
---------	---------