

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09765

研究課題名(和文) エピゲノム編集による抹消血を用いた網膜色素変性病因遺伝子の発現解析法の開発

研究課題名(英文) Development of expression analysis for retinitis pigmentosa causative genes using peripheral blood by epigenome editing

研究代表者

西口 康二 (Nishiguchi, Koji)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30447825

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)：本研究では、網膜色素変性患者由来の不死化リンパ芽球を対象に、ゲノム編集技術を用いて特定の網膜色素変性病因遺伝子のプロモーターを非メチル化することにより同遺伝子の強制発現細胞株の樹立を可能にする技術を開発することを目的とした。まずは日本人網膜色素変性患者の病因遺伝子として最も頻度が高いEYS遺伝子を開発対象とした。患者由来の不死化リンパ球細胞株にゲノム編集により、本来リンパ球では発現しないEYS遺伝子のmRNA発現解析を行い、同患者のゲノム情報と照合することにより、病因変異が同定可能であることを確認した。この方法を改良することで比較的簡便かつ安価な遺伝子診断補助検査法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の失明原因の上位である網膜色素変性は難治性の遺伝性疾患であるが、大半の患者で病因変異が特定できていない。mRNA解析が有効な補助診断となりえるが、血液など容易に採取可能な患者由来サンプルで有用な結果を得るのは困難であった。この状況において、本研究では、患者リンパ球由来の網膜特異的遺伝子の強制発現細胞株を樹立し、遺伝子解析に対する有効性を示すことができた。この技術が発展すれば遺伝子診断の補助検査として広く普及する可能性がある。さらに、本技術は、網膜疾患以外の遺伝性疾患や非遺伝性疾患の病態解明や治療開発にも応用可能であり、汎用性と波及効果が極めて高く、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The genetic basis of Japanese retinitis pigmentosa remains largely unknown. Therefore, using genome editing technology, we developed a technique for over expression of a specific retinitis pigmentosa-causing gene promoter by unmethylating it in lymphoblasts derived from patients with retinitis pigmentosa. First, the EYS gene, which has the highest frequency as a pathogenic gene in Japanese patients with retinitis pigmentosa, was targeted for development. We performed mRNA analysis of the EYS gene expressed by genome editing in a patient-derived lymphoblastoid cell lines, and confirmed that the disease-causing mutation could be identified by comparing it with the patient's genomic information. It is possible to develop a comparatively simple and inexpensive genetic test method.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 ゲノム編集 リンパ球

1. 研究開始当初の背景

若年者の失明原因第1位である網膜色素変性 (Retinitis Pigmentosa: RP) は難治性の遺伝性疾患である。近年、RP 類縁疾患に対する遺伝子治療の成功により、同疾患に対する遺伝子診断の重要性が増している。しかし、次世代シーケンサーを用いて網羅的ゲノム解析を行っても、本邦の大半の RP 患者で病因変異が特定できない (文献 1, 2)。この問題に対しては、病因変異は何らかの mRNA の質的 (稀に量的) 異常を介して病原性を示すため、mRNA 解析が有効な補助診断となりえる。しかし、RP 病因遺伝子の多くは網膜特異的な発現を示すため、血液など容易に採取可能な患者由来サンプルを用いた mRNA 解析で有用な結果を得るのは困難であった。

近年、メチル化により不活化されたプロモーターの一部を相同的な非メチル化プロモーターに置換することで、任意の遺伝子の発現を誘導できることが報告された (文献 3)。遺伝子の不活化を担うメチル化酵素群は細胞運命決定後に大幅に活性が低下するために、ある程度分化した細胞で非メチル化プロモーターに置換すると、細胞継代後も非メチル状態は維持され、下流の遺伝子の発現も安定的に持続する。本研究では、この方法を用い、末梢血で任意の RP 病因遺伝子の発現解析が可能になる技術を開発する。そして、同技術が遺伝子診断の補助検査や遺伝子治療の効果判定に対する有用性を検証する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、網膜色素変性 (Retinitis Pigmentosa: RP) 患者由来の不活化リンパ球を対象に、ゲノム編集技術を用いて特定の RP 病因遺伝子のプロモーターを非メチル化することにより同遺伝子の強制発現細胞株の樹立を可能にする技術開発である。そして、本来リンパ球では発現しない RP 病因遺伝子の mRNA 発現解析を行い、技術の有用性を評価する。本研究により、比較的簡便かつ安価な遺伝子診断補助検査法の開発が可能になり、遺伝性疾患の診断率の向上に寄与すると期待される。

3. 研究の方法

以下の3つのステップで実験を進めた。(1) 非メチル化プロモーター置換用のベクターの作製と mRNA 発現解析の最適化、(2) 患者由来不活化リンパ球の樹立と mRNA 解析の有効性評価、(3) CRISPRa (CRISPR activation) を用いた mRNA 発現誘導

(1) 非メチル化プロモーター置換用のベクターの作製と mRNA 発現解析の最適化

対象遺伝子として、日本人で最も頻度の高い RP 病因遺伝子である *EYS* に着目した。まずは、メチル化プロモーター領域 (約 600 bp) を切除するガイド RNA (gRNA) を設計した。さらに、切除したゲノム領域に相同的な配列に数ベース以内のタグ配列を有する非メチル化プロモーターを合成し、ドナー DNA とした。ドナー DNA の両端に 20 bp の microhomology arm (MA) を設置し、Cas9 と gRNA を用いて Microhomology-Mediated End Joining (MMEJ; 文献 4, 5) によりドナー DNA をゲノムへ挿入するベクターを作製した。また、同様に CAG プロモーター配列を挿入するベクターを作製した。HEK293T 細胞および正常不活化リンパ球に対して、開発したベクターを遺

伝子導入した。導入後に、RT-PCRによりRNA解析を行った。また必要に応じてメチル化抑制剤の添加も行った。

(2) 患者由来不死化リンパ球の樹立と mRNA 解析の有効性評価

EYS 遺伝子変異が同定済みの患者から不死化リンパ球を作製した。同細胞株に対して開発したベクターを遺伝子導入し、RT-PCR による mRNA 解析を行った。さらに、樹立した細胞株に対して、*EYS* 病因変異を正常配列に置換するゲノム編集遺伝子治療ベクターを投与し、治療効果を判定した。

(3) CRISPRa (CRISPR activation) を用いた mRNA 発現誘導

Cas9 の nuclease を不活化した変異体である dCas9 に transcriptional activator を付加した dCa9-VR とガイド RNA 発現カセットを組み込んだベクターを作製し、HEK293T 培養細胞および不死化リンパ球細胞に導入し、RT-PCR により mRNA 発現を解析した。

4. 研究成果

不死化リンパ球に対してゲノム編集を行うことで、網膜特異的遺伝子の mRNA を安定して発現する細胞株を作製し、患者由来不死化リンパ球の mRNA 解析が遺伝子診断あるいは遺伝子治療効果判定に有用か検証した。

(1) 非メチル化プロモーター置換用のベクターの作製と mRNA 発現解析の最適化

EYS のメチル化プロモーター領域 (約 600 bp) を同配列の非メチル化プロモーターに置換するゲノム編集ベクターを作製し、HEK293T 培養細胞を用いた評価を行ったが、内在のプロモーター配列の置換では、安定した発現が得られなかった。そこで、より強力かつ組織非特異的に発現を誘導する CAG プロモーター配列を採用して、標的遺伝子の開始コドンのすぐ上流に CAG プロモーター配列をゲノム編集により挿入するベクターを作製した (図 1)。このベクターを HEK293T 培養細胞および不死化リンパ球に導入し、さらに、脱メチル化剤を添加した上で、RT-PCR による発現解析を行ったところ、安定した mRNA 発現を得ることができた。

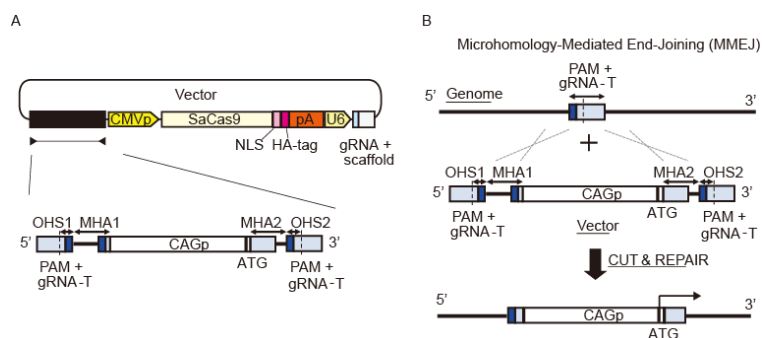


図 1 CAG プロモーター挿入ゲノム編集ベクターの構造 (A)

とそのゲノム挿入の模式図 (B)

(文献 8 より規定に従い転載のうえ改変)

(2) 患者由来不死化リンパ球の樹立と mRNA 解析の有効性評価

構築した培養細胞評価系を用

いて、日本人 RP 患者の遺伝子解析により検出された *EYS* 遺伝子の変異に対して、*EYS* mRNA の構造異常を検出できるか解析を行った。*EYS* については、7 つの主要な転写バリエーションが存在することが報告されているが、その中でも網膜特異的な長いアイソフォームは、視細胞に不可欠であると考えられている (文献 6)。そこで、*EYS* G843E と S1653Kfs のホモ接合体を保持する患者から不死化リンパ球を樹立し、*EYS* の発現を調査した。上記のゲノム編集により発現誘導させた

mRNA を、RT-PCR により検出し、サンガー法を用いて配列決定したところ、G843E (エクソン 16) を含む mRNA が網膜特異的な長いアイソフォームの C 末端を失うことなく発現することが確認された (図 2A-C)。一方、ホモ接合体 S1653Kfs では、EYS mRNA が検出されなかったが、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構の阻害剤添加により検出することができた。このことは、変異によりナンセンス変異依存 mRNA 分解機構が働き、転写産物が分解されることを示している。また、これはゲノム編集によって突然変異を野生型配列に置き換えることで正常化された (図 2D)。このことは、血球由来の細胞を用いて、網膜色素変性原因遺伝子 mRNA の構造異常を検出できることを示している。

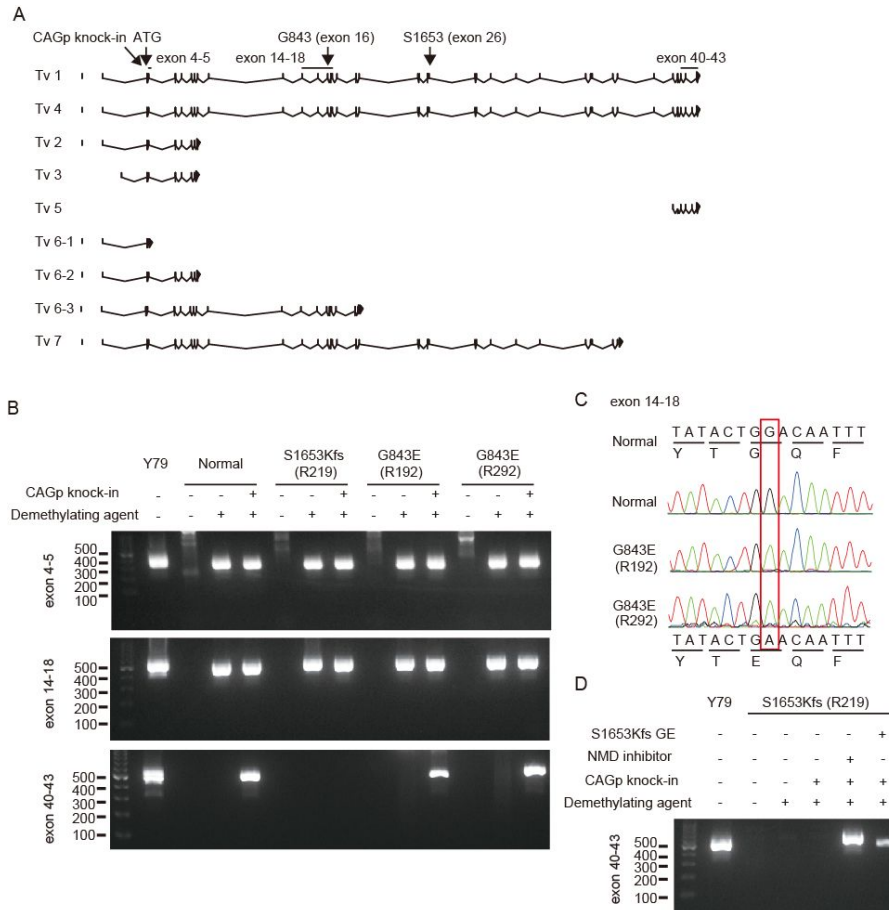


図 2 患者由来の不死化リンパ球細胞を用いた EYS mRNA の解析

A: EYS の転写バリエーションとエクソン-イントロン構造。

B: RT-PCR 解析。EYS のエクソン 5-6、エクソン 14-18、およびエクソン 40-43 を RT-PCR で検出した。Y79 網膜芽細胞腫細胞株を陽性対照として使用した。網膜特異的 Tv1 の C 末端エクソンは、G843E ホモ接合体では検出されたが、S1653Kfs ホモ接合体では検出されなかった。

C: RT-PCR 産物のサンガーシーケンス (エクソン 14-18)。G843E が患者由来の mRNA から検出された。

D: S1653Kfs ホモ接合体不死化リンパ球の変異置換ゲノム編集 (GE) およびナンセンス媒介 mRNA 分解 (NMD) の阻害後の RT-PCR 解析。エクソン 40-43 の発現は NMD 阻害剤投与で検出された (NMD により分解されていた)。また、変異置換ゲノム編集によりレスキューされた。

(文献 8 より規定に従い転載のうえ改変)

(3) CRISPRa (CRISPR activation) を用いた mRNA 発現誘導

開発した方法は薬剤により遺伝子発現を誘発するため、安定的な mRNA 発現解析には不十分であり、また、シーケンス結果もゲノム領域によってばらつきがあった。そこで、新たな網膜色素変性原因遺伝子発現誘導の方法として、CRISPRa (CRISPR activation; 文献7) による発現誘導系の構築を行った。これは、Cas9 の nuclease を不活化した変異体である dCas9 に transcriptional activator を付加したものと対象遺伝子の promoter 領域にデザインしたガイド RNA を用いて mRNA の発現を誘導する方法である。これを、まずは HEK293T 細胞を用いて確立した。続いて、正常不死化リンパ球において、EYS を含む網膜色素変性原因遺伝子の上位 3 遺伝子の mRNA 発現を誘導することに成功した。この方法は、薬剤で EYS 発現を誘発する必要がないため、より簡便に解析をすることができる。現在、正常者末梢血を用いた網膜色素変性原因遺伝子の、dCas9 発現システムの構築実験を行っている。

本研究において、患者由来の網膜特異的遺伝子の強制発現細胞株を樹立し、遺伝子解析や遺伝子治療開発に対する有効性を示すことができた。この技術が発展すれば遺伝子診断の補助検査として広く普及する可能性がある。また、単一クローン由来の強制発現細胞株を樹立することにより、RNA シーケンスを含めた詳細な mRNA 解析を介した病態解明研究や遺伝子治療の効果判定などにも発展的に応用できる。さらに、本技術は、網膜疾患以外の遺伝性疾患や非遺伝性疾患の病態解明や治療開発にも応用可能であり、汎用性と波及効果が極めて高く、その意義は大きい。

<引用文献>

1. Oishi M, et al. Comprehensive molecular diagnosis of a large cohort of Japanese retinitis pigmentosa and Usher syndrome patients by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 7369-7375 (2014).
2. Koyanagi Y, et al. Genetic characteristics of retinitis pigmentosa in 1204 Japanese patients. *J Med Genet* **56**, 662-670 (2019).
3. Katayama S, et al. A Powerful CRISPR/Cas9-Based Method for Targeted Transcriptional Activation. *Angew Chem Int Ed* **128**, 6562-6566 (2016).
4. Nakade S *et al.* Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* **5**, 5560 (2014).
5. Nishiguchi KM, Fujita K *et al.* Single AAV-mediated mutation replacement genome editing in limited number of photoreceptors restores vision in mice. *Nat Commun* **11**, 482 (2020).
6. Alfano G, et al. EYS is a protein associated with the ciliary axoneme in rods and cones. *PLoS One* **11**, e0166397 (2016).
7. Gilbert LA, et al., CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. **154**, 442-51 (2013).
8. Nishiguchi KM, et al., A hypomorphic variant in EYS detected by genome-wide association study contributes toward retinitis pigmentosa. *Commun Biol*. **4**, 140 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Nishiguchi KM, Miya F, Mori Y, Fujita K, Akiyama M, Kamatani T, Koyanagi Y, Sato K, Takigawa T, Ueno S, Tsugita M, Kunikata H, Cisarova K, Nishino J, Murakami A, Abe T, Momozawa Y, Terasaki H, Wada Y, Sonoda KH, Rivolta C, Tsunoda T, Tsujikawa M, Ikeda Y, Nakazawa T	4. 巻 4
2. 論文標題 A hypomorphic variant in EYS detected by genome-wide association study contributes toward retinitis pigmentosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01662-9	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koji M Nishiguchi
2. 発表標題 Development of Genome Editing Gene Therapy for Inherited Retinal Degeneration
3. 学会等名 1st Asia Retina Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji M Nishiguchi
2. 発表標題 Application of a Novel Genome Editing Approach for Treating a Common Mutation in a Large Gene Untreatable by Conventional Gene Supplementation
3. 学会等名 Sonoma Eye Virtual Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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	中澤 徹 (Nakazawa Toru) (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	藤田 幸輔 (Fujita Kosuke) (80708115)	名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901)	

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