

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09823

研究課題名（和文）ゲノム編集技術を用いた遺伝性網膜変性症遺伝子治療技術プラットフォームの開発

研究課題名（英文）Development of the platform of gene therapy for inherited retinal diseases using gene-editing technologies

研究代表者

岩川 外史郎（Iwagawa, Toshiro）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30638648

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）：視細胞や網膜色素上皮（RPE）が変性する遺伝性網膜変性症（IRD）に対する根本的な治療法の開発を目指し、本研究は候補標的遺伝子に対するエクソンスキッピングの有効性の評価を試みた。CRISPR/Cas9システムによりCHMやMYO7Aの機能を喪失するヒトiPS細胞変異株を樹立し、RPEへ分化させた後に、エクソンスキッピングを誘導し、その有効性を評価した。CHMの変異株では酸化ストレス条件下で貪食能の低下が認められたが、エクソンスキッピングにより一部機能の回復が認められるとともに、RAB38の局在の変化が見出された。今後MYO7Aにおけるエクソンスキッピングの有効性の評価が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視細胞や網膜色素上皮（RPE）が変性する遺伝性網膜変性症（IRD）に対する根本的な治療法の開発を目指し、本研究は筋ジストロフィーで有効性が見出されているエクソンスキッピングの評価を試みた。ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムによりCHMやMYO7Aの機能を喪失するヒトiPS細胞変異株を樹立し、RPEへ分化させた後に、エクソンスキッピングを誘導した。CHMの変異によりRPEの機能低下が認められたが、エクソンスキッピングにより一部機能の回復が認められるとともに、RAB38の局在の変化が見出され、エクソンスキッピングの有効性が示唆された。研究成果は査読付き論文として発表した。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a treatment for inherited retinal diseases, I evaluated the effects of exon-skipping using a CRISPR/Cas9 system on retinal pigment epithelium (RPE) differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) with a mutation in CHM or MYO7A. Under oxidative stress, RPE with a mutation in CHM exon 6 showed the decreased expression level of CHM protein and phagocytic activity. By targeting a splice donor site of exon 6, exon 6-skipping was induced and the expression of truncated CHM protein was confirmed. CHM exon 6-skipping partially rescued the decreased phagocytic activity and affected the localization of RAB38 protein. Therefore, CHM exon 6-skipping contributed to RPE phagocytosis probably by increasing RAB38 prenylation under oxidative stress. In the future, the evaluation of the exon-skipping targeting MYO7A in RPE and retinal cells is hoped.

研究分野：眼科学

キーワード：エクソンスキッピング 遺伝子治療 ヒトiPS細胞 RPE ゲノム編集

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症をはじめとする遺伝性網膜変性症 (IRD) は、重度の視覚機能障害に及ぶ可能性のある遺伝性疾患である。発症頻度は 2,000 人から 3,000 人に 1 人と言われており、250 を超える原因遺伝子が報告されているが、根本的な治療法は、RPE65 の機能を失った患者に対して、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用い、正常な RPE65 を発現させる遺伝子治療のみである。AAV ベクターを用いた遺伝子治療法の開発は、一部の常染色体劣性遺伝を示す疾患で臨床試験が進行中であるが、AAV ベクターではサイズの大きな遺伝子は導入が難しいといった課題が残されている。

本研究では、デュシユンヌ型筋ジストロフィーで有効性が示されているエクソンスキッピングに着目した。エクソンスキッピングでは、変異を持ったエクソンをフレームシフトが引き起こされないように飛ばすことで、アミノ酸が一部欠失するものの部分的に機能を持ったタンパク質を発現させ、治療効果を得ることが期待される。デュシユンヌ型筋ジストロフィーに対して、アンチセンスオリゴを用いてエクソンスキッピングを誘導する治療法が国内外で認可されているが、眼科領域でエクソンスキッピングの評価がなされた事例は 1 件の報告があるのみで、IRD に対する有効性の評価は十分にはなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、IRD 原因遺伝子の中から標的遺伝子を選び出し、標的遺伝子に対してゲノム編集技術を利用したエクソンスキッピングの有効性を評価する基盤技術を開発し、エクソンスキッピングの有効性の評価を目的とした。

### 3. 研究の方法

標的遺伝子として、劣性遺伝であること、網膜色素上皮 (RPE) で評価可能なこと、3 の倍数の長さのエクソンに変異が報告されていることといった条件から、コロイデレミアの原因遺伝子である *CHM* や、遺伝子サイズが 4kbp 以上であるという条件から *MYO7A* を選んだ。ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を利用して、*CHM* や *MYO7A* に機能を喪失することが予想される変異を持ったヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞株を樹立し、RPE へ分化させ、CRISPR/Cas9 を利用して、標的エクソンのスキップを誘導した。RPE への分化は免疫染色によって、エクソンスキッピングの誘導は、RT-PCR、RT-qPCR、ddPCR、ウェスタンブロットによって確認した。蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーにより、RPE の貪食能の評価を行い、エクソンスキッピングの有効性を評価した。

### 4. 研究成果

(1) RPE への分化誘導実験系は既存の報告を元に行い (Dewell TE et al., *Stem Cell Res.* 2021) RPE への分化を促進する転写因子である *OTX2*, *PAX6*, *MITF* の発現をドキシサイクリンによって誘導する細胞株を樹立した。RPE への分化は、免疫染色により *OTX2*, *PAX6*, *ZO-1* の発現を確認し、形態的にも多角形で色素を帯びた RPE 様の細胞であることが確認された。

(2) *CHM* では、エクソン 6, 9, 10、*MYO7A* ではエクソン 3 を標的エクソンとし、それぞれのエクソンに機能を失うことが予想される変異を持った細胞株を CRISPR/Cas9 によって樹立した。エクソンスキッピングの誘導のために、*CHM* ではスプライシングに重要な部位であるスプライドナーサイトに Cas9 の切断が入り、非相同組み換えにより塩基の欠失や挿入が生じるように gRNA を設計した。*MYO7A* では、エクソン 3 の前後のイントロンを標的とし、エクソン 3 の欠失が誘導されるように gRNA を設計した。ヒト iPS 細胞において、標的エクソンのスキッピングの誘導を試み、RT-PCR、RT-qPCR、ddPCR、ウェスタンブロットによってエクソンスキッピングの確認を行った。その結果、*CHM* のエクソン 9, 10 のスキッピングでは誘導されるタンパク質の発現が著しく低いことが示されたが、エクソン 6 のスキッピングではある程度の発現レベルが確認されたため、エクソン 6 のスキッピングの評価を進めることとした。

(3) *CHM* や *MYO7A* に変異を持ったヒト iPS 細胞を RPE へ分化させた後に、CRISPR/Cas9 によって標的エクソンのスキッピングを誘導し、しばらく培養後、エクソンスキッピングの評価を試みた。RPE の機能の一つとして貪食能があげられるため、蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによって貪食能を評価するアッセイ系の構築を試みた。蛍光ビーズを培地に添加しただけではビーズの取り込みはほとんど認められなかったが、ブタの視細胞の外節とビーズを混ぜたり、RPE の食作用を血清で活性化させたりすることでビーズの取り込みが認められた。次に、野生型 RPE と *CHM* 変異型 RPE で貪食能の評価を行ったが、通常の培養条件では差が認められなかった。コロイデレミアの病態では酸化ストレスが亢進していることが示唆されているため、より病態

に近い条件で評価を行うことを考え、 $\text{NaIO}_3$  を培地に添加した後に貪食能の評価を行った。その結果、*CHM* 変異型 RPE では、貪食能の低下や細胞死の亢進が認められ、*CHM* の変異による表現型が見出された。さらに、エクソン 6 のスキッピングを誘導した RPE で評価を行ったところ、*CHM* の変異により低下した RPE の貪食能に一部回復が認められ、エクソンスキッピングの効果が示された。

(4) *CHM* のエクソン 6 のスキッピングが RPE の貪食能に与えた影響を明らかにするために、*CHM* の標的タンパク質である RAB タンパク質に着目した。*CHM* は RAB タンパク質のプレニル化を制御しており、RAB タンパク質はプレニル化によって細胞膜上に存在するようになるため、*CHM* は RAB タンパク質の局在に寄与していることが分かっている。野生型や *CHM* 変異型 RPE、エクソンスキッピングを誘導した RPE で RAB タンパク質全体のプレニル化レベルを評価したところ、*CHM* 変異型 RPE ではプレニル化レベルの低下が認められ、*CHM* の変異によってプレニル化反応が阻害されていることが示された。エクソンスキッピングを誘導した RPE では変異型 RPE と同程度のプレニル化レベルで、エクソンスキッピングの影響は認められなかった。各 RPE のライセートから細胞膜分画を超速心により取得し、RAB タンパク質のうち、RAB27 や RAB38 の局在を調べたところ、*CHM* の変異によって RAB27 や RAB38 の細胞膜における発現量の低下が認められた。エクソン 6 のスキッピングにより、*CHM* 変異型 RPE と比較して、RAB27 の発現量は変化が認められなかったが、RAB38 の発現量は一部回復していることが示唆され、エクソン 6 のスキッピングによって RAB38 の局在に影響を受けている可能性が示された。以上の *CHM* における研究成果は、査読付き論文として発表した (Iwagawa T et al., J Gene Med., 2023)。MYO7A に関しては、変異が RPE の貪食能などに与える影響を評価したが、明確な差が示されず、表現型を見出せなかったため、エクソンスキッピングの有効性の評価に至らなかった。今後、エクソン 3 以外に変異を持った細胞株を樹立し、RPE の機能への影響を確認したうえで、標的エクソンのスキッピングの評価が望まれる。

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 0件）

1. 著者名 Toshiro Iwagawa, Hiroki Masumoto, Hitoshi Tabuchi, Kenzaburo Tani, Bruce R Conklin, Sumiko Watanabe	4. 巻 25
2. 論文標題 Evaluation of CRISPR/Cas9 exon-skipping vector for choroideremia using human induced pluripotent stem cell-derived RPE	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Gene Med.	6. 最初と最後の頁 e3464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgm.3464	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------