

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21551

研究課題名(和文) 遺伝子治療を目指した新規ゲノム編集ツールの開発と、がん治療への応用

研究課題名(英文) Development of novel genome editing tool for gene therapy and its application to cancer therapy

研究代表者

大塚 正人(Ohtsuka, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90372945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単鎖抗体フラグメント(scFv)をCas9と融合した新規ツール(scFv-Cas9)を構築し、白血病の原因であるキメラ遺伝子を標的としたgRNAと共に用いることで、分子標的薬と抗体医薬の利点を併せ持った新規治療法開発を目指した。そのために、i) 培養細胞を用いたキメラ遺伝子特異的ゲノム編集系の確立、ii) scFv-Cas9ツールの構築とマウス個体レベルでの解析、を進めた。その結果、キメラ遺伝子を欠損させることで白血病細胞を除去できる可能性を示唆する結果を得た。しかしながら、scFv-Cas9タンパク質の精製が困難であったことから、その評価ができておらず、引き続き検討していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

in vivo遺伝子治療成功の鍵は、いかに正確且つ適切にゲノム編集ツールを患部の細胞へデリバリーできるかと、いかに副作用を回避できるかなどにある。今回開発を目指した系が期待通りに動くのであれば、標的細胞の特異性と標的DNAの特異性の2点で、キメラ遺伝子を有する白血病細胞のみに治療効果をもたらすことができ、正常細胞への副作用が回避できると考えられる。それが本システムの特徴であるが、scFv領域やgRNAは他の抗原やDNA領域を標的としたものに自在に変更可能であることから、幅広い分野の研究にも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop novel therapeutic tools that combine the advantages of molecularly targeted drugs and antibody drugs by applying genome-editing technology. Specifically, we attempted to construct a novel tool (scFv-Cas9) by fusing a single-chain antibody fragment (scFv) with Cas9 protein, and used it together with gRNA targeting leukemia-causing chimeric genes. Here, we tried to i) establish a chimeric gene-specific genome editing system using cultured cells, and ii) develop the scFv-Cas9 tool and analyze it in the mouse. The results suggest that deletion of the chimeric gene eliminate leukemic cells. However, the scFv-Cas9 tool itself has not yet been evaluated because of the difficulty in purifying the scFv-Cas9 fusion protein. We will further improve the purification method and investigate other fusion methods.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集 遺伝子治療 白血病

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄性白血病は、染色体間の転座に伴い恒常的に活性化したチロシンキナーゼである BCR-ABL1 キメラ遺伝子産物が生じたことにより発症する。その治療薬としては、チロシンキナーゼ阻害剤などの分子標的薬(Druker et al. N. Engl. J. Med. 2001)や、CAR-T 細胞による免疫細胞療法が効果を示すことが報告されている(David et al. N. Engl. J. Med. 2011)。実際に CAR-T 細胞療法は、2019 年に日本国内においても新規治療法として承認されがん免疫療法として期待されている。しかしながら、これら治療法において、薬剤抵抗性細胞の出現(再発)や正常細胞への影響(副作用)など、見逃せない課題も多く残されている(Baccarani et al. Leukemia 2019, Neelapu et al. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2018)。

これらの課題は、白血病の原因遺伝子変異そのものを排除(遺伝子治療)することで、抜本的に解決できるものと考えられる。それを可能とする手法の一つに CRISPR に代表されるゲノム編集技術があるが、それを遺伝子治療に応用する際の極めて重要な課題の一つが、ゲノム編集試薬を如何に効率よく標的細胞に送達(デリバリー)できるかである。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術を応用し、分子標的薬と抗体医薬の利点を併せ持った、革新的な新規治療薬を開発することで、上述の懸念事項の根本的な解決を目指す。具体的には、CAR-T 細胞で使用される単鎖抗体フラグメント(scFv: single-chain variable fragment [B 細胞表面抗原(CD19)を標的としたもの])を、Cas9 タンパク質と融合した新規ツール(scFv-Cas9)を構築する。それを、白血病の原因遺伝子(BCR-ABL1 や MYC-IGH)を標的とした gRNA と共に血中に注入する。CD19 陽性 B 細胞に scFv-Cas9 が結合すると、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、一部の scFv-Cas9 が遊離・核移行し BCR-ABL1 または MYC-IGH を破壊する、すなわち腫瘍特異的なゲノム編集が生じる可能性がある。これにより、抗体医薬の特性を利用したデリバリー系とゲノム編集技術を融合した、より特異性の高い革新的な治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

新しいコンセプトに基づく慢性骨髄性白血病の新規治療薬の開発を目指し、(1) 培養細胞を用いた融合遺伝子特異的なゲノム編集系の確立、および(2) scFv-Cas9 ツールの構築とマウス個体レベルでの解析、を進めた。方法の詳細については研究成果の中で記す。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた融合遺伝子特異的なゲノム編集系の確立

原因キメラ遺伝子特異的にゲノム編集を引き起こすことで、がん細胞特異的な排除が可能であるかを検証することとした。そのためにも、BCR-ABL1 キメラ遺伝子を有する K562 細胞および同様なメカニズムで血球がん細胞の起因に關与する IFH-c-myc キメラ遺伝子を有する Daudi 細胞の融合遺伝子を標的とした gRNA を設計した。これらの細胞からゲノム DNA を抽出し、

Daudi に関しては融合遺伝子の境界(junction)部分と IGH の E μ 領域、Myc 領域、K562 に関しては融合遺伝子の境界(junction)部分と BCR 側、ABL 側、それぞれの gRNA 設計候補領域の DNA 塩基配列を確認した。一部、既報のゲノム DNA 配列と異なっていたが、今回確認した DNA 配列をもとに gRNA の設計を行った。BCR-ABL1 に関しては、2020 年に同様のコンセプトの論文(Nat Commun. 2020 11:5060)が発表されたため、そこで使用された gRNA も用いることとした。in vitro で切断活性を確認後(図1)、sgRNA 発現ベクター(CFP 蛍光遺伝子発現カセット含む)として作製した。それらを Cas9 安定発現 K562/Daudi 細胞(本研究にて作成)に導入した。その結果、sgRNA 発現ベクター内に含まれている CFP 発現は確認できたものの、それらの細胞でゲノム編集による影響を確認することはできなかった。

細胞内での gRNA/Cas9 複合体の形成効率が低いことが原因である可能性等を考え、次に、細胞外で形成した複合体(RNP: 蛍光タンパク質融合 Cas9 と gRNA[gRNA-1 と gRNA-3 の組合せ、以降 BCR-ABL と表記])を Cas9 発現カセットを有していない野生型 K562 細胞株に導入することを試みた。蛍光タンパク質融合 Cas9 の導入条件を検討後、実際にキメラ遺伝子に作用する RNP およ

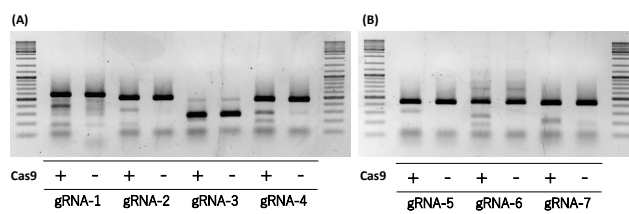


図1 : gRNAの切断活性の確認

K562細胞由来のBCR-ABL1キメラ遺伝子(A)、Daudi細胞由来のIGH-cMycキメラ遺伝子(B)を標的としたgRNAの切断活性を確認した。

びコントロールの RNP を導入した。FACS にて蛍光細胞のみを分離後、コロニー形成能および死細胞率の評価を行った結果、ゲノム編集を施した細胞では死細胞率が高く、且つコロニー形成能が低いことが分かった(図2A,B)。mRNA および DNA レベルでの解析では、large deletion を含めた様々なパターン of ゲノム編集が生じていることが分かった(図2C,D)。以上の結果から、キメラ遺伝子特異的なゲノム編集により、がん細胞を特異的に除去できる可能性が示唆された。

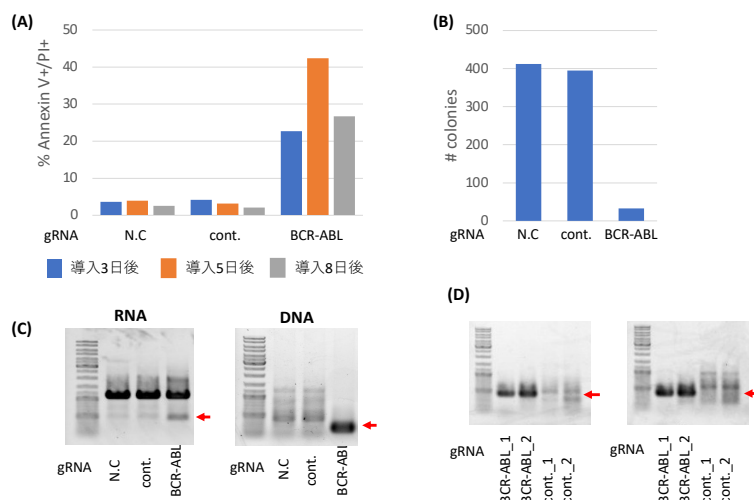


図2: キメラ遺伝子特異的なゲノム編集によるがん細胞除去の可能性
K562細胞由来のBCR-ABL1キメラ遺伝子を標的としてゲノム編集を行った結果、BCR-ABL1 gRNAを用いたものでは死細胞率が高く(A)、且つコロニー形成能が減少していた(B)。RNA/DNAレベルでは、キメラ遺伝子間において欠損(C)や逆位(D)が生じていた。

更に、scFv-Cas9 ツールが目的の細胞(例えば CD19 発現 B 細胞)に期待通りに送達され、ゲノム編集が生じたことを簡便に評価する系の開発を進めた。具体的には、読む枠をずらした状態の赤蛍光遺伝子発現カセットとそれを標的とした gRNA 発現カセットを有するプラスミドを構築し、それを K562 細胞に導入した。これは、Cas9 が存在する時(Cas9 が K562 細胞内に送達された時)にのみ赤蛍光を発現するシステムである。一過性発現実験によってこの蛍光発現評価システムが働くことを確認した後に(図3)、レポーターカセットを有する K562 細胞株を樹立した。現在、その細胞株を用いて評価系の確認を進めているところである。

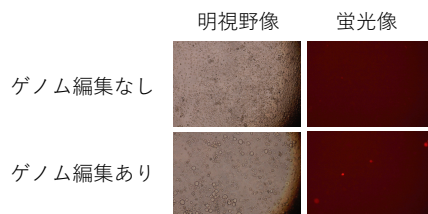


図3: 培養細胞を用いたゲノム編集評価システムの開発

(2) scFv-Cas9 ツールの構築とマウス個体レベルでの解析

CAR-T 細胞で実績のある既知の抗 CD19 scFv 領域(B 細胞を標的)について、Cas9 遺伝子と融合させた DNA プラスミドを構築した。今回は *in vivo* ゲノム編集評価系マウスを用いての概念実証実験に用いるためのツールとして、マウス CD19 に対する scFv 領域を用いた。Cas9 タンパク質の N 末端側に scFv を融合させたものを作製した。大腸菌でのタンパク質調製用のものと、動物細胞で発現させるための発現用のもの、さらに scFv と Cas9 間のリンカーを変えたもの、などを加えた複数種類の plasmid を作製した。タンパク質調製用のものに関しては、His タグを有する scFv-Cas9 を大腸菌内で発現させて精製を試みたが、可溶性画分ではなく不溶性画分の方に含まれてしまい、精製が難航した(図4)。尿素による変性後にリフォールディングさせたものに関しては、SUMO 部分が含まれていることが原因かもしれないが、Cas9 の活性を有していないようであった。

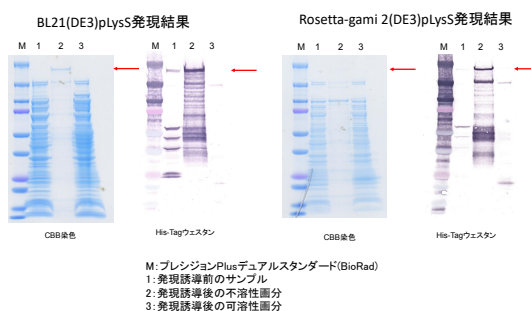


図4: scFv融合Cas9タンパク質(scFv-Cas9)の大腸菌での発現

その後、SUMO 部分を除去しリンカー領域を置換した新たな plasmid を複数作成し、大腸菌ではなく無細胞系での合成を行った。その結果、上記と同様に不溶性画分に多くのタンパク質が含まれていたものの、一部は可溶性画分にも含まれていた。しかしながら十分量合成することは困難であり、条件検討が必要であると考えられた(図5)。

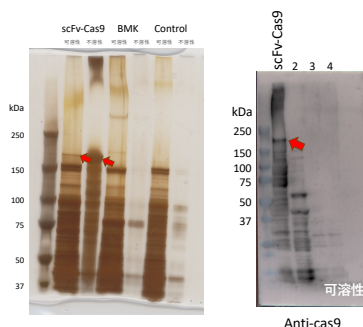


図5: scFv融合Cas9タンパク質(scFv-Cas9)のin vitro発現

動物細胞発現用の plasmid に関しては、ハイドロダイナミクス法にて独自のゲノム編集レポーターマウス(以下の補足参照)の肝臓に導入したところ、肝細胞内でゲノム編集を引き起こすことがわか

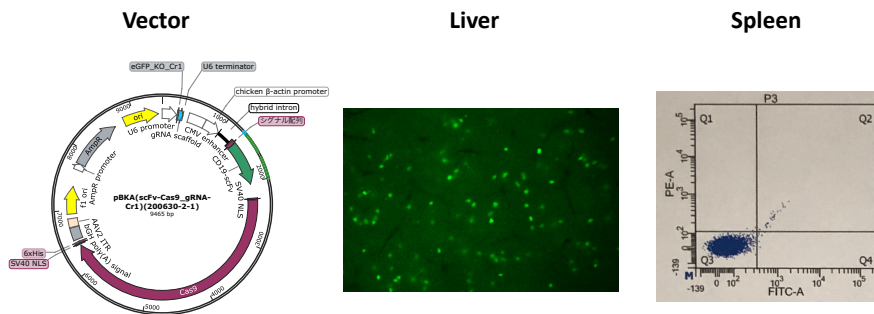


図6:ハイドロダイナミクス法によるscFv-Cas9発現ベクターの肝臓への導入と、肝臓と脾臓におけるeGFP発現処置3日後に、肝臓ではeGFP蛍光が観察されたが、脾臓細胞では観察されなかった。

り、scFv 融合 Cas9 は活性を有していることが明らかとなった(図6)。しかしながら、scFv-Cas9 が細胞外に分泌されて B 細胞まで移動し、そこでゲノム編集が生じているかに関して FACS で脾臓細胞を調べたところ、脾臓細胞ではゲノム編集が生じていなかった。

補足

scFv-Cas9 の *in vivo* 評価を行うために、ゲノム編集レポーターマウス(1塩基欠損して読み枠がずれた GFP 遺伝子を有しており、ゲノム編集によって読み枠が回復した細胞のみが緑蛍光を発する: Miura ら Mol Ther Nucleic Acids 2021)に関して今回新たな改良を行った。scFv-Cas9 をタンパク質と gRNA の複合体(RNP)として送達する実験では問題とならないが、scFv-Cas9 プラスミドを肝臓に送達した後に、肝細胞で scFv-Cas9 を発現・分泌させて B 細胞への送達を試みる場合には、gRNA が期待通りに scFv-Cas9 と複合体を作って分泌される必要がある。しかし、scFv-Cas9 と gRNA が複合体を形成して分泌されるかは定かではないため、gRNA を全身で発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、ゲノム編集レポーターマウスと交配して得たダブル Tg マウス(図7)を *in vivo* 評価に使用した。これにより、scFv-Cas9 が肝臓から血中に分泌された場合、それが gRNA と複合体を形成していなくても、標的細胞に送達された後に標的細胞内で発現する gRNA と複合体を形成してゲノム編集が生じることが期待される。なお、gRNA Tg マウスの作製には、我々が開発した *ι*-GONAD 法を使用し、380bp の gRNA 発現カセット(U6 promoter-gRNA カセットと相同領域を含む 500 塩基の ssDNA ドナーを導入)をノックインした。これまで *ι*-GONAD 法では 200 塩基以上の長さの配列のノックインは難しいとされていたが、今回、約 40%という極めて高効率でのノックインが可能であることが示された。

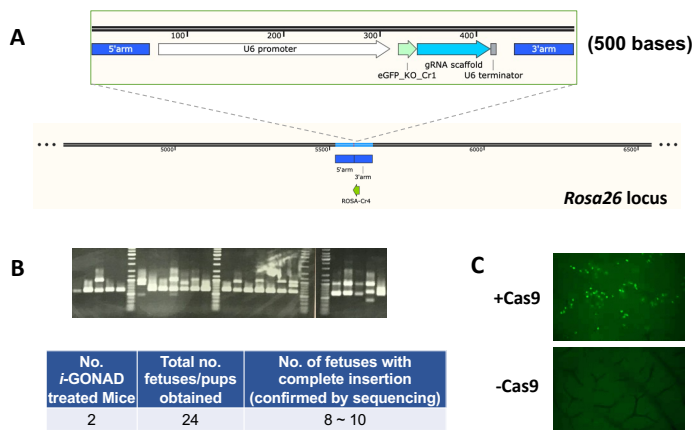


図7:ゲノム編集レポーターマウス用gRNA発現Tgマウスの作製 (A) ノックインコンストラクトの詳細。ι-GONAD法でMCH(ICR)マウスに導入。(B) ι-GONAD法でのノックイン効率。(C)ゲノム編集レポーターマウスとのダブルTgマウスの肝臓にCreタンパク質を送達した際のGFP蛍光発現。

<まとめおよび今後の課題>

融合遺伝子を標的としたゲノム編集は期待通りに働き、標的融合遺伝子を欠損させることができた。また、それにより白血病細胞を除去できる可能性を示唆する結果を得た。したがって、使用した gRNA を用いて転座遺伝子のチロシンキナーゼドメインを欠損させて根本的な要因を排除することで、正常細胞への副作用を回避しつつ白血病の治療ができるものと期待される。しかしながら、CD19 を発現する白血病細胞を標的として scFv-Cas9 を送達する部分に関して、目的の scFv-Cas9 の精製が困難であったことから scFv-Cas9 ツール自体の評価がまだできていない。scFv-Cas9 に親水性のアミノ酸を含んだペプチドを付加する、あるいは scFv 部分と Cas9 部分を別々に精製してから結合させる、Cas9 を含んだ VLP や LNP の膜上に scFv を発現させる、などの何らかの工夫が必要なものと考えられ、これらに関して今後検討していく予定である。VLP に関しては、特に最近開発された SEND システム(Segel ら Science 2021, Gurumurthy ら Nat Protoc 2022)への応用を考えている。VLP の膜上に scFv を発現させるコンセプトも最近報告されたこともあり(Hamilton ら bioRxiv 2023)、今後世界中の研究者によって開発が進んでいくシステムとなると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura Hiromi, Imafuku Jurai, Kurosaki Aki, Sato Masahiro, Ma Yongjie, Zhang Guisheng, Mizutani Akiko, Kamimura Kenya, Gurumurthy Channabasavaiah B., Liu Dexi, Ohtsuka Masato	4. 巻 24
2. 論文標題 Novel reporter mouse models useful for evaluating in vivo gene editing and for optimization of methods of delivering genome editing tools	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 325 ~ 336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2021.03.003	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 Gurumurthy Channabasavaiah B., Quadros Rolan M., Ohtsuka Masato	4. 巻 17
2. 論文標題 Prototype mouse models for researching SEND-based mRNA delivery and gene therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 2129 ~ 2138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-022-00721-7	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦浩美、今福樹来、黒崎亜希、水谷晃子、上村顕也、佐藤正宏、Dexi Liu、大塚正人
2. 発表標題 In vivoゲノム編集評価系レポーターマウスにおける有用性の検証とその特性について
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Ohtsuka
2. 発表標題 PITT、Easi-CRISPR、i-GONAD: genome engineering tools in mice
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦 浩美、今福 樹来、黒崎 亜希、大塚 正人
2. 発表標題 独自の in vivo ゲノム編集評価系レポーターマウスの汎用性の拡張を目指した研究
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第7回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚正人
2. 発表標題 独自の in vivo 受精卵・卵管ゲノム編集法と生殖系改善への応用の可能性
3. 学会等名 第7回HAC 鹿児島（招待講演）
4. 発表年 2023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	八幡 崇 (Yahata Takashi) (10398753)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

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
---------	---------