

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：82508

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21618

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9 TGAシステムによるアレルギー疾患の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapy for Allergic Diseases Using the CRISPR/Cas9 TGA System

研究代表者

遠藤 裕介 (Endo, Yusuke)

公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・室長

研究者番号：80612192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：特定の転写制御コンポーネント(MS2-p65-HSF1 or KRAB-DNMT3A/3L)と切断活性のないdCas9を組み合わせることでDNAを切らずに制御するエピゲノム編集(dCas9 活性：Epi-activator/抑制：Epi-suppressor)を高効率で誘導できることを示した。具体的には、IL-10、IL-27などのサイトカインについては、数十倍以上の誘導、およびDusp10などのシグナル因子については数倍の発現誘導が認められた。また、リンパ球についてはアデノ随伴ウイルス(AAV)セロタイプDJが、上皮細胞についてはセロタイプ6が優先的に感染できることを検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノム編集システムはDNAに傷を入れないため、従来のゲノム編集と比べて安全面での優位性がある。また、エピゲノム編集の強みは、抑制だけでなく特定因子を長期活性化させることができる点にある。疾患制御に関して、特定因子の活性化は一因子だけでも強力な作用を示すことが認められ、アレルギー治療に対する期待は大きい。また、既に臨床面で使用されているAAVや脂質ナノ粒子を用いるため比較的安価であり、経済的・社会的に及ぼす波及効果は大きい。さらに、ほとんど全ての既存治療法は対症療法に限定されているが、本研究でエピゲノム編集を長期間持続する技術が確立されれば根治につながる可能性が高く革新的な治療法となる。

研究成果の概要(英文)：Epigenome editing (dCas9 activity: Epi-activator/repression: Epi-suppressor) can be induced by combining a specific transcriptional regulatory component (MS2-p65-HSF1 or KRAB-DNMT3A/3L) with dCas9, which has no enzymatic activity. By using dCas9/sgRNA for IL10, IL27 or Dusp10, several dozen-fold induction was observed for cytokines such as IL-10 and IL-27, and several-fold induction of expression for signaling factors such as Dusp10, respectively. We also verified that adeno-associated virus (AAV) serotype DJ can preferentially infect lymphocytes and serotype 6 can preferentially infect epithelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：CRISPR/Cas9 エピゲノム編集 ぜんそく アトピー 病原性Th2細胞

1. 研究開始当初の背景

ぜんそくなどのアレルギー疾患は病変部への炎症細胞浸潤やサイトカイン増加という共通点があるが、実際の診療では臨床的にばらつきが多くそれぞれ多様な病像を示す。しかしながら、現状の治療については、ステロイド吸入薬などの画一的な手法が主に用いられており、患者ごとに異なる endotype の情報が治療に組み込まれていない。また、ステロイドを含む既存の免疫抑制剤などに加え、生物学的製剤として、抗 IL-4/IL-13 受容体抗体が治療として使用されているが、このような現状の治療は副作用リスクに加え、高額な抗体製剤の長期間の投与という医療経済そのものへの負担増を招くことが大きな問題である。こうした現状を踏まえ、治療パターンを患者にはめ込むのではなく、患者ごとの病態特性を正確に捉え、科学的知見から治療を行うプレシジョンメディシンが求められている。

2. 研究の目的

これまでの基礎研究データの蓄積によりアレルギー疾患を抑制する因子(サイトカイン、転写因子、および代謝物)について、疾患をコントロールするいくつかの有力な候補因子が挙げられている。しかしながら、生理的重要性や治療効果の証明については遺伝子改変マウスに強く依存しており、マウス作製含め検証自体に多くの時間を要することもあるため、臨床応用への距離は未だ非常に遠くなっている。本研究ではアデノ随伴ウイルスを用いた、*in vivo*で効率良く特定の遺伝子を発現誘導することのできる CRISPR/Cas9 TGA (Target Gene Activation) システムにより、喘息やアトピー性皮膚炎をはじめとしたアレルギー疾患の新規遺伝子治療法を開発し、基礎と臨床の距離を縮めること目標とする。具体的には、これまでのわれわれの免疫アレルギー研究で培ってきたエビデンスを基に、IL-10 や IL-27 などの抑制性液性サイトカインについては環境細胞を中心に誘導、また Eomes、Ezh2、および Dusp10 などの内因性制御因子についてはリンパ球に発現させ、アレルギーの場合、およびエフェクター細胞の両方をコントロール・沈静化を図る革新的なアレルギー疾患治療の開発を行う。

3. 研究の方法

A. 細胞株を用いた CRISPR/Cas9 TGA システムの構築

各種アレルギー疾患をコントロールする能力を持つサイトカイン (IL-10 および IL-27)、転写因子、酵素群 (Eomes, Dusp10, Ezh2) に対するガイド RNA (sgRNA) を作製し、細胞株レベルでこれらの遺伝子が誘導されるか検証した。遺伝子発現については定量的 PCR を用いて解析する。これまでの CRISPR 解析の経験により、一つの遺伝子あたり 10 種類の sgRNA を設計すれば 2-3 個の優れた誘導活性をもつものが得られるため、少なくとも各遺伝子 10 種類の sgRNA について検討を行った。

サイトカインについては肺および皮膚環境細胞である線維芽細胞株 (3T3-L1 および MLE15)、転写因子については T 細胞株である (EL4) を用いて検討を行う。また、Cas9 の切断副作用を欠損した dCas9 を用いた。

B. アデノ随伴ウイルスを用いたマウス個体レベルでの CRISPR/Cas9 TGA システム検討

研究項目 A で得られる優れた遺伝子誘導活性を示す sgRNA について、アデノ随伴ウイルス (AAV) に発現させ、濃縮、回収後、マウスへの感染を行った。発現誘導が認められたサンプルについては感染後どの期間まで持続的に発現し続けるか、臓器ごと (特に肺と皮膚については重点的) に時系列を追って確認作業を進めた。

C. CRISPR/Cas9 TGA システムによる喘息およびアトピー性皮膚炎の制御

研究項目 A, B の結果を基に、発現誘導が認められた sgRNA および AAV セロタイプを用いて喘息への影響について検討を行った。喘息については、OVA および IL-33 を複合使用することで、非常に強い抗原特異的な喘息症状を誘導することができる。アレルギーマウスモデルについては当研究施設において共に確立済みである。喘息病態の指標については、炎症細胞浸潤・病理像

解析・サイトカイン産生プロファイル・粘液産生および病態スコアを用いて評価を行った。

4. 研究成果

研究期間内に推進した成果の概要を以下に示す。

1) *In vitro* システムにおいて、特定の転写制御コンポーネント (MS2-p65-HSF1 or KRAB-DNMT3A/3L) と切断活性のない dCas9 を組み合わせることで DNA を切らずに制御するエピゲノム編集 (dCas9 活性: Epi-activator/抑制: Epi-suppressor) を高効率で誘導できることを示した (図1 上段)。具体的には、IL-10、IL-27 などのサイトカインについては、数十倍以上の誘導、および Dusp10 などのシグナル因子については数倍の発現誘導が認められた。また、リンパ球についてはアデノ随伴ウイルス (AAV) セロタイプ DJ が、上皮細胞についてはセロタイプ 6 が優先的に感染できることを確認した。

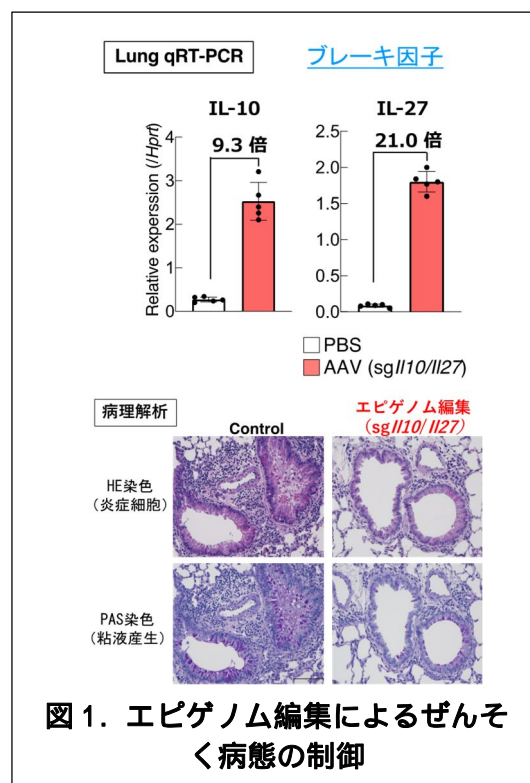
2) Cas9 Tg マウスに sgII-10 や sgII-27 を AAV を用いて肺特異的に誘導することで、ぜんそく病態の著しい改善が認められた (図1 下段)。In vivo においてもこれらの因子が 10-20 倍程度に増加することを確認しており、肺における炎症細胞の数も劇的に減少することが認められた。

3) 脂質ナノパーティクル (LNP) により CRISPR/Cas9 複合体を高効率で In vitro で細胞に発現させることができた。現在、in vivo で肺の細胞特異的に CRISPR/Cas9 複合体を誘導することができるか検討中である。

4) IL-10、IL-27、Dusp10 以外のターゲット因子についても効率的に発現をコントロール可能な候補 sgRNA の作成を行った。現在 10 種類の因子については数倍以上の発現できることを確認済みである。

5) エピゲノム編集サンプルを用いて、(エピ)ゲノムシーケンス解析を行った。細胞レベルでのエピゲノム編集については有意なオフターゲット作用については今のところ確認されていない。今後は in vivo サンプルを用いて安全性確認を進めていく予定である。

これらのシステムを臨床に応用するべく、Cas9 Tg マウスを使用せずに、LNP および AAV を組み合わせることで、高効率、かつ正確に標的因子を肺特異的に誘導するハイブリッド手法の開発を進めている。また、現在ではぜんそくに対する評価を進めているが、その他のアレルギー関連疾患についても、アトピー、肺線維症、COPD など含めエピゲノム編集の有用性について随時解析を進行中である。同時に、エピゲノム編集によってオフターゲットな作用が認められないか、全ゲノムレベルでシーケンス解析を行なっている。これら全ての項目を達成することで、各疾患についてはそれぞれ特異的な因子のエピゲノム編集パネルを創出し、最も安全で最適なエピゲノム編集治療をいち早く臨床の現場に提供するべく研究を推進している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura R., Nakajima D., Sato H., Endo Y., Ohara O., and Kawashima Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 A simple method for In-depth proteome analysis of mammalian cell culture conditioned media containing fetal bovine serum.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052565	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 Nakayama Y., Fujii K., Yuki R., Oishi Y., Suimye M., Morioka M., Isagawa T., Matsuda J., Oshima T., Matsubara T., Sugita J., Kudo F., Kaneda A., Endo Y., Nakayama T., Nagai R., Komuro I., Manabe I	4. 巻 25
2. 論文標題 A long noncoding RNA regulates inflammation resolution by macrophages through fatty acid oxidation activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 14365-14375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2005924117	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 遠藤裕介	4. 巻 2
2. 論文標題 脂質代謝による免疫システムのfine-tuning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 感染・炎症・免疫	6. 最初と最後の頁 74-77
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 遠藤裕介	4. 巻 5
2. 論文標題 T細胞の活性化と脂質代謝	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 449-455
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 遠藤裕介	4. 巻 1
2. 論文標題 「代謝で免疫を制御する」：脂肪酸代謝による記憶T細胞への運命決定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 54-60
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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 遠藤裕介
2. 発表標題 T細胞の機能分化を司る脂質イムノメタボリズム の分子作用点解明
3. 学会等名 第7回JFAS (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤裕介
2. 発表標題 免疫システムと病気～代謝からアレルギーの克服を目指す～
3. 学会等名 大人が楽しむ科学教室2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤裕介
2. 発表標題 T細胞の機能分化を司る脂質イムノメタボリズム の分子作用点
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------	---------