

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09673

研究課題名（和文）網膜色素変性症治療のための高効率なゲノム編集遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Development of highly efficient genome editing gene therapy for retinitis pigmentosa

研究代表者

藤田 幸輔 (Fujita, Kosuke)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80708115

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）：本研究の目的は、網膜疾患の原因となるゲノム上の変異を正常な配列に置き換えるためのゲノム編集効率を改善することで、より効果的な遺伝子治療を可能にする技術開発である。投与することによりゲノム編集効率を促進する薬剤を選定した。培養細胞モデルにおいて約7倍の編集成功率の増加を確認し、マウス網膜への顕著な毒性はなかった。さらに、ベクター構造の改変も行い、より効率的なゲノム編集ベクターを開発した。研究は効率的な遺伝子機能解析の大幅な効率化とともに、他の遺伝子治療への応用も期待できるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性は、本邦での中途失明原因の第2位の遺伝性神経変性疾患である。アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた遺伝子補充療法の有効性が示されているものの、同治療の適応範囲は狭く、日本人網膜変性患者の数%しか治療対象にならない。一方、ゲノム編集を用いた場合、対象遺伝子の種類に左右されないが、臨床応用のためには低い治療効果が課題としてある。本研究で得られた成果により、効率的なゲノム編集遺伝子治療ができるようになった場合、治療不可能であった遺伝子変異に対する治療が可能となる。これにより、従来では治療不可能であった遺伝子変異に対する遺伝子治療への道が拓かれた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to develop technology that will enable more effective gene therapy by improving the efficiency of genome editing to replace genomic mutations that cause retinal diseases with normal sequences. A drug that promotes genome editing efficiency when administered increased the editing success rate by about 7 times in a cultured cell model, and had no significant toxicity to the mouse retina. Furthermore, by modifying the vector structure, we developed a more efficient genome editing vector. The research is expected to greatly improve the efficiency of efficient gene function analysis, as well as to be applied to other gene therapies.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 遺伝子治療 ゲノム編集 アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症を含む網膜疾患の遺伝子治療にあたって、網膜細胞に低毒性に効率よく治療用遺伝子を導入するにはアデノ随伴ウイルス(AAV)が最適なベクターである。また、臨床治療のためには1つのAAVに治療用遺伝子を搭載する必要がある。AAVはパルボウイルス科の1本鎖DNAウイルスであり、野生型で4.7kbpのゲノムサイズである。これを遺伝子補充療法に用いる場合、対象遺伝子のcDNAに加え、発現に必要なプロモーターとpolyAが必要である。例えば、一般的なCMVプロモーターで500bp、polyAが200~300bp

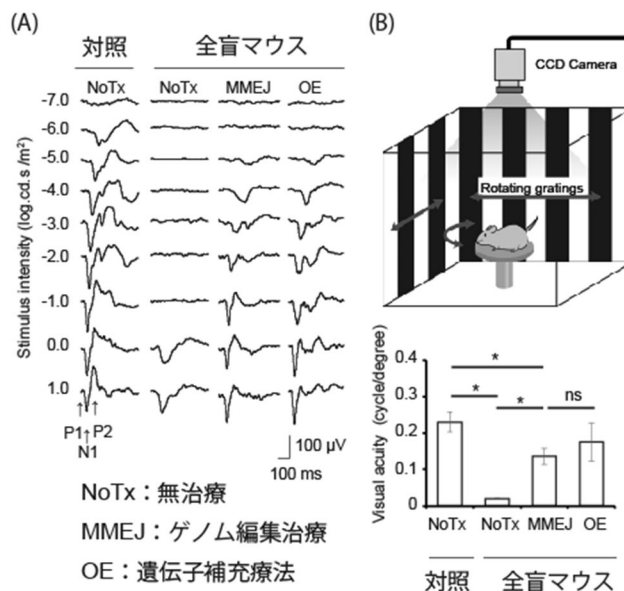


図1 ゲノム編集遺伝子治療後の (A) 脳波の光感度と (B) 視力

程度と計算すると、4kbp以下の小さい遺伝子しか治療できない。一方、ゲノム編集を用いた場合、対象遺伝子の大きさに左右されないが、単一のAAVへの搭載に問題があった。

最近、研究代表者らは、ゲノム編集に必要な因子を小型化し、さらに正常配列を挿入するゲノム修復機構にマイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)を利用することで、構成要素を1つのAAVに搭載したシングルAAV遺伝子編集ベクターを開発した。開発したゲノム編集遺伝子治療用AAVベクターを成体の全盲網膜変性のマウスに投与したところ、ゲノム配列上の病因変異の約10%の正常化で、光感度が10,000倍改善し、視力の回復が実証され、従来の遺伝子補充療法と同等の治療効果を示した(図1)(Nishiguchi*, Fujita* et al., *Nat commu* 2020;11 482 - 482. *equal contribution)。これにより、遺伝子のサイズに限定されない遺伝子治療への道が拓かれた。本研究では、この方法を基にゲノム編集効率を改善させる薬剤の投与やベクター配列の改変を行い、全盲網膜変性マウスを用いて検証することで、ゲノムの修復率を大幅に改善する、治療効果の高い新たなゲノム編集遺伝子治療法の開発を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、網膜疾患の原因となるゲノム上の変異を正常な配列に置き換えるためのゲノム編集効率を改善することで、より効果的な遺伝子治療を可能にする技術開発である。具体的には、投与することでゲノム編集効率を促進する薬剤の開発と編集効率を向上させるためのベクターの開発を行う。これにより、網膜変性マウスモデルのゲノム編集遺伝子治療において、ゲノム修復効率の向上とそれに伴う視力回復の大幅な改善を目指す。

3. 研究の方法

研究代表者らが作製に成功したall-in-oneゲノム編集遺伝子治療アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、全盲網膜変性マウスを対象とした遺伝子治療を行い、ゲノムの修復と視力の回復の程度について検証し、より効果的な治療法の開発を行った。具体的には、(1)投与することでゲノム編集効率を促進する薬剤の開発、(2)編集効率を向上させるためにドナー配列を最適

化したベクターの開発、(3)網膜変性マウスモデルを用いた治療効果の評価の3つのステップで実験をすすめた。

(1) 投与することでゲノム編集効率を促進する薬剤の開発

標的候補として、Cas9によるゲノムDNAの二本鎖DNA切断後の修復機構の経路にかかわる分子を文献検索により選定した。培養細胞に候補分子の阻害剤を投与し、T7E1アッセイとゲノム解析を行いゲノム編集効率を評価した。

(2) 編集効率を向上させるためにドナー配列を最適化したベクターの開発

ドナー配列を最適するために、MMEJに必要なマイクロホモロジーアーム(MHA)配列の構造について検討を行った。各種のMHAを搭載したゲノム編集ベクターを作製し、培養細胞に導入した。ゲノム編集の評価は次世代シーケンスにより行った。

(3) 網膜変性マウスモデルを用いた治療効果の評価

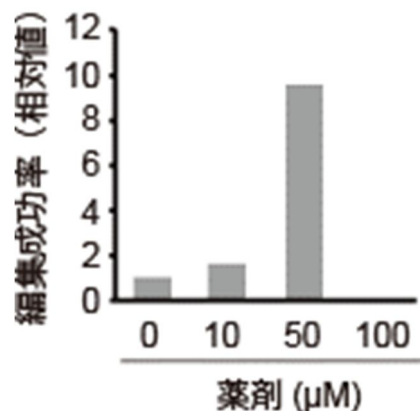
投与することでゲノム編集効率を促進する薬剤については、マウスを用いた安全性評価と有効性の評価を行った。正常マウスに候補薬剤を投与し、網膜電図(ERG)と網膜組織の評価を行い評価した。有効性の評価は、網膜変性マウスモデルに治療ベクターと共に投与し、網膜機能を測定し、評価した。ドナー配列を最適化したベクターについては、最適化した配列を組み込んだAAVベクターを作製した。作製したAAVベクターを生後6週から12週のマウスの網膜下あるいは硝子体内に注射することにより遺伝子導入した。ゲノム編集効果の評価する方法として、網膜ゲノム解析、ウェスタンブロット、RT-PCR、免疫組織学的解析に加えて、網膜機能の測定などを行って評価した。

4. 研究成果

ゲノム編集 AAV ベクターを用いて、網膜色素変性の病因となる遺伝子変異をより効率的に修復できる遺伝子治療ツールの開発を行った。

(1) 投与することでゲノム編集効率を促進する薬剤の開発

MMEJ 経路によるゲノム編集を促進するために、競合する修復経路である NHEJ 経路分子に着目した。その既知の阻害剤の中から候補物質を選定し、培養細胞を用いて評価したところ、阻害剤の投与により編集成功率が7倍に増加した(図2)。



(2) 編集効率を向上させるためにドナー配列を最適化したベクターの開発

最初に、MMEJに必要なMHAの長さについて培養細胞を用いて検討し、ゲノム解析とmRNA解析により、最適な長さのMHAについて評価した。その結果、長さを変えることによりドナー配列の挿入頻度の増加を確認し、最適な長さを決定するこ

図2 阻害剤投与とゲノム編集効果。編集成功率の増加が認められた。

とができた。また、ドナー配列の末端を工夫することによりこれまでよりも遺伝子挿入効率の高い新たなゲノム編集法の開発と、さらに別の新しいゲノム編集法の開発にも成功した。

(3) 網膜変性マウスモデルを用いた治療効果の評価

投与することでゲノム編集効率を促進する候補薬剤について、マウスを用いた評価をおこなった。薬剤を正常マウスに投与し、ERG測定により視機能を評価したが、非投与群と比べ差は見られなかった(図3A)。また、網膜組織についても視細胞数に変化は無く、顕著な毒性は見られなかった(図3B)。さらに、ゲノム編集遺伝子治療用AAVベクターと共に成体の全盲網膜変性のマウスに投与したところ、非投与群に対し、治療の改善傾向が見られた(図3C)。実際の治療時に薬剤を投与することは実現性が高く、投与により編集効率の改善ができれば非常に有用となる可能性が高い。

新たに開発したゲノム編集遺伝子治療

AAVベクターを網膜変性のマウスに投与し、治療効果について検討した。編集の判定のためにゲノム解析、RNA解析、タンパク質解析を行い、電気生理(ERG、fVEP、pVEP)行動学(視運動反射、恐怖条件付け実験)により視力と治療効果を判定した。その結果、光感度が10,000倍改善し、視力の回復が実証され、網膜変性に対する治療効果が示された(データ非提示)。

ゲノム編集はゲノム局所を治療対象とするため、病因遺伝子の大きさに関わらず、ほぼすべての変異を治療できる。本研究の発展により、効率的なゲノム修復ができるようになった場合、治療不可能であった遺伝子変異に対する治療が可能となる。さらに、開発した遺伝子治療法は、網膜色素変性症だけではなく、他の遺伝性網膜疾患にも応用可能である。

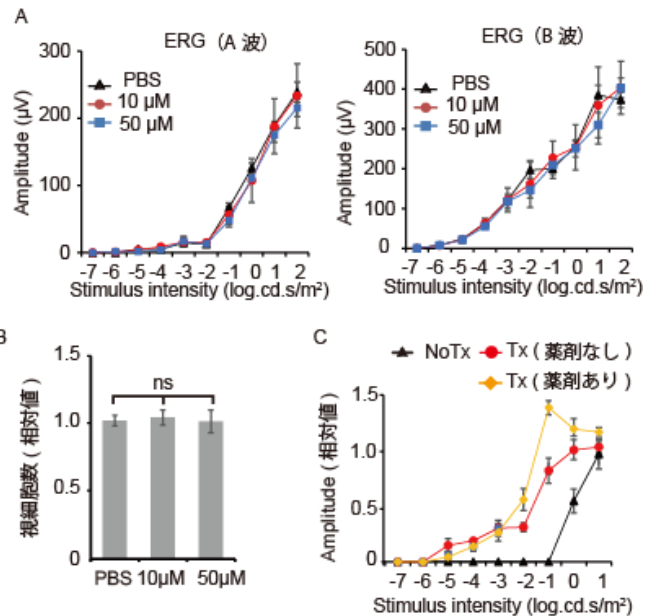


図3 候補薬剤のマウス試験。
安全性 (A:ERG、B:網膜組織評価) と
治療効果 (C:fVEP) について評価。

<引用文献>

Nishiguchi KM, Fujita K *et al.* Single AAV-mediated mutation replacement genome editing in limited number of photoreceptors restores vision in mice. *Nat Commun.* 2020;11(1):482.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 藤田幸輔、山田和久、平澤輝一、西口康二
2. 発表標題 網膜色素変性に対する変異アレレル特異的リフレームゲノム編集遺伝子治療の開
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 単一のAAVベクターによるゲノム編集を用いた遺伝子治療	発明者 西口康二、藤田幸輔	権利者 東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/046944	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	西口 康二 (Nishiguchi Koji) (30447825)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (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
---------	---------