

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590405

研究課題名(和文)人工制限酵素とウイルスベクターとを利用した高効率遺伝子修復治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a highly efficient gene targeting strategy using adenovirus-mediated delivery of donor DNA and artificial nucleases

研究代表者

三谷 幸之介(Mitani, Kohnosuke)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10270901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アデノウイルスベクターを用いた鑄型DNAの導入ならびに人工制限酵素による標的染色体遺伝子のDNA二本鎖切断との組み合わせによって、ヒトiPS細胞におけるゲノム編集(遺伝子ターゲッティング)効率の改善を試みた。2つの遺伝子座において、アデノウイルスベクターと人工制限酵素の組み合わせは、どちらか一つだけに比べると約2倍の促進効果が観察された。また、人工制限酵素CRISPRを鑄型DNAと同一のアデノウイルスベクター(all-in-oneベクター)から発現することによって、さらに約2倍の効率上昇が得られた。all-in-oneベクターにより様々な細胞での高効率なゲノム編集が可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Several strategies are known to enhance gene targeting in mammalian cells. Expression of sequence-specific nucleases, such as TALENs and CRISPRs, introduces DNA double-strand breaks at the target chromosomal sites, thus stimulating homology-mediated DNA repair. As an alternative strategy, delivery of donor DNA by a helper-dependent adenoviral vectors (HDAdV), also reportedly enhances gene targeting efficiencies. In this study, we combined TALEN/CRISPR expression and HDAdV-mediated delivery of donor DNA for gene targeting at the HPRT and the IL2RG loci in human induced pluripotent stem cells. At both loci, the combination of the nucleases and donor HDAdV enhanced the targeting efficiencies by ~2 folds. Delivery of both the nuclease and the donor DNA by a single HDAdV further enhanced the targeting by additional ~2 folds. These results suggest that adenovirus-mediated gene targeting technologies can be further improved in a variety of cells.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：遺伝子ターゲッティング iPS細胞 遺伝子治療 TALEN アデノウイルスベクター 遺伝子修復 CRISPR
R ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝病の遺伝子治療は、21世紀になり X 連鎖重症複合免疫不全症 (SCID-X1) や ADA 欠損症などの疾患に対して、次々と成功例が報告されてきた。しかしながら、最も顕著な成功例である SCID-X1 の治療において、一部の患者で、用いたレトロウイルスベクターの染色体挿入・がん遺伝子活性化による白血病の発症が報告され、大きな問題となった。それを解決する手段の一つとして、病因遺伝子上の変異を相同組換え (homologous recombination) を利用して正確に修復するいわゆる「遺伝子修復治療」技術の確立が強く望まれている。この戦略は、患者細胞より iPS 細胞を誘導する技術の開発により、現実に近い。しかし技術的問題として、ヒト iPS 細胞における相同組換え頻度は非常に低く、マウス ES 細胞で確立された技術をそのまま応用しても染色体組換えにおける割合が 1%に満たない場合がほとんどである。遺伝子修復細胞のスクリーニングにかかる余分な細胞培養過程を考えると、実現化に向けてさらに効率を上げる必要がある。

(2) 動物細胞において、染色体上に自然に生じた変異を修復するための相同組換えのメカニズムについてはある程度解明されている。しかし、相同組換えを利用して外来 DNA を染色体上の標的領域に組み込むいわゆる遺伝子ターゲティング (gene targeting) のメカニズムに関しては、何も明らかとなっていないに等しい。現在考えられている遺伝子ターゲティングのモデルの一つは、通常の染色体 DNA 修復と同様に染色体上の DNA 二本鎖切断 (double strand break) が入った部位が DNA 損傷として宿主の遺伝子修復タンパク質によって認識され、外来 DNA 上の相同配列を利用して組換えを行うというものである (図 1 左)。このモデルだと、遺伝子ターゲティングが起こるためには標的領域に自然に二本鎖切断が入る必要があるが、その頻度の低さから遺伝子ターゲティングの効率は説明できない。従って、もう一つのモデルとして、遺伝子ターゲティングの場合には導入された外来 DNA の末端が DNA 損傷

として認識され、染色体上の相同配列を探して組換えを行う経路 (図 1 右) も考えられている。

(3) 最近、ヒト iPS 細胞においても染色体組み込みの 10%以上の効率で遺伝子ターゲティングが得られる比較的効率の良い方法が、いくつか発表された。その一つは、私達自身が報告したヘルパー依存型アデノウイルスベクター (helper-dependent adenoviral vector, HDAdV) を用いて遺伝子ターゲティング用鋳型 DNA を導入する方法である。これまでに、ハウスキープ並びに組織特異的な 10 を超える遺伝子座において、染色体組み込み (薬剤耐性細胞クローン) の平均 20%で遺伝子ターゲティングが得られた。もう一つは、ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9 などの人工制限酵素を用いて標的 DNA 部位に人工的に二本鎖切断を導入して、DNA 修復活性を刺激する方法である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞においてこれらの効率の高い遺伝子ターゲティング法を組み合わせることによって、常に 80%以上の効率で遺伝子ターゲティングを得る方法を確立することである。私達の HDAdV 法で細胞に DNA を導入することで平均 20%の効率で遺伝子ターゲティングが可能である。その一方、TALEN や CRISPR などの人工制限酵素を用いて染色体に二本鎖切断を挿入すると、遺伝子ターゲティングの効率が約 200-1400 倍上昇すると報告されている。従って、HDAdV と人工制限酵素とが違うメカニズムで遺伝子ターゲティングを上昇させているのであれば、HDAdV + 人工制限酵素の組み合わせで相乗効果により、常に 100%とは行かないまでも 80-90%に近い効率が期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) 遺伝子座を標的とする、HDAdV の感染と人工制限酵素 TALEN による *HPRT* 遺伝子座の切断との組み合わせ。

HPRT 遺伝子座を標的とする HDAdV の構築と産生: *HPRT* 遺伝子座のエクソン 6 を PGK-neo カセットで置き換える形の遺伝子ターゲティング用 HDAdV をデザインした。5' と 3' の相同領域の長さはそれぞれ 14.5 kb と 9.3 kb である。このベクターを、ヘルパーアデノウイルス AdNG163R-2 (ペイラー医科大学の Ng 博士より分与) と 116 (293Cre) 細胞を共感染することで、調整した。*HPRT* 遺伝子座のエクソン 6 を標的とする TALEN (TALEN-*HPRT*) は、連携研究者の Cathomen 博士が構築したものの分与を受けた。ベクターの構造と、TALEN による DNA 二本鎖切断の部位について、図 2 に示す。

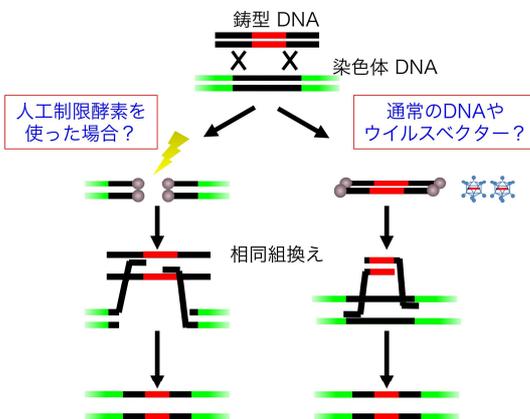


図 1 遺伝子ターゲティングの機構

ヒト iPS 細胞を用いた遺伝子ターゲティング実験: ヒト男性由来 iPS 細胞 TIG3/KOSM (国立研究開発法人 産業技術総合研究所の中西真人博士より分与) を用いて a) *HPRT* 標的 TALEN のみ、b) *HPRT* 標的 HDAdV のみ、c) TALEN + HDAdV の組み合わせ、による遺伝子ターゲティングの頻度を検討した。ベクターは細胞 1 個あたり 1000-3000 粒子の濃度で感染し、TALEN は FuGene HD により導入した。DNA 導入後にベクターが染色体に組み込まれた細胞はネオマイシンで選択した。X 染色体上の *HPRT* 遺伝子座は男性由来細胞には 1 つしかなく、それが欠損すると細胞は 6-thioguanine (6TG) 耐性になるので、遺伝子ターゲティングの起こった細胞数は、ネオマイシン耐性/6TG 耐性の二重耐性コロニー数で簡単に計測可能である。この方法を用いて、ベクターの染色体への組込あたり標的 *HPRT* 遺伝子座にベクターが正確に組み込まれた遺伝子ターゲティングの頻度を計測した。

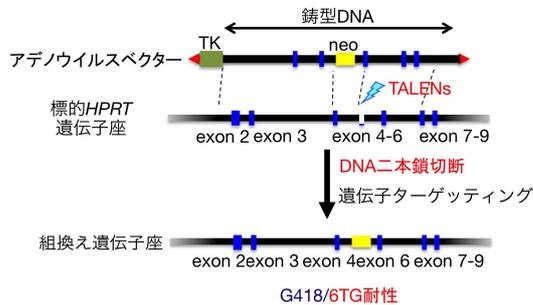


図2 *HPRT* 遺伝子座のターゲティングストラテジー

(2) 人工制限酵素 CRISPR と鋳型 DNA の両方を一つのベクターに搭載した all-in-one HDAdV を用いたヒト interleukin -2 receptor gamma chain (*IL2RG*) 遺伝子座の遺伝子ターゲティングの試み。

IL2RG 遺伝子座を標的とする HDAdV の構築と産生: *IL2RG* 遺伝子座のイントロン 4 を PGK-neo カセットで置き換える形の遺伝子ターゲティング用 HDAdV をデザインした。5' と 3' の相同領域の長さはそれぞれ 8.8 kb と 11.5 kb である。また、*IL2RG* 遺伝子座のイントロン 4 を標的とする CRISPR をデザインした。さらに、鋳型 DNA と CRISPR-*IL2RG* との両方をコードした *IL2RG* 修復用 all-in-one HDAdV ベクターを構築した。このベクターを、ヘルパーアデノウイルス AdNG163R-2 と 116 細胞を共感染することで、調整した。大量産生後の HDAd-hIL2RG-neo ベクターの感染力価は、 $2.0 \times 10^{11}/\text{ml}$ であった。これら HDAdV の構造と、CRISPR による DNA 二本鎖切断の部位について、図 3 に示す。

ヒト iPS 細胞を用いた遺伝子ターゲティング実験: ヒト男性由来 iPS 細胞 TIG3/KOSM

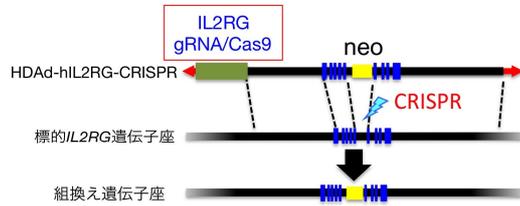


図3 *IL2RG* 遺伝子座のターゲティングストラテジー

を用いて a) *IL2RG* 標的 CRISPR のみ (FuGene HD によるトランスフェクションで細胞へ導入) b) *IL2RG* 標的 HDAdV のみ、c) CRISPR (トランスフェクションで細胞へ導入) + HDAdV の組み合わせ、d) all-in-one HDAdV の感染、による遺伝子ターゲティングの頻度を比較検討した。鋳型 DNA が染色体に組み込まれた細胞はネオマイシンで選択した。さらに、染色体上のランダムな部位に HDAdV が組み込まれた iPS 細胞クローンは、FIAU による HSV チミジンキナーゼ遺伝子の negative 選択により除去した。G418/FIAU の二重耐性 iPS 細胞クローンを個別に拾い、DNA を抽出し、PCR 法によって正確に遺伝子ターゲティングが行われているクローンを同定した。

4. 研究成果

(1) *HPRT* 遺伝子座を標的とする、HDAdV の感染と、人工制限酵素 TALEN による *HPRT* 遺伝子座の切断との組み合わせ。

ヒト男性由来 iPS 細胞を用いて *HPRT* 標的 TALEN のみ、*HPRT* 標的 HDAdV のみ、TALEN + HDAdV の組み合わせ、によるターゲティングの頻度を検討した。独立した実験を 2 回行い、いずれにおいてもターゲティング効率は (HDAdV + TALEN) > (HDAdV のみ) > (TALEN のみ) であった。HDAdV + TALEN は HDAdV のみより、感染条件が細胞当たり 1000 ベクターゲノムの時に 14% から 25% へ、3000 ベクターゲノムの時に 7% から 13% と約 2 倍上昇した (図 4)。即ち、人工制限酵素を用いて標的染色体に切断を導入する事による遺伝子ターゲティング効率の促進法と、遺伝子ターゲティング用鋳型 DNA を HDAdV で導入する促進法とではそのメカニズムが異なるために、組み合わせた場合にはさらに効率が上がるという、本研究の仮説を部分的に支持する結果が得られた。ただし、約 2 倍という上

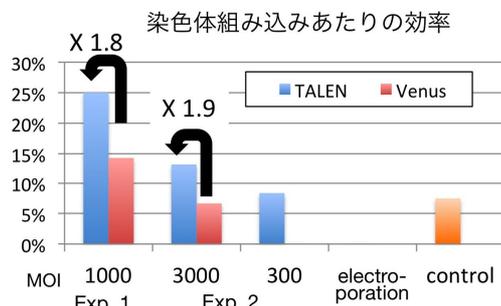


図4 *HPRT* 遺伝子座のターゲティングの結果

昇率は予想されたほどは高くなく、それがベクターのデザインによるものかそれとも他に原因があるのか、検討する必要がある。

(2) 人工制限酵素 CRISPR と鋳型 DNA の両方を一つのベクターに搭載した all-in-one HDAdV を用いた、ヒト *IL2RG* 遺伝子座の遺伝子ターゲティングの試み。

ヘルパー依存型アデノウイルスベクター-HDAd-hIL2RG-neo を感染させた際の、細胞あたりの遺伝子ターゲティング頻度は、 2.4×10^{-5} (遺伝子導入細胞 42,000 個当り 1 個) であった。一方、*IL2RG* を標的とした CRISPR 発現プラスミド (pCRISPR-*IL2RG*) と 5' と 3' の相同領域をそれぞれ 1 kb ずつコードした鋳型プラスミド DNA をトランスフェクションした際に得られる遺伝子ターゲティング頻度は、 1.4×10^{-4} (遺伝子導入細胞 7,100 個当り 1 個) であった。(図 5)

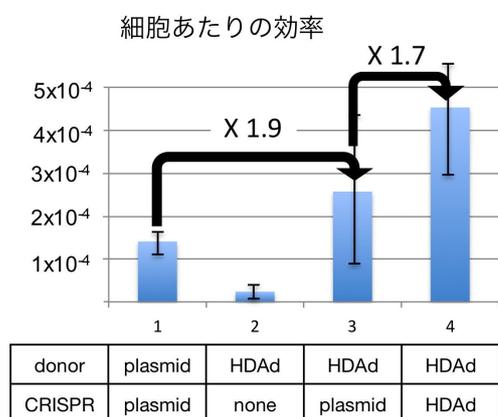


図5 *IL2RG* 遺伝子座のターゲティングの結果

HDAd-hIL2RG-neo による鋳型 DNA の導入と pCRISPR-*IL2RG* による標的 DNA 切断の組み合わせによる遺伝子ターゲティング頻度は、 2.6×10^{-4} (遺伝子導入細胞 3,600 個当り 1 個) と、1) の CRISPR のみの場合の頻度に比べて 1.9 倍上昇した。all-in-one ベクター-HDAd-hIL2RG-CRISPR の感染による鋳型 DNA の導入と標的 DNA 切断による遺伝子ターゲティング頻度は、それよりもさらに 1.7 倍上昇し、 4.5×10^{-4} (遺伝子導入細胞 2,200 個当り 1 個) という高頻度であった。(図 5)

(3) 以上の結果から、HDAdV による鋳型 DNA と CRISPR の発現(プラスミドもしくは HDAdV の形で)が、効率の高い遺伝子修復法の確立に向けて非常に有効であることが明らかとなった。

(4) 同じ *IL2RG* 遺伝子座を標的とした場合の遺伝子ターゲティング効率を比較しても、CRISPR による二本鎖切断の効率は TALEN と比べておそらく 10 倍以上高いために、HDAdV と組み合わせた場合の結果の評価が難

しい。単独で比較した場合の効率は CRISPR > HDAdV > TALEN となった。この 3 法の比較はこれまでに報告されておらず、興味深い知見である。

(5) ヒト iPS 細胞へは通常のトランスフェクション法を用いても効率よく DNA 導入が可能であるが、all-in-one ベクターに鋳型 DNA と CRISPR を搭載したことにより、DNA 導入が困難な様々な細胞・組織における高効率な *in vitro* ならびに *in vivo* の遺伝子修復が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Mitani K, Gene targeting in human-induced pluripotent stem cells with adenoviral vectors, *Methods Mol Biol*, 査読有, 1114, 2014, 163-167
DOI: 10.1007/978-1-62703-761-7_10

[学会発表](計 6 件)

Mitani K, Aizawa E, CMussolino C, Ohtaka M, Nishimura K, Cathomen T, Nakanishi M, One step human iPS cell induction and enhanced gene targeting using viral vectors and TALE nucleases, *American Society of Gene & Cell Therapy*, 平成 24 年 5 月, Philadelphia, USA

Mitani K, Mussolino C, Cathomen T, Gene targeting in human iPS cells with helper-dependent adenoviral vector and TALE nucleases, *日本遺伝子治療学会*, 平成 24 年 6 月, ホテル熊本テルサ(熊本県熊本市)

Mitani K, Aizawa E, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, One step human iPS cell induction and gene targeting using viral vectors, *日本遺伝子治療学会*, 平成 24 年 6 月, ホテル熊本テルサ(熊本県熊本市)

Mitani K, Aizawa E, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Consecutive human iPS cell induction and gene targeting using viral vectors, *CiRA International Symposium 2013*, 平成 25 年 3 月, 京都大学(京都府京都市)

三谷幸之介, 栗原佳絵, 岩長ゆずる, ウイルスベクターと人工制限酵素とを組み合わせたヒト多能性幹細胞における高効率遺伝子ターゲティング法の開発, 第 36 回 *日本分子生物学会年会*, 平成 25 年 12 月, 神戸ポートアイランド(兵庫県神

戸市)

三谷幸之介、太田尚志、二橋望、大高真奈美、中西真人、ウイルスベクターを駆使したヒト iPS 細胞誘導と遺伝子修復の時間的効率化、第 14 回 日本再生医療学会総会、平成 27 年 3 月、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 幸之介 (MITANI, Kohnosuke)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10270901

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

石井 直人 (ISHII, Naoto)

東北大学・医学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60291267