

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860811

研究課題名(和文) アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターを用いた BTK遺伝子修復研究

研究課題名(英文) BTK gene repair by homologous recombination using a helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid vector

研究代表者

山元 裕之 (YAMAMOTO, Hiroyuki)

九州大学・環境発達医学研究センター・学術研究員

研究者番号：00710170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBTK遺伝子のexon2-19、およびGFP、ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載したアデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターを作製した。このベクターとCRISPR-Cas9を用いると、感染させた臍帯血由来CD34陽性細胞から24個のピューロマイシン耐性赤芽球コロニーを得て、そのうち10個のコロニーでBTK遺伝子座における相同組み換えを認めた。その頻度は感染させた細胞あたり $1.8 \times 10^{-5}$ であった。本ベクターとCRISPR-Cas9システムにより、造血幹細胞における相同組み換えによるBTK遺伝子の変異修復を行える可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We constructed a new helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid vector (HD-Ad.AAV hybrid vector) that is composed of the genomic sequence containing BTK exons 2-19, and GFP/puromycin resistant gene. Using this HD-Ad.AAV hybrid vector and CRISPR-Cas9, we found that the targeting in the BTK gene occurred in 10 among 24 hygromycin-resistant BFU-E colonies differentiated from the cord blood CD34+ cells. The estimated targeting efficiency was  $1.8 \times 10^{-5}$  per cell. Our study shows the possibility to perform gene repair of BTK gene by homologous recombination in hematopoietic stem cells using this HD-Ad.AAV hybrid vector and CRISPR-Cas9 system.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子変異修復

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界中で臨床研究が行われているが、成功例はごくわずかで原発性免疫不全症(X連鎖重症複合免疫不全症: X-SCID、ADA欠損症など)に対する遺伝子治療はその代表である。しかし、レトロウイルスベクターを用いたX-SCIDの遺伝子治療では、5例のリンパ性白血病が発症したことから、その安全性が大きな問題となった。このように現在の“遺伝子治療”は、正規の遺伝子の場所に関係なく付加的に遺伝子を導入する方法であり、変異遺伝子そのものの修復は未だ行われていない。

(2) Bruton型無ガンマグロブリン血症(XLA)は、X染色体長腕に位置するBruton's tyrosine kinase (BTK)遺伝子変異によって生じるB細胞の分化障害が原因である。グロブリンの定期的補充にも関わらず感染症を繰り返し、呼吸不全やエンテロウイルス脳炎、敗血症、消化器癌などにより死亡する場合がある。Btk変異を有する骨髄細胞を致死放射線照射マウスに移植する際、正常骨髄細胞を0.5%混入させるだけで60%のマウスが免疫グロブリン産生能を回復することから、遺伝子修復された細胞がわずかであっても、B細胞の増殖優位性により治癒する可能性がある。

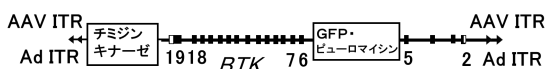
(3) ウイルスベクターの中でアデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターは、高い遺伝子導入効率、大きな遺伝子の挿入が可能、高力価のベクターの調整が比較的容易、といったアデノウイルスベクターの長所と、最も効率良く標的遺伝子に組み込みをおこすというアデノ随伴ウイルスベクターの長所を兼ね備えている。

2. 研究の目的

我々は、過去の研究で、*in vitro*において、正常ヒト臍帯血由来造血幹細胞でのBTK遺伝子ターゲティングに成功した。しかし、その頻度は十分ではなかったため、本研究では、さらなる頻度の向上を目指し、改良型のウイルスベクターの作製を行うことや人工ヌクレアーゼとの併用による、遺伝子ターゲティングの頻度を調べることを目的とする。

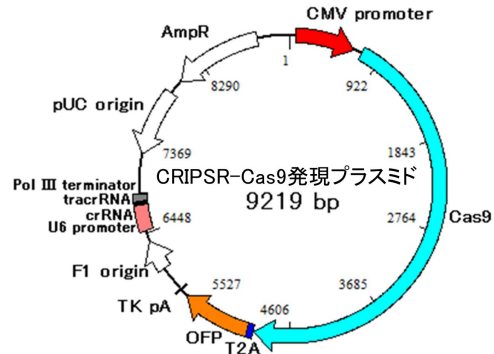
3. 研究の方法

(1) ターゲティング効率の向上を目的として、図1に示す、改良型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターを作製した。



(図1) 改良型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターの構造

(2) BTK遺伝子配列特異的DNA切断を引き起こす、人工ヌクレアーゼであるCRISPR-Cas9発現プラスミドを作製した。

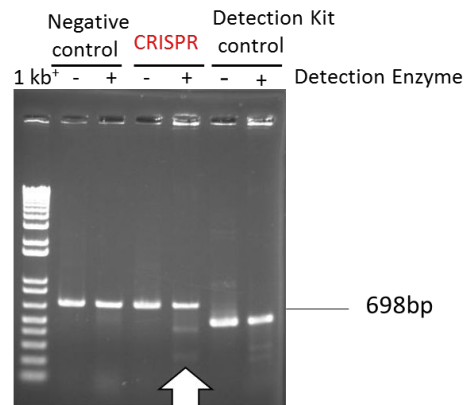


(図2) BTK遺伝子配列特異的DNA切断を引き起こす、CRISPR-Cas9発現プラスミド

4. 研究成果

(1) 作製したCRISPR-Cas9発現プラスミドをヒト血球系細胞株であるK562細胞と臍帯血由来CD34陽性細胞に導入する条件検討を行った。結果、エレクトロポレーション法を用いた適切な導入条件を得られた。

(2) 標的遺伝子であるBTK遺伝子を配列特異的に切断するかを確認するため、K562細胞に(1)で求めた条件により導入を行い、配列特異的なDNA切断を図3に示す通り確認した。

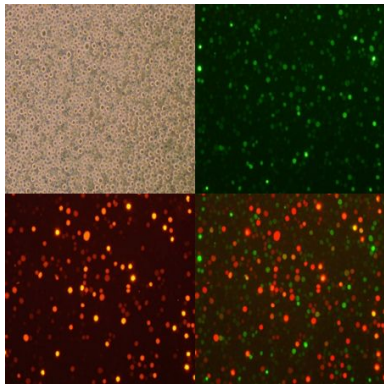


(図3) 配列特異的DNA切断の確認

(3) ヒト血球系細胞株K562細胞に過去の研究で作製済のヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルスベクター(図4)を感染させた後、CRISPR-Cas9発現プラスミドをエレクトロポレーション法による細胞導入を行った。結果、図5に示す通り、両者が同時に導入されたことを確認した。



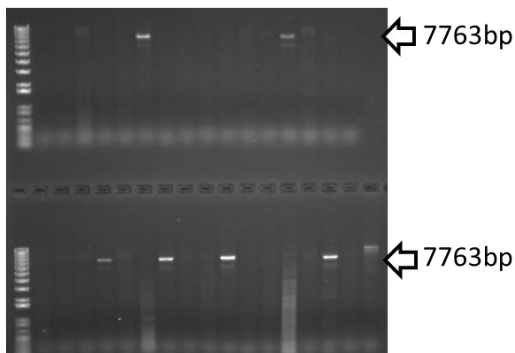
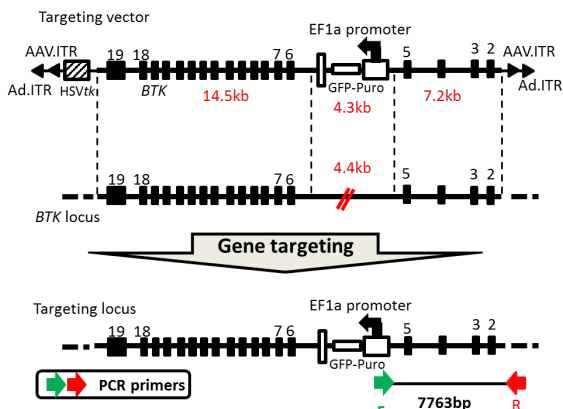
(図4) 過去に作製済のアデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターの構造



Bright-field	GFP ウイルスベクター
OFP CRISPR-Cas9 発現プラスミド	Overlay

(図 5) ウイルスベクターと CRISPR-Cas9 発現プラスミドの K562 細胞への導入

この導入を確認した細胞をピューロマイシンにて薬剤選択による、シングルセルクローニングを行った。得られた 32 個のクローンより DNA を抽出し、PCR 法によるターゲティングの頻度を算出した。結果、図 6 に示す通り、32 個のうち 6 個のクローンでターゲティングを認めた。

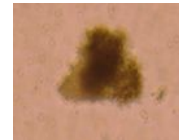


(図 6) PCR 法によるターゲティングスクリーニング

K562 細胞でのターゲティング頻度は、ウイルスベクター単独に比べ、CRISPR-Cas9 との

併用時のほうが高頻度であった。その頻度は、約 1%であった。

(4) 正常ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞からのコロニーアッセイにおいて、アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターと人工ヌクレアーゼである CRISPR-Cas9 の併用時の、ターゲティング効率を算定した。結果、感染させた臍帯血由来 CD34 陽性細胞から 24 個のピューロマイシン耐性赤芽球コロニーを得て、そのうち 10 個のコロニーで *BTK* 遺伝子座における相同組み換えを認めた。そのうちの 1 つコロニーの写真を図 7 に示す。

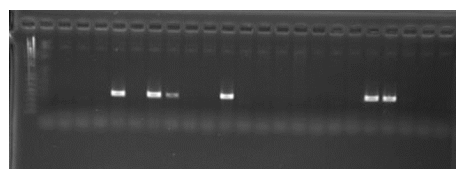


(図 7) 相同組換えが確認された BFU-E コロニー

ターゲティング頻度は感染させた細胞あたり、 $1.8 \times 10^{-5}$  であった。過去の研究で得られた、ウイルスベクター単独時の頻度が  $2.7 \times 10^{-7}$  であったことから、CRISPR-Cas9 を併用すると、約 67 倍、頻度が上昇することが分かった。

(5) 異なったウイルスベクターと人工ヌクレアーゼの組み合わせによる遺伝子ターゲティング効率を調べるため、新たに作製した、改良型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクター (図 1) を用いて、ヒト血球系細胞株 K562 細胞における、遺伝子ターゲティングを行った。(3) と同様に、シングルセルクローニングを行った。得られた 24 個のクローンのうち、2 個のクローンでターゲティングを認めた。異なった組み合わせを用いた場合でも、同程度の効率での遺伝子ターゲティングを認めた。

また、改良型ベクターには、ランダムインテグレーションを除くための、チミジンキナーゼ遺伝子を新たに搭載している。図 8 に示す通り、24 個のクローンのうち、6 個のクローン中にチミジンキナーゼ遺伝子が導入されたことが判別された。



(図 8) チミジンキナーゼ遺伝子の検出

実際、ガンシクロビルでネガティブセレクションを行ったところ、24 個のクローンのうち、4 個のクローンが死滅した。チミジンキナーゼ遺伝子を活用することで、ランダムインテグレーションを除く効果が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yamamoto H, Ishimura M, Ochiai M, Takada H, Kusahara K, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Mitani K, Hara T:  
"BTK gene targeting by homologous recombination using a helper-dependent adenovirus/adeno-associated virus hybrid vector" Gene Therapy 23. 205-213 (2016), 査読有  
DOI: 10.1038/gt.2015.91

〔学会発表〕(計1件)

高田英俊、Gene Therapy for PID, The 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research, April 15-18, 2015, 大阪府立国際会議場 (大阪府大阪市)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山元 裕之 (YAMAMOTO Hiroyuki)  
九州大学・環境発達医学研究センター・  
学術研究員  
研究者番号: 00710170