

論文の内容の要旨

論文題目 アルデヒド脱水素酵素の一遺伝子多型の改変による 代謝酵素活性制御法の開発

氏名 大野 元子

アルコール代謝に関与する重要な酵素であるアルデヒド脱水素酵素(Aldehyde dehydrogenase、ALDH2) は、487 番目のアミノ酸をグルタミン酸からリジンに変える一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が酵素活性に大きく影響するが、この変異型 SNP はアジア人に多く分布することが知られている。ALDH2は4量体を形成して機能するが、変異型サブユニットの混在はNAD⁺結合領域の変形により4量体の活性を大きく低下させる。従ってヘテロ (wt/mut) 遺伝子型を持つ人では野生型ホモ (wt/wt) に比較して ALDH2 の代謝活性が弱く、飲酒後に中間代謝産物アセトアルデヒドの体内高濃度が遷延する。反応性の高いアセトアルデヒドは DNA 損傷を惹起するため、癌を初めとした多くの疾患のリスクとなる。

一方、近年遺伝子編集の手法が目覚ましく発達し、分子生物学の分野において一般的に応用されるようになってきた。遺伝子編集とは、ゲノムにおける任意のターゲット部位に対し DNA 二重鎖切断を人工的に導入し、DNA 修復機構を利用して遺伝子ノックアウトやノックインなどを起こす手法であるが、従来の遺伝子編集手法である Zinc finger nuclease (ZFN) や Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) が一つのターゲットに対し配列特異的な二種のタンパクをカスタマイズする必要があるのに対し、新しく報告された Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas system は、ヌクレアーゼである Cas9 と、ターゲットに相補的な短い一本鎖の single guideRNA (sgRNA または gRNA) が複合体を形成し、gRNA によって誘導された Cas9 が DNA 二重鎖切断を起こすというもので、より簡便な遺伝子編集ツールとして近年急速に広まってきた。この手法では、gRNA をカスタマイズするだけでゲノムにおける様々なターゲットを切断でき、導入したい配列 (ドナー配列) を共に導入しておくことで、二重鎖切断時の相同組換え修復 (Homology-directed repair: HDR) を利用した目的配列の挿入が可能となる。

現在、遺伝子編集技術の治療への応用は *ex-vivo editing* の手法をとりやすい血液領域で進歩が目立つ一方、血液以外の領域では *in-vivo editing* についてのマウスレベルでの報告が徐々に出てきているものの、ヒトへの臨床応用のためには更に十分な編集効率の上昇・安全性の担保が必要と考えら

れる。本論文では、ALDH2 SNP の変異型が癌などの多くの疾患と関連することに着目し、遺伝子編集の手法を用いてヘテロ (wt/mut) から野生型ホモ (wt/wt) への SNP 改変によりタンパク機能を改善し、これらの疾患リスクを下げる可能性を探ることを目的とした。また、ALDH2 が 4 量体で機能することから、外来遺伝子の強制発現と ALDH2 SNP の直接編集を比較し、4 量体という特徴が編集の手法とタンパク機能改善にどのように影響するか、さらに臨床応用に向けて更に遺伝子編集の効率を上げるための様々な条件や手法について検討した。

最初に、各細胞の ALDH2 遺伝子の SNP genotyping を、Taqman PCR 法、及び DNA シークエンス解析によって確認した。その結果より、野生型ホモ (wt/wt) と判明したヒト腎臓上皮細胞の 293T 細胞及びヒト肝臓細胞の JHH5 細胞と、ヘテロ (wt/mut) と判明したヒト肝臓細胞の JHH7 細胞を用いることとした。

まず 293T 細胞及び JHH7 細胞に対し、野生型 ALDH2 遺伝子の強制発現、及び ALDH2 SNP の wt/mut→wt/wt への改変の二つの方法で、CRISPR/Cas system による遺伝子編集を行った。野生型 ALDH2 遺伝子の強制発現では、遺伝子改変部位として多用される AAVS1 (*adenovirus associated virus integration site 1*) をターゲットとした Cas9 + gRNA 発現プラスミド、及び野生型 ALDH2 cDNA と薬剤選択マーカー遺伝子 (puro) を持つドナープラスミドを細胞に共導入し、遺伝子編集後の細胞を薬剤選択により単離した。ALDH2 SNP の編集では、ALDH2 SNP 近傍をターゲットとした Cas9 + gRNA 発現プラスミド、及び野生型 SNP 配列と薬剤選択マーカー遺伝子 (puro, hTK) を持つドナープラスミドを細胞に共導入し、編集された細胞を薬剤選択後に余計な配列を除き、正しい ALDH2 遺伝子が復帰されたと思われる細胞を gancyclovir による negative selection で単離した。

それぞれの手法による編集後細胞の ALDH2 発現および活性を調べた結果、遺伝子型は wt/wt だが内在性の ALDH2 発現がわずかな腎上皮細胞の 293T 細胞では、外因性の野生型 ALDH2 強制発現によって十分なタンパク発現を得られ著明に活性が上昇したものの、ALDH2 遺伝子 SNP 改変では低発現・低活性のままであった。一方、ALDH2 発現はあるが wt/mut である肝細胞の JHH7 細胞では、野生型 ALDH2 強制発現および ALDH2 遺伝子 SNP 改変 (wt/mut→wt/wt) のいずれでも編集前より有意に活性が上昇した。野生型 ALDH2 強制発現では発現量が増加している一方で、ALDH2 遺伝子 SNP 改変では明らかな発現増加はなかったが、有意差はないものの野生型 ALDH2 強制発現より活性改善の程度がやや高い印象であった。wt/mut の JHH7 細胞では、野生型遺伝子を新たに導入しても、内在性の変異型サブユニットが ALDH2 の 4 量体に混在するため活性改善の程度が低くなり、SNP を直接改変の方が効率良く活性が改善する可能性が考えられた。細胞の発現様式や目的タンパクの特徴によって遺伝子編集で得られる結果が変化し得るため、それらをよく考慮して編集のターゲットや方法を選択するべきであることが示唆された。

上記の手法では薬剤選択により正しく遺伝子編集されたと思われる細胞を単離したが、薬剤選択

なしの細胞集団全体では AAVS1 および SNP 編集のいずれでも活性変化はなく、細胞集団全体に対する編集効率は現状ではかなり低いと考えられた。遺伝子編集効率は、細胞への Cas9 導入効率や Cas9 発現効率、ターゲットの設定による切断効率への影響、ドナー配列の導入効率、ランダム挿入や非同源末端結合 (Non-homologous end joining: NHEJ) による目的外の遺伝子編集の混在など、様々な要素に左右されると考えられる。従って、編集効率向上を目的にこれらの要因に対する様々な条件検討を試みた。Cas9 導入効率に依らない他の要因の影響を調べるために Cas9 安定発現細胞株をレンチウイルスにより作成し、以後の実験に用いることとした。

gRNA の設定による Cas9 切断効率の変化を調べるため、ALDH2 SNP 近傍の計 6 か所のターゲットを設定し、それぞれに対応した gRNA を作成して Cas9 切断効率を確認した。*in vivo* では gRNA による切断効率差が大きく、細胞内環境の複雑な要因が効率に影響する可能性が考えられた。

次に、短い一本鎖 DNA である ssODN (single strand oligo donor nucleotide) をドナーとして用いる方法は、短い変異の導入にはプラスミドのドナーを用いるよりも簡便で、より導入効率が高いという報告があるため、効率の良い gRNA とそれに対応した ssODN を Cas9 安定発現細胞株に導入し、編集後配列に特異的なプライマーを用いた PCR 法によって編集の有無を確認した。その結果、切断効率が良好でもターゲットにより編集効率に差が生じ得る可能性が示唆された。

さらに、NHEJ 阻害および gRNA と ssODN の導入量・導入比の編集効率への影響を検討した。DNA ligaseIV の阻害剤 SCR7 は、NHEJ を阻害することで相同組換え修復を促進するという報告がある。そこで、gRNA と ssODN の導入量条件を 6 段階設定し Cas9 安定発現細胞株に各条件で導入後、SCR7 添加有無による編集への影響の違いを、編集後配列に特異的なプライマーを用いた PCR 法によって確認した。その結果、いずれの条件でも SCR7 存在下でより効率良く編集がみられたが、gRNA・ssODN 導入量による効率差から、導入条件の設定も良く吟味するべきであると示された。

現時点までは、遺伝子編集による目的配列導入およびタンパク機能回復の可能性をある程度の変化として得ることができたが、臨床応用を目標とした更なる編集効率・機能回復の増強のためには、各段階でのプロトコルの最適化が極めて重要であることが示唆された。

本検討の結果は、さらなる条件やデリバリー法の最適化と、今後の *in vivo* での遺伝子編集と発癌予防効果についての検証が必要であるが、遺伝子編集手法を用いた新たな疾患予防法の開発を進める上での基盤になるものと考えられた。