

博士論文（要約）

Monogenic な心疾患治療を促進する

ゲノム編集技術基盤の開発

許沢 佳弘

論文の内容の要旨

論文題目 Monogenic な心疾患治療を促進するゲノム編集技術基盤の開発

氏名 許沢 佳弘

序論

循環器領域において、Fabry 病、Marfan 症候群、家族性高コレステロール血症、QT 延長症候群など、様々な疾患の遺伝子異常が解明されてきた。一方で、遺伝性心疾患の治療に関しては、2001 年から Fabry 病に対し、酵素補充療法が適応になるなどの進展はあったものの大きくは進んでいない。また原因遺伝子自体に介入するような遺伝子治療に関しては、同領域において未だ臨床応用されたものはない。先天性免疫不全症候群などで行われてきた遺伝子治療は、正常遺伝子の強制発現による欠損遺伝子の機能的な補完が中心であったが、発癌などの予期せぬ副作用が問題となった。また変異遺伝子の発現産物が疾患の原因となっている場合や、正常遺伝子の発現調節が必要な場合は治療できないなどの問題点も指摘されてきた。将来的には、ゲノム編集技術を応用し、in vivo でゲノム上の遺伝子変異を正しい配列に置き換える新しい遺伝子治療の開発が必要と考えられる。

ゲノム編集は、標的とするゲノム配列へ DNA 二本鎖切断 (double-strand break, DSB) を引き起こし、同部位における修復経路を利用して行われる。2012 年に発表された CRISPR-Cas9 システムはゲノム上の任意の部位へ DNA DSB を作成する技術の一つだが、その編集効率の高さ、圧倒的な簡便さから、様々な研究分野にゲノム編集技術を急速に普及させる契機となった。ゲノム修復機構には、相同組み換え修復 (homology-directed repair, HDR) と非相同末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) の 2 種類があり、遺伝子ノックインは主に DNA DSB 後の HDR を利用して行われてきた。HDR は正確なゲノム修復が可能である一方、鋳型となる姉妹染色分体が存在する S 期から G2 期にしか起こらないという特徴がある。生体の大部分を占める分化後の細胞では、HDR がほとんど起こらないことから、in vivo におけるノックインは困難とされてきた。

そんな中、2016 年 1 月、CRISPR-Cas9 システムと NHEJ を利用して、Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウスの表現型の原因となる未成熟終止コドンを含んだエクソンをスキップさせることで、ジストロフィンの機能および筋力を回復させたという報告が 3 つの研究グループからなされた。また同年 12 月には、homology-independent targeted integration (HITI) 法と呼ばれる NHEJ 経路を介した新たなノックイン手法が報告された。HITI 法は、①インサート DNA 配列の両側にノックイン先の CRISPR-Cas9 認識配列を逆方向に付加したドナー

プラスミドと、②同配列を認識する sgRNA, Cas9 発現ベクターを細胞に co-transfection することで、インサート DNA が細胞内で Cas9 により切り出され、高率に順方向にインサート DNA をノックインできる手法である。同報告では、これまで困難であった培養細胞や初代神経細胞において、50%以上と高効率な遺伝子ノックインを実現させるとともに、網膜色素変性症モデルラットの欠失エクソンの挿入を in vivo で行い、視力を回復させたと報告した。これらの報告は、将来的に NHEJ 経路を介した単一遺伝子疾患の遺伝子修復などを期待させるものとして、注目されている。

方法・結果

私は、“NHEJ 経路を介したノックイン”の再現性および効率を検証する目的で、HITI 法を用いて、HeLa 細胞の GAPDH 3'UTR 領域へレポーター遺伝子 (EGFP-ブラストサイジン融合遺伝子, EBs) のノックイン実験を行い、その再現性を確認した。しかし、そのノックイン効率は、抗生剤で選択圧を加えてようやく検出できる程度であり、既報の 50%以上と大きく異なっていた。“NHEJ 経路を介したノックイン”を臨床応用するためには、現在未知であるその分子機序を解明し、ノックイン効率を改善させる必要があると考えられた。

私は“NHEJ 経路を介したノックイン”に関わる制御因子を同定するため、同ノックイン効率を簡便で正確に定量化できるシステムの構築に着手した。外来遺伝子をノックインした際には、しばしば遺伝子サイレンシングが生じ、外来遺伝子発現とノックインの成否が乖離する。そのため、多くの研究ではノックイン効率を測定する際、複数のクローンのゲノムを PCR 法やサンガーシーケンス法で解析し、ノックインの成否を確認しているが、その手法の煩雑さから解析できる細胞数には限りがあり、正確性に欠けるという問題点があった。

そこで私は、レポーター遺伝子のノックイン先として、AAVS1 部位を選択した。AAVS1 部位は、レポーターをノックインする際に問題となる①ノックイン先のゲノム情報が障害されることによる有害事象や、②ノックインした外来レポーター遺伝子のサイレンシングが生じにくいことが知られており、外来遺伝子をノックインする際の“safe harbor 領域”として知られる部位である。実験の結果、私は episomal なプラスミド由来の一過性の EGFP 発現と、目的とするノックインによる EGFP の発現強度が異なることを発見し、ドナープラスミドの transfection 量、transfection から解析までの日数を調節することで、ノックインに成功した EGFP 強陽性細胞群を分離することに成功した。実際に、①EGFP 強陽性細胞群の 20 クローン全ての safe harbor 部位に EBs 発現カセットが順行性にノックインされていることと、②それ以外の細胞群の safe harbor 部位に EBs 発現カセットがノックインされた細胞がないことを PCR 法で確認した。これらの結果から、フローサイトメトリーで EGFP 強陽性細胞集団の出現頻度を計測することで、safe harbor 部位におけるノックイン効率を正確に定量化できることが示された。

私は、今回構築したノックイン効率定量化システムを基に、①HeLa 細胞において、従来の“HDR 経路を介したノックイン”は困難で、“NHEJ 経路を介したノックイン”のみが可能であること、②“NHEJ 経路を介したノックイン”に、ゲノムとドナープラスミド上の CRISPR-Cas9 認識配列が同一である必要性はないこと、③“NHEJ 経路を介したノックイン”には、インサート DNA が細胞内でドナープラスミドから切り出される必要があることを示した。一方で、今回私が行った一連のノックイン効率は、抗生剤で選択圧を加えてもなお 1~10%と、既報に比し著しく劣っており、細胞種や環境などによりノックイン効率が大きく異なる可能性が考えられた。

私は、“NHEJ 経路を介したノックイン”を制御する分子群を遺伝学的にスクリーニングする方法の確立に着手した。ある遺伝子が“NHEJ 経路を介したノックイン”を制御する場合、その遺伝子がノックアウトされた細胞では“NHEJ 経路を介したノックイン”の効率が変わると考えられる。このため、ゲノムワイドに遺伝子がノックアウトされた変異細胞群に対して、今回と同様の NHEJ 経路を介したノックイン実験を行い、ノックインに成功した細胞群のノックアウト遺伝子の分布が母集団とどのように異なるかを解析することで、NHEJ 経路を介したノックインに関わる遺伝子を同定することが可能となると考えられる。

私は、2014 年に報告された、18,080 の遺伝子を標的とした 64,751 のユニークな guide sequence からなる GeCKO (Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout)レンチウイルスライブラリーを HeLa 細胞に感染させることで、ゲノムワイド遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを得た。HITI 法を用いてノックアウト細胞群の safe harbor 部位へ EGFP 発現カセットをノックインし、ノックイン成功細胞群と母集団をそれぞれ回収し、ゲノムを抽出した。各細胞のゲノムに integrate された gRNA 配列は、PCR で増幅可能に設計されており、PCR 産物を超並列シークエンサーで、解析することにより、回収した細胞集団の gRNA 配列の分布、すなわち CRISPR 標的遺伝子の分布を明らかにすることができる。私は、予備実験としてノックイン成功群、母集団それぞれ約 22,500 細胞のゲノムを各 4 サンプル解析し、sgRNA 配列が判読可能であることを確認した。1 サンプルで得られた CRISPR 標的遺伝子数は GeCKO library の 47%とカバー率は不十分であったが、両群間を比較することで“NHEJ を介したノックイン”の制御分子として 106 の遺伝子が候補に挙げられた。候補遺伝子には、DNA 切断の修復に関わるものやヒストンのアセチル化に関わるものなどが含まれた。今後、ノックイン成功細胞群および母集団細胞群の解析細胞数を増やし、同様のスクリーニングを行うことで“NHEJ 経路を介したノックイン”を制御する分子の同定を試みる。

考察

今回私が新たに構築した“NHEJ 経路を介したノックイン”の制御分子スクリーニング方法は、①ノックインに成功した細胞群を正確に回収できるシステムを独自に確立できてい

る点、②CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを用いることで従来用いられてきた RNA 干渉ライブラリーよりも、確実に特異性の高い loss of function 細胞ライブラリーを作成できる点から、感度・特異性の高いスクリーニング結果が期待できる。また次世代シーケンサーを用いて、大量のシーケンスデータを解析することで、各細胞集団のノックアウト遺伝子の分布を従来の方法より正確に比較でき、これまで検出が困難であった、表現型への寄与が比較的小さい制御分子も検出できる可能性がある。以上の特徴および予備実験結果から、本スクリーニング系は、これまで未知であった“NHEJ 経路を介したノックイン”の制御遺伝子を解明する有望な実験系であると考えられる。今後、同定された制御遺伝子群の発現や機能をノックイン反応の際に一時的に調節することで、“NHEJ を介した効率的なノックインシステム”の構築が期待される。

2011 年、2016 年、心不全患者の冠動脈にアデノ随伴ウイルス 1(AAV1)ベクターを注入することで、SERCA2a を心筋細胞に導入する遺伝子治療の phase II 臨床試験が報告された。最終的には、治療による病態の改善は得られず、遺伝子導入効率の安定性などに課題が残る結果であったが、AAV1 ベクターを用いた心臓への遺伝子導入の実現可能性、安全性を示した意味で意義の大きい報告であった。心疾患の遺伝子治療に必要な技術は年々進展がみられる。本研究を通じて“NHEJ を介した効率的なノックインシステム”が開発できれば、上述の AAV ベクターなどを用いることで、効率的な心筋細胞のゲノム編集を実現する技術基盤の一助になると期待される。