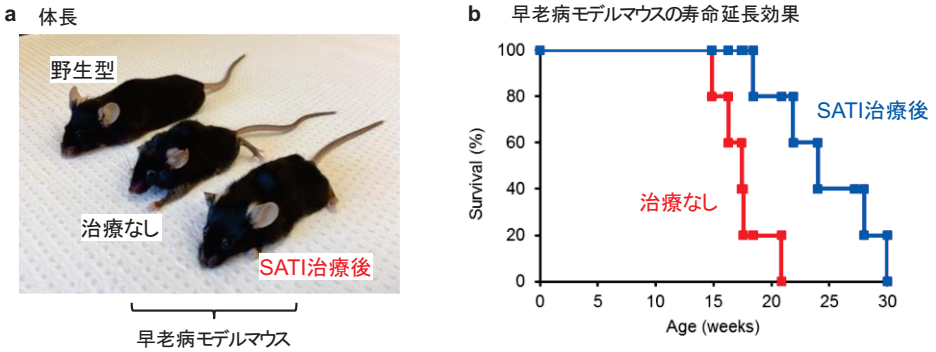
40　優性変異を持つ遺伝性疾患に対する根本的治療法の開発	鈴木　啓一郎

【目的】先天的な遺伝子変異により発症する遺伝病として 6,000 以上の疾患名がすでに報告されており、10,000 以上の遺伝性疾患が存在すると推測されている。一方で、そのほとんどが根治する可能性がなく有効な治療法が存在しない難治性遺伝病である。近年、ゲノムの標的配列のみを特異的に切断・改変するタンパク質『人工 DNA 切断酵素』が開発され、標的遺伝子の破壊（遺伝子ノックアウト）や、外からの遺伝子挿入（遺伝子ノックインや遺伝子修復）など、様々な細胞種・生物種で自由自在にゲノム配列をデザイン・改変する『ゲノム編集』技術が開発されてきた。特に近年では、CRISPR／Cas9 の開発によってゲノム DNA の任意の部位に切断を容易に加えることが可能となったが、切断部位への遺伝子ノックインや遺伝子置換には、細胞が有する DNA 修復機構の一種である『相同組換え修復』が用いられてきた。しかし、相同組換え修復によるゲノム編集には高い細胞分裂活性が必要であるため、生理的に細胞分裂を行っていないほとんどの生体内の細胞への応用は非常に困難であった。このような背景の中、筆者は非分裂細胞でも活性のある「非相同末端結合」経路を利用した標的遺伝子の改変手法を独自に開発し、生体内、特に非分裂細胞である神経、筋肉、網膜における標的ゲノム配列を自由に改変する世界初の技術を開発し、HITI（Homology-Independent Targeted Integration）と名付け、実際に遺伝性疾患である網膜色素変性症のモデルラットに対して視覚機能障害の治療効果が得られた（Suzuki et al, Nature 2016）。しかしながら、既存の HITI 法では、任意の配列をゲノム標的部位に挿入することはできても、原因変異を取り除くことは出来ないという大きな問題点があり、治療可能な標的は遺伝子の一部が欠落している欠失変異のみであった。本研究では、自ら開発した HITI 技術を更に発展させることで、従来の遺伝子治療法の治療対象とならない『Gain of function（優性遺伝子変異）』を治療可能とする新規ゲノム編集技術の確立を目指す。

【方法】優性変異を持つエクソンの前のイントロンに以降のエクソンとイントロンと 3’ UTR を結合した『mini-gene』を HITI 法により挿入する『イントロンノックイン法』を考案し、優性変異の治療を試みた。具対的な実験系として、生体内での DNA 導入に優れているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに遺伝子治療用『mini-gene』を持たせ、これを *Lmna* 遺伝子座に優性変異を持ち病的に老化が促進する早老症（プロジェリア症候群）マウスに静脈注射し、優性点突然変異の遺伝子修復による治療効果を検討した。

【結果】本研究過程で、新規の遺伝子改変機構（oaHDR: one-armed Homology-directed repair）を発見し、これらの方法を組み合わせた新規のゲノム編集法「SATI：intercellular linearized Single homology Arm donor mediated intron-Targeting Integration」の開発に成功した。さらに本技術を用いることで、プロジェリア症候群モデルマウスに対し、複数の組織や臓器で同時にゲノム編集を行い、全身性のゲノム編集治療に成功した（Suzuki et al, Cell Res 2019）。今後本技術がさらに改良されることで、成人の神経・心臓・筋肉・網膜など様々な組織または全身に異常を持つ数多くの難治性遺伝病に対し、その原因となる異常遺伝子を病変部位で直接修復する医療への応用へ繋がることを期待している。

優性変異を持つプロジェリア症候群モデルマウスのゲノム編集治療



40. 優性変異を持つ遺伝性疾患に対する根本的治療法の開発

鈴木　啓一郎

大阪大学 大学院基礎工学研究科 物質創成専攻 機能物質化学領域

Key words：ゲノム編集，HITI，SATI，優性遺伝子変異

緒　言

先天的な遺伝子変異により発症する遺伝病として 6,000 以上の疾患名がすでに報告されており、10,000 以上の遺伝性疾患が存在すると推測されている。一方で、そのほとんどが根治する可能性がなく有効な治療法が存在しない難治性遺伝病である。近年、ゲノムの標的配列のみを特異的に切断・改変するタンパク質『人工 DNA 切断酵素』が開発され、標的遺伝子の破壊（遺伝子ノックアウト）や、外からの遺伝子挿入（遺伝子ノックインや遺伝子修復）など、様々な細胞種・生物種で自由自在にゲノム配列をデザイン・改変する『ゲノム編集』技術が開発されてきた。特に近年では、CRISPR/Cas9 の開発によってゲノム DNA の任意の部位に切断を容易に加えることが可能となったが、切断部位への遺伝子ノックインや遺伝子置換には、細胞が有する DNA 修復機構の一種である『相同組換え修復』が用いられてきた。しかし、相同組換え修復によるゲノム編集には高い細胞分裂活性が必要であるため、生理的に細胞分裂を行っていないほとんどの生体内の細胞への応用は非常に困難であった。このような背景の中、筆者は非分裂細胞でも活性のある「非相同末端結合」経路を利用した標的遺伝子の改変手法を独自に開発し、生体内、特に非分裂細胞である神経、筋肉、網膜における標的ゲノム配列を自由に改変する世界初の技術を開発し、HITI（Homology-Independent Targeted Integration）と名付け、実際に遺伝性疾患である網膜色素変性症のモデルラットに対して視覚機能障害の治療効果が得られた［1］。しかしながら、既存の HITI 法では、任意の配列をゲノム標的部位に挿入することはできても原因変異を取り除くことは出来ないという大きな問題点があり、治療可能な標的は遺伝子の一部が欠落している欠失変異のみであった。本研究では、自ら開発した HITI 技術を改良することで、従来の遺伝子治療法の治療対象とならない『Gain of function（優性遺伝子変）』を治療可能とする新規ゲノム編集治療法の開発を行い、優性変異を有し病的に老化が促進する早老症（プロジェリア症候群）マウスにおいて、全身性のゲノム編集治療に成功した［2］。

方　法

1.　新規ゲノム編集技術の開発

筆者が開発した非相同末端結合活性を利用した HITI 技術の特徴として、任意の配列をゲノム標的部位に挿入することが挙げられるが、本研究ではこの特徴を生かした優性変異の治療法の開発を発案・実行する。具体的には、優性変異を持つエクソンの前のイントロンに以降のエクソンとイントロンと 3’ UTR を結合した『mini-gene』を HITI 法により挿入する『イントロンノックイン法（図 1）』を考案し、その有効性を検討した。

2.　プロジェリア症候群モデルマウスを用いた治療効果の検討

新規ゲノム編集治療法の有効性を検討するため、生体内での DNA 導入に優れているアデノ脳随伴ウイルス（AAV）ベクターに遺伝子治療用 DNA を搭載した。これを病的に老化が促進する早老症マウスに静脈注射し全身性でゲノム編集治療を試みた。

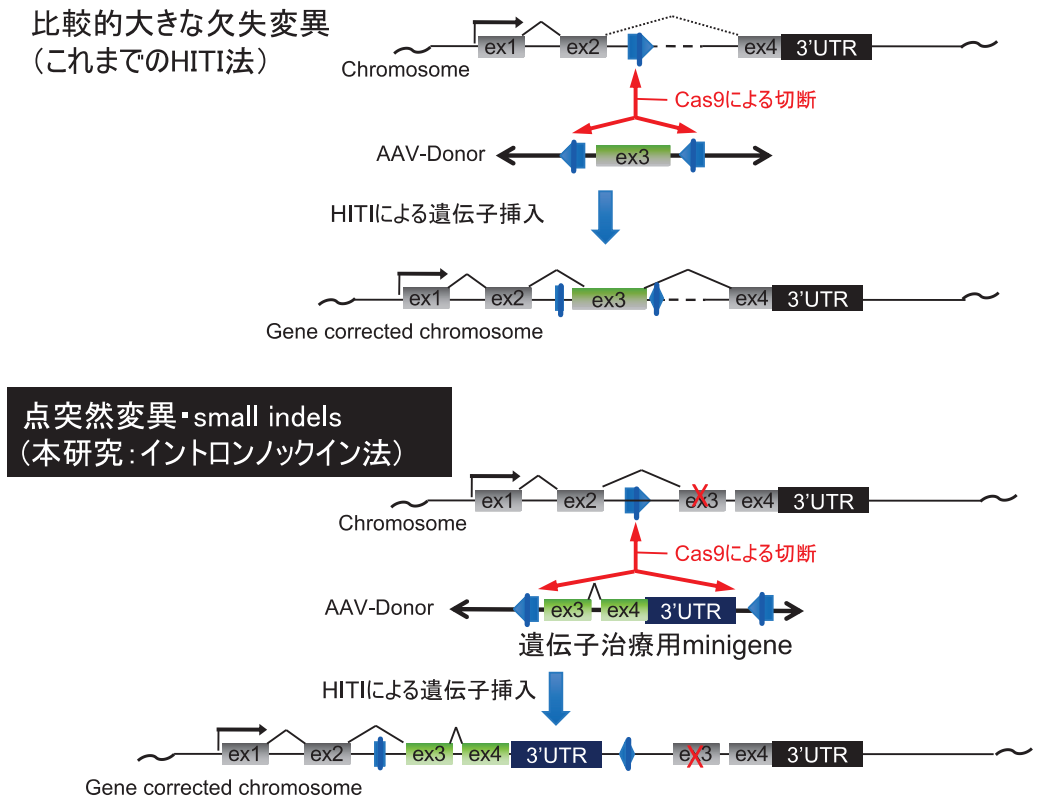


図 1. イントロンノックイン法

優性変異の持つエクソンの前のイントロンに以降のエクソン+イントロン+3’ UTR を挿入することで正常型の遺伝子が発現する。変異を取り除くことの出来ない従来の HITI 法の欠点を補う遺伝子修復法である。

結　果

1.　新規ゲノム編集技術の開発

考案したイントロンノックイン法は、図 1 のようにゲノム中の相同部位に対してドナーDNA の片側のみ相同配列（one arm）を持つが、ゲノム標的部位とドナーDNA を細胞内で同時に切断することで、外来遺伝子が片側のみの相同配列を介して標的遺伝子に置換される新規遺伝子ノックイン経路を発見し、「one-armed HDR（oaHDR）」と名付けた（図 2）。この技術は筆者らが以前開発した HITI 法では不可能であった配列置換も行なえるため、より汎用性の高い技術であることが示唆され、新規のゲノム編集技術「SATI 法: intercellular linearized Single homology Arm donor mediated intron-Targeting Integration」と名付けた。更に oaHDR の原理を詳細に調べるため、shRNA を用いて DSB 修復経路に関与する遺伝子を発現抑制した（図 3）。この結果、分裂細胞で主な DSB 修復経路である HDR と NHEJ の両方の遺伝子群が関わる複合的な新規 DSB 修復経路が神経細胞では働いていることが示唆された。

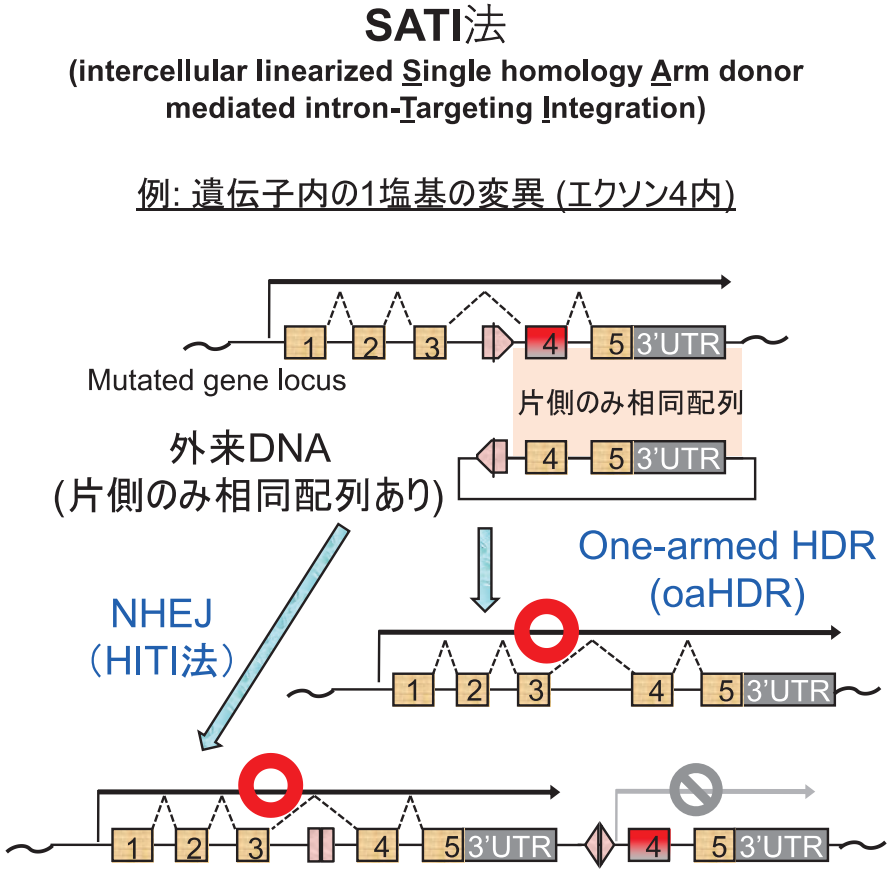


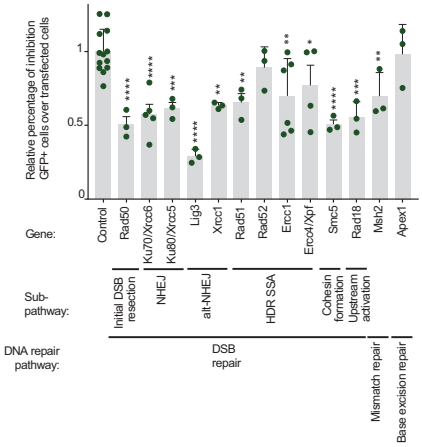
図 2. oaHDR と NHEJ を利用した SATI 法

変異の存在するエクソンより上流のイントロンに、変異を持たない遺伝子の一部を持たせた外来 DNA をノックインする。ドナーDNA が有する片側のホモロジーアームを介した新規相同組換え経路を発見し、oaHDR と名付けた。SATI 法は oaHDR か NHEJ（HITI）のどちらの経路で挿入されても正常型タンパク質が発現するため、優性突然変異を含むほとんどの変異が修復対象となる。

a

Repair pathway	Sub pathway	Gene	Clone ID (Sigma)
DSB repair	Initial DSB resection	*Rad50*	TRCN0000336380
	NHEJ	*Ku70/Xrcc6*	TRCN0000321228
		Ku80/Xrcc5	TRCN0000312877
	alt-NHEJ	*Lig3*	TRCN0000070980
		Xrcc1	TRCN0000077239
	HDR	*Rad51*	TRCN0000012660
	SSA	*Rad52*	TRCN0000233363
		Ercc1	TRCN0000238086
		Ercc4/Xpf	TRCN0000175845
	Cohesin formation	*Smc5*	TRCN0000241751
	Upstream activator	*Rad18*	TRCN0000124781
Mismatch repair		*Msh2*	TRCN0000042496
Base-excision repair		*Apex1*	TRCN0000304312

b



c

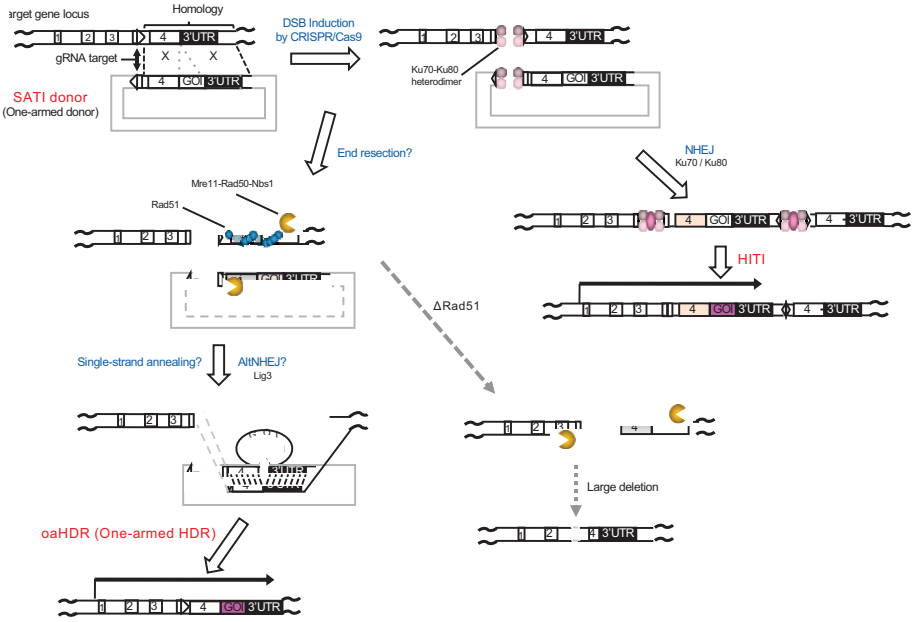


図 3. oaHDR の分子機構

a）使用した shRNA リスト。

b）shRNA を用いた遺伝子ノックダウンによる培養神経細胞での遺伝子ノックイン効率の測定
Student's *t*-test：****$P<0.0001$、***$P<0.001$、** $P<0.01$、* $P<0.05$。

c）oaHDR の分子機構モデル。

2. プロジェリア症候群モデルマウスを用いた治療効果の検討

生後 1 日目の早老症マウスに静脈を介し AAV を注入し、全身性でゲノム編集治療を試みた。結果として、老化の表現型の緩和や、短縮した寿命を 1.5 倍延長できることを確認でき、当該技術はゲノム編集治療法として有効な手段であることが示唆された（図 4）。一連の研究成果は 2019 年の Cell Research 誌に掲載された［2］。

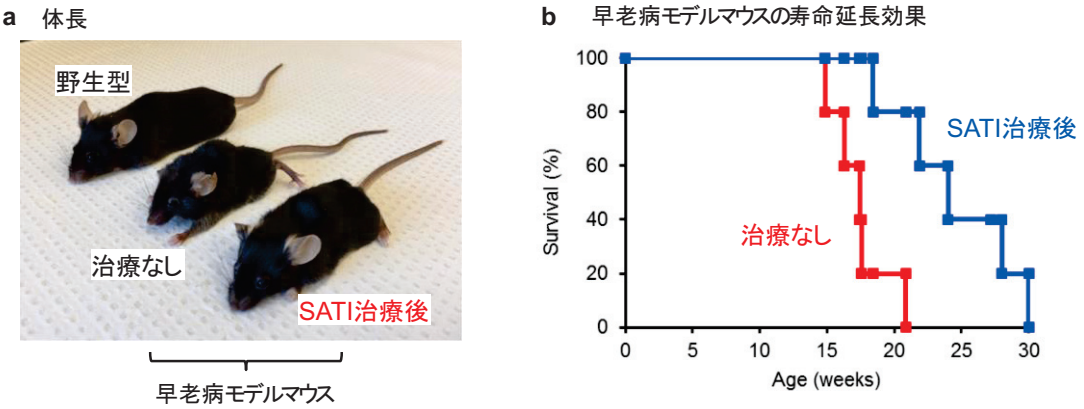


図 4. 優性変異を持つプロジェリア症候群モデルマウスのゲノム編集治療

SATI 治療による早老症モデルマウスの遺伝子治療。生後 118 日の早老症モデルマウスで見られる老化症状（a、体長）や生存率（b）の部分回復

考　察

このように本研究では、従来の遺伝子治療法では治療が困難であった優性突然変異を根本から修復可能な新規ゲノム編集治療法の開発に成功した。今後本研究で開発された技術の安全性が確認され、遺伝子修復効率も更に改良されることで、成人の神経・心臓・筋肉・網膜など様々な組織または全身に異常を持つ数多くの難治性遺伝病に対し、その原因となる異常遺伝子を病変部位で直接修復する医療への応用へ繋がることを期待している。

共同研究者・謝辞

本研究は、米国ソーク生物学研究所ベルモンテ教授を始め多くの共同研究者に参画いただいた。また、本研究は公益財団法人上原記念生命科学財団の研究助成金によって遂行された。この場を借りて感謝申し上げます。

文　献

1） Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J, Kim, J. E., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebl, A., Soligalla, R.D., Qu, J., Jiang, T., Fu, X., Jafari, M., Esteban, C.R., Berggren, T., Lajara, J., Nuñez, E., Guillen, P., Campistol, J.M., Matsuzaki, F., Liu, G.H., Magistretti, P., Zhang, K., Callaway, E.M., Zhang, K. and Izpisua Belmonte, J.C. In vivo genome editing via CRISPR-Cas9 mediated homology-independent targeted integration. Nature. 2016 Dec 1;540(7631):144-149. Epub 2016 Nov 16. PMID: 27851729 DOI: 10.1038/nature20565

2） Suzuki, K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Li, Z., Wei, C., Soligalla, R.D., Aizawa, E., Hatanaka, F., Kurita, M., Reddy, P., Ocampo, A., Hishida, T., Sakurai, M., Nemeth, A.N., Nuñez Delicado , E., Campistol, J.M., Magistretti, P., Guillen, P., Esteban, C.R., Gong, J., Yuan, Y., Gu, Y, Liu, G.H., López-Otín, C., Wu, J., Zhang, K. and Izpisua Belmonte, J.C. Precise in vivo genome editing via single homology arm donor mediated intron-targeting gene integration for genetic disease correction. Cell Res. 2019 Oct;29(10):804-819. Epub 2019 Aug 23. PMID: 31444470 DOI: 10.1038/s41422-019-0213-0