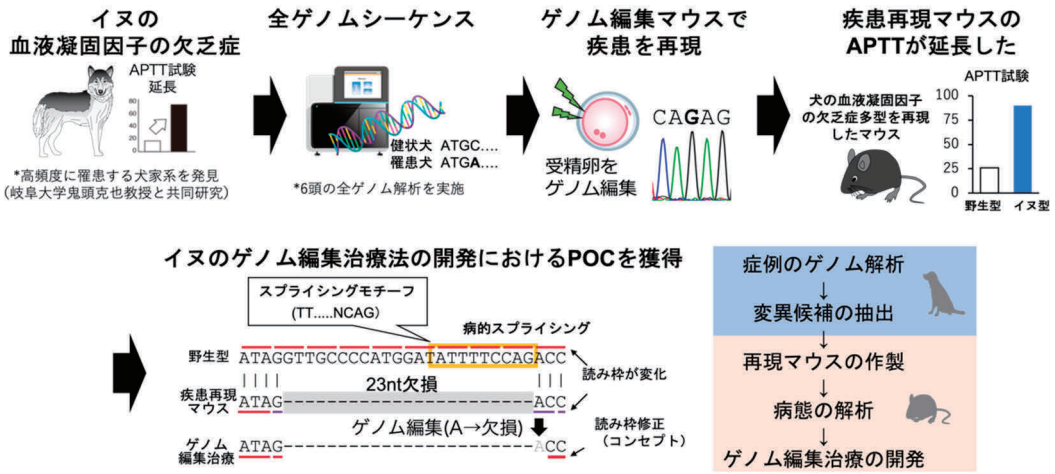
153　犬の遺伝性疾患に対するゲノム編集治療法の開発	宮脇　慎吾

【目的】多くのイヌの遺伝性疾患において原因遺伝子が不明であるため、根本的な治療法はない。著者は、近年急速に進歩している CRISPR/Cas9 をはじめとするゲノム編集技術を用いて、ゲノムレベルでイヌの遺伝性疾患をゲノム編集マウスで再現することにより、遺伝子多型が生体に与える影響をゲノム編集マウスにより評価してきた。本研究では、イヌの遺伝性疾患を再現したゲノム編集マウスを利用して、ゲノム編集によるイヌの疾患の遺伝子治療法を開発することを目的とする。これによって、現在治療法のないイヌの遺伝性疾患の治療につながると考える。

【方法】本研究では、イヌの先天性血液凝固疾患を対象として、その原因遺伝子の特定から、遺伝子治療法の確立までを実施した。具体的には、罹患犬から原因遺伝子の特定、CRISPR/Cas9 を用いた原因遺伝子を再現するマウスの作製、活性化部分トロンボプラスチン時間（Activated Partial Thromboplastin Time：APTT）試験による再現マウスの血液学的臨床検査、肝臓の RT-PCR による再現マウスの分子生物学的表現型解析、病的スプライシングを補完する遺伝子治療のための先天的遺伝子変異の導入実験を実施した。

【結果】はじめに、血液凝固異常症を呈する犬の家系を同定し、全ゲノム解析によりその原因遺伝子変異の候補を抽出した。抽出した候補には、遺伝子のイントロンのスプライシング部位に生じた一塩基多型が存在した。次に、抽出した変異をゲノム編集により再現したマウスの作製に成功し、そのマウスの血液凝固検査により、イヌの症例と同様に、再現マウスの血液凝固試験の結果が延長することを見出した。疾患再現マウスの肝臓をサンプリングし、RT-PCR による遺伝子発現解析を実施したところ、病的なスプライシング変化が生じていることが明らかになった。最後に、病的なスプライシングにより生じたフレームシフトをインフレームにする変異を新たに導入したマウスを作製した。現在、このマウスで表現型がレスキューされているかを検証しているところである。今後、インフレーム変異の導入により血液凝固の異常がレスキューできた場合には、AAV などを使った後天的なゲノム編集により遺伝子治療が可能かを検証し、将来的にはイヌの症例において、実験的な遺伝子治療を実施する予定である。

ゲノム編集によるイヌの遺伝性疾患の原因遺伝子の同定と遺伝子治療法の開発



153. 犬の遺伝性疾患に対するゲノム編集治療法の開発

宮脇　慎吾

岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 獣医外科学研究室

Key words：イヌ，ゲノム編集，遺伝性疾患，遺伝子治療，マウス

緒　言

イヌは、形態、行動、遺伝性疾患、癌などの加齢性疾患、寿命の点で最も多様な哺乳類である［1]。イヌは人間と同じ環境を共有し、高度な医療システムを持つことを踏まえると、様々な病気に関連する遺伝的、環境的、生活様式の要因を明らかにするための有益な情報をもたらす［2]。2004 年にイヌのゲノム情報が公開され［3]、現在では比較的容易にイヌのゲノム解析ができるようになり、様々なイヌの特徴をもたらす遺伝的背景が明らかになってきている。このような背景から、イヌを対象とした分子生物学的な解析により、病態の理解や治療法の開発が可能になってきている。

イヌは最も古くに家畜化された動物であり、品種改良の結果として多様な大きさや体毛などの特徴を有する犬種に系統化されている。それぞれの犬種には固有の遺伝性疾患があり、動物の遺伝性疾患のデータベースである Online Mendelian Inheritance in Animals（OMIA）には、現在、約 400 の遺伝性疾患が登録されている。しかしながら、多くのイヌの遺伝性疾患において原因遺伝子が不明であるため、根本的な治療法はない。著者は、近年急速に進歩している CRISPR/Cas9 をはじめとするゲノム編集技術を用いて、ゲノムレベルでイヌの遺伝性疾患をゲノム編集マウスで再現することにより、遺伝子多型が生体に与える影響をゲノム編集マウスにより評価してきた。本研究では、イヌの遺伝性疾患を再現したゲノム編集マウスを利用して、ゲノム編集による遺伝子治療法を開発し、将来的に、イヌの症例を治療することを目的とする。本研究を礎にして、将来的に現在治療法のないイヌの遺伝性疾患の治療法の開発につながると考える。

方法および結果

1. ゲノム編集マウスを用いた犬に認められた血液凝固疾患の原因遺伝子および原因変異の同定

著者は、動物の血液内科学を専門とする鬼頭克也（岐阜大学応用生物科学部・教授）との共同研究により、血液凝固因子の欠乏症を高頻度に発症する犬の家系を見出している。血液凝固因子の欠乏症はヒトとイヌで共通して発症する常染色体劣性遺伝の先天性血液凝固異常症である。血液凝固因子の欠乏症は、肝臓で発現する遺伝子の変異による機能不全を原因とする。血液凝固因子の欠乏症は血液凝固検査で活性化部分トロンボプラスチン時間（Activated Partial Thromboplastin Time：APTT）の延長を示し、特定の凝固因子の低下により診断される。現在、複数ある血液凝固因子の欠乏症の中で治療法が存在しないものがある。はじめに、当該のイヌ家系の臨床検査と家族歴の調査から、疾患の変異をホモで有する個体とヘテロで有する個体を抽出し、全ゲノム解析による多型解析を実施した。結果として、6 つのホモ個体で特有の多型が同定され、さらにヘテロ個体の結果と照合することで、2 つの原因変異の候補まで絞り込むことができた。本研究では、エキソン 5 とエキソン 6 に挟まれるイントロンのスプライシング部位に存在する多型に着目して解析を進めた（図 1a)。

イヌの遺伝性疾患の原因変異を特定するためにはいくつかの障壁がある。すなわち、ゲノム解析で特定した多型をイヌの遺伝子改変で実験的に評価することが技術的・倫理的に困難であり、多型と疾患の因果関係を証明できないことが障壁のひとつになっている。この障壁を解決するために、本研究では、ゲノム解析により探索した

イヌの多型をゲノム編集により動物種を超えてマウスに導入することで、イヌの遺伝性疾患の原因変異をマウス実験で特定した。はじめに、当該のイヌ多型が存在するゲノム配列がマウスでも保存されていることを検証し、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の gRNA と鋳型となる多型を有する DNA を設計した。次に、マウスの受精卵へエレクトロポレーション法により Cas9 タンパク、gRNA、鋳型 DNA を導入し、マウスのゲノム編集を実施した。ゲノム編集した受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植し、生まれた産仔をジェノタイピングし、イヌ疾患をゲノムレベルで再現するマウス（疾患再現マウス）を得た（図 1b)。

交配により系統化した疾患再現マウスから、血液を採取し、イヌの血液凝固因子の欠乏症と同様の症状を示すことを APTT 試験により検証した。結果として、疾患再現マウスの APTT は高度に延長を示し、導入した多型が犬の血液凝固因子の欠乏症の原因変異であることが明らかになった（図 1c)。

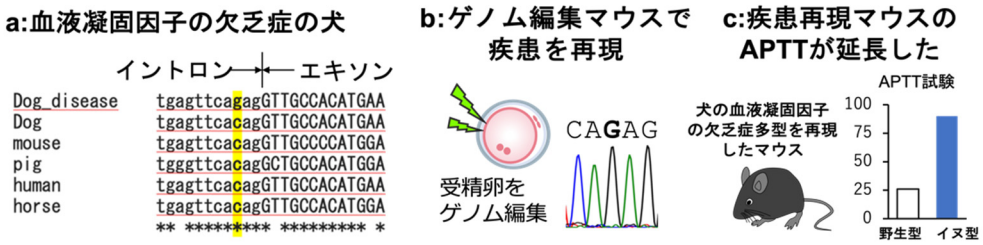


図 1. イヌの血液凝固疾患の原因遺伝子変異を再現したゲノム編集マウス

a) 血液凝固因子の欠乏症に罹患したイヌのみが変異（黄色ハイライト）を有する。

b) ゲノム編集で変異を再現したマウスを作製した。ゲノム編集マウスの当該配列のシーケンスデータを示した。太文字の G は野生型では C であった配列である。

c) 疾患再現マウスは APTT の延長を示した。この結果から導入した変異が血液凝固因子の欠乏症の原因変異であると判断した。

2. 疾患再現マウスの解析によるイヌ疾患の病態解明

次に、疾患再現マウスを使って、当該変異が血液凝固因子の欠乏症をもたらすメカニズムの解析を実施した。当該の血液凝固因子は肝臓で産生されるため、疾患再現マウスの肝臓の RT-PCR を実施して、転写産物の解析を実施した。結果として、エキソン 6 のスプライシング部位が 23 塩基後方にシフトする病的なスプライシングが生じていることが明らかになった（図 2)。新たに生じた病的スプライシング部位には、スプライシングモチーフとなる（T）n＋AG 配列が存在し［4]、この配列はマウスとイヌで保存されていた。すなわち、在来のスプライシング部位の機能が低下したことにより、新たに後方のスプライシング部位を使ってイントロンが除去されたことになる。この結果として、フレームシフトが生じて、それ以降のアミノ酸が翻訳されず、当該の血液凝固因子は機能不全になったと考えられた。

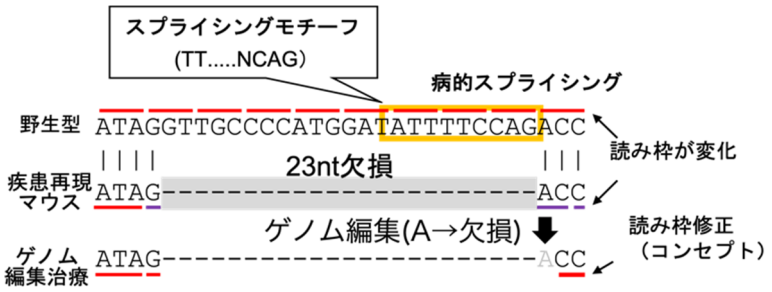


図 2. 血液凝固疾患の病的スプライシング

疾患再現マウスの肝臓の RT-PCR により、転写産物に病的なスプライシングが生じていることが明らかになった。病的スプライシングにより生じたフレームシフトをゲノム編集することで遺伝子治療を実施する（コンセプト）。

3. ゲノム編集治療に向けたフレームシフト変異の修正による血液凝固不全のレスキュー（治療）

上記の結果から、犬の血液凝固因子の欠乏症はエキソン 6 の前方に位置するスプライシング部位の変異により、病的なスプライシングが生じ、フレームシフトによりタンパクの機能が不全になることが分かった。このフレームシフトを修正できれば、タンパクの機能が回復し、血液凝固異常をレスキュー（治療）できる可能性がある。この仮説を検証するために、疾患再現マウスの受精卵をさらにゲノム編集することで、フレームシフト後の配列を 1 塩基欠損させるインフレーム化を実施した。結果として、新たに生じたエキソンの 1 塩基を欠損したマウス個体を得ることができた（図 3）。現在、このマウスの凝固異常の表現型がレスキューされているかを APTT による血液凝固試験で評価しているところである。

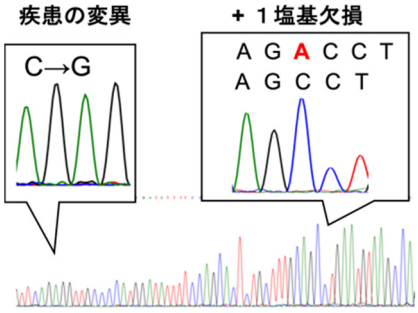


図 3. 先天的にゲノム編集した疾患再現マウスの遺伝子配列

疾患再現マウスをゲノム編集によりフレームシフトを修正した。図は実際のシーケンスデータである。一連のシーケンス上に疾患の変異と加えて導入した 1 塩基欠損が並んでいる。

4. ゲノム編集治療に向けた、AAV による後天的ゲノム編集法の確立

疾患再現マウスの受精卵を先天的にゲノム編集による修正を加えた際に、血液凝固異常が回復した場合には、次に、疾患再現マウスを後天的にゲノム編集する治療を実施する。本研究では、その予備的検討のために、AAV による肝臓のゲノム編集の実験系を立ち上げた。残念ながら、本研究期間では、結果を得ることができなかったが、HEK293 細胞の導入、細胞培養実験のセットアップまで完了しており、今後、遺伝子組換え等の関連法規の申請、ベクターの構築、トランスフェクションによるウイルスの作製を実施し、後天的なマウスのゲノム編集を実施する予定である。

考　察

21 世紀のはじめに、全ゲノム情報が解読されている生物はマウスとヒトのみであった。しかしながら、科学技術の進歩により、現在ではイヌを含む 300 種を超える動物の全ゲノム情報が公開されている。全ゲノム情報の公開に加えて、CRISPR/Cas9 を代表としたゲノム編集技術が成熟したことにより、あらゆるゲノム配列を自在に操作することが可能になった［5］。このような科学技術の発展に基づいて、2020 年代には、全ての動物種が分子生物学の研究対象となりつつある。

イヌのゲノムが解読される以前の研究では、遺伝子を研究するためのツールが少ないため、イヌの研究の大半はヒトの疾患に関する知識に基づいて行われていた。現在では、イヌのゲノム解析に必要なリソースが揃い、さらに GWAS を中心としたゲノム解析が普及したことにより、様々な疾患で、犬の遺伝性疾患の遺伝子多型が報告されてきている。本研究で実施した、ゲノム編集マウスを使った、遺伝子変異の同定手法は、イヌの遺伝性疾患の原因遺伝子を同定するために有用なだけでなく、この疾患再現マウスを使った遺伝子治療法の確立に使用できる。残念ながら、本研究期間では、実際のイヌの治療まで到達することができなかったが、マウスを使って病態を解明することに成功し、その治療法のコンセプトを確立することができた。後天的に疾患再現マウスの治療が成功した場合には、そのスケールをイヌまで拡大することで、実際にイヌ症例の治療が可能になると想定している。これらが達成された場合には、初めてのイヌにおけるゲノム編集治療薬を実現することになり、ヒトのゲノム編集治療薬に先駆けて、イヌで新たな治療法を開発することに繋がる。今後、イヌの遺伝性疾患の原因遺伝子および遺伝子変異の同定が進むことで、イヌ疾患の病態解明や遺伝子診断法の開発はもとより、ヒト疾患の克服にも役立つと期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究は、共同研究者の岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科の鬼頭克也教授の協力のもとに実施された。

文　献

1） Creevy KE, Akey JM, Kaeberlein M, Promislow DEL; Dog Aging Project Consortium. An open science study of ageing in companion dogs. Nature. 2022 Feb;602(7895):51-57. doi: 10.1038/s41586-021-04282-9. Epub 2022 Feb 2. Erratum in: Nature. 2022 Aug;608(7924):E33. PMID: 35110758; PMCID: PMC8940555.

2） Shimizu M, Miyawaki S, Kuroda T, Umeta M, Kawabe M, Watanabe K. Erythritol inhibits the growth of periodontal-disease-associated bacteria isolated from canine oral cavity. Heliyon. 2022 Aug 13;8(8):e10224. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10224. PMID: 36051266; PMCID: PMC9424944.

3） Lindblad-Toh K, et al., Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature. 2005 Dec 8;438(7069):803-19. doi: 10.1038/nature04338. PMID: 16341006.

4） Churbanov A, Rogozin IB, Deogun JS, Ali H. Method of predicting splice sites based on signal interactions. Biol Direct. 2006 Apr 3;1:10. doi: 10.1186/1745-6150-1-10. PMID: 16584568; PMCID: PMC1526722.

5） Miyawaki S, Kuroki S, Maeda R, Okashita N, Koopman P, Tachibana M. The mouse Sry locus harbors a cryptic exon that is essential for male sex determination. Science. 2020 Oct 2;370(6512):121-124. doi: 10.1126/science.abb6430. PMID: 33004521.