

切らないゲノム編集による血友病 B に対する新規治療法の開発

平本貴史

自治医科大学 生化学講座 病態生化学部門

【研究の背景】

血液凝固第 IX 因子 (*F9*) 遺伝子異常に起因する出血性疾患である血友病 B は、血液中の凝固因子レベルで治療効果が確認できる点、凝固因子の治療域に幅があり、比較的わずかな血液中の凝固因子の上昇でも QOL の上昇が期待できることから遺伝子治療のよい対象疾患として考えられてきた。CRISPR-Cas9 等によるゲノム編集による治療法は、単回投与で永続的な効果が期待でき、我々もその有効性をマウスモデルを用いて検討を行った¹⁾。しかし、DNA 二重鎖切断 (DSB) を伴うゲノム編集は目的領域に大きな遺伝子挿入・欠損を生じることが報告されている²⁾。近年、「ゲノム切断を伴わないゲノム編集」として脱アミノ基酵素を用いて塩基を変換する「塩基編集」が注目されている。しかし、Cas9 タンパク質が認識・結合する配列である PAM 配列により、塩基編集は編集可能領域に大きな制限を受ける。東京大学の濡木理教授、西増弘志准教授らのグループは、PAM 配列が「G」のみの SpCas9-NG を開発した³⁾。本研究はこの SpCas9-NG を用いて、血友病 B 患者由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の疾患原因遺伝子の修復を行った。

【目 的】

脱アミノ基酵素を結合した SpCas9-NG を用いて、血友病 B 患者由来 iPS 細胞のミスセンス変異の修復を行い、修復効率を野生型 SpCas9 を用いた場合と比較する。また、変異修復した iPS 細胞を単離し、肝臓系細胞へ分化誘導させることにより *F9* 遺伝子発現を検討する。

【方 法】

重症血友病 B 患者の抹消血単核球より、センダイウイルスベクターを用いて、iPS 細胞 (H002 細胞) を樹立した。樹立した iPS 細胞のミスセンス変異近傍にガイド RNA を設計し、SpCas9-NG 及び野生型 SpCas9 の切断効率を解析した。切断が確認できた SpCas9-NG 及び野生型 SpCas9 とガイド RNA の組み合わせに、2 つの脱アミノ基酵素、PmCDA1⁴⁾ と APOBEC1⁵⁾ をそれぞれ単独に結合させ、塩基編集用プラスミドを構築した。その後、H002 細胞に塩基編集プラスミドを遺伝子導入したのち、ゲノム DNA を採取し、次世代シーケンス解析によって塩基編集効率を解析した。塩基編集が確認できた H002 細胞より、変異修復細胞 (H002Cl29 細胞) を単離し、肝臓系細胞に *in vitro* で分化誘導を行った。分化誘導して得られた H002Cl29 細胞由来肝臓細胞を、免疫不全マウスの腎皮膜下に移植し、移植後 12 週目にて移植細胞を採取し、*F9* 遺伝子発現を解析した。

【結 果】

樹立した H002 細胞は患者由来細胞と同様のミスセンス変異 (c.947T>C) を保有しており、また iPS 細胞の未分化マーカーである NANOG、OCT4 の発現が確認できた。我々は変異近傍に 3 つのガイド RNA を設計し、SpCas9-NG、及び野生型 SpCas9 を用いて切断効率を解析した結果、野生型では切断効率が低かったガイド RNA でも、高い切断効率を SpCas9-NG は確認でき、SpCas9-NG による PAM 標的範囲の拡張を確認できた。切断が確認できた SpCas9 とガイド RNA との組み合わせ

せに脱アミノ酵素を結合し構築した塩基編集は、野生型では切断効率が低かったガイド RNA と SpCas9-NG に PmCDA1 を組み合わせたプラスミドにおいて、最も高い変異修復効率が確認できた。この PmCDA1 と SpCas9-NG による塩基編集を行なった H002 細胞から樹立した、変異修復が確認できた H002Cl29 細胞は免疫不全マウス体内において奇形腫形成が確認でき、多分化能を保有していることが確認できた。H002Cl29 細胞を *in vitro* にて肝臓系細胞へ分化誘導を行なった結果、分化誘導開始後 25 日目において、肝臓細胞特異的な遺伝子である、*alpha-fetoprotein*、*albumin*、*cytochrome p450 3a4*、*hepatocyte nuclear factor 4 alpha* の遺伝子発現が確認できた。In vitro 分化誘導後、F9 遺伝子の発現は低かったため、ガンシクロビルを投与した TK-NOG マウス腎皮膜下に分化誘導して得られた H002Cl29 細胞由来肝臓細胞を移植し、移植後 12 週目の組織において高い F9 遺伝子発現が確認できた。

【考 察】

我々の結果より、SpCas9-NG は、野生型と比較して編集可能領域の拡張が見られ、その結果として野生型では塩基編集効率が低い変異に対しても高い編集効率を示した。また、塩基編集によって変異修復を行った細胞において、F9 遺伝子発現が確認でき、塩基編集によって血友病 B の遺伝子修復が可能であることが示された。その一方、野生型では切断が確認できる NGG 配列において、SpCas9-NG は野生型と比較して切断効率が低いことがわかった。また、野生型 SpCas9 を用いた塩基編集の場合と比較して、塩基編集が行われる領域が SpCas9-NG では拡張されていることがわかった。これらの結果より、SpCas9-NG は、野生型と比較しより広域な塩基編集が可能になる一方、野生型で塩基編集可能領域においては編集効率が低下しすることが予想された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

我々が検討した、SpCas9-NG を用いた PAM 自由度の高い塩基編集によって、血友病の点変異修復が可能であることが示された。血友病 B は点変異に起因する割合が高く、本塩基編集は、他の変異に対しても有効であると考えられる。まだ問題点も多いが、塩基編集は血友病のみならず、様々な疾患に対して有効な遺伝子治療法となりうる。

【参考・引用文献】

- 1) Ohmori T. et al. Sci. Rep. 7: 4159 (2017).
- 2) Kosicki M., et al. Nat. Biotechnol. 36: 765-771 (2018).
- 3) Nishimasu H., et al. Science 361: 289-292 (2018).
- 4) Nishida K., et al. Science 353: aaf8729 (2016).
- 5) Komor AC., et al. Nature 533: 420-424 (2016).