

エピゲノム編集技術を用いたレット症候群の新規治療法の開発研究

堀家慎一

金沢大学疾患モデル総合研究センター

【研究の背景】

レット症候群は、主に女兒に発症する神経発達障害で、乳児期からの姿勢運動の障害、知的発達障害、特徴的な常同運動、退行を特徴とし、年齢依存性にてんかんなどのさまざまな症状を呈する。原因遺伝子として、1999年に Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) が報告され、2003年に Cyclin-dependent Kinase like 5 (CDKL5) が報告された。いずれの遺伝子も、その遺伝子産物の機能的喪失 (loss of function) により発症する。MeCP2 は、DNA メチル化を認識し、結合することで下流に位置する標的遺伝子の転写を制御する転写因子である。これまでに、レット症候群における多彩な症状を説明するために、MeCP2 によって制御をうける標的遺伝子の探索が世界中で精力的に行われており、我々も MeCP2 の標的遺伝子として、DLX5 遺伝子の同定に成功した。(Horike S. et al., *Nature Genetics*, 2005) しかしながら、MeCP2 の標的は数十から数百遺伝子存在するとされ、それぞれの標的遺伝子に関連した治療薬などの開発は現実的でなく、これまでも様々な化合物やペプチドを使用した治療薬の開発が試みられてきたが、十分な有効性が認められたものはない。(Yasui D.H. et al., *Human Molecular Genetics*, 2011) CDKL5 についても、同様に、その標的リン酸化基質の多様性から治療薬の開発には至っていない。そのため、現時点では症状別による対処療法として、運動に対して理学療法・作業療法、言語に対する言語療法、痙攣に対して抗けいれん薬の調整、側弯に対するコルセット使用・整形外科的治療が試みられており、根本的な治療方法の開発には至っていない。このように、レット症候群には、現在のところ有効な治療法がないため、家族の不安と動揺は計り知れず、家庭や社会生活上の問題を抱え医療ニーズが非常に高い。

【目的】

原因遺伝子として、1999年に Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) が報告され、2003年に Cyclin-dependent Kinase like 5 (CDKL5) が報告された。いずれの遺伝子も、その遺伝子産物の機能的喪失 (loss of function) により発症する。さらに、これらの遺伝子は X 染色体上に存在することから、その遺伝子異常は X 染色体不活化 (XCI) の影響を受け、臨床症状の軽重を左右する。 (遺伝子変異を持つアレルの skewed な不活化は、比較的軽い症状をもたらし、逆に、正常アレルの skewed な不活化はより重篤な症状を引き起こす。また、これら遺伝子のゲノムコピー数の増加は MeCP2 重複症候群や CDKL5 重複症候群という重篤な疾患を引き起こすことから、健やかな子どもの脳の発達には適切な時期に適切な量の MeCP2 や CDKL5 が重要であると示唆されている。近年、様々な遺伝病に対する遺伝子治療の研究が世界中で進められており、RTT 患者家族の間においても遺伝子治療への期待が非常に大きくなっているが、RTT のような正確な遺伝子量コントロールが要求される疾患に対しては、遺

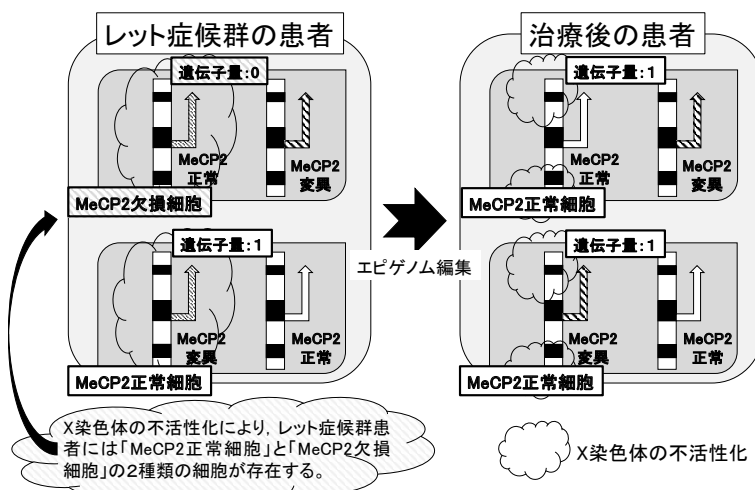


図1 エピゲノム編集技術によるレット症候群治療への可能性

伝子量の量的制御という課題から実現に至っていない。また、図1に示すように、RTT患者において全ての細胞がMeCP2変異を持つにもかかわらず、XCIにより機能的には「MeCP2正常細胞」と「MeCP2欠損細胞」の2種類の細胞がモザイク状に存在する。アデノ随伴ウイルス等を用いた現在の遺伝子治療において、「MeCP2欠損細胞」特異的に遺伝子導入する術はないことから、既存の遺伝子治療に変わる新たな治療戦略が求められている。そこで、我々は「MeCP2欠損細胞」においてXCIにより不活化されている正常MeCP2遺伝子をエピゲノム編集技術により再活性化させることができれば、副作用のない安全なRTT治療法を確立できると考えた。本研究では、不活化X染色体上のヘテロクロマチン化されたMeCP2遺伝子領域のみをユークロマチン化し、正常MeCP2遺伝子を再活性化されるために最適なCRISPR/dCas9-TET、ガイドRNA、化学物質の組み合わせを模索することで、RTTに対するエピゲノム編集治療法を確立する。

【方 法】

一つのガイドRNA(gRNA)は、ターゲット領域近傍100~200bpの領域を脱メチル化することに寄与する。そこで、MECP2遺伝子の発現に寄与する最小脱メチル化領域を絞り込み、治療に最適なgRNAの数とターゲット領域を決定する。これまでの研究で、図2に示すようにMECP2遺伝子の転写開始点近傍は不活性化X染色体上であってもメチル化されておらず、むしろMECP2遺伝子の転写開始点から数百ベース上流のCpGアイランドショアと呼ばれる領域がメチル化を受け、MECP2遺伝子の転写に重要である可能性が示唆されている。興味深いことに、これらの領域は共同研究者のLaSalle教授(UC Davis)らが以前、自閉症患者で有意にメチル化されていることを報告した領域とも重なる。本研究で、脱メチル化率の評価には独自の不活性化ヒトX染色体を一本保持したマウス雑種細胞を用い、パイロシーケンシング法でMECP2遺伝子のプロモーター領域のCpGのメチル化率を定量的に解析する。

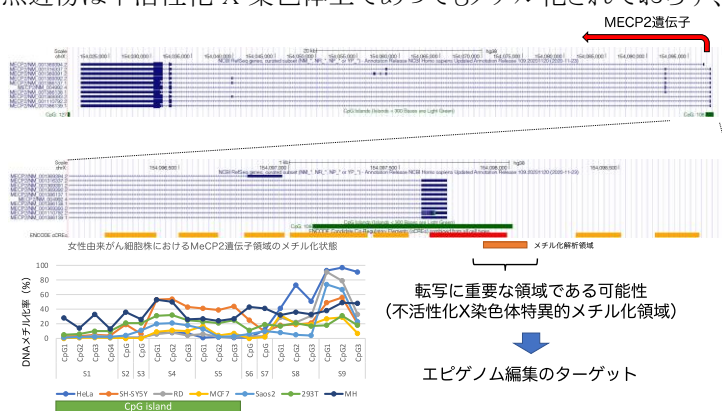


図2 MeCP2遺伝子上流領域のメチル化状態の解析

【結 果】

MeCP2遺伝子の転写調節領域に関しては、ルシフェラーゼアッセイによりMeCP2転写開始点から「-179bp~-309bp」の領域がMeCP2遺伝子のコアプロモーター領域であることを明らかにした。また、このコアプロモーター領域内の6つのCpGが不活性化X染色体特異的にメチル化されていることを見出した。そこで、この6つのCpGをエピゲノム編集のターゲットとし、4つのガイドRNAを設計し脱メチル化効率を神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞にて精査した。その結果、gRNA4を用いた際、約15~20%の脱メチル化が誘導され(図3A)、それに伴い、MeCP2遺伝子の発現が1.3倍に上昇することを明らかにした。(図3B)また、一つのガイドRNAは、ターゲット領域近傍100~200bpの領域を脱メチル化することに寄与することが知られている。単独のgRNAでは脱メチル化効果が小さいものでも、組み合わせによって脱メチル化効果をもたらすものを見出した。そこで、今後MeCP2遺伝子の発現に寄与する最小脱メチル化領域を絞り込み、治療に最適なgRNAの組み合わせを決定する。

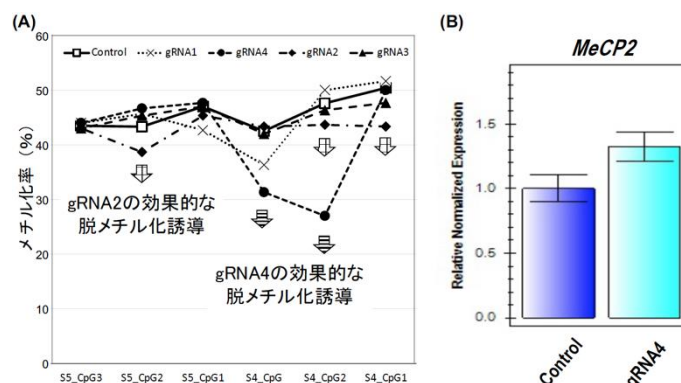


図3 脱メチル化効率の高いガイドRNAの選択

【考 察】

本研究では、MeCP2遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化を対象としたエピゲノム編集を行ってきた。その結果、

CRISPR-dCas9-TET (dCas9 に脱メチル化酵素 TET を融合したもの)の長期的な作用により部分的な脱メチル化と MeCP2 遺伝子の再活性化が認められた。しかしながら、その効果は非常に限定的であり、且つ、50 日程度の培養時間を要することからエピゲノム編集治療への応用は不適であると考えられた。そこで、今後、より可逆性の強いエピゲノムであるヒストン修飾 (H3K9 のメチル化、H3K27 のメチル化)に着目し、CRISPR-dCas9 システムをベースに、JmjN+JmjC (H3K9 の脱メチル化酵素部位)、JmjC (H3K27 の脱メチル化酵素部位)を MeCP2 遺伝子/CDLK5 遺伝子領域に作用させることを計画している。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

新しく開発した CRISPR 脱メチル化システムによるエピゲノム編集を RTT の治療に応用することで、これまで困難であった RTT の根本的治療のブレイクスルーとなることが期待できる。この治療法は、RTT が本来持つ正常な MECP2 を利用しており、これまで課題となっていた外来 MECP2 の量的なコントロールの問題が回避できる。また、本研究で目指すのはエピゲノム修復であり、ゲノム編集による遺伝子変異の修復のように患者ゲノムを直接傷つけることがないため、CRISPR/Cas9 システムで問題となるオフターゲット変異による副作用も考慮する必要がない。本研究の成果は、新しい治療法を提案し、RTT 患者及び患者家族に光明をもたらすことが期待される。本研究終了後の 5 年後、本研究で開発したエピゲノム編集治療が少なくともレット症候群患者へ臨床応用されるように、本支援終了後も AMED 等の大型外部資金を継続的に獲得することで先天性疾患であるレット症候群の治療方法の確立を目指す。

【参考・引用文献】

- 1) **Horike S**, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T. (2005) “Loss of Silent Chromatin-Specific Looping and Impaired Imprinting of DLX5 in Rett Syndrome.” *Nature Genetics*, 37, 31-40.
- 2) Yasui D.H., Scoles H.A., **Horike S**, Meguro-Horike, M., Dunaway, K.W., Schroeder, D.I., LaSalle, J.M. (2011) “15q11-13 chromatin organization reveals epigenetic regulation of CHRNA7 and deficiencies in Rett and autism brain.” *Human Molecular Genetics*, 20, 4311-4323.