

■受領No.1350

生体内ゲノム編集技術を用いた難治性遺伝病に対する テーラーメイド医療技術の開発

代表研究者

鈴木 啓一郎 大阪大学大学院基礎工学研究科 教授



1. 研究目的

主としてある一つの遺伝子（単一遺伝子）に生じた変異が原因となり発症する疾患を遺伝子疾患と呼び、ヒトでは10,000以上の遺伝子疾患が存在すると推測されている。多くの場合、疾患変異が次世代の子や孫に遺伝する遺伝性の疾患であり、自覚症状のない重症度の低いものを含めると、100人に1人の割合で先天的に遺伝子疾患を持つと考えられている。しかしながら、ほとんどの遺伝子疾患に対しては、変異を起こした遺伝子の機能を補完しない限り、症状を改善・根治することは不可能であり、現状では有効な治療法は存在していない。

近年、CRISPR-Cas9に代表される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』が登場し、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）など、様々な細胞種・生物種でゲノム配列をデザイン・改変する『ゲノム編集』が可能となった。特に遺伝子ノックイン技術は標的配列を自由自在に改変することができる汎用性の高い技術であり、遺伝子変異を体内で直接修復する治療への応用も期待されるようになった。しかしながら、『相同組換え』と呼ばれる細胞が持つDNA修復経路を利用した既存の遺伝子ノックイン技術は、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。つまり、

多くの細胞が分裂を止めた非分裂細胞状態にある生体内で有効な遺伝子ノックイン技術は存在しておらず、次世代技術としてその開発が期待されていた。

こういった背景の中、研究代表者が2016年に発表した非相同末端結合（NHEJ）機構と呼ばれる別のDNA修復経路とCRISPR-Cas9を利用した生体内非分裂細胞への遺伝子ノックイン技術「Homology-Independent Targeted Integration (HITI)」は、これまで困難であった生きたマウスの脳・筋肉など非分裂細胞にて標的ゲノム配列を自由に改変する世界初の技術であった。本技術の登場により、生体内の病変部位で疾患変異を直接修復することが可能となり、実際に遺伝性疾患である網膜色素変性症モデルラットの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、HITI法による遺伝子ノックインは、現時点では適応となる組織・器官は限定的であり、ゲノム編集効率が低いこと、また安全性の検討も十分になされていない事が課題であった。本研究では、研究代表者が開発したHITI技術を安全性と自由度に特化し評価・改良することで、将来的に医療応用可能なテーラーメイド型のゲノム編集治療法の確立を目指す。

2. 研究内容

本研究課題では、具体的に以下の 2 点に焦点を絞り研究を進めた。

2.1. 研究目標 1: 効率的な HITI 技術の開発

これまでに報告された HITI 法を用いた遺伝病モデル動物の治療対象組織は網膜のみであった。本研究では、対象とする標的を様々な組織とするため、病的に老化が促進する早老症マウス対してアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを経静脈的し HITI 法を用いた全身性の治療を試みた。結果として、全身性で老化の表現型の緩和、短縮した寿命を延長することができることを確認した (Suzuki et al, Cell Res In press)。

2.2. 研究目標 2: HITI 技術の安全性の検討

上記の HITI 法により治療した早老症マウス対して、標的配列以外に外来遺伝子が組み込まれる予期せぬ変異 (オフターゲット作用) を調べた。その結果、肝臓と心臓において発現量の多い遺伝子座に外来遺伝子が組み込まれている可能性が示唆されたが、その効率は非常に低く、腫瘍形成など異常な症状は観察されなかった (Suzuki et al, Cell Res In press)。

以上の結果より、HITI 法を用いることによって局所性、全身性の遺伝性疾患の症状を緩和することが明らかになった。今後更なる遺伝子修復効率・安全性の改善を目指すことで、より根治性の高いテーラーメイド型の難治性遺伝病治療法の開発を行っていきたいと考えている。

3. 発表 (研究成果の発表)

【論文】

(1) 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* in press
Corresponding author

【招待講演】

- (1). Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, M., Wu, J., Matsuzaki, F. and Izpisua Belmonte, J.C. Development of targeted gene knock-in method in non-dividing cells. 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience (Nara, Japan, 2018 May)
- (2). Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, M., Wu, J. and Izpisua Belmonte, J.C. Genome-editing therapy via HITI (Homology-Independent Targeting Integration) method. Stem Cell Symposium Regenerative medicine at a glance (Singapore, 2018 May)
- (3). Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, M., Wu, J. and Izpisua Belmonte, J.C. Genome-editing therapy via HITI (Homology-Independent Targeting Integration) method. 24th Annual Meeting of JSGCT 2018 (Tokyo, Japan, 2018 July)
- (4). Suzuki, K. Therapeutic application of in vivo genome editing method “HITI”. KAIST Symposium : Cutting Edge in Life Science, (Daejeon, Korea, 2018 November)