

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 遺伝子治療ならびにゲノム編集に適した新規ウイルスベクターの開発
(英語) Development of novel viral vector for gene therapy and genome editing

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 三谷 幸之介
(英語) Kohnosuke Mitani

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 学校法人埼玉医科大学・医学部・教授
(英語) Saitama Medical University・Faculty of Medicine・professor

II 研究開発の概要

遺伝子治療やゲノム編集治療の臨床プロトコールの多くではアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) が用いられている。しかし、AAV は導入できる DNA サイズが 4.5 kb までという制約がある。そこで本研究では、この弱点を補う新規ベクターを開発した。新規ベクターの新たなゲノム編集技術である prime editing (PE) のためのベクターとしての有用性と、大きな DNA を鋳型として運べる遺伝子修復ドナーベクターとしての有用性を検証した。さらに、X 連鎖重症複合免疫不全症 (SCID-X1) モデルマーマーモセットを対象とした、*ex vivo* ゲノム編集治療への応用の可能性について検討した。

(1) 新規ベクターの遺伝子発現ベクターとしての解析

- レポーター遺伝子である CAG-Venus の発現カセットを持つ新規ベクターを産生した。K562 細胞において、AAV やアデノウイルスベクターと比べて約 3 倍の高レベルで遺伝子を発現した。
- prime editor (PE2) cDNA と変異 Venus に対する修復 pegRNA をコードするベクター、ヒト *HPRT* 遺伝子座 exon 6 をノックアウトする gRNA と SpCas9 とをコードするベクター、SARS-CoV-2 の Spike, M, E 遺伝子を同時に発現するベクター、ヒト遺伝病の原因遺伝子の cDNA を発現するベクターなど、計 14 種類の遺伝子治療ならびにゲノム編集用新規ベクターを産生した。
- 様々な細胞や遺伝子導入法での PE 効率を容易に定量化できる、変異 Venus 遺伝子を作製した。このレポーター遺伝子を染色体上に組み込んだ種々のヒト細胞株を樹立した。
- 産生した PE2 ベクターを用いて A549 細胞で変異 Venus レポーター遺伝子を標的とした PE の効率を検討した。これまでに報告されてきた効率の中でも最高レベルの 50.2% の修復効率を達成した。また、ヒト白血病細胞株 K562 で 27.2%、ヒト iPS 細胞でも 25.7% と、非常に高い効率で PE に成功した。
- AAV にはクローニングできない大きな遺伝子サイズの PE2 を新規ウイルスベクターから強発現し、効率良く PE を得られることがわかった。ゲノム編集治療の臨床応用に向けて、一つのオプションとなることが期待される。

(2) 新規ベクターのドナーベクターとしての解析

- intron 4 にネオマイシン耐性遺伝子 (neo) が挿入されたヒト *IL2RG* 遺伝子座をコードした新規ベクターと、同じ *IL2RG* 相同配列をコードする AAV を作製した。ヒト白血病 K562 細胞株に標的配列に対する CRISPR 複合体を電気穿孔法で導入した後に、修復ドナー DNA をコードしたこれらのベクターを感染させて、neo 配列の染色体組込みの頻度と相同組換え修復 (HDR) による正確な組込みの頻度を測定した。1 コピーのみが挿入される正確な HDR は AAV では全細胞の 18% であったが、新規ベクターでも 10% で達成可能なことが示された。
- 一方、新規ベクターの方が AAV よりも不正確な HDR を生ずる割合が高かったため、それを除去するためにヒト *IL2RG* 遺伝子相同配列の外側にネガティブ選択遺伝子をコードする修復ドナー AAV を作製した。このベクターを用いて K562 細胞で解析したところ、不正確な組込みを含む細胞の割合は全組込みのうち 54% から 33% と減少した。
- ヒト CD34 陽性細胞においても、同様の方法で *IL2RG* exon 2 に対するゲノム編集を行った。液体培養において FACS にて染色体組込み頻度を測定すると、AAV では染色体組込みの割合は約 40% で、新規ベクターにおいては 10% を下回った。ヒト CD34 陽性細胞における遺伝子修復効率の低さは、ベクターが複数コピー繋がって組み込まれる現象が原因の一つとして考えられた。そこで、細胞内でモノマーになるよう設計したベクターを作製した。
- K562 細胞株を用いて、CRISPR 複合体を電気穿孔法で導入した後にこのドナーベクターを感染させ、さら

に、ベクターのモノマー化に加えてある低分子化合物で処理した。その結果、AAV では染色体組込みの割合が 35%から 86%へ、新規ベクターでは 10%から 60%へと飛躍的に上昇し、そのほとんどが正確な HDR であるという結果を得た。

- ゲノム編集における HDR に関して、染色体に組み込まれたドナーDNA の詳細な解析は、これまでにほとんどされていない。私達は、詳細な PCR 解析によって、一見成功に見える HDR の半分以上は、ドナーDNA が複数繋がっていることと、またそれを防止して HDR 効率を改善する方法を開発した。今後、臨床応用において安全で高効率な HDR を達成するために重要な知見である。

(3) SCID-X1 マーモセットモデルを用いた遺伝子修復治療

- マーモセット造血幹前駆細胞の細胞超免疫不全 NOG-W41 (c-Kit KO) マウスへの移植条件検討では、CD117 陽性細胞を 2 匹のマウスに移植したが、移植後 4 週間後で死亡し、MACS で除去しきれなかった T 細胞による移植片対宿主病 (GVHD) が原因と考えられた。ヒト CD34 陽性細胞を移植した場合には、高い割合 (末梢血で 50%以上) の生着を確認し、T cell を含めた各 lineage の細胞も確認できている。GVHD の問題を解決するために、ヒト CD34 陽性細胞を用いて前処置の busulfan 濃度を比較して、12.5mg/kg を至適条件と決定した。
- 感染症に極めて弱い SCID-X1 モデルマーモセットからの骨髄採取を目標としていることから、膝関節経由での骨髄採取法と、尾静脈への静脈留置針による血管確保技術を開発した。また、末梢血の採取は大腿静脈での実施が望ましいということが判明した。
- SCID-X1 マーモセットの作出実験については、令和 2 年 8 月に 2 匹の個体を獲得した。遺伝子検査の結果、そのうちの雄 1 匹が SCID-X1 マーモセットであったが、令和 3 年 6 月に 11 月齢で死亡した。そこでさらに 2 匹の妊娠マーモセットを得て、令和 3 年の 9 月に個体が誕生した。

Many clinical protocols for gene therapy and genome editing therapies use adeno-associated viral vectors (AAV). However, the upper size limit of exogenous DNA in AAVs is 4.5 kb. In this project, we developed a novel vector to overcome this limitation. We verified the usefulness of the new vector as a vector for prime editing, a new genome editing technology, and as a donor vector that can carry large DNA for precise DNA repair. Furthermore, the potential application for *ex vivo* genome editing therapy in the X-linked severe combined immunodeficiency disease (SCID-X1) marmoset model marmoset was examined.

(1) Analysis of novel vectors as gene expression vectors

- prime editor (PE2) cDNA and a vector encoding a repair pegRNA for a mutant Venus gene, a vector encoding a gRNA to knock out exon 6 at the human HPRT locus and SpCas9, a vector simultaneously expressing Spike, M, and E genes of SARS-CoV-2, vectors expressing the large cDNAs of the causative genes of human genetic diseases were constructed and propagated as vital vectors.
- The efficiency of PE targeting the mutant Venus reporter gene was examined in A549 cells using the PE2 vector produced. We achieved a repair efficiency of 50.2%, the highest efficiency reported to date. PE was also successfully achieved with very high efficiency of 23.5% in the human leukemia cell line K562 and 25.7% in human iPS cells.

(2) Analysis of new vectors as donor vectors

- A novel vector encoding the human IL2RG locus with a neomycin resistance gene (neo) inserted into intron 4 and an AAV encoding the same IL2RG homologous sequence were created. The frequency of homology-directed repair (HDR) were measured in the human leukemia K562 cell line with these vectors after electroporating the CRISPR complex for the target sequence. The precise HDR in which only one copy is inserted was 18% of all cells for AAV, and was 10% with the new vector.
- For HDR in genome editing, there has been little detailed analysis of the donor DNA incorporated into the chromosome. Through detailed PCR analysis, we found that more than half of seemingly successful HDRs involve multiple donor DNA. Therefore, we created a vector designed to become a monomer in the cell. The K562 cell line was infected with these donor vectors after electroporating the CRISPR complex, and further treated with DNA repair inhibitors. This resulted in a dramatic improvement in the efficiency of HDR from 35% to 86% for AAV and from 10% to 60% for the novel vector.

(3) Gene repair therapy using SCID-X1 marmoset model

- In an examination of conditions for transplantation of marmoset hematopoietic stem progenitor cells into cellular hyper-immunodeficient NOG-W41 (c-Kit KO) mice, CD117 positive cells were transplanted into two mice, which died around 4 weeks after transplantation, probably due to graft-versus-host disease (GVHD) caused by T cells not fully removed by MACS. To solve the problem of GVHD, pretreatment by busulfan at 12.5 mg/ kg was determined to be optimal.
- We developed a bone marrow collection method via the knee joint and a vascularization technique using an indwelling vein needle in the tail vein. It was also found that peripheral blood collection should be performed in the femoral vein.

As for the SCID-X1 marmoset breeding experiment, two individuals were obtained in August 2020. Genetic testing showed that one of the males was a SCID-X1 marmoset, but he died in June 2021 at the age of 11 months. Two more pregnant marmosets were obtained, and an individual was born in September of 2021.