

【報告様式A】

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 機能予測と安全を担保したゲノム編集造血幹細胞による遺伝子治療技術の開発
(英語) Development of Genomic Editing Hematopoietic Stem Cell-based Gene Therapy
Technology Ensuring Functional Prediction and Safety

研究開発実施期間：令和3年5月10日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 山崎 聡
(英語) Yamazaki Satoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 筑波大学 医学医療系 教授
(英語) Laboratory of Stem Cell Therapy Faculty of Medicine University of Tsukuba Professor

II 研究開発の概要

現在までに世界では造血幹細胞（HSC）を用いた血液疾患への遺伝子治療が実施されている。2000年代初めにはレトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いて HSC に正常な遺伝子を強制発現させて補完する方法が実施されてきた。これまでも、国内において慢性肉芽腫症の患者を対象に臨床研究が行われた実績がある。一方で、最近ではゲノム編集技術を用いた遺伝子治療研究が加速化しており、ゲノム編集技術はウイルスを用いた強制発現系とは異なり、異常な遺伝子の領域を正常な配列に修正するため、健常者と同等のレベルに遺伝子の発現を回復できる可能性がある。そのため、将来的にはゲノム編集技術を用いた強力な遺伝子治療が実現できると期待されている。しかし、ゲノム編集した HSC が正常に機能し、かつ、ゲノム編集後の全ゲノムの安全性が担保されていることを解析した上で患者へ必要十分な HSC を移植するプロセスの実現には、HSC が多能性幹細胞のような幹細胞性を維持したまま細胞増幅が可能である培養方法の開発が必須であり、実現を阻んでいた。哺乳類 HSC の生体外増幅技術開発の挑戦は歴史が古く、その技術は切望されたため、多くの研究グループが多大な資金を投じたが、実現不可能であると考えられていた。我々はマウス HSC を用いた研究から世界で初めて哺乳類 HSC を 1000 倍近く増幅可能な培養技術を開発した (Wilkinson 2019, Nature)。また、この培養技術はマウス HSC を 1 ヶ月以上もの間、未分化な状態を維持し増幅可能になったことから多能性幹細胞と同様な細胞加工技術が行えるようになった。重要な点として、本研究を開始する以前にマウス HSC に限らず、機能的なヒト造血幹前駆細胞も長期間培養により幹細胞性を維持したまま、数十倍増幅可能になっていた。以上のように我々はマウス造血幹細胞を用いた実験から“機能予測と安全を担保したゲノム編集 HSC による免疫不全疾患に対する遺伝子治療モデル”を構築できうるのではと考え本課題を計画的に遂行した。具体的な提案としては遺伝子に変異がある免疫不全 (Scid) マウスの生体内から HSC を分取し 1 週間増幅させ、その細胞集団へ CRISPR-Cas9 システムにより 1 塩基を正常の塩基へ編集する。この状態で移植する試みは幾つかの研究グループが行っているが、申請者はゲノム編集した後の造血幹細胞をさらに増やし、その後、骨髄再構築能に長けている高機能 HSC を予測し 1 細胞ソートする。そして、再度増幅することでクローナルな HSC 集団として一部の細胞はゲノムの安全性試験へ、一部は移植へ用いるというスキームを完成させている。この技術は組織幹細胞を用いたゲノム編集分野でも世界最先端であり、本研究期間で、同様のスキームを実際にヒト造血幹細胞により構築し、達成することを大きな目的とし研究を行なった。

研究期間の前半において、ヒト造血幹前駆細胞においてサイトカインを用いず長期間での培養と増幅に成功し、さらには PVA とは異なる新たなポリマーを同定することでヒトの造血幹前駆細胞を数十倍以上に安定して増幅することを可能にした。このヒト造血幹前駆細胞の増幅技術とゲノム編集技術を融合することで“機能予測と安全を担保したゲノム編集造血幹細胞による遺伝子治療技術の開発”という次世代の遺伝子治療の確立を目標とし研究をよりスムーズ遂行することができた。本研究で開発された技術は、世界で行われているゲノム編集技術を用いた造血幹細胞の遺伝子治療とも比べて独自性に富んだ日本発の技術あることは間違いなく、ヒト造血幹細胞が多能性幹細胞と同等に扱える可能性が期待できた。本研究課題において得られた成果は複数あり、以下に記載することができる。

1) ヒト HSPC を対象としたゲノム編集技術の確立

我々はヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞へ CRISPR-Cas9 システムと一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) による 1 塩基置換法によりゲノム編集を行い、その後、ヒト造血幹前駆細胞が機能を維持し増幅す

ることを実験的に明らかにした。実験モデルとしては、ヒト血液型を決定する一塩基多型 (SNP) に着目し、ABO 型を決める A および B 型糖転移酵素を発現する遺伝子にゲノム編集技術を適応することで根本的な技術の確度を明らかにした。ABO ゲノム編集を行なったヒト造血幹細胞は重症免疫不全を示す NOG マウスへ移植し、ゲノム編集されたヒト CD34 陽性細胞の中にゲノム編集された機能的な造血能を有していることを示した。以上の実験により、CRISPR-Cas9 システムにおける gRNA デザイン、エレクトロポレーション法、ssODN に関する最適な条件を構築した。

2) 1 細胞からの増幅による高機能造血幹細胞の予測

我々はマウス造血幹細胞において 1 細胞から増幅した細胞表面マーカーの解析によって高機能な造血幹細胞の予測が可能にしていることから、この技術をヒトへ適用することで、ゲノム編集後の安全かつ機能的な遺伝子治療への基盤を構築した。具体的な研究成果として、ヒト CD34 陽性細胞からのゲノム編集→増幅→機能予測 1 細胞分取→NOG マウスへ移植を行い、ゲノム編集造血幹細胞の 1 細胞からの増幅と機能予測評価系を確立させた。

3) ゲノム編集造血幹細胞の機能、安全性評価と環境整備

ゲノム編集された CD34 陽性細胞がゲノムの安全性を保ち、染色体異常、白血病化を起こさないことが重要な評価項目となる。そこで、ゲノム編集をした後に 30 日間培養する間の複数のポイントで経時的に細胞を分取し、ゲノムを抽出して全ゲノムシーケンスを行うことでオフターゲット効果やゲノム変異の有無を解析した。同時に、G バンド法による染色体解析、白血病化に関わる遺伝子群に注目した解析を行なった。さらに NOG マウスへ移植した際にも半年—1 年間経過観察と解析を行うことで白血病化のリスクが無いことを血液検査や病理検査により明確に明らかにした。これらの評価等は臨床医学研究開発機構(T-CreD0)の支援のもと臨床研究を視野にいれた環境作りを行い、臨床応用も見据えた議論を行なった。また、筑波大学附属病院に設置している細胞加工施設 (CPF) を使用することを目的とした講習はもちろん、実際に臨床応用に向けた凍結臍帯血パックからの CD34 陽性細胞の分離から培養までを基礎研究よりもグレードの高い方法により実施した。これらの作業から実際に複数の問題や改善点が理解できたことから、今後は実際に CPF 内で細胞を加工するという新たな目的が挙げられた。

本研究課題期間内に研究計画に沿って実験を遂行し達成できたことから、ヒト造血幹細胞におけるゲノム編集を用いた遺伝子治療のプラットフォームが確立できたと考えている。強みとしては、独自に開発したヒト造血幹細胞の長期培養方法があり、世界には優位な造血幹細胞の遺伝子治療モデルを確立することが可能になると想定している。一方で、ヒトの造血幹細胞を評価するシステムが現在では重症免疫不全マウス (NOG および NSG マウス) の系しかないことは問題であると考えている。それは、NOG マウスなどにヒト造血幹細胞を移植することで“正着率”が実際のヒトと同様ではない点である。具体的には、NOG マウスの生体内にヒト造血幹細胞が正着しても B 細胞がほとんどの分画を示すこと、また赤血球や血小板はマウスの末梢血内で検出できないことである。今後は異種移植におけるヒト造血幹細胞の評価系を確度の高いシステムにすることは必須であり、細胞の加工、調整も大きな課題であるが、細胞の評価系においても革新的なシステム構築が重要であると確信したことから、評価分野においても研究を引き続き続けたいと考える。最後に、本技術により、体細胞の 1 つである造血幹細胞が ES、iPS 細胞など多能性幹細胞と同等に加工できることを意味している。本提案技術を世界へ先駆けて確立し発信することは再生医療、遺伝子、細胞治療分野にとって我が国の強みであり、将来的に日本から世界へ大きく展開することが可能であると確信している。

We have successfully achieved long-term culture and expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells without the use of cytokines. Furthermore, by identifying a new polymer distinct from PVA, we have enabled over 50-fold expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. Our goal was to integrate this expansion technique with genome editing technology to establish the next generation of gene therapy called "Functional and Safe Genome-Edited Hematopoietic Stem Cell Therapy," with a focus on predicting functionality and ensuring safety. The developed technology in this study is undoubtedly a unique Japanese contribution to the field of genome-edited hematopoietic stem cell therapy, distinguishing itself from the ongoing genome editing techniques worldwide. The potential to treat human hematopoietic stem cells as pluripotent stem cells equivalent is highly promising.

The achievements obtained in this research project include:

Establishment of genome editing technology targeting human HSPCs:

We conducted genome editing using the CRISPR-Cas9 system and single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) base editing method on human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells. We experimentally demonstrated that human hematopoietic stem and progenitor cells can maintain functionality and undergo expansion after genome editing. As a specific example, we focused on a single nucleotide polymorphism (SNP) determining the human blood type and clarified the fundamental technical accuracy by applying genome editing to the genes expressing A and B transferases that determine the ABO blood group. We transplanted ABO genome-edited human hematopoietic stem cells into NOG mice with severe immunodeficiency and demonstrated the presence of genome-edited functional hematopoietic capacity within the human CD34-positive cells. Through these experiments, we established optimal conditions for gRNA design in the CRISPR-Cas9 system, electroporation method, and ssODN.

Prediction of high-functioning hematopoietic stem cells through expansion from a single cell:

By analyzing cell surface markers expanded from single mouse hematopoietic stem cells, we developed the ability to predict high-functioning hematopoietic stem cells. We applied this technique to humans, establishing a foundation for safe and functional gene therapy after genome editing. As a specific research outcome, we performed genome editing, expansion, single-cell prediction of functionality, and transplantation into NOG mice using human CD34-positive cells. This established a system for expansion from a single cell of genome-edited hematopoietic stem cells and functional prediction.

Functional and safety evaluation of genome-edited hematopoietic stem cells and environmental preparations:

It is crucial to evaluate the safety of genome-edited CD34-positive cells, ensuring genome stability, absence of chromosomal abnormalities, and prevention of leukemogenesis. Therefore, we performed sequential sampling of cells at multiple time points during a 30-day culture after genome editing, followed by whole-genome sequencing of extracted genomes to analyze off-target effects and the presence of genomic mutations. Additionally, we conducted chromosome analysis using the G-band method and focused on the analysis of gene groups associated with leukemogenesis. Furthermore, we performed long-term observation and analysis for six months to one year after transplantation into NOG mice to clearly demonstrate the absence of leukemogenesis through blood and pathological examinations.

Using this established system, we hope that establishing and disseminating the results technology ahead of the rest of the world is one of Japan's strengths in the fields of regenerative medicine, gene therapy, and cell therapy.