

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業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) ムコリピドーシス (ICD) を対象とした CRISPR-Cas3 系ゲノム編集技術により作製した胎児付属物由来造血幹細胞製剤の POC 取得
(英語) Establishment of POC for regenerative medicine products made by CRISPR-Cas3 genome editing technology for Mucopolysaccharidosis

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) 福原康之
(英語) Yasuyuki Fukuhara

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語)

機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

所属・役職：遺伝診療センター遺伝診療科・医長

(英語)

National Center for Child health and development

Division of medical genetics

II 研究開発の概要

ムコリピドーシス (ML II/III, ICD) は、ライソゾーム酵素修飾障害に分類され、多くのライソゾーム酵素に結合するライソゾーム移行シグナル、マンノース 6-リン酸残基の生合成を司る転移酵素 (*GNPTAB*) の変異により、30 種類以上のライソゾーム酵素が機能欠損することにより引き起こされる。これら全てを含む酵素製剤の開発は困難であることから、酵素補充療法の対象外と見なされている。造血幹細胞移植を主とした細胞移植治療は、酵素補充療法では治療できない先天性代謝異常疾患群に対する唯一の根治治療法であり、ML II/III に対しても一定の効果があることが、米国、ドイツ、日本等の研究者により報告されている。しかし、骨髄移植の場合、ドナー不足の問題や、移植の際の前処置、生着不全、GVHD 等の安全性の問題ある。

米国主導で 2012 年に初めて開発されたゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 は、培養細胞や微生物、植物やモデル動物において遺伝子を効率的に改変できることから、世界中の研究者に利用されている。一方、CRISPR-Cas9 は、1) 標的配列以外のゲノム領域を誤って切断してしまうオフターゲット変異、2) 変異細胞と野生型細胞が混ざったモザイク変異、3) 標的ゲノム配列がリピートやヘテロクロマチン構造内などの切断されにくい配列などの技術的課題や、4) 知的財産の多くが米国に押さえられているため、日本国内で開発したモデル動物やゲノム編集による遺伝子治療法の開発、利用が制限されるなどの課題が存在している。研究分担者の真下らは、世界で初めて、Class 1 (Type I) に属する大腸菌由来 CRISPR-Cas3 を用いて、ヒト細胞 (真核細胞) において CRISPR-Cas9 のようにゲノム編集ができることを発見した (Morisaka et al. Nat Commun 2019)。遺伝子治療などの医療応用には、標的配列以外のゲノム領域を誤って切断してしまうオフターゲット変異を引き起こさないかが重要である。CRISPR-Cas3 は、CRISPR-Cas9 に比べ、配列特異性が高くオフターゲット変異という観点では長じていることに加え、研究分担者 (真下) がすでに基本特許を取得しており、既に国産ゲノム編集技術プラットフォームを確立しているという研究推進上のアドバンテージがある。

我々は、ML II/III を対象として、CRISPR-Cas3 によるゲノム編集技術を応用し、患者本人の細胞を Ex vivo で遺伝子治療し、その正常化細胞を移植する自家細胞移植治療法の開発と実用化を目指している。本年度は、1) Ex vivo での遺伝子治療と *Gnptab* 遺伝子ノックアウトマウスを用いた細胞移植、2) ML II/III 患者由来の線維芽細胞および健常者由来の造血幹細胞でのゲノム編集の 2 つの研究開発項目を踏まえ研究を実施した。

1) Ex vivo での遺伝子治療と *Gnptab* 遺伝子ノックアウトマウスを用いた細胞移植

本研究開発項目の 1 年目として、ML II/III 患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した。また、線維芽細胞は有限増殖のため CRISPR-Cas3 導入実験に継続的に使用するため、hTERT を導入して線維芽細胞を不死化した。この細胞の作製により、ML II/III 患者由来細胞のゲノム編集に資する gRNA とドナー配列の設計に使用出来ることが期待された。更に、ML II/III 患者の *GNPTAB* 遺伝子変異には Hot spot がないため、*GNPTAB* 遺伝子の多様な病的バリエーションにも対応することを想定して、樹立した iPS 細胞とは、異なる病的バリエーションを持つ ML II/II 患者を新たに 2 人リクルートし、これまでと同様のやり方、即ち、末梢血に Sendaivirus ベクターを介してリプログラミング因子を導入し、それぞれ 3 クローン以上の iPS 細胞を樹立した。これら樹立した細胞はモデル細胞として CRISPR-Cas3 を用いた *GNPTAB* 遺伝子修復研究に使用するため、共同研究施設間で共有した。

また、マウスモデルにおける細胞移植治療戦略として、ML II/III 患者由来の iPS 細胞を CRISPR-Cas3 で遺伝子修復した後、造血前駆細胞に分化誘導し移植する方法を想定していることから、健常者 iPS 細胞を使用し、市販の造血前駆細胞分化誘導培地を用いて分化誘導をおこなった。現在のところ分化誘導開始から 2 週間程度で造血前駆細胞様の細胞を分化誘導可能であることを確認した。今後この細胞の詳細な性

質・特性を遺伝子発現や細胞表面抗原の発現解析等といった手法で明らかにしていくとともに、in vitro や in vivo での細胞動態やライソゾーム酵素活性についての解析に使用する。

更に、*Gnptab* 遺伝子ノックアウトマウスへの細胞移植の実施のために、凍結胚から *Gnptab* 遺伝子ノックアウトマウス個体を復元した。*Gnptab* 遺伝子ホモノックアウト個体は妊孕性がないため、これらのマウスは *Gnptab* 遺伝子ヘテロノックアウトとして凍結保存していた。さらに、ヒト細胞を移植し、その効果を評価するため、本ノックアウトマウスは、事前に、scid マウスと交配させていたものを保存していた。現在は、これらヘテロノックアウトマウスを掛け合わせ scid 化された *Gnptab* 遺伝子ホモノックアウトを作成、維持している。また、細胞移植実験のドナーとして使用することを念頭に、当センター受診患者の中から健常者臍帯血由来造血幹細胞を採取した (n=5)。

その他、*Gnptab* 遺伝子ノックアウトマウスへの細胞移植における有効性の判定基準策定のため、健常者臍帯血 (造血幹細胞) の各種ライソゾーム酵素活性を測定した (n=2)。マウスにヒト細胞を移植するための preconditioning の検討もおこなった。本研究で使用するマウスは、*Gnptab* 遺伝子と scid のダブルノックアウトマウスである。scid の場合、NK 細胞の影響を無視することは出来ないことから、適切な preconditioning 条件について検討するとともに、preconditioning マウスの免疫能の評価を FACS 等により検討した。健常者臍帯血の *Gnptab* 遺伝子ノックアウトマウスへの移植を開始した。移植方法は、①マウス尾静脈、②腎皮膜下の 2 つの経路を検討し、いずれも方法でも安定に移植できる出来ることを確認した。特に、後者に関しては、移植した臍帯血由来細胞の 2 週間の生着を確認した。

2) ML II/III 患者由来の線維芽細胞および健常者由来の造血幹細胞でのゲノム編集

1 年目に、高効率でターゲットである *GNPTAB* 遺伝子変異を修復するために必要なガイド RNA や相同組換えドナーとなる配列の設計をおこなった。対象となるゲノムの 2 箇所の変異にそれぞれ複数のガイド RNA を設計し、患者由来の不死化線維芽細胞に導入し *GNPTAB* 遺伝子の切断を試みたが、想定外に患者由来の不死化線維芽細胞の状態が悪く増殖の遅滞がみられた。特に、遺伝子導入後の細胞死の割合が非常に高く実験に用いることが難しいと判断し、効率よくガイド RNA の切断効率判定を行うために、線維芽細胞ではなくすでに CRISPR-Cas3 でのゲノム編集の実績のある HEK293 細胞でおこなった。その結果、標我々が設計した CRISPR-Cas3 とガイド RNA が標的とした *GNPTAB* 遺伝子を切断していることが確認された。また、ML II/III 患者由来 iPS 細胞についても *GNPTAB* 遺伝子を切断出来ることが確認された。

決定したガイド RNA が同様に造血幹細胞でも *GNPTAB* 遺伝子を切断できるかどうか、健常者由来の造血幹細胞を用いて評価した。造血幹細胞にプラスミドを導入すると強力な細胞死を誘導するだけでなく、血球細胞への分化が誘導されたことから、CRISPR-Cas3 およびガイド RNA は RNP として導入した。造血幹細胞へ効率よく RNP を導入し、かつ細胞死や分化を誘導しない条件を決定した。RNP を導入した造血幹細胞を回収し、そのゲノムを精製し、PCR により標的領域の切断が起こっているかどうかを評価した所、十分な切断効率が確認できた。以上のことから、CRISPR-Cas3 を用いた造血幹細胞のゲノム編集の実験系は確立できたと考えている。今後は、ドナー DNA のモダリティーを決定した上で、変異修復を試みる予定である。

近年、CRISPR-Cas9 の登場により任意の領域を標的とした遺伝子改変技術が身近なものとなり、In vivo や Ex vivo での遺伝子治療の有効性と安全性がさまざまな疾患を対象に検証されている。本研究計画では ML II/III を対象として、国内で開発された CRISPR-Cas3 によるゲノム編集技術を応用し、患者本人の細胞を Ex vivo で遺伝子修復し、その正常化細胞を移植する自家細胞移植治療法の開発と実用化を目指している。細胞移植治療は、酵素補充療法では治療できない先天性代謝異常疾患群に対する根治治療法である。ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 は、研究分担者がすでに基本特許を取得しており、国産ゲノム編集技術プラットフォームを確立し、多くの国内の研究者や企業開発者がこの新しいゲノム編集技術を利用しやすい環

境の整備を進めている。そのため、ヒト細胞を用いての高効率且つ安全性の高い *GNPTAB* 遺伝子改変方法の開発、*Gnptab* 遺伝子ノックアウトマウスを用いてゲノム編集細胞の有効性・安全性が立証することで、本研究の成果は ML II/III のみならず、その他の多くの遺伝性疾患への応用できると期待される。

Mucopolipidosis (ML II/III, ICD) is a rare autosomal recessive disorder caused by a mutation in the *GNPTAB* gene or the *GNPTG* gene. The *GNPTAB* gene encodes the α/β subunits (and *GNPTG* gene encodes the γ subunit) of the enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GNPT). GNPT helps to couple phosphate groups to mannose residues (mannose-6-phosphate moieties, M6P) on lysosomal enzymes. Pathogenic variants of *GNPTAB* or *GNPTG* cause abnormal GNPT function which lead to inappropriate trafficking of lysosomal enzymes to the extracellular compartment. To date, no effective enzyme replacement therapy for ML II/III has been invented. For patients with lysosomal storage disorders like ML II/III, HSCT (Hematopoietic stem cell transplantation) aims to provide donor-derived hematopoietic cells that produce lysosomal enzymes with M6P moiety allowing for intracellular uptake with appropriate trafficking to the lysosome for substrate degradation. In fact, there have been several reports from the US, Germany and Japan where HSCT has been done and the results show some efficacy for patients with ML II/III. However, HSCT has three challenges. As for bone marrow transplantation, it is not easy to obtain MLA-matched donors for transplantation. Secondly, various drugs for transplantation such as immunosuppressants may cause serious consequences. In addition, engraftment failure and GVHD are also problems which must be solved. So, we are developing autogenous transplantation therapy for patients with ML II/III using new genome editing technology, the CRISPR-Cas3. In brief, patients' cells are taken out and treated by the CRISPR-Cas3 ex vivo, then returned to the patient. The transplanted cells will be expected to supply lysosomal enzymes with M6P moiety like HSCT.

Now, we are trying to cut and repair fibroblasts and iPS cells of patients with ML II/III using CRISPR-Cas3 technology. Alongside this research, we are also trying to transplant human hematopoietic stem cells differentiated from the repaired iPS cells and umbilical cord blood cells' hematopoietic stem cells into *Gnptab* 'knock out' mice. By the end of this year, we generated three different ML II/III patients' iPS cells (more than three clones respectively). As it is reported previously that there is no hot spot in pathogenic variants of ML patients, it is necessary to produce more than one iPS cell strain. Next, we successfully designed gRNA for the genome editing of one patient with ML II/III, which enabled us to cut the *GNPTAB* gene of the patient's iPS cells. Umbilical cord blood cells were taken from 5 healthy neonates and their mothers and cultured in vitro. Then we measured the activity of the lysosomal enzymes. The umbilical cord blood cells were then transplanted into our mice via tail veins and under renal membranes after preconditioning. The transplanted umbilical cord blood cells were found to be alive at least for two weeks.

There are 12 ML II/III patients who were diagnosed at our hospital, and about 40 patients in Japan. We are going to establish patient registration for ML II/III in Japan within a couple of years. If ex vivo genome edited cell transplantation therapy is established in ML II/III, it can be applied to many other lysosomal diseases. In addition, since CRISPR-Cas3 technology is unique to Japan and is expected to be applied to various gene therapies for many congenital diseases, the results of this research are expected to be applied to a wide range of diseases in the future.