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

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 遺伝性難治性疾患治療のための超高精度遺伝子修正法の確立
(英語) Establishment of Ultra-High Precision Gene Editing Methods for the Treatment of Refractory Hereditary Diseases

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 中田 慎一郎
(英語) NAKADA, Shinichiro

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 大阪大学 高等共創研究院・教授
(英語) Professor, Institute for Advanced Co-Creation Studies, Osaka University

II 研究開発の概要

【本課題全体の概要】

ゲノム編集技術を用いた遺伝性疾患治療において、特に CRISPR/Cas9 などの一般的な方法が目的外の変異を引き起こす問題が知られている。これにより、ゲノムの安定性が損なわれ、癌化や細胞機能の異常が発生するリスクがある。この問題を解決するため、新しい技術として NICER 法と MILD 法を開発した。これらの方法では、DNA 二重鎖切断 (DSB) や外来性 DNA、逆転写酵素を使用しないため、目的外変異のリスクを大幅に低減することができる。

NICER 法は、ヘテロ接合体変異を持つ細胞で変異アレル特異的にニックを発生させ、さらに相同染色体にもニックを発生させることにより、相同染色体間相同組換えを誘導し、ヘテロ接合性変異を修正する方法である。単回の NICER により 5～6%、複数回の繰り返しにより 15%以上の遺伝子修正効率が達成された。NICER 法は、数 bp 以内の挿入欠失変異やミスセンス変異のみならず、600bp 以上に及ぶ長い欠失も効率よく修正できることも示された。さらに、NICER 法を用いることで FANCONI 貧血における FANCA 遺伝子、遺伝性再生不良性貧血 (AmE 症候群) における ADH5、重症好中球減少症における ELANE 遺伝子、潜性栄養障害型表皮水疱症における COL7a 遺伝子など、複数の遺伝性疾患において変異遺伝子の野生型配列への修正および細胞の機能回復を実現した。

MILD 法は、複数のニックを利用して高効率に長い欠失を誘導する方法である。標的とする染色体のみ複数のニックを発生させることが可能であり、また、1つしかニックが入らない相同染色体で

は変異発生頻度が極めて低く抑えられるため、常染色体におけるアレル特異的な遺伝子破壊が可能となる。これまでに Duchenne 型筋ジストロフィーにおける DMD 遺伝子、強直性ジストロフィー I 型 (DM1) における DMPK、顕性栄養障害型表皮水疱症における COL7a 遺伝子の編集に成功し、細胞レベルでの疾患表現型の健常型への回復に成功した。

機能面からの研究により、NICER 法は細胞周期の調整に完全に依存せず、post-mitotic 細胞での適用が可能であることが示され、神経細胞や筋細胞などの治療への適用が期待できる。さらに、全ゲノムシーケンシングとアンプリコンシーケンシングをはじめとする多くのゲノム解析技術を駆使してオフターゲットにおける変異発生頻度解析を実施し、これらの方法は目的外変異の発生が非常に低く抑制されていることが証明された。

これらの成果に基づき、日本、アメリカ、欧州、中国での特許申請を行い、一部は特許を取得、さらに G 社との共同研究契約を締結するに至った。

【各研究項目の成果】

NICER (N-IHR) 法におけるニック配置の最適化

Thymidine kinase 1 (TK1) 遺伝子に複合ヘテロ接合体変異 (c. 231dupC [exon 4], c. 311_318del [exon 5]) を持つ TK6261 細胞 (独自に樹立) をモデルとし、ヘテロ接合体変異修復効率の解析を実施した。遺伝子修正効率測定は、TK 活性の回復を指標とし、測定法として colony formation assay および proliferation assay を独自開発した。ゲノムレベルでの修正はアンプリコンシーケンスにより確認した。

プライマリーガイド RNA と 88 種類のガイド RNA から 1 つと Cas9 (D10A) mRNA (以下、ニックアーゼ) を用いて NICER 法を実施し、遺伝子修正効率を測定した。すべての組み合わせでプライマリーガイド RNA 単独よりも高効率に TK 活性が回復し、多くの組み合わせで 10 倍以上、そして paired nick による DSB と同等以上の高い効率を示した。コロニー形成能による精密な測定では、プライマリーガイド RNA を含む 2 つのガイド RNA を利用することで 3~4%、3 種類のガイド RNA を利用することで 5~6% の遺伝子修正が達成された。1 塩基対挿入、8 塩基対欠失、ミスセンス変異、600 bp 以上の欠失も効率よく修正され、期待以上の成果が得られた。

NICER 法が成立する分子機構の解明

遺伝子ノックアウト細胞およびオーキシシデクロンシステムによる高度ノックダウン細胞を用いて、16 の遺伝子の NICER 法への関与を解析した。NICER 法は HR の必須因子 BRCA1/BRCA2 に約 50% 依存し、CtIP にはほぼ依存しなかった。Palbociclib により細胞周期を G1 期に停止させても、遺伝子修正効率が 40% 程度に維持された。総合すると、BRCA1/BRCA2 に依存し、S/G2 期に機能する経路と BRCA1/BRCA2 に依存せず post-mitotic cell でも機能する未知の経路が存在することが示された。また、post-mitotic 細胞でも NICER 法が機能するため、神経細胞や筋細胞での適用の可能性が示された。

分子機構に基づいた N-IHR 法の改良

NICER 法を用いた場合、遺伝子修正が行われなかった細胞では、標的配列が変異せずに保たれるため、何度でも NICER 法の実施が可能である。同一 DNA 鎖を標的とする 3 種類の sgRNA を組み合わせ、NICER 法を 3 回繰り返すことで 18.5%、2 種類の sgRNA の組み合わせでも 13.6% の遺伝子修正効率が得られ、最終目標であった 10% を大きく超える遺伝子修正を達成した。なお、ADH5 の修正においてもリピートによる修正効率の上昇が認められた。ミスマッチ修復遺伝子 MLH2、もしくは fork reversal に関わる遺伝子である SMARCA1 の抑制により、それぞれ 2 倍・1.5 倍の遺伝子修正効率の改善に成功した。

目的外変異頻度測定による NICER 法および MILD 法の正確性実証

TK6261 細胞の TK1 遺伝子の片アレルに SNP を発生させた細胞を数種類作成し、遺伝子修正に伴うヘテロ接合性消失 (LOH) リスクを検証した。元々存在していたエクソン 7 の neutral mutation も利用した。SNP が 2 つのニックに挟まれる場合、LOH が発生しうる。しかし、SNP を挟まないようにニックを発生させることで LOH のリスクは回避されることが示された。

マルチプルニック導入後、94×3 のシングルセル由来クローンにおいて、LD および indel 変異の検出を行った。NICER 法における変異頻度は最大 2.1% であり、DSB+外来 DNA ドナーによる変異発生率 95% よりも顕著に低かった。本解析において、センス鎖を標的とするガイド RNA とアンチセンス鎖を標的とするガイド RNA、ニックアーゼを組み合わせた場合、ニックに挟まれる領域が 35% (TK1 遺伝子) ~60% 以上 (DMD 遺伝子) (センス鎖のみに発生させた場合は最大で数%) と高頻度に LD が発生することを発見した (MILD 法)。MILD 法による LD は、野生型 Cas9 により DSB を 2 カ所発生させた場合と同等かそれを上回る効率であった。Deletion 頻度を droplet digital PCR により測定することにより、複数の遺伝子における long deletion 頻度の定量的測定を実施し、データを強固なものとした。セカンダリーガイド RNA の標的における indel 発生頻度は、DSB 2 箇所の場合 96.5% に対し、MILD 法ではわずか 2.38% にとどまった。本手法は dominant negative 効果により発症する autosomal dominant 疾患における変異アレル破壊や、exon skipping が有効な疾患に有効なゲノム編集法であると考えられる。

アンプリコンシーケンスにより、ガイド RNA の標的部位における indel 発生頻度を詳細に解析した。on-target における indel 頻度は野生型 Cas9 利用時には対象アレルの 80~90% (全体の 40~45%) に達したが、NICER 法では 1% 以下であった。MILD 法においては最大 5% であった。Cas9 野生型を用いた際に 90% 以上のリードで indel が示される off-target でも、NICER 法での indel はほぼ 0 であった。また、アンプリコン NGS により準定量的な解析を行い、実験結果を裏付けた。

sgRNA の組み合わせ 3 種類で NICER 法による遺伝子修正を実施したシングルセル由来クローンを 9~13 クローン樹立し、全ゲノム解析を実施した。in silico で予想される top 99 の off-target について indel 変異および構造変異を解析した。DSB と外来性 DNA ドナーにより遺伝子修正した細胞では、 3.00×10^{-2} /off target/clone で indel・SNV、 3.33×10^{-3} /off target/clone で構造多型 (SV) が検出されたのに対し、NICER 法では indel・SNV は全く検出されず、SV が検出されたのも 1 クローンのみであった。

実践的遺伝子修正

遺伝子修正の最難関遺伝性疾患 FANCONI 貧血のうち、FANCA 遺伝子複合ヘテロ接合体変異患者由来 hTERT-transformed fibroblast において、NICER 法により 2% 以上の細胞で FANCA 変異修正、発現回復に成功した。DNA 架橋剤による DNA 損傷時の FANCD2 mono-ubiquitination も確認され、FANCA の機能回復が示された。ALDH2 ヘテロ接合体変異・ADH5 複合ヘテロ接合体変異が原因となる遺伝性再生不良性貧血 (AMeD 症候群) 由来線維芽細胞 AP39P において、NICER 法による ADH5 タンパクの発現回復が達成された。

劣性 (潜性) 遺伝型栄養障害型表皮水疱症 (COL7A 複合ヘテロ接合体) の水疱より採取された間葉系幹細胞において、NICER 法による遺伝子修正を実施し、変異の修正および培養上清中へのコラーゲン VII の分泌を確認した。

Exon 44 欠失が原因の Duchenne muscular dystrophy 患者由来 iPS 細胞において、MILD 法により exon 45 の削除を試み、成功した。LD 済のシングルセル由来 iPS 細胞 2 株を筋細胞へ分化させ、in-frame となった DMD 遺伝子産物として DMD タンパクの発現が確認された。

ELANE 遺伝子変異疾患 iPS 細胞では、NICER 法により、19.5%、13.4% と、想定を大きく超える遺伝子修正効率を得た。一つの変異については、CD34 陽性細胞においても 13.1% の修正効率が得られ、

in vitro での好中球分化誘導実験の結果、表現型の回復が確認された。

NICER/MILD 法を筋強直性ジストロフィー I 型 (DM1) の患者由来 iPS 細胞において適用し、異常伸長 CTG リピートの短縮または削除を行う技術開発を実施した。ゲノム編集を実施したバルク細胞サンプルにおいてロングリードシーケンスを行った結果、異常伸長 CTG リピートの短縮または削除が様々なパターンで発生したことが確認された。また、WT Cas9 を用いた場合との比較実験において、WT Cas9 を用いると健常アレルには、非特異的な長鎖欠損または indel が起きているのに対し、ニックアーゼを用いた方法では、健常アレルには非特異的編集が起きていないことも確認された。

異常伸長 CTG リピートの短縮または削除が起きた患者由来 iPS 細胞から、編集サブクローンを取得した。これらサブクローンについて筋分化を行い、DM1 疾患表現型を解析し、細胞レベルでの疾患表現型の回復を確認した。さらに、全ゲノムシーケンシングによりオフターゲット編集の有無を解析したところ、使用した sgRNA・ニックアーゼにより引き起こされたと思われるオフターゲット編集は見られなかった。

顕性 (優性) 型栄養障害型表皮水疱症の治療では、変異アレルの特異的破壊により症状の軽減が期待できる。HPV の E6/E7 とヒト TERT 遺伝子の両者を導入して不死化細胞を樹立した。MILD 法実施後にこの不死化細胞から樹立した 1 細胞由来クローンでは、12.5%に LD が検出された。このうち 1 クローンについてゲノム DNA のシーケンスを行ったところ、変異アレルに 2412 bp の LD を確認した一方で、正常アレルには変異は生じていなかった。転写産物におけるフレームシフトも確認された。さらにこのクローンの細胞免疫染色を行ったところ、細胞内の VII 型コラーゲンの発現量減少が認められた。さらに、疾患表現型の回復を示すデータを得た。

特許出願・導出

NICER (MN-IHR) 法に関する特許を各国 (日本、アメリカ、欧州、中国) に移行し、MILD 法に関する特許を PCT 出願した。さらに、NICER 法改良に関連する特許および MILD 法の顕性栄養障害型表皮水疱症への応用に関する特許を PCT 出願した。また、NICER 法の国内特許を取得した。G 社とオプション付き共同研究契約を締結した。

In the treatment of hereditary diseases using genome editing technology, common methods such as CRISPR/Cas9 are known to cause off-target mutations. This can compromise genome stability and increase the risk of cancer and cell function abnormalities. To address these issues, we have developed new techniques called NICER and MILD. These methods do not use DNA double-strand breaks, exogenous DNA, or reverse transcriptase, significantly reducing the risk of off-target mutations.

The NICER method induces specific nicks in mutant alleles in cells with heterozygous mutations and further induces nicks in homologous chromosomes to promote inter-homolog homologous recombination, correcting heterozygous mutations. A single application of NICER achieved a gene correction efficiency of 5-6%, and repeated applications achieved over 15%. NICER could efficiently correct not only small insertions/deletions and missense mutations but also larger deletions over 600 bp. The NICER method has successfully corrected and restored function in multiple hereditary diseases, including the FANCA gene in Fanconi anemia, the ADH5 gene in hereditary aplastic anemia (AMeD syndrome), the ELANE gene and the COL7A gene in recessive dystrophic epidermolysis bullosa in severe congenital neutropenia, by converting mutant genes to wild-type sequences and recovering cellular function.

The MILD method uses multiple nicks to efficiently induce long deletions. This method can generate

multiple nicks only in the target chromosome, while the homologous chromosome, which receives only a single nick, has a very low mutation frequency. This allows allele-specific gene disruption in autosomes. We have successfully edited the DMD gene in Duchenne muscular dystrophy, the DMPK gene in myotonic dystrophy type I (DM1), and the COL7A gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa, achieving the restoration of normal phenotypes at the cellular level.

Functional studies have shown that NICER does not rely on cell cycle regulation completely and can be applied to post-mitotic cells, making it promising for the treatment of nerve and muscle cells. Additionally, we used comprehensive genome analysis techniques, including whole-genome sequencing and amplicon sequencing, to perform off-target mutation frequency analysis. These methods have been proven to achieve very low frequencies of off-target mutations.

Based on these achievements, we have filed patent applications in Japan, the United States, Europe, and China, and have entered into a joint research agreement with company G.