

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 多様な難聴遺伝子変異に対応した遺伝性難聴患者 iPS 細胞による AAV ゲノム編集
治療法の開発

(英語) Development of inner ear AAV genome editing system with iPS cells from
patients of various hereditary deafness

研究開発実施期間: 令和 3 年 6 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 神谷 和作
(英語) Kazusaku Kamiya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 学校法人順天堂 順天堂大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科学・准教授
(英語) Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University, Faculty of Medicine,
Associate Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

世界保健機構 (WHO) は、遺伝性難聴をはじめとした聴覚障害を持つ患者数が世界的に増加しており、2050 年までに現在の推計約 4 億 7 千万人から 9 億人に達すること、その場合の治療コストは年間 7500 億ドル (80 兆円) となることを発表している。遺伝性難聴は出生児 1,600 人に 1 人の割合で発症するが、現時点での根本的治療法や治療薬は存在しない。GJB2 (Gap Junction Protein Beta 2、タンパク質名: コネキシン 26) 変異型難聴は、遺伝性難聴の約 50% の割合を占めており、世界で最も多い難聴型である。本研究課題では、カプシド改変により内耳支持細胞に広範囲に感染するアデノ随伴ウイルス (AAV) を開発するとともに、AAV に搭載可能なゲノム編集ツールを構築し、それらを AAV に搭載した All-in-one AAV ベクターを用いて GJB2 変異型難聴の典型変異型に対する AAV ゲノム編集治療を実施した。これにより、多種多様な原因遺伝子と変異型を有する遺伝性難聴に対し、それらを一元的に修復する内耳ゲノム編集プラットフォームを開発することを目指した。

本研究課題の推進にあたり、以下の 4 つの項目の研究を実施した。以下、項目ごとに結果をまとめた。

1. 内耳ゲノム編集用 AAV ベクターの開発

これまでの AMED 事業において開発した内耳遺伝子治療用カプシド改変型 AAV に対して更にアミノ酸変異を加

え、GJB2 遺伝子がコードするコネキシン 26 から構成されるギャップ結合プラークを形成する内耳支持細胞に対して感染指向性の高い改変型 AAV ベクターの選抜を行った。カプシドのシアル酸結合部位の構造変化がウィルスの感染指向性の増加を引き起こすと仮説を立て、既存の血清型 (AAV1-10) の中でギャップ結合形成細胞に対する感染性の高い AAV6 と AAV8 のカプシド可変領域の配列を組み変えることで、AAV-Sia6e を開発した。AAV-Sia6e は AAV6 や AAV8 と比較してギャップ結合を形成する内耳支持細胞に対して広範囲な感染指向性を示した。

2. 内耳ゲノム編集用 AAV ベクターのための Cas、ガイド RNA、ドナー DNA のデザインと合成

AAV は病原性が低く、血清型によっては一部の内耳標的細胞に遺伝子導入ができるため、難聴治療用ベクターとして最適である。しかし、Cadherin23 (CDH23) などの難聴遺伝子は AAV に搭載可能な遺伝子サイズ (5.2Kb) を超過しており、他の多くの原因遺伝子でも同様に AAV 遺伝子治療は不可能である。さらに従来の Cas9 の遺伝子サイズも大きいため 2 種類以上のベクターに分割した同時感染が必要であり、細胞間ネットワークが重要な内耳細胞ではゲノム編集効率が不十分であり、これらを克服する革新的技術開発が期待される。そこで我々は、一塩基エディターである Adenine Base Editor (ABE)、Cas nuclease、および sgRNA を AAV に搭載可能なサイズ (5.2Kb) に収めたゲノム編集ベクターを構築した。GJB2-R75W 優性阻害型変異難聴は、重度難聴と掌蹠角化症を併発する症候性難聴であり、遺伝子補充療法では治療できない疾患である。GJB2-R75W 優性阻害型変異に対して構築したゲノム編集ベクターは、GJB2 R75W を発現させた HeLa 細胞に対して変異箇所の T を約 50%の割合で C へ修復し、断片化したギャップ結合プラークを示す病態型を正常型へ部分的に修復した。そこで、このゲノム編集ベクターを新たに開発した AAV-Sia6e に搭載することで内耳ゲノム編集用 All-in-one AAV ベクターを構築した。

3. 多様な遺伝性難聴患者 iPS 細胞からの内耳疾患モデル細胞の作製

指定難病であるアッシャー症候群の原因遺伝子である USH2A 難聴患者由来の iPS 細胞を樹立し、その成果を論文として報告した (Ukaji *et al.*, Stem Cell Res., 2023)。同じく指定難病である若年発症型両側性感音難聴の原因遺伝子である CDH23 について最も頻度の高い P240L と二番目に高い R2029W のコンパウンド変異を持つ難聴患者由来 iPS 細胞の樹立を完了し、学術雑誌へ投稿中である。さらに、当グループが樹立した日本人の三大 GJB2 変異型 iPS 細胞のうち、ABE によるゲノム編集治療の標的となりうる軽度難聴型 (GJB2 V37I) に対して内耳細胞への分化誘導を行い、コネキシン 26 とコネキシン 30 から構成される GJPs を細胞膜上に形成する内耳細胞への分化誘導に初めて成功した。GJB2 V37I 患者は健聴者と比較して優位に短い GJPs を形成しており、GJB2 V37I 変異難聴患者の新規病態を明らかにした。

4. 患者 iPS 由来内耳疾患モデル細胞と疾患モデル動物へのゲノム編集と遺伝子機能回復の評価

GJB2 R75W に対するゲノム編集ベクターを AAV-Sia6e に搭載した All-in-one AAV ベクターをコネキシン 26 R75W を発現させた HeLa 細胞に感染させたところ、ギャップ結合プラークの部分的な修復が認められた。さらにギャップ結合プラークのイオン輸送能を Neurobiotin tracer を用いた Dye transfer assay により評価した結果、AAV ゲノム編集した場合は物質透過性が回復し、透過性が回復した細胞が形成するギャップ結合プラークは長さが優位に増加していた。また、同 AAV ベクターをヒト GJB2 R75W 優性阻害型変異を持つトランスジェニックマウス (GJB2-R75W-Tg) から摘出した蝸牛組織に感染させた結果、未処理群と比較して AAV ゲノム編集治療したマウスでは蝸牛支持細胞に発現するコネキシン 26 からなるギャップ結合プラークの長さが優位に長く、野生型マウスと同様なプラークを形成することが確認された。さらに、All-in-one ゲノム編集ベクターのガイド RNA 部分を、GJB2 V37I 修復を目的とした sgRNA に置換したものを複数設計し、GJB2 V37I 難聴患者由来 iPS 細胞に遺伝子導入した結果、変異箇所のみを編集し、約 14-20%が野生型へ修復された。さらに、このゲノム編集ベクターを AAV-Sia6e に搭載した All-in-one AAV ベクターを GJB2 V37I 難聴患者由来 iPS 細胞に感染させたところ、治療前と比較して治療後ではギャップ結合プラークの長さが優位に長く、健常者と同等なプラークを形成した。以上の結果より、本研究課題で構築した All-in-one AAV ベクターを用いたゲノム編集治療は GJB2 遺伝子変異型難

聴患者の異常なギャップ結合プラークを修復し、物質透過機能を回復させることが可能であることが示された。以上の結果より、GJB2 遺伝子変異型難聴の病態および生理機能を修復可能な All-in-one AAV ベクターの開発を達成した。

本研究課題の社会的意義

遺伝性難聴は約 1600 出生に 1 人の頻度で発症し現在までに 100 種類以上の原因遺伝子が報告されている。の中で GJB2 遺伝子の変異による難聴は世界最大の遺伝性難聴型として知られ、Connexin26 で構成されるギャップ結合の機能異常により発症する。根本的治療法は存在せず、聴力と言語発達の障害により QOL が著しく低下する。昨年 2023 年 10 月、欧米と中国で遺伝性難聴患者（OTOF 遺伝子変異）に対する世界初のアデノ随伴ウィルス（AAV）遺伝子治療の臨床試験が相次いで行われ AAV 遺伝子治療の聴力改善効果がヒトで初めて実証された。これに対し、GJB2 遺伝子は次の治療標的として治療法が開発が期待されている。

本研究課題により開発したカプシド改変型 AAV ベクター（AAV-Sia6e）は内耳細胞に対して広範囲に感染する特徴を有していることから、GJB2 遺伝子を発現する内耳支持細胞に対する遺伝子治療が可能である。さらに、GJB2 遺伝子と同様に内耳支持細胞に発現する様々な難聴原因遺伝子に対する遺伝子治療に応用することも期待できる。今回我々は、多種多様な原因遺伝子と変異型をする遺伝性難聴に対し、それらを一元的に修復する内耳ゲノム編集プラットフォームを開発すること最終目標として、一塩基エディターである Adenine Base Editor (ABE) と小型の Cas nuclease を組合わせて AAV ベクターに搭載可能な限界サイズ (5.2Kb) に収まるような All-in-one ゲノム編集ベクターを構築した。このゲノム編集ベクターを AAV へ搭載し感染させたところ、GJB2 R75W 優性阻害変異を持つトランスジェニックマウス（GJB2-R75W-Tg）や GJB2 V37I 劣性変異型難聴患者 iPS 由来内耳細胞の異常なギャップ結合プラークを修復し、生理機能を回復させた。これらの結果は、遺伝性難聴に対するゲノム編集治療の有効性を示すものである。本研究課題で構築した All-in-one ゲノム編集ベクターは変異箇所のみを選択的に編集することが可能であり、ベクターのガイド RNA を変異型によって変更することにより、GJB2 のさまざまな変異型や CDH23 や USH2A などの AAV に搭載可能な遺伝子サイズ (5.2Kb) を超過した難聴原因遺伝子の治療に対しても応用できる。特に、本ゲノム編集ベクターは正常な遺伝子を補充して治療する遺伝子補充療法では治療不可能な優性阻害型変異に対しても有効であることが GJB2 R75W に対する治療評価によって示されたことから様々な難聴遺伝子型の治療に対する応用が期待できる。

今後は、本学耳鼻咽喉科との連携により継続して典型的な GJB2 遺伝子変異型および他の遺伝性難聴患者より iPS 細胞を樹立し、それぞれの変異型を修復する All-in-one ゲノム編集ベクターを構築し、薬効評価を進めることで、これまで根本的治療法が存在しなかった遺伝性難聴に対する新規治療法の開発に繋がる成果が得られると考える。

Mutation of the Gap Junction Beta 2 gene (GJB2) is the most frequent cause of hereditary deafness worldwide. GJB2 encodes connexin (CX) 26, a component in cochlear gap junction. We demonstrated that the drastic disruption of gap junction plaque (GJP) macromolecular complex composed of Cx26 and Cx30 are critical pathogenesis starting before hearing onset (Kamiya, Journal of Clinical Investigation, 2014;124(4):1598-1607). As effective therapeutic tool, Adeno associate virus (AAV) were used for the GJB2 gene transfer and restoration of GJP (Iizuka, Human Molecular Genetics. 2015, 24(13):3651-61). In this project, we developed AAV-Sia6e, a vector suitable for GJB2 related hearing loss, by shuffling capsid sequences between wild type serotypes and selecting AAV vectors with high efficacy of infection to inner ear supporting cells. Dominant-negative mutations of GJB2, such as R75W, cause syndromic hearing loss and palmoplantar keratoderma. We previously reported that R75W results in fragmentation of GJPs. The fundamental treatment for this disease does not require gene-replacement therapy or transient nucleic-acid drug therapy such as siRNA or an antisense oligonucleotide but rather treatment

that corrects the underlying genomic mutation. Adenine base editor (ABE) repairs only a single mutated site within a genome. Therefore, it has the advantage over conventional CRISPR-Cas genome editing with donor DNA because ABEs do not lead to undesirable effects such as insertions or deletions. However, in general, the recommended genome size that can be loaded onto an AAV is ≤ 5.2 kb. Therefore, we aimed to restore functionality to abnormal GJPs caused by a GJB2 dominant-negative mutation not possible with gene-replacement therapy and to generate All-in-one AAV vector platform with a small genome editor using ABE. Our All-in-one AAV vector, which includes an ABE targeting R75W within GJB2, corrects this pathogenic mutation with up to high efficiency and facilitates recovery of the gap-junction intercellular communication network of GJP. In a transgenic mouse model with the GJB2 R75W mutation, single AAV-mediated genome editing also restored the fragmented GJPs to orderly pentagonal or hexagonal outlines in cochlea-supporting cells. We also developed human iPS cells from the patients with Japanese and East Asian typical GJB2 mutations (GJB2 V37I), which normally show mild hearing loss, and treated using All-in-one AAV vector for GJB2 V37I. As a result, AAV-genome editing corrected pathogenic mutation and restored the fragmented GJPs to orderly pentagonal or hexagonal outlines. Our results suggest that an ABE-based genome-editing strategy can be an optimal treatment for the dominant form of GJB2-related hearing loss and other deafness-related mutations, especially single-base substitutions. We anticipate that All-in-one AAV vector, by virtue of its compact size and broad targeting range, will enable a range of therapeutic applications for a variety of hereditary deafness with improved safety and efficacy owing in part to ABE packaging into a single-vector system.