作成／更新日:令和８年５月２６日
課題管理番号: 25bm1223010h0003

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（非臨床 PoC 取得研究課題）
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： （日本語）遺伝性免疫異常症に対する新規遺伝子修正治療の研究開発
（英　語）Study and development of gene correction techniques applicable for a variety of inborn errors of immunity

研究開発実施期間：令和 5 年 6 月 19 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：（日本語）森尾　友宏
（英　語）Tomohiro MORIO

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人東京科学大学　総合研究院　特別教授
（英　語）Distinguished Research Professor, Advanced Research Initiative, Institute of Science Tokyo

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等
和文：2 ページ以上
英文：1 ページ程度

本研究開発課題では、遺伝性免疫異常症（inborn errors of immunity, IEI）に対する新たな根治的治療法として、造血幹細胞（hematopoietic stem cells, HSC）を標的とした遺伝子修正治療の開発を目指した。遺伝性免疫異常症は免疫系の機能・発達に関与する遺伝子の変異による疾患の総称で原因遺伝子として500以上が同定されている。疾患により様々な免疫異常に伴う合併症をきたすが、重症感染症を合併し、乳児期に致死的な転帰をたどる疾患も多い。従来の根治療法である造血細胞移植にはドナー依存性や移植関連合併症などの課題があり、患者自身のHSCを用いた遺伝子治療の開発が期待されている。現在、臨床研究レベルでも臨床応用されている遺伝性免疫異常症に対する遺伝子治療は遺伝子付加型の治療に留まっており遺伝子修正型の治療法開発が望まれている。

本研究開発課題の対象疾患は、遺伝性免疫異常症のひとつであるGATA2異常症（ヘテロ接合性*GATA2*機能喪失バリアントにより発症）とした。GATA2異常症はB細胞、単球、樹状細胞等の欠損を特徴とし、易感染性に加えて骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病といった骨髄系悪性腫瘍発症のリスクが高いことが知られる。本研究では、Cas9ニッカーゼを用いて健常アリルを鋳型とした相同組換え修復を誘導するNICER法(a method for correcting heterozygous mutations that employs multiple nicks induced by Cas9 nickase and a homologous chromosome as an endogenous repair template)、およびベースエディター（BE）法を中心に、HSCの遺伝子修正法を体系的に検討した。

まず、マウスおよびヒトHSCの培養増幅法と遺伝子導入条件の最適化を行った。培養マウスHSCでは95%以上の高効率でmRNA導入可能な条件を確立し、長期造血能を維持したまま二次移植可能であることを確認した。また、ヒトHSCについても、骨髄・臍帯血由来CD34陽性細胞を、幹細胞性を保ちながら高効率に増幅できる培養法を確立した。これにより、HSCを用いたex vivo遺伝子治療の基盤技術が整備された。

GATA2異常症に対しては、国内患者コホートから得られた情報をもとに、2種類の疾患原性バリアントノックイン(KI)細胞株およびKIマウスモデルを作製し、NICER法およびBE法による遺伝子修正条件を最適化した。NICER法では、点変異のみを修復するピンポイント修正と、複数エクソンを含む大領域修正の両方を検討した。その結果、修正効率はバリアント依存的であり、ピンポイント修正では最大数%に留まる一方、大領域修正では1-2%程度ながら、複数の疾患原性変異に共通して適用できる可能性が示された。一方、BE法では最大90%程度という極めて高い編集効率が得られ、ガイドRNAおよび改良型BEの組み合わせにより、バイスタンダー変異を抑えた条件も確立された。

一方で、GATA2異常症の病態再現には課題が残った。本研究開発課題で作製した2系統のGATA2異常症KIマウスに対して、GATA2異常症患者に見られる免疫異常（B細胞、NK細胞、単球減少など）や、既に報告されているGATA2異常症マウスモデルを参考に免疫表現型解析を行ったが、長期観察においても期待された表現型は見られなかった。レンチウイルスを用いて変異*GATA2*遺伝子を導入したヒトHSC（GATA2異常症モデルヒトHSC）を次世代免疫不全マウスに移植したヒト化マウスでは、GATA2異常症患者に特徴的なB細胞・単球・樹状細胞減少などの免疫異常が明確には再現されなかった。しかし、GATA2異常症KIマウスを用いた競合的骨髄移植実験ではKIマウス由来HSCの生着非優位性が確認された。また、患者骨髄解析ではHSCおよび造血前駆細胞分画の減少が確認された。以上より、GATA2異常症の造血異常病態として、HSCレベルでの機能障害が存在することが示唆された。

GATA2異常症KIマウスモデルの免疫表現型解析やGATA2異常症モデルヒトHSCによるヒト化マウス作成実験では、明確な造血・免疫表現型異常がみられなかったことから、並行して患者病態を再現するIKAROS異常症マウスモデル（IKAROS異常症の疾患原性バリアントKIマウス）を用いた検証を進めた。IKAROS異常症KIマウスモデルを用いた検討では、培養HSCに対してBE法による遺伝子修正治療を行いレシピエントマウスに移植するこ

とで IKAROS 異常症 KI マウスにみられた異常免疫表現型の正常化が認められ、修正 HSC 由来細胞では病的変異の修復も確認された。一方、NICER 法では現行条件下では有意な免疫再構築効果は認められなかった。これにより、BE 法を用いた HSC 遺伝子修正治療が、遺伝性免疫異常症に対する有効な治療戦略となりうることが示された。本研究開発課題において、遺伝性免疫異常症の疾患原性バリアント KI マウスを用いた、HSC の培養増幅、遺伝子編集、レシピエントマウスへの移植、免疫再構築評価までを一貫して実施できる非臨床有効性評価系が確立された。

遺伝子編集治療の重要な安全性評価として、本研究開発課題において開発された遺伝子編集治療を施した GATA2 異常症モデル細胞株を用いて全ゲノム解析も実施した。NICER 法では、既報告のとおり 1 塩基置換、欠失、挿入、重複などのオフターゲット変異や染色体構造異常はほとんど認められず、バックグラウンドと同等のレベルであった。BE 法では比較的高効率な編集が得られる一方で、オフターゲット変異や構造異常の導入が NICER 法よりやや多い傾向が観察された。このことから、BE 法は高効率で有望である一方、臨床応用に向けてはさらなる安全性評価が重要であることが示された。

さらに、本研究開発課題では非臨床 PoC 取得に向けた問題や実用化戦略も整理された。遺伝子修正後 CD34 陽性細胞数、修正細胞比率、長期造血能維持、ddPCR 等による修正細胞検出系、オンターゲット・オフターゲット解析などをキーパラメータとして設定し、超希少疾患における PoC 取得の方向性を AMED 伴走支援課題と連携して検討した。本研究で確立された HSC 遺伝子修正技術は、GATA2 異常症や IKAROS 異常症に限らず、他の遺伝性免疫異常症や造血疾患への応用可能性を有しており、HSC 遺伝子修正治療のプラットフォーム技術としての発展が期待される。

This research project aimed to develop a curative therapeutic strategy for inborn errors of immunity (IEI) by establishing gene correction therapy targeting hematopoietic stem cells (HSCs). IEI comprise a group of diseases caused by genetic variants affecting the development and function of the immune system, with more than 500 causative genes identified to date. These disorders present with a wide spectrum of immunological abnormalities and associated complications, and many severe forms are complicated by life-threatening infections during infancy. Although hematopoietic cell transplantation has been considered as the conventional curative treatment for some IEI, it remains limited by donor dependency and transplantation-related complications. Therefore, the development of gene therapy using patients' own HSCs has been highly anticipated.

The target disease of this project was GATA2 deficiency, an IEI caused by heterozygous loss-of-function variants in the *GATA2* gene. In this study, we systematically investigated HSC gene correction approaches based on the NICER method (a method for correcting heterozygous mutations that employs multiple nicks induced by Cas9 nickase and a homologous chromosome as an endogenous repair template), which induces homologous recombination repair using the healthy allele as a repair template, as well as base editing (BE).

First, we optimized culture expansion methods and gene delivery conditions for both murine and human HSCs. In cultured murine HSCs, we established conditions enabling highly efficient mRNA delivery (>95%) while preserving long-term hematopoietic reconstitution capacity, including the ability to support secondary transplantation. For human HSCs, we established culture conditions that enabled highly efficient expansion of bone marrow- and cord blood-derived CD34+ cells while maintaining stem cell properties.

For GATA2 deficiency, based on information obtained from a nationwide patient cohort, we established two knock-in (KI) cell lines and two KI mouse strains harboring pathogenic *GATA2* variants, and optimized gene correction conditions using both the NICER and BE approaches. In the NICER approach, both pinpoint correction of point mutations and large-region correction were evaluated. The correction efficiency was found to be variant-dependent: pinpoint correction achieved efficiencies of up to several percent, whereas large-fragment correction yielded efficiencies of approximately 1–2%, while demonstrating the potential applicability to multiple pathogenic variants. In contrast, the BE approach achieved high editing efficiencies of up to approximately 90%.

However, challenges remained in faithfully recapitulating the disease phenotype of GATA2 deficiency. In the two GATA2 deficiency KI mouse lines generated in this project, comprehensive immunophenotypic analyses were performed based on the abnormalities observed in patients and a previously reported mouse model. Furthermore, in humanized mouse models generated by transplanting human HSCs expressing mutant GATA2 via lentiviral transduction into immunodeficient mice, characteristic immunological abnormalities seen in GATA2 deficiency patients were not clearly reproduced. On the other hand, competitive bone marrow transplantation experiments using GATA2 deficiency KI mice demonstrated a competitive disadvantage in engraftment capacity of KI-derived HSCs. In addition, analyses of patient bone marrow samples revealed reductions in HSC and hematopoietic progenitor fractions. Together, these findings suggested that functional impairment at the HSC level contributes to the hematopoietic abnormalities associated with GATA2 deficiency.

Because clear hematopoietic and immunological abnormalities were not observed in the GATA2 deficiency KI mouse models or humanized mouse experiments, we concurrently performed validation studies using an IKAROS deficiency mouse model that recapitulates patient phenotypes. In studies using the IKAROS deficiency KI mouse model, cultured HSCs were subjected to BE-mediated gene correction therapy and transplanted into recipient mice. This resulted in normalization of the abnormal immune phenotypes observed in the KI mice, and repair of the pathogenic variant was confirmed in cells derived from the corrected HSCs. In contrast, under the current conditions, the NICER approach did not demonstrate significant immune reconstitution effects. Through this study, we established an evaluation platform including HSC culture expansion, gene editing, transplantation into recipient mice, and evaluation of immune reconstitution using murine models of IEI.

As a safety assessment for genome editing therapies, whole-genome sequencing was performed using GATA2 deficiency model cell lines subjected to the gene correction therapies. Consistent with previous reports, the NICER approach induced very few off-target alterations, including single nucleotide substitutions, deletions, insertions, duplications, or chromosomal structural abnormalities, with frequencies comparable to background levels. In contrast, although the BE approach achieved relatively high editing efficiencies, there was a tendency toward slightly increased off-target mutations and structural abnormalities compared with the NICER method.

Finally, this project also clarified key issues and implementation strategies toward obtaining nonclinical proof-of-concept (PoC). Strategies for PoC acquisition in micro-rare and nano-rare diseases were explored through the program. The HSC gene correction technologies established in this study are expected to be applicable not only to GATA2 deficiency and IKAROS deficiency but also to other IEI and hematological diseases, thereby serving as a platform technology for future HSC gene correction therapies.