

## ゲノム編集をより効果的かつ安全に行うための造血幹細胞培養技術を開発

ゲノム編集を行った造血幹細胞を1個から増殖させるクローン培養システムを開発しました。これにより、特定のゲノム編集を持つ細胞の選択と、非特異的変異を持つ細胞の除去が可能になりました。

造血幹細胞は、骨髄に存在する希少な細胞で、赤血球、白血球、血小板を産生します。この細胞が正しく機能することは、生体の成長と健康に不可欠です。造血幹細胞のDNAに変異があると、血液細胞の産生に障害が生じて、重篤な遺伝子疾患を引き起こす可能性があります。

CRISPR/Cas9技術を用いるゲノム編集により、このような疾患の原因となる変異の修正（機能の回復）が可能となり、この造血幹細胞を移植して疾患を治療することができるようになりました。しかし、ゲノム編集ではごく一部の細胞の変異が修正されるだけであり、他の細胞に新たな変異が導入される可能性があります。このことから、修正された造血幹細胞のみを選択的に移植することが望ましいです。

この問題に対し、本研究では、高分子ポリマーを用いた新しい造血幹細胞培養システムを開発しました。免疫不全疾患マウスの造血幹細胞における疾患変異をCRISPR/Cas9で編集した後に、本システムを用いて個別に増幅させました。1個の細胞から増えた造血幹細胞コロニーをスクリーニングして、目的の修正編集のみを含む、生着能力が高いコロニーを選択して免疫不全マウスに移植したところ、免疫細胞の再構築が認められ、免疫系の正常な機能も確認できました。この方法により、変異が修正された造血幹細胞の割合が、20-30%からほぼ100%に上がり、移植の際に、危険な変異を持つ細胞を除外することが可能になりました。

この培養システムは、造血幹細胞におけるゲノム編集の効率と安全性の向上に貢献すると期待されます。

### 研究代表者

筑波大学 医学医療系

山崎 聡 教授

## 研究の背景

造血幹細胞では、血液細胞、すなわち、体内に存在するすべての免疫細胞および血球細胞（赤血球・白血球・血小板）が作られます。血液細胞に起因する疾患は多く存在しますが、中でも遺伝的に DNA の変異が病気を引き起こす鎌形赤血球症、重症複合型免疫不全などが、よく知られています。その治療法として、造血幹細胞を対象とした「遺伝子治療」が期待されています。

近年の遺伝子治療分野における最も素晴らしい進歩の一つは、CRISPR/Cas9<sup>注1)</sup>によるゲノム編集技術です。これを用いると、細胞のゲノムに外来 DNA を挿入し、病気の原因となる変異を修正することができます。このようにして機能を回復した細胞を移植して、病気の治療を行います。

CRISPR/Cas9 でゲノム編集を行う際には DNA 二本鎖切断が生じますが、それを修復する経路として、一般的に HDR と NHEJ<sup>注2)</sup> の 2 種類があります。HDR は、テンプレート<sup>注3)</sup> を用いて正確に修復する経路で、ゲノム編集に応用されています。それに対して NHEJ は、切断された DNA の末端同士を結合して修復する経路で、その過程では、小さい「挿入や欠失 (indel)」がランダムかつ高い頻度で発生し、遺伝子の機能が失われたり、有害変異が導入される可能性があります。また最近、HDR と NHEJ 以外の経路で、ゲノムの安定性を損なう「数百-数千塩基に及ぶ欠損 (Large deletion)」が起きることが報告されています。

造血幹細胞においては HDR より NHEJ が優位されることから、HDR を介して目的の編集が導入されている細胞は 2~3 割程度に止まり、残りの 7~8 割は非特異的な Indel や Large deletion を持つ細胞や編集されていない細胞です。つまり、従来の方法でゲノム編集された造血幹細胞のほとんどは、目的の編集を持たず、機能せず安全性も不明な細胞です。

本研究グループは、この問題に取り組むために、造血幹細胞の単一増幅技術の開発を目指しました。

## 研究内容と成果

まず、造血幹細胞でゲノム編集を行うとどのような変異が起こるかを調べるために、本研究グループが 2019 に報告した培養プロトコル (*Nature*, 2019) を用いて、*Prkdc* 遺伝子に変異を持つ SCID 免疫不全マウス<sup>注4)</sup>由来の造血幹細胞をバルク増幅<sup>注5)</sup>しました。SCID 変異を修正するためにゲノム編集を行いました。これを SCID 免疫不全マウスに移植したところ、7 日間後の時点で、造血能力が高い造血幹細胞の数は約 9 倍に増えました。ゲノムを解析すると、HDR を介した SCID 変異の修正、NHEJ による Indel、未編集のアレル<sup>注6)</sup>が、2:5:3 の割合で混在していることが確認できました。さらに、移植 4 週間後から免疫細胞が末梢血や胸腺、脾臓に出現し、これらはゲノム編集で修正された幹細胞から分化したものと考えられました。しかし、体内で分化した血球の一部にも Indel が検出され、この細胞では *Prkdc* は正常に機能していないことが予想されました。つまり、目標通りの編集を持つ細胞の割合は低いことが、バルク増幅を用いたゲノム編集方法の問題です。

Indel は遺伝子治療においても問題を引き起こす可能性があるため、できるだけ除去する必要があります。そこで、単一の造血幹細胞 (クローン) を特定・増殖して、各クローンからできた細胞集 (コロニー) でゲノム解析を行う方法を考えました。こうすることにより、設計した編集の有無を確認した上で、クローンを選択して移植することができ、望ましくない変異を持つクローンを除去することが可能になります。

しかしながら、従来の PVA (ポリビニルアルコール)<sup>注7)</sup>を用いた培養系では、造血幹細胞のクローン増殖の頻度は低かったことから、培地としてより優れたポリマーのスクリーニングを行いました。その結果、PCL-PVAc-PEG (ポリビニルカプロラクタム-ポリ酢酸ビニル-ポリエチレングリコールグラフトコ

ポリマー)<sup>注8)</sup>を用いると、健常のマウス（免疫不全マウスではない）の造血幹細胞において、1個の細胞から約3万倍も増殖ができることを見いだしました。

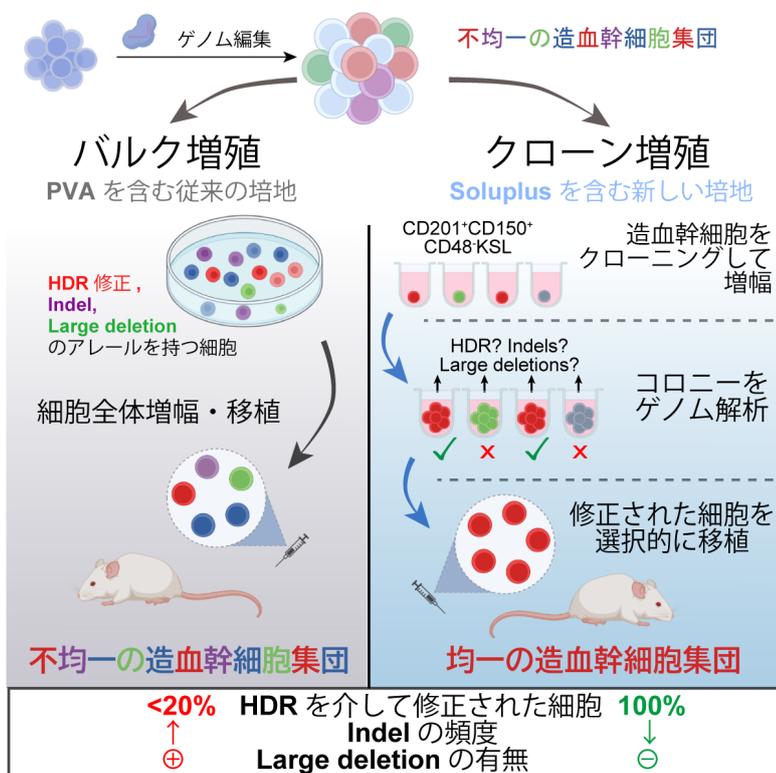
この PCL-PVAc-PEG を培地とした増殖システムを、SCID ゲノム編集モデルに適用しました。上述の実験と同様に、SCID マウスから造血幹細胞を3日間バルク増殖した後にゲノム編集を行い、さらに4日間培養して、造血能力が高いと思われる CD201<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>KSL 分画<sup>注9)</sup>から細胞をクローニングし、2週間後に SCID 変異の修正と Indel の有無をスクリーニングしました。その結果、約100個のクローンのうち、修正されたアレルを少なくとも1つ持つクローンは50%、Large deletion を有するクローンも約50%でした。その中から、変異が修正されていたクローンだけを選択して SCID マウスに移植しました。すると、バルク増殖法と同様に、移植4週間後から末梢血で免疫細胞が見られました。さらに、血球を解析したところ、7割以上のアレルが HDR で修復されており、NHEJ による Indel はありませんでした。これは従来のバルク増殖法とは大きく異なる点です（参考図）。

SCID 変異が修正された造血幹細胞が、本当に機能的な免疫細胞を作り出せるかを確認するために、ヒト腫瘍細胞を皮下投与すると、修正された造血幹細胞を移植したマウスだけが腫瘍細胞を拒絶したため、免疫系が回復していると結論づけました。

### 今後の展開

造血疾患に対するゲノム編集技術を用いる遺伝子治療は、今後ますます広がると予想されます。今回開発したクローン増殖方法は、造血幹細胞におけるゲノム編集の有効性と安全性を高めることができる点で、ヒトの遺伝子治療に非常に有用であると考えられます。

### 参考図



(Indel、Large deletion など) を持つ細胞 (紫、緑) と、編集されていない細胞 (青) が混在する状態になる (上図)。

従来の PVA を用いるバルク培養法 (下図左) では、この不均一の細胞集団を増幅してから移植を行うが、修正された細胞は 20~30% しかなく、残りの 70~80% には遺伝子が機能せず安全性も不明な細胞が含まれる。一方、PCL-PVAc-PEG (Soluplus) を基盤にした培地 (下図右) を用いると、修正された造血幹細胞の割合が、ほぼ 100% となった。

#### 用語解説

注 1) CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced palindromic repeats/Cas9)

細菌のウイルスに対する免疫システムとして発見されたゲノム編集ツール。Cas9 は DNA を切る核酸分解酵素で、ゲノムの特定の場所で、DNA 2 本鎖の切断を起こす。この DNA 損傷を利用して、ゲノムに外来 DNA を挿入し、病気の原因となる変異を修正することができる。

注 2) HDR (homology-directed repair) と NHEJ (non-homologous end joining)

Cas9 による DNA の 2 本鎖切断を修復する 2 種類の経路。NHEJ (非相同末端結合: non-homologous end joining) は効率が高いが、1~3 塩基の挿入と欠失 (Indel) により新たな変異が頻繁に発生する。一方、HDR (相同性修復: homology-directed repair) は効率では劣るが、正確な修復が得られるため、ゲノム変種に適する。

注 3) テンプレート

相同性修復 (HDR) を介してゲノムに挿入する外来 DNA 配列の鋳型となる DNA 分子。1 本鎖 DNA の形態で使用する人が多い。

注 4) SCID マウス

*Prkdc* という DNA 修復遺伝子に点変異を持つマウス系統。この変異によって、免疫受容体の T 細胞受容体、B 細胞受容体や抗体の再構成が行われなため、機能的 T 細胞および B 細胞が欠損され、重度の免疫不全を呈する。

注 5) バルク増幅

多数の細胞 (>1 個) を同時に培養して増やすこと。本研究におけるバルク増幅では、 $1 \times 10^3$  から  $10^6$  以上の細胞数を用いた。

注 6) アレル (対立遺伝子)

相同な遺伝子座を占める遺伝子に複数の種類がある個々の遺伝子。

注 7) PVA (ポリビニルアルコール)

機能性樹脂の一種で、液体のりなどの日用品に用いられる。造血幹細胞の培養においては血清アルブミンの代わりに使用ができ、長期に安定して増幅することができる。

注 8) PCL-PVAc-PEG (ポリビニルカプロラクタム-ポリ酢酸ビニル-ポリエチレングリコールグラフトコポリマー)

ドイツ BASF 社が医薬品の賦形剤や結合剤として開発した高分子ポリマー (商品名: Soluplus)。

注 9) CD201<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>KL 分画

細胞の表面タンパクである CD201、CD150、CD48、cKit (K)、Lineage (L) の発現パターンで造血能力が分かる。能力が高い造血幹細胞では CD201、CD150 と cKit の発現は高く (+)、CD48 と Lineage の発現は低い (-)。本研究では、この発現パターンを示す細胞集 (分画) からクローンを分離した。

## 研究資金

本研究は、科研費（#20K16234, #23K15315, #21F21108, #20K21612）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（#21bm0404077h0001, #21bm0704055h0002）、国立研究開発法人 科学技術振興機構（#18071245）、Blood Cancer UK Bennett Fellowship (15008)、ERC Starting Grant (ERC-2016-STG-715371)、CR-UK Programme Foundation award (DCRPGF¥100008)、MRC Mouse Genetics Network Haematopoiesis Cluster (MC\_PC\_21043)、MRC-AMED joint award (MR/V005502/1)、German Research Foundation (BE 6847/1-1)の一環として実施されました。

## 掲載論文

【題名】 Controlling Genetic Heterogeneity in Gene-edited Hematopoietic Stem Cells by Single Cell Expansion.

（ゲノム編集を行った造血幹細胞における遺伝的不均一性に対するクローン増殖システムの開発）

【著者名】 Hans Jiro Becker<sup>1,2,\*</sup>, Reiko Ishida<sup>2</sup>, Adam C. Wilkinson<sup>3</sup>, Takaharu Kimura<sup>1</sup>, Michelle Sue Jann Lee<sup>4</sup>, Cevayir Coban<sup>4</sup>, Yasunori Ota<sup>5</sup>, Yosuke Tanaka<sup>6</sup>, Meike Roskamp<sup>7</sup>, Tsubasa Sano<sup>8</sup>, Arinobu Tojo<sup>9</sup>, David G. Kent<sup>10</sup>, Satoshi Yamazaki<sup>1,2,\*</sup>

1 Laboratory for Stem Cell Therapy, Faculty of Medicine, Tsukuba University, Tsukuba 305-8577, Japan

2 Division of Stem Cell Biology, Center for Stem Cell Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

3 MRC Weatherall Institute of Molecular Medicine, Radcliffe Department of Medicine, University of Oxford, Oxford OX3 9DS, United Kingdom

4 Division of Malaria Immunology and International Vaccine Design Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

5 Department of Pathology, Research Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

6 International Research Center for Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto City 860-0811, Japan

7 Pharma Solutions, Nutrition & Health, BASF SE, Carl-Bosch-Strasse 38, D-67056 Ludwigshafen am Rhein, Germany

8 Pharma Solutions, Nutrition & Health, BASF Japan Ltd., Tokyo 103-0022, Japan

9 Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8510, Japan

10 York Biomedical Research Institute, Department of Biology, University of York, Wentworth Way, York YO10 5DD, United Kingdom

\*共同責任著者

【掲載誌】 *Cell Stem Cell*

【掲載日】 2023年6月28日

【DOI】 10.1016/j.stem.2023.06.002

## 問合わせ先

【研究に関すること】

山崎 聡（やまざき さとし）

筑波大学幹細胞治療研究室 教授

URL: <https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/sct/index.html>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp