

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06758

研究課題名（和文）エクソソームを利用した後天的トリソミックレスキュー法の構築

研究課題名（英文）Constructing an Acquired Trisomic Rescue Method Using Exosomes

研究代表者

脇田 幸子（WAKITA, SACHIKO）

三重大学・医学部・技術員

研究者番号：20782981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：エクソソームドラッグデリバリーシステムを利用した後天的トリソミックレスキュー法を構築することを目標に実験を行った。しかし、エクソソームの大量精製に時間を要し、エクソソームデリバリーシステムの確立までは至っていない。

21番染色体消去プラスミドの改良を重ねた結果、長腕側テロメア付近の13カ所のgRNAを連結したCRISPR-Cas9プラスミドで最も効率が高かった（約17%）。さらにdCasに載せ替えたプラスミドを作製したところ、染色体除去率は約4%と低下した。dCasを使用して染色体除去を惹起するためには更なる改良が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後天的トリソミックレスキュー法の構築が確立されれば、染色体数異常による合併症の根本的治療への足掛かりになると考えられる。本研究では、CRISPR/Casを用いたアレル特異的染色体消去法の改良を行い、効率の高いプラスミドを作製した。今後切断を伴わないアレル特異的染色体消去法の構築に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Experiments were conducted with the goal of establishing an acquired trisomic rescue method using an exosomal drug delivery system. However, it took time to purify a large number of exosomes, and we have not yet established an exosome delivery system.

After repeated improvements of chromosome 21 elimination plasmids, the CRISPR-Cas9 plasmid linked with gRNAs at 13 sites near the long arm telomere showed the highest efficiency (about 17%). Further improvement is needed to induce chromosome removal using dCas.

研究分野：遺伝子編集

キーワード：エクソソーム 遺伝子編集 iPS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1．研究開始当初の背景

ダウン症候群（DS）は、21 番染色体がトリソミーであることにより、知的障害や、心奇形、血液疾患、内分泌疾患など多彩な合併症を引起す。これら合併症に対し、現在、器官別治療や療育医療が行われているが、過剰染色体の消去を目指した研究活動は国内外にほとんどない。注目すべき事に、トリソミー細胞と正常核型細胞の混在をみるモザイク型 DS では、生体のトリソミー細胞構成比率と合併症発症率が相関をなし、トリソミー細胞が全体の 20%以下では知的障害を含めた DS 表現型は全く呈さない。ゆえに、後天的にモザイク型に誘導が可能になれば、合併症を含む表現型の多くを大幅に抑制・治療する事が可能となり得る。

染色体消去という一見不可能とされる技術  
を、安全性および効率の点において改良・創造することで臨床応用に発展させうることが出来るか否か in vitro および in vivo 試験で検証する。医学・医療の発展により、約 40 年前までは 20 歳であった平均寿命は約 50 歳と延長している。しかしながら、知的障害における治療は確立しておらず、DS 患者およびそのご家族の将来への不安は計り知れない。

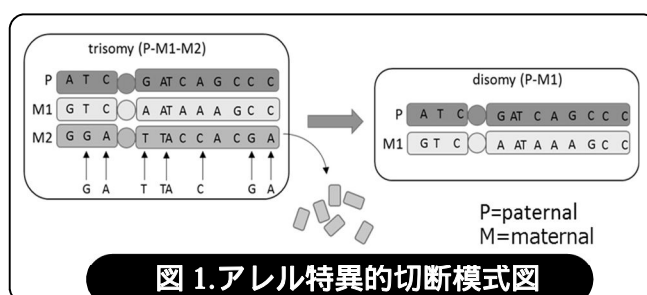


図 1. アレル特異的切断模式図

申請者らグループはこれまで、細胞分裂が不要な染色体消去方法を研究してきた。具体的には、アレル特異的な SNP 配列を 21 番染色体全長にわたり調査する方法を見出し、30 箇所以上を選定した。選定した数箇所の過剰染色体特異的 gRNA を CRISPR/Cas9 と共に搭載したプラスミドを DS 由来 iPS 細胞にエレクトロポレーションすることにより低効率ではあるが、ダイソミー細胞を取得している（図 1.）。さらに効率を高めるために標的箇所を増やし、CRISPR/Cas9 を deadCas9（dCas9）に置き換え DNA 修復阻害タンパクを特定箇所に結合させる等の改良を進めた。

一方、エクソソームは、鼻腔内投与することで脳内へ移行することが報告されている。臓器特異性を有するエクソソーム内にプラスミドを搭載し、脳内でのみトリソミックレスキューが誘導されれば、QOL の大幅な改善に繋がる。鼻腔内投与は、非侵襲的で頻回投与が可能なため、臨床応用への期待が高まる。そこでまず DS 由来 iPS 細胞よりエクソソームを大量精製することが必要となる。そのエクソソームに申請者らが作製中のプラスミドを搭載し、後天的トリソミックレスキューを in vitro で検証することを目的とした。

本研究は、核型の後天的修正はおよそ不可能とする常識にあえて抵抗するものであり、核型正常化という方法を指向する点において、トリソミー由来合併症に対する他に類をみない根源的な対処方法の開発に直結する。加えて本研究は潜在的に、他の染色体異数性疾患、あるいは一部の Alzheimer 病の治療戦略に直結しうる。

### (1) これまでの研究活動

申請者グループは、これまで DS 由来 iPS 細胞を用いて後天的な核型正常化方法の開発を目標に研究してきた。3 本の 21 番染色体のうち、特定の 1 本の染色体上の塩基配列の相違を利用し、複数の Cas を結合させて何らかの生化学的作用を期待するためには、SNP などの固有の塩基配列が 3 本のうちのどの染色体上に個別に存在するか知る必要がある。これは、相の決定あるいはフェージング(phasing)と呼称される作業が既に完了している(図 2.)。すなわち、特定の 21 番染色体上の配列のみに結合する CRISPR/Cas9 システムが構築可能な状態にある。

【現在までの過剰染色体消去に関する国内外の研究動向】

21 番染色体のトリソミー細胞における過剰染色体を後天的に消去し、正倍数性の細胞(21 番染色体が 2 本の正常核型細胞)を誘導することを目的とした研究はこれまでに少数行われてきた。理論上 DS(anuploidy)では 21 番染色体が 3 本あることにより、21 番染色体上の遺伝子コピー数が等しく正倍数性(euploidy)の 1.5 倍となっている。事実、DS では 21 番染色体上の 220~320 の遺伝子のうち、約 1/3 に過剰発現をみる。これらの遺伝子の作用を抑制する方法で、X 染色体不活性化遺伝子 Xist を用いた 21 番染色体の不活性化による遺伝子発現正常化が in vitro で報告されたが、ゲノム改変を用いるため、臨床応用には不適である。一方、21 番染色体上の DYRK1A 遺伝子の過剰発現は脳神経組織の成熟を阻害するため、この阻害薬を用いた臨床試験が行われた(NCT01394796, Phase 2)。これは有益な結果を示した唯一の臨床研究であるが、効果は軽微でかつ服用中止とともに効果もキャンセルされる。DS 表現型に直接与ると考えられる遺伝子は 100 前後あり、これら全ての遺伝子の作用を個別に減弱させ適正化するの、およそ非現実的である。

### 2. 研究の目的

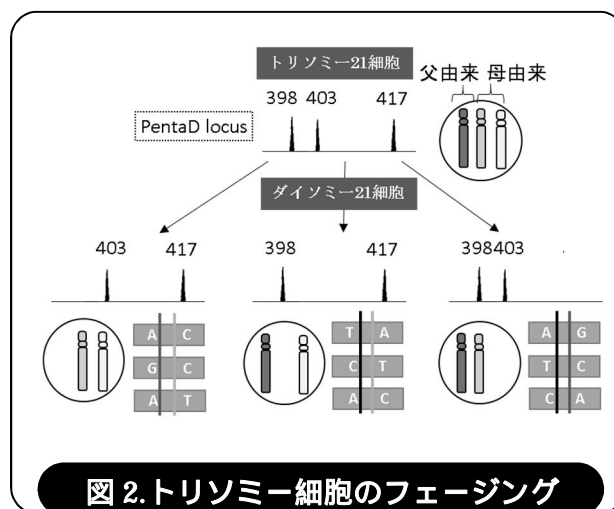
本研究は、過剰 21 番染色体 1 本の全消去(whole chromosome deletion、全染色体消去)により核型正常化を誘導し、表現型の改善を意図するものであり、病因本幹に着手する本質的な方法論である。

エクソソームは鼻腔投与から脳内移行するため苦痛なく頻回投与が可能である。核酸の封入効率や体内動態に改善の余地はあるものの、申請者らの目的である脳標的ベクターとしてエクソソームは最適であると考え、エクソソームベクターと組み合わせたトリソミックレスキューを誘導出来るか否かを検証した。

核型修正を方法とした医学的介入を臨床的に行うためには、ゲノム改変を行わないこと、標的細胞が制限されていること、安全性が担保されていること、頻回な介入が可能であること、後天的な細胞分裂が極端に少ないとされる神経系細胞標的とする場合細胞周期非依存性の作用が望ましいこと、が挙げられる。生殖細胞系列が標的とならないためにも、標的細胞へのターゲティングが必須である。また、ゲノム編集を回避するためには、dCAS による DNA 修復阻害タンパク質結合による新規染色体消去法の確立も必須となる。

### 3. 研究の方法

#### (A) エクソソーム内封入方法の構築



DS 由来 iPS 細胞培養上清よりエクソソーム大量精製する条件検討を行った。DS 由来 iPS 細胞を培養する際の培地や添加する試薬を検討した。精製は、培養上清を超遠心することが一般的であるが、大量精製するのに不向きであるため、ポリマー吸着キットを用いて精製した。申請者らグループは、ポリマー吸着キットにて DS 由来 iPS 細胞放出エクソソームを精製し、電子顕微鏡にてエクソソームの存在を確認している。

#### (B) 新規核型修正法の改良と in vitro トリソミックスキュー

DS では、卵子形成過程での第 1 減数分裂の不分離が最も多い (75%以上)。この場合 21 番染色体は、父親由来 1 本、母親由来 2 本で、計 3 本がすべてヘテロとなる。21 番染色体上の遺伝子において、明確なゲノムインプリンティング機構の発現様態をとるものは報告されていないが、母性発現遺伝子の存在を間接的に示唆する既報があり、母親由来の 1 本を標的として染色体消去を指向するのが自然である。

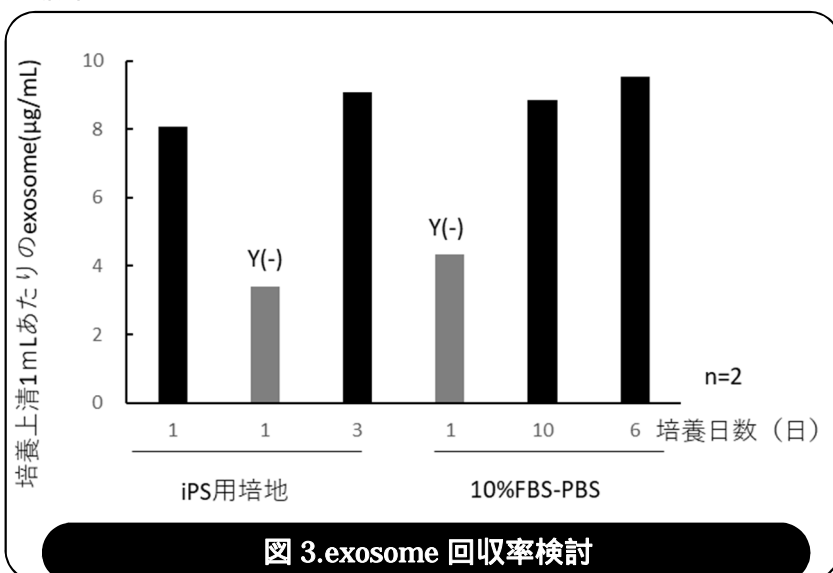
本研究で使用する DS 由来細胞は、本施設の臨床試験で採取された、21 番染色体の由来が判明している細胞株である。ゲノム編集を伴わない方法に改変するために、現在使用している CRISPR/Cas9 を deadCas9 (dCas9) に置き換えた。dCas9 は、DNA 切断活性が不活性化されている Cas 変異体で、gRNA と共に特定の塩基配列に結合する。gRNA および dCas9 との fusion protein を発現させることで、DNA は活性酸素等により常に損傷を受けており、精巧な DNA 修復機構により維持しているが、この修復機構をブロックすることで染色体消去を試みた。gRNA は、申請者らグループが既に関連した、NGG 配列を有し、かつ特定の 21 番相同染色体に特有な一塩基多型 (SNP) 情報 (ハプロタイプ情報) を用いて設計した。特定の 21 番染色体上に、dCas9 を複数結合させ、染色体消去の効率を評価した。ダイソミー化効率は蛍光 in situ hybridization (FISH) 法にて評価した。

染色体消去の判定を簡便にするための新規評価系として、21 番染色体各々に別の蛍光色素 (赤、青、緑) を発現させた DS 由来 iPS-3color 細胞を作製した。この細胞を用いて染色体消去を誘導した場合、消去された染色体の由来が色で判別可能である。細胞を回収し、FACS にて染色体除去効率を評価した。

### 4. 研究成果

#### (A) エクソソーム内封入方法の構築

DS 由来 iPS 細胞培養上清よりエクソソーム大量精製方法を検討した。培地量を削減するため、培地および PBS にて培養した場合のエクソソーム収量を検討した。精製は、ポリマー吸着キットにて DS 由来 iPS 細胞放出エクソソームを精製し、定量比較した。培養上清 1mL 当たりのエクソソーム量を比較すると iPS 用培地と PBS は同程度



であった。Y 非添加によりエクソソーム量が低下することから、エクソソームを大量取得するため

には、Yが必要であることが示された(図3.)。しかし、細胞数が増えるとカラムの目詰まりが起こり、収量が頭落ちになるため、エクソソーム回収方法を変更する必要が出てきた。エクソソームへプラスミドを封入するまでに至っていない。

## (B) 新規核型修正法の改良と in vitro トリソミックスレキュー

CRISPR/Cas9 を deadCas9 (dCas9) に置き換えたプラスミドを作製し、特定の 21 番染色体上に、dCas9 を複数結合させることによる染色体消去の効率を評価した。ダイソミー化効率は蛍光 in situ hybridization (FISH)法にて評価した。gRNA を搭載していないemptyと比較してdCasで約 4% 染色体除去が上昇した(図.4)。しかし、同じ gRNA を搭載した Cas9 では約 17%であり、dCas を使用した染色体除去の詳細な評価を行うためには、効率を上げる工夫が必要と考えられた。

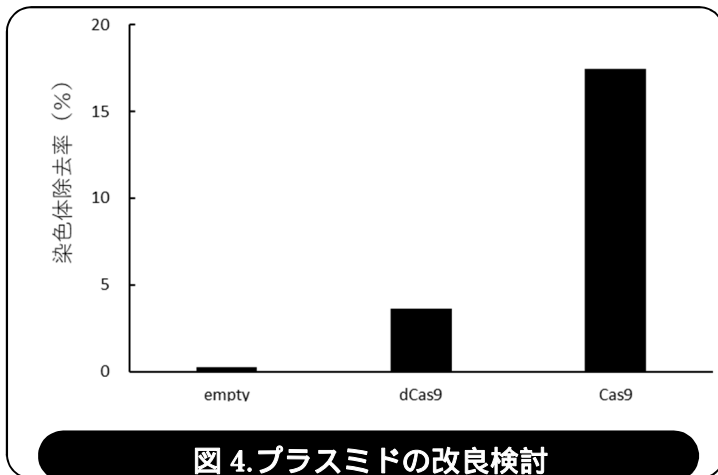


図 4. プラスミドの改良検討

染色体消去の判定を簡便にするための新規評価系として、21 番染色体各々に別の蛍光色素(赤、青、緑)を発現させた DS 由来 iPS-3color 細胞を用いて染色体消去を誘導した場合、消去された染色体の由来を FACS にて簡便に評価した。結果、切断なしの empty-Cas9 と比較して、21 番染色体ランダムに切断する 21AB では、3 色全てにおいて発色していない細胞集団が約 2% 検出された(図.5、6)。21 番染色体 3 本のうち 1 本だけ(M2 染色体を標的)を標的として切断する tel13R では、M2 の色(Red)のみ消失した細胞集団が約 8%検出された。しかし、細胞増殖により色が自然に抜けてしまう細胞も見受けられ、絶対的な評価には適さない系であると考えられた。今後、細胞の改善が必要である。

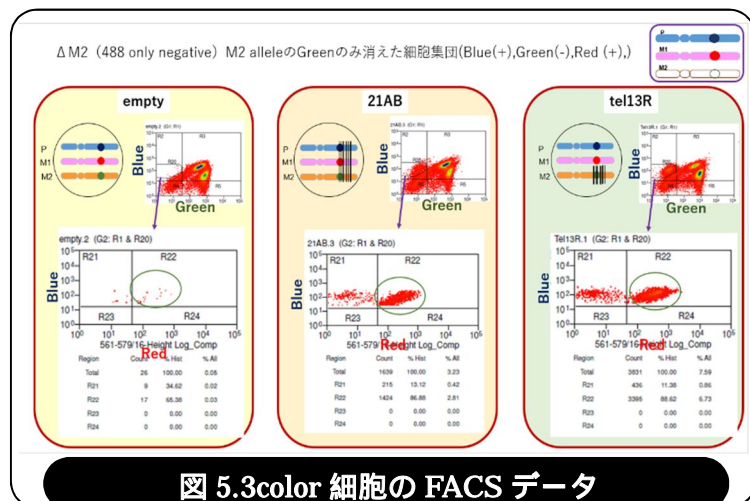


図 5. 3color 細胞の FACS データ

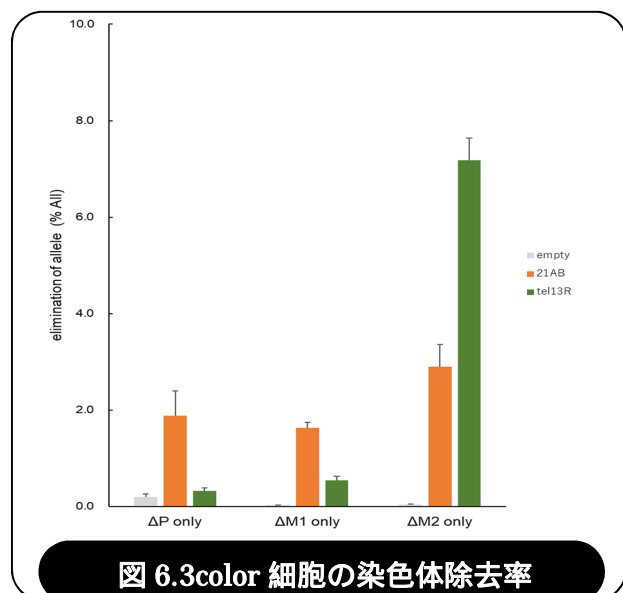


図 6. 3color 細胞の染色体除去率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋詰 令太郎
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 を用いた染色体切断による異数性細胞からの染色体除去は可能か？
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 脇田幸子、原万里、河谷沙由花、橋詰令太郎
2. 発表標題 CRISPR/Casシステムを用いたトリソミックレスキューの誘導
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	原 万里  (HARA MARI)  (30176383)	三重大学・医学部・教務職員   (14101)	

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 協 力 者	橋詰 令太郎  (HASHIDUME RYOTARO)  (50456662)	三重大学・医学部・講師   (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------