

# 研究報告書

## 「光照射により任意の組織においてゲノム編集・遺伝子発現操作する技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月 ~ 2020 年 3 月

研究者: 高山 和雄

### 1. 研究のねらい

10 年前に登場したオプトジェネティクス技術は、光照射による厳密な時空間の人為的操作のもと、生命現象の因果関係を明確に言及しうる科学をもたらした。時を同じくして開発された、ゲノム編集のみならず任意の遺伝子発現を操作できる CRISPR-Cas9 システムも飛躍的發展を見せたが、時空間の細かな狙い撃ちまでは達成できていない。その問題克服には、CRISPR-Cas9 システムへのオプトジェネティクス技術の導入が有用である。すなわち、両者の技術融合により、特定の組織におけるゲノム配列や遺伝子発現レベルを、特定のタイミングの光照射により操作できるため、生命現象に変化を与える要因を高精度に特定することが可能になる。

したがって、CRISPR-Cas9 システムとオプトジェネティクス技術の融合は、生命科学の躍進に寄与すると期待されているが、光感受性を付与した CRISPR-Cas9 タンパク質を設計・作製するだけでは汎用性が高いツールにはなり得ない。なぜならば、観察対象となる組織や個体への遺伝子導入の段階で、遺伝子改変動物の作製は労力と時間を要するものであり、一方で簡便さを優先した従来のウイルスベクターの利用では感染効率の低さがゆえに標的とする組織への高効率かつ均一な遺伝子導入が望めないからである。

そこで本研究課題における達成目標は、次世代の生命科学研究において、あらゆる研究者が使用できる「高い汎用性と利便性を兼ね備えたゲノム編集および遺伝子発現操作のためのオプトジェネティクス技術」を開発することである。本研究者の所属する研究室ではこれまでに、全身のあらゆる細胞や組織に対して高効率に遺伝子導入できる改良型 Ad(アデノウイルス)ベクターを独自に開発している。ゲノム編集および遺伝子発現操作のためのオプトジェネティクス技術の汎用性と利便性を高めるために、改良型 Ad ベクターを駆使して本達成目標を実現するツール(称して「Opt/Cas-iAd ベクターシステム (Optogenetically-modified CRISPR/Cas9-expressing improved-Ad vector system)」)の開発に取り組む。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、【テーマ 1】ゲノム編集のみならず任意の遺伝子発現を操作できる CRISPR-Cas9 システムに時空間の細かな狙い撃ちができる能力を付与するため、光感受性のある CRISPR-Cas9 システムを用いる。次に、【テーマ 2】光感受性 CRISPR-Cas9 システムを簡便かつ効率的に標的組織に導入するために、遺伝子導入効率に優れた改良型 Ad ベクターを用いて、「Opt/Cas-iAd ベクターシステム (Optogenetically-modified CRISPR/Cas9-expressing improved-Ad vector system)」を構築した。最後に、【テーマ 3】前立腺癌の治療を例として、Opt-Cas-iAd ベクターシステムの有効性の証明を行った。

【テーマ 1】Opt-Cas-iAd ベクターに内蔵する Opt-Cas カセットの作製

CRISPR/Cas9 システムを使えば、わずか 20 塩基からなる gRNA (guide RNA) を設計するのみで、いかなる遺伝子座におけるゲノム編集も遺伝子発現操作も、簡単・迅速に実施できることが担保されている。本研究では、CRISPR-Cas9 システムに光依存性を付与するため、光照射により CIB1 (Calcium and integrin-binding protein 1) とヘテロ二量体を形成できる光感受性タンパク質 CRY2 (Cryptochrome 2) を用いる。CRISPR-Cas9 システムに改変を加え 2 分割し、それぞれ CIB1 と CRY2 と融合させることにより、光応答的にゲノム編集や遺伝子発現操作できる CRISPR-Cas9 カセット (Opt-Cas カセット) を作製した。

#### 【テーマ 2】感染能力の高い改良型アデノウイルスベクターへの搭載

従来のオプトジェネティクス技術では、レンチウイルスベクターや AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターが遺伝子導入ツールとして汎用されてきたが、それぞれ感染効率の低さ、搭載する遺伝子カセットの大きさ等に厳しい制限がある。これらの問題点を克服できるツールとして Ad ベクターが期待できる。特に、所属研究室が独自開発した改良型 Ad ベクターは Ad 受容体の発現の有無に関わらず、ほとんどの細胞や組織に対して高効率に遺伝子導入できる。また、改良型 Ad ベクターは AAV ベクターとは異なり、サイズの大きい CRISPR-Cas9 システムも搭載できる。所属研究室が有する Ad ベクター改変技術を駆使し、細胞種や臓器を問わず光応答性のゲノム編集・遺伝子発現操作カセットを高効率に導入可能な改良型 Ad ベクター「Opt-Cas-iAd ベクター」を開発した。

#### 【テーマ 3】Opt-Cas-iAd ベクターの有用性の検証

本研究で開発した Opt-Cas-iAd ベクターの有用性を証明するために、前立腺癌治療への効果を検証した。前立腺は経尿道的にアクセス可能な位置にあるため、非侵襲的に光照射及び Ad ベクターを局注できる。癌抑制遺伝子を搭載した Opt-Cas-iAd ベクターを作製し、前立腺癌の細胞株に対する効果を検証するとともに、前立腺癌モデル動物を用いて、本ベクターの有用性を詳細に検討した。

上述の研究開発により完成した Opt-Cas-iAd ベクターは、動物や臓器の種類を問わない高効率なゲノム編集・遺伝子発現操作を可能とするツールである。簡便かつ汎用性の高い本システムにより、光遺伝学を神経科学だけにとどまらず、疾患・生命科学全般にイノベーションを起こす技術へと発展させたい。

#### (2) 詳細

##### 【テーマ 1】Opt-Cas-iAd ベクターに内蔵する Opt/Cas カセットの作製

本研究では、まず、光照射によって、任意の遺伝子発現を操作する技術の開発を行った。CIB1 (Calcium and integrin-binding protein 1) とヘテロ二量体を形成できる光感受性タンパク質である CRY2 (Cryptochrome 2) を活用した。また、任意の領域の転写制御を行うために、CRISPR-Cas9 システムを適用した。通常の Cas9 タンパク質は、DNA 2 本鎖切断活性を有しているが、DNA 2 本鎖切断能を失活した dCas9 と転写調節ドメインを融合することにより、gRNA (guide RNA) を設計した位置において転写を制御できる。これらの要素を組み合わせ、まずは、CIB1-dCas9 の融合体、CRY2 と転写活性化ドメイン VP64 の融合体 (CRY2-VP64) を作製した。gRNA 発現プラスミド、CIB1-dCas9 発現プラスミド、CRY2-VP64 発現プラスミドを培養細胞に同時にトランスフェクションし、光を照射した。その結

果、gRNA を設計した位置において CIB1-dCas9 と CRY2-VP64 が複合体を形成し、転写の操作ができることを確かめた (Takayama K and Mizuguchi H. ACS Chem Biol 2018)。標的遺伝子として、がん抑制効果がある遺伝子 Dkk3 をターゲットとする Opt-Cas カセットを作製した。

#### **【テーマ 2】感染能力の高い改良型アデノウイルスベクターへの搭載**

次に、上述の光応答性のゲノム編集および遺伝子発現操作の技術を動物個体レベルに適用可能なものにするため、本研究では、所属研究室が開発したあらゆる組織に対して高効率に感染可能な改良型 Ad ベクターを用いた。改良型 Ad ベクターとして、CAR とヘパラン硫酸を認識する AdK7 ベクターを使用した。CIB1-dCas9 と gRNA を発現する改良型 Ad ベクター、CRY2-VP64 を発現する改良型ベクターの 2 種類を作製した。なお、単一の Ad ベクターが複数の遺伝子発現を操作できるように、単一 Ad ベクターに複数の gRNA 発現カセットを搭載させた。動物実験を実施するためには高タイトルのウイルスが必要であることから、Opt-Cas-iAd ベクターの大量調製も行った。

#### **【テーマ 3】Opt-Cas-iAd ベクターの有用性の検証**

Opt-Cas-iAd ベクターの有用性を証明するために、本研究では前立腺癌への応用を目指した。まずは、*in vitro* で前立腺癌の細胞株 (LNCaP、PC-3 細胞等) を用いて、本ベクターの癌抑制効果を確認した。これらの細胞株に Opt-Cas-iAd ベクターを作用させたのちに、青色光を照射することにより、標的遺伝子である Dkk3 の遺伝子発現を誘導できることを確かめた。その際に、標的以外の遺伝子の誘導が認められないことを網羅的な遺伝子発現解析により確かめた。次に、皮下に PC-3 細胞を移植した異所性前立腺癌モデルマウスを作製し、これを用いて本ベクターの癌抑制効果を確認した。皮下腫瘍に対して、Opt-Cas-iAd ベクターを投与したのち、青色光を照射することにより、腫瘍体積がコントロール群 (非光照射群) よりも小さくなることを確認した。さらに、腫瘍部位で標的遺伝子である Dkk3 がタンパク質レベルで発現誘導できていることを確かめた。

以上のことから、開発した Opt-Cas-iAd ベクター (Takayama K and Mizuguchi H. ACS Chem Biol 2018) を用いて、光依存的な遺伝子治療が可能であることが証明できた。本技術により、遺伝子治療技術の正確性と安全性が向上することを期待する。

### **3. 今後の展開**

上述のスキームによって完成した Opt-Cas-iAd ベクターは、あらゆる組織や個体を標的とした任意の遺伝子座におけるゲノム編集や遺伝子発現の操作を可能とする。本技術はマウスだけでなく、より大型の動物やヒトにも適用可能な技術としての発展性が見込まれる。様々な動物個体のあらゆる臓器において光遺伝学を用いて生命現象の解明を試みる研究分野の開拓と創造が期待できる。

### **4. 自己評価**

当初の研究目標はほぼ 100% 達成できた。また、研究体制および研究費予算執行も特に問題なかったと自己評価している。光照射デバイスの開発や光操作のためのカセット開発では、他分野との研究者と緊密な共同研究を行った。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. **Takayama K.\***, Mizuguchi H.\* Generation of Optogenetically Modified Adenovirus Vector for Spatiotemporally Controllable Gene Therapy. *ACS Chem Biol.*, 2018 Feb 16;13(2):449-454.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:3 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 2018 年 日本薬学会 奨励賞
2. 2018 年 第 2 回バイオインダストリー奨励賞