

塩基編集を用いた難治性心筋症の新規治療法の構築

西山崇比古

慶應義塾大学医学部 循環器内科

【研究の背景】

拡張型心筋症(DCM)は、心機能低下や致死性不整脈を引き起こし、心不全の原因を占める主要な疾患の一つであり、原因遺伝子の多岐にわたることが知られている。DCMの原因遺伝子であるRNA結合タンパク質(RNA binding motif protein 20: *RBM20*)の変異は家族性DCMの2-6%に認められる。*RBM20*の遺伝子変異によるDCMの病態は、急速に進行する心機能障害と、致死性不整脈が発生することが特徴であり、DCMの中でも非常に予後が不良であることが知られている。しかし、現時点では遺伝子変異を同定しても、治療対象とすることは困難であり、心臓移植のみが唯一の治療法である。

【目 的】

本研究では、新規遺伝子編集技術である、Prime editing (PE)を用いて心筋症の遺伝子変異を修復する技術の構築を目的とする。PEは逆転写酵素とプライムエディターガイドRNAを組み合わせることで、任意の塩基対置換、挿入、削除を行うことができるようになった。プライムエディターガイドRNAはpegRNAと呼ばれ、標的DNA配列と結合する部分と、新しいDNA配列を導入するためのテンプレートを含む部分の2つの部分から構成されている。逆転写酵素は、このテンプレートに基づいて新しいDNA配列を合成し、標的部位に導入することができる。Prime editingは、非常に精密な修正を可能にし、幅広い遺伝子変異を修復することが可能となった。これらの技術の進歩は、急速に進んでおり、さまざまな方法や応用が研究されてきた。そして、技術的な応用だけでなく、いかに生体内で作用させるか、特定の臓器や細胞に伝達させることができるかという点が注目されるようになってきている。本研究は、PEを用いて新たなDCMの*RBM20*変異に効果があるかどうかを検討した。

【方 法】

•HEK293細胞による変異株の樹立

遺伝子編集効率の確認のために、RSRSP配列内の遺伝子変異である*RBM20* R634W、S635A、S637G、P638L変異株の作成を行う。*RBM20*遺伝子の変異配列を含むベクターを作成し用いて、HEK293細胞を細胞に導入を行い、変異株を作成した。

遺伝子配列には、gBlockにて作成して、ベクターにクローニングして、細胞に導入した。細胞からDNAを抽出し、サンガーシーケンスにより、配列が適切に導入されていることを確認した。

•Prime editing コンポーネントの準備¹⁾

Prime editingには、

pU6-pegRNA-GG-acceptor plasmid

pmCherry_gRNA plasmid

pCMV-PE2-P2A-GFP plasmid

pCMV-PEmax plasmid

を用いて、コンストラクト作成した。

pegRNA は DNA オリゴから配列を作成し、クローニングにてベクターに導入して、シーケンスにて配列を確認した。

・非ウイルスベクターを用いた Prime editing (PE) のデリバリーシステムの構築

遺伝子編集コンポーネントの細胞への導入を目的としたウイルス様粒子などの非ウイルス性デリバリーシステムの構築を行う。PE を目的としたシステムの構築を主に行う。PegRNA に関しては以前に報告されたものを使用する²⁾。

非ウイルス性デリバリーシステムとして、

gag-MCP-pol

gag-PE

MS2-epgRNA-Dnmt1

を使用して、本研究の epegRNA を組み入れて使用した^{3, 4)}。

・遺伝子編集効率の確認

HEK293 細胞における編集効率の確認

HEK293 細胞には、非ウイルス粒子を培養液中に直接添加し遺伝子編集効率を確認した。

【結 果】

遺伝子編集効率の確認のために、RSRSP 配列内の遺伝子変異である *RBM20* R634W、S635A、S637G、P638L 変異株の作成を行い、それぞれの変異に対する新規の HEK293 細胞を構築した。サンガーシーケンスにより、正確に遺伝子導入が行われていることが確認された(図1)。

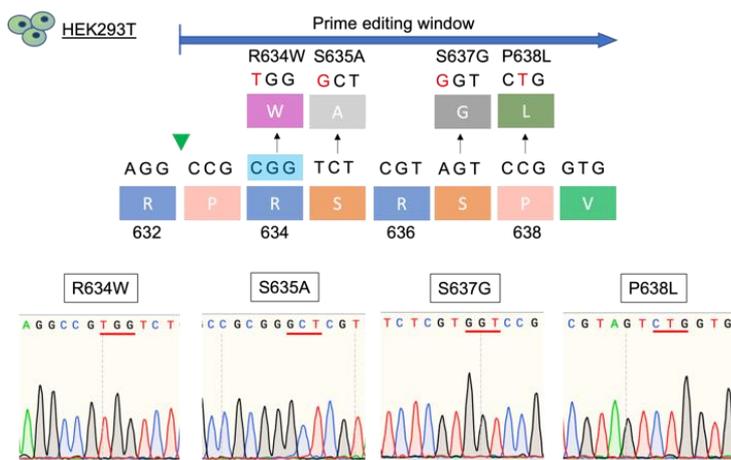


図1:RBM20 遺伝子の RSRSP 配列変異株の作成

その後、gag-MCP-pol、gag-PE、MS2-epgRNA-Dnmt1 プラスミドを用いて、遺伝子編集用の新規のコンポーネントを作成した。また、ウイルス様粒子を作成し、樹立した新規 HEK293 細胞株の2種類(R634W と S635A 変異)にて、遺伝子編集が行われるかを検討した。その結果、R634W と S635A 変異に対して、編集が行われていることが確認できた(図2)。

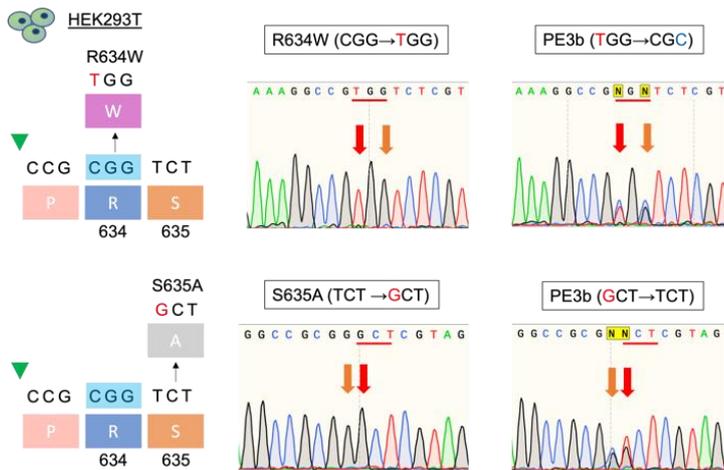


図 2: Prime editing による R634W と S635A 変異に対する遺伝子編集効果

今後は、iPS 細胞で変異株を樹立し、心筋細胞に分化させて、ウイルス様粒子による編集が可能であるかの検討を行い、in vivo での研究に繋げていく予定である。

【考 察】

主な非ウイルス性デリバリーシステムには、脂質ナノ粒子 (LNP)、ウイルス様粒子、ナノカーゴなどが知られている⁵⁾。非ウイルス性デリバリーシステムには、いくつかのメリットとデメリットがあり、安全性についてはウイルスベクターに比べて、免疫反応や遺伝子組み換えリスクが低い。製造コストもウイルスベクターに比べて製造コストが低く、大規模生産が可能であることが知られている。多様性でも比較的さまざまな細胞タイプや組織に適用可能とされている。しかし、デメリットとしてはウイルスベクターに比べてデリバリー効率が低いことがある。長期に持続しないことは、遺伝子編集コンポーネントが細胞内に長期間とどまらないというメリットとしても考えられるが、一回の効率が落ちるというデメリットにもつながる。今後、非ウイルス性デリバリーシステムと遺伝子編集技術を組み合わせた研究がより一層必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回の研究では非ウイルスベクターを使った遺伝子編集が細胞レベルでは可能であった。今後は生体での検証が必要である。臨床試験においては、安全性や有効性の確認が重要であるが、これらの研究結果により、将来的に DCM 治療の新たな選択肢が提供されることが期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Samagya Banskota, Aditya Raguram, David R Liu et al. Engineered virus-like particles for efficient in vivo delivery of therapeutic proteins. *Cell*. 2022 Jan 20;185(2):250–265.e16.
- 2) Takahiko Nishiyama, Yu Zhang, Eric N. Olson et al. Precise genomic editing of pathogenic mutations in RBM20 rescues dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*. 2022 Nov 23; 14(672): eade1633.
- 3) Samagya Banskota, Aditya Raguram, Susie Suh, Samuel W Du, Jessie R Davis, Elliot H Choi, Xiao Wang, Sarah C Nielsen, Gregory A Newby, Peyton B Randolph, Mark J Osborn, Kiran Musunuru, Krzysztof Palczewski, David R Liu. Engineered virus-like particles for efficient in vivo delivery of therapeutic proteins. *Cell*. 2022 Jan 20;185(2):250–265.e16. doi: 10.1016/j.cell.2021.12.021. Epub 2022 Jan 11.
- 4) Meirui An, Aditya Raguram, Samuel W Du, Samagya Banskota, Jessie R Davis, Gregory A Newby, Paul Z Chen,

Krzysztof Palczewski, David R Liu. Engineered virus-like particles for transient delivery of prime editor ribonucleoprotein complexes in vivo. *Nat Biotechnol.* 2024 Jan 8;10.1038/s41587-023-02078-y. doi: 10.1038/s41587-023-02078-y.

- 5) Felix Horns, Joe A Martinez, Chengcheng Fan, Mehernaz Haque, James M Linton, Victoria Tobin, Leah Santat, Ailiena O Maggiolo, Pamela J Bjorkman, Carlos Lois, Michael B Elowitz. Engineering RNA export for measurement and manipulation of living cells. *Cell.* 2023 Aug 17;186(17):3642-3658.e32. doi: 10.1016/j.cell.2023.06.013. Epub 2023 Jul 11.