

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 大阪医科薬科大学
薬学部 感染制御学研究室
職・氏名 教授・駒野 淳

研究テーマ：新規タンパク質送達技術 NanoMEDIC の有用性検証

研究期間：

2022 年 4 月 1 日 ～ 2024 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 駒野 淳 (大阪医科薬科大学・薬学部・感染制御学研究室・教授)

<共同研究機関>

研究代表者 堀田 秋津 (京都大学 iPS 細胞研究所・准教授)

研究目的：

日本が世界に貢献した iPS 細胞は再生医療成功の鍵を握っている。しかし、臨床応用に際しては安全性への懸念がある。そのひとつが治療用細胞の安全性である。iPS 細胞は転写因子を体細胞に導入することにより作出されるが、安全性の観点から、導入法は改善の余地がある。タンパク質を直接細胞内に導入する技術も報告されているが技術的な完成度は高いとは言えない。近年では iPS 細胞に内在性のゲノム不安定性があると指摘されている。脱分化そのものがゲノム不安定性を誘発していると考えられる (Adv Exp Med Biol 2019)。iPS 細胞を利用した臨床応用に注目が集まる一方、安全性に関する懸念を払拭するための基礎的な技術開発は遅れている。iPS 細胞を経由しない Direct cell reprogramming (DCR) は治療用細胞の作出に要する期間も短く、変異誘発リスクが比較的低いとされ、再生医療を実用化する観点から高く評価されている (J Biol Engineer 2019)。iPS 細胞の樹立・再分化と共通する問題点として ゲノム障害・細胞悪性化を回避できる簡便かつ一過性の転写因子導入技術 は十分に確立されていない。

我々は科研費 B、AMED の支援を得てこれを解決する技術基盤 NanoMembrane-derived Extracellular vesicles for the Delivery of macromolecular Cargo (NanoMEDIC) 法を開発した。これはタンパク質や RNA を直接細胞に導入する非常に簡便な方法で、我々がウイルス学の基礎研究で得た成果に基づいて独自に開発した技術である (Sci Rep 2012; Nat Commun 2020)。これまでに遺伝子編集酵素 Cas9 やレポータータンパク質を細胞に送達することに成功している。本研究では NanoMEDIC による Cas9 導入でオフターゲット効果が生じるリスクを検証する。その上で、転写因子を細胞に導入して DCR するための技術としての潜在性を評価することを目的とする。

研究内容および研究成果：

Cas9-NanoMEDIC を用いて、核酸のトランスフェクションと比較して Cas9 によるオンターゲット編集の質と効率を評価した。モデル実験系には我々がすでに確立したレポーターシステムを利用した (Leukemia 2013)。具体的には、HTLV-1 provirus の LTR に存在する配列で firefly luciferase を挟んだレポーター遺伝子を用い、この遺伝子が Cas9 により Removal editing されると renilla luciferase が発言するシステムである。ヒト細胞株 293FT 細胞と NP2 細胞へレポータープラスミドを導入したうえで、LTR を標的とする Cas9/gRNA 複合体を NanoMEDIC またはトランスフェクションにて送達した。Removal editing された標的遺伝子を解析したところ、NanoMEDIC ではほぼ全ての細胞に Cas9/gRNA を送達できること、indel を伴わない removal editing を起こす頻度が有意に高いことがわかった。この結果は間接的に NanoMEDIC による Cas9/gRNA 送達がオフターゲット効果を生じにくい技術であることを示唆する。遺伝子細胞治療において遺伝子編集は重要な技術基盤であり、CRISPR-Cas9 システムは中心的な役割を期待されている。本研究により、NanoMEDIC がオフターゲット効果を伴いにくい Cas9/gRNA の送達法として有用であることが示された。また、細胞への送達効率が高いことから、DCR するための技術としても有用性が高いことが示唆された。現在、オフターゲット候補遺伝子における編集の有無を直接評価しており、結果がまとまり次第、論文発表する予定である。

成果発表：

<原著論文>

- ・特記すべきことなし

<学会発表>

・富田 智称, 中村 友寿, 栗田 芳樹, 濱 みなみ, 八木 真裕子, Gee Peter, 堀田 秋津, 駒野 淳.
新規 RNP 導入法 NanoMEDIC による Cas9/gRNA 送達の有用性に関する研究. 第 7 回 日本ゲノム編集学会 2022 年 6 月 ポスター賞

・富田 智称, 中村 友寿, 栗田 芳樹, 濱 みなみ, 八木 真裕子, Gee Peter, 堀田 秋津, 駒野 淳.
遺伝子編集における新規 RNP 導入法 NanoMEDIC の有用性に関する研究. がん予防学術大会 2022 京都 2022 年 7 月 研究症例賞

<その他>

- ・特記すべきことなし