

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書



平成28年5月9日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 申請時:京都大学医学研究科博士課程4年

現 在:米国国立衛生研究所

博士研究員

氏 名 新 井 康 之

助 成 の 種 類	平成27年度 ・ 在外研究長期助成		
研 究 課 題 名	慢性肉芽腫症における新規治療法の開発		
受 入 機 関	米国国立衛生研究所		
渡 航 期 間	平成27年5月4日 ～ 平成30年5月3日(予定) (助成対象期間:平成27年5月4日～平成28年5月3日)		
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	300万円	
	使用した助成金額	300万円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	渡航航空運賃・運搬費等(60万円)	
		滞在費充当(240万円)	
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 外国で新規に生活を立ち上げるには、予想を超える出費が必要となりました。今回、本財団から出発前に助成金を受け取ることができ、新生活の立ち上げにあたり、大変心強い思いを致しました。		

2015年5月より、米国国立衛生研究所・アレルギー免疫研究所・生体防御研究部門・遺伝子免疫治療分野に博士研究員として留学し、慢性肉芽腫症（CGD）に対する新規治療戦略の開発を行っている。CGDは好中球における活性酸素産生障害を伴う先天性免疫不全の一つで、NADPH オキシダーゼ欠損がその原因であり、患者は幼少期より細菌、真菌感染を繰り返す疾患である。その治療法として、同種骨髄移植と、遺伝子治療が行われている。この遺伝子治療に関しては、従来よりレンチウイルスベクターを用いて、NADPH オキシダーゼを発現するDNAを導入する方法が用いられている。しかし、遺伝子発現の低さと、それに伴う活性酸素産生の経時的な減少が大きな問題点である。

そこで、レンチウイルスベクターの投与の代わりに、体外で直接原因遺伝子を修復する方法でより効率よく治療する戦略を考え、CRISPR/Cas9を用いたシステム構築を目指すこととした。CGDの代表的な原因遺伝子であるp47をターゲットとし、CRISPRのガイドRNAを設計した。続いて、血球系の細胞株（K562）を用いて、CRISPR/Cas9プラスミドをトランスフェクションし、細胞毒性および抗生剤ピュロマイシンによる選択効率が最適となる条件を検討した。続いて、p47欠損患者でよく見られる遺伝子変異点の上下50塩基配列と同じ一本鎖DNAを合成し、CRISPR/Cas9と同時にトランスフェクションすることで、患者と同じ変異を持つCGD-K562細胞株を作成した。この細胞株で活性酸素の産生が低下していることを確認し、これを治療のターゲットとして用いることとした。

続いて、変異を持つ塩基配列のみを認識し、正常配列は認識しないgRNAを設計し、上記のCGD-K562細胞株に対してトランスフェクションを行い、設計通りCRISPR活性を持つことを確認した。同様に、変異点を中心に上下50塩基配列に渡って正常の塩基配列をもつ一本鎖DNAを合成し、CRISPR/Cas9と同時にトランスフェクションを行い、修復効率を塩基シークエンスによって決定した。さらに、修復されたCGD-K562クローンにおいては、活性酸素酸性能が改善していることも確認した。

これら、*in vitro*での細胞株を用いた実験結果を基に、現在、患者におけるCRISPR/Cas9を用いた治療戦略を検討中である。具体的には、CGD患者から得られた造血幹細胞に対して、上記と同様の変異塩基配列特異的に認識するgRNAを用いて、CRISPR/Cas9による塩基の切断と、正常塩基配列一本鎖DNAの挿入を試みている。細胞株と違い、造血幹細胞では現時点で十分な効率を得られていない。トランスフェクションの方法（エレクトポレーションのプロトコルや、DNAを用いるかRNAを用いるか、あるいは、Cas9に関しては蛋白の直接投与方法を用いるか）について、様々な条件を試し、最も良い方法を検討中である。CGD造血幹細胞でも十分な修復効率が確認できれば、免疫不全マウスを用いた移植実験にて*vivo*での効果を検証し、問題なければ、ヒトにおける臨床試験を目指して、さらに詳細の解析を行う予定である。