



Title	CRISPR/Cas9システムを用いた劣性栄養障害型表皮水疱症の新規遺伝子治療法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高島, 翔太
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13696号
Issue Date	2019-06-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74967
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2487
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Shota_Takashima_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 高島 翔太

学位論文題名

CRISPR/Cas9 システムを用いた劣性栄養障害型表皮水疱症の新規遺伝子治療法の開発
(Efficient gene reframing therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9)

【背景と目的】

二本鎖 DNA 切断 (double strand break; DSB)が起きた際の修復経路として、数塩基の挿入や欠失を伴い再結合する非相同末端再結合 (non-homologous end-joining; NHEJ)、および相同染色体 DNA との交叉が起こり、正しい遺伝情報に基づき修復される相同組換え修復 (homologous recombination; HR) の二つの経路がある。実際に細胞内で DSB が生じた場合、NHEJ が高頻度に生じる。近年、特定の塩基配列で DSB を起こすことが可能な CRISPR/Cas9 システムが開発され、遺伝子治療に応用されている。本来遺伝性疾患の遺伝子治療を行う場合、HR による変異を有する DNA 配列から正常 DNA 配列への遺伝子組換えが理想的であるが、HR が生じる頻度は極めて低いため、選択マーカー等を用いずに HR を治療に応用することは困難である。そこで我々は HR に比し発生頻度が高い NHEJ の経路を介した遺伝子治療を開発することで、選択マーカーを用いるなどの複雑な工程を経ずに遺伝子治療が実現できると考えた。劣性栄養障害型表皮水疱症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa; RDEB) は、VII型コラーゲン (COL7) をコードする遺伝子 (*COL7A1*)の変異により発症し、日本人では高頻度に frameshift 変異 (c.5819delC) が認められる。そこで我々は本変異を有する RDEB 患者由来線維芽細胞 (RDEB Fb)に対し、変異特異的な CRISPR/Cas9 を用いて、NHEJ によって生じる数塩基の挿入や欠失を意図的に誘導することにより、ある一定の細胞において frameshift 変異が in-frame 化する新規遺伝子治療法の開発を試みた。

【材料と方法】

1. 変異配列特異的 CRISPR の作製と RDEB Fb の遺伝子編集

ZiFiT Targeter を用いて変異配列を特異的に認識する gRNA を設計し、Surveyor nuclease assay を用いて変異配列に特異的に DSB が生じているか確認する。

次に、作製した CRISPR/Cas9 を用いて RDEB Fb に遺伝子編集を行なった。遺伝子編集後の RDEB Fb には、NHEJ により複数種類の変異が誘導された細胞集団になっていることが予測される。そのためシングルセルクローニングにより単一細胞由来の細胞株を作製し、それぞれ更なる解析を行なった。

2. 遺伝子編集後 RDEB Fb の解析

in-frame 化した COL7 の解析を行うため、作製した細胞株と同一の変異を有する COL7AI cDNA を作製し、三本鎖形成能の解析を行なった。またそれぞれの細胞株での COL7 の発現を *in vitro* 及び *in vivo* の系で real time qPCR 法や免疫組織学的手法を用いて解析した。

3. NHEJ を介した遺伝子治療の有用性の検討

NHEJ を介して in-frame 化を含む様々な変異を誘導された細胞集団を用いて、western blot 法、real time qPCR 法、*in vivo* で免疫組織学的解析を行なった。また anchoring fibril の形成を観察するため、mCol7a1 ノックアウトマウスの皮膚を免疫不全マウスに植皮し、植皮部位に遺伝子編集後の RDEB Fb を投与し、8 週後に電子顕微鏡を用いて観察した。

【結果】

1. 変異配列特異的に認識する CRISPR の作製と RDEB Fb の遺伝子編集

Surveyor nuclease assay で、変異を有する allele のみで DSB が起き、NHEJ が誘導されていることを確認した。RDEB Fb をシングルセルクローニングして作製した 7 種類の細胞株のうち 4 つで遺伝子変異が in-frame 化していた。

2. 遺伝子編集後 RDEB Fb の解析

in-frame 化した変異 COL7 を強制発現させ、western blot 法を行ったところ、290kDa (monomer) と 900kDa (trimer) にバンドを認め、三本鎖形成能を有していることがわかった。またそれらの細胞株では real time qPCR 法で遺伝子編集前と比較して COL7AI mRNA の発現増加を認め、免疫不全マウスへの投与では真皮表皮境界部にヒト COL7 の発現を認めた。

3. NHEJ を介した遺伝子治療の有用性の検討

シングルセルクローニングを経ずに培養した群では治療前細胞群と比較して、mRNA レベル及びタンパクレベルで COL7 の発現量は増加しており、また免疫不全マウスへの投与でもヒト COL7 が発現していた。また遺伝子編集後 RDEB Fb 投与部で anchoring fibril の形成を認めた。

【考察】

CRISPR/Cas9 システムの開発以降、遺伝子治療の研究が盛んに行われており、HR を応用した遺伝子治療だけでなく、筋ジストロフィーなどの疾患では NHEJ を応用した治療戦略も報告されている。また RDEB では exon skipping やリードスルーといった手法を用いて、完全に正常な遺伝子配列に修復しなくても、高効率で機能的なタンパクを供与することが遺伝子治療の選択肢となりうると報告されている。本研究の結果は frameshift 変異で発症する表皮水疱症においても NHEJ を介した遺伝子治療は一つの選択肢となりうることを示唆された。

【結論】

我々は NHEJ を介した遺伝子治療が、従来の HR を用いた遺伝子治療よりも簡便に行うことができ、かつ有用な選択肢であることを示した。本研究で用いた手法は表皮水疱症だけでなく他の frameshift 変異で発症する皮膚疾患、ひいては多くの遺伝性疾患の治療選択肢となりうることを考える。