



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
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
DOI	10.14943/doctoral.k13696
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/74969">http://hdl.handle.net/2115/74969</a>
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2487
File Information	Shota_Takashima.pdf



[Instructions for use](#)

# 学位論文

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)

2019 年 6 月

北海道大学

高島 翔太



# 学位論文

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)

2019 年 6 月

北海道大学

高島 翔太

# 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 項
要旨	2 項
略語表	4 項
緒言	6 項
方法	24 項
結果	35 項
考察	53 項
結論	56 項
謝辞	57 項
利益相反	58 項
引用文献	59 項

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shota Takashima, Satoru Shinkuma, Yasuyuki Fujita, Toshifumi Nomura, Hideyuki Ujiie, Ken Natsuga, Hiroaki Iwata, Hideki Nakamura, Artem Vorobyev, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu  
Efficient gene reframing therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9  
J Invest Dermatol, in press

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Shota Takashima, Satoru Shinkuma, Yasuyuki Fujita, Toshifumi Nomura, Hideki Nakamura, Hiroshi Shimizu  
Efficient reframed gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9.  
The 7th International Investigative Dermatology (IID) 2018, Orland, US, 2018.05

Shota Takashima, Satoru Shinkuma, Yasuyuki Fujita, Toshifumi Nomura, Hideyuki Ujiie, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu  
Gene-edition targeting mutation site recovers null-expression of type VII collagen caused by frameshift mutation via non-homologous end joining in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa  
The 76th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Portland, US, 2017. 4.27

## 要旨

### 【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、変異を有する DNA 配列から正常 DNA 配列への HR を介した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、遺伝子変異特異的な 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/Cas9 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した。次に、作製した CRISPR/Cas9 を用いて RDEB Fb の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た。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、細胞株毎に詳細に解析を行なった。

#### 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 *COL7A1* 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 RT-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、RT-qPCR 法、生体内における機能解析を行なった。また anchoring fibril (係留線維)の形成を観察するため、mouse *Col7a1* (*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 anchoring fibril の有無を観察した。

#### 【結果】

#### 1. 変異配列特異的 CRISPR/Cas9 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 NHEJ が誘導されていることを確認した。遺伝子編集後の 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 RT-qPCR 法で遺伝子編集前と比較して *COL7A1* 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 human COL7 (hCOL7)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 hCOL7 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、筋ジストロフィーなどの疾患では HR を応用した遺伝子治療だけでなく、NHEJ を応用した治療戦略も報告されている。また RDEB で 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。本研究の結果によって 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が 1 つの選択肢となりうると示唆された。

#### 【結論】

我々は、NHEJ を介した遺伝子治療が、従来の HR のみ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と考える。



## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BSA: bovine serum albumin

COL7: type VII collagen

CRISPR/Cas9: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins

cDNA: complementary DNA

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DEB: dystrophic epidermolysis bullosa

DEJ: dermal-epidermal junction

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: deoxyribonucleic acid

DSB: double strand break

EB: epidermolysis bullosa

EBS: epidermolysis bullosa simplex

Fb: fibroblasts

FBS: fetal bovine serum

gRNA: guide RNA

hCOL7: human COL7

HEK: human embryonic kidney

HR: homologous recombination

iPSC: induced pluripotent stem cell

JEB: junctional epidermolysis bullosa

mCOL7: mouse COL7

NHDF: normal human dermal fibroblasts

NHEJ: non-homologous end-joining

NOD/SCID: NOD/ShiJic-*scid*Jcl

PAM: protospacer adjacent motif

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PVDF: polyvinylidene difluoride

RT-qPCR: reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

RDEB: recessive dystrophic epidermolysis bullosa

RNA: ribonucleic acid

TALENs: transcription activator-like effector nucleases

TBS: Tris Buffered Saline

TIDE: tracking of indels by decomposition

## 緒言

### 表皮水疱症(epidermolysis bullosa: EB)について

表皮水疱症 (epidermolysis bullosa: EB)は、先天的に真皮と表皮の接着に関わる構造遺伝子の異常により真皮・表皮の接着が脆弱となり、新生児あるいは乳児期から軽微な外力により全身の皮膚、粘膜に水疱、びらんを繰り返す遺伝性の皮膚疾患である (図 1) (Fine et al., 2014). 真皮表皮結合部とその分子構造を図 2 に示す. 皮膚は、表皮、真皮および皮下脂肪組織から構成され、真皮と表皮は真皮表皮結合部 (dermal-epidermal junction: DEJ) において多数のタンパクにより接着されている. 表皮細胞はヘミデスモソームにより透明層を介して基板と接着し、基板は VII 型コラーゲン (COL7)により真皮に係留されている. 分子レベルでは、ケラチン中間径線維(ケラチン 5 とケラチン 14)はトノフィラメントを形成し、ヘミデスモソームはケラチンを結合するアンカータンパクであるプレクチン及び BP230、細胞膜貫通タンパクである  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリン及び XVII 型コラーゲンで構成される. これら膜貫通タンパクの細胞外ドメインは、基底膜構成タンパクであるラミニン 332 及び IV 型コラーゲンと結合する. 基底膜を真皮につなぐ係留線維は COL7 で構成される. COL7 は N 末端でラミニン 332 と基底膜内で結合し、C 末端はもう 1 つの COL7 と結合しており、真皮マトリックスの主成分である I 型コラーゲンを縫うように基底膜に繋いでいる. これらのタンパクの連結構造が、皮膚に加わる外力に対して抵抗する表皮・真皮間接着維持システムであり、これらを構成する分子のいずれかに遺伝子異常が生じた場合に EB が発症する. 旧厚生省の稀少難治性皮膚疾患調査研究班の全国調査によると、国内の推定患者数は 500~640 人とされており、指定難病となっている. EB の中でも、DEJ の下で anchoring fibril (係留線維)を形成する主なタンパクである COL7 をコードする *COL7A1* 遺伝子の変異によって引き起こされる重症型が、劣性栄養障害型表皮水疱症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa: RDEB) である (Dang and Murrell, 2008; Shinkuma, 2015; Shinkuma et al., 2011). 治療としては、タンパク補充療法や造血幹細胞移植、間葉系細胞療法、培養表皮シートの移植なども試みられているが、根治的治療法は未だなく、びらんや潰瘍が形成された部位に創傷被覆材等の処置を行う対症療法が主体である.



図 1. EB の臨床像 (Shimizu, 2017)

生後より全身にびらん・水疱を繰り返す。手指の癒着伴も伴う。

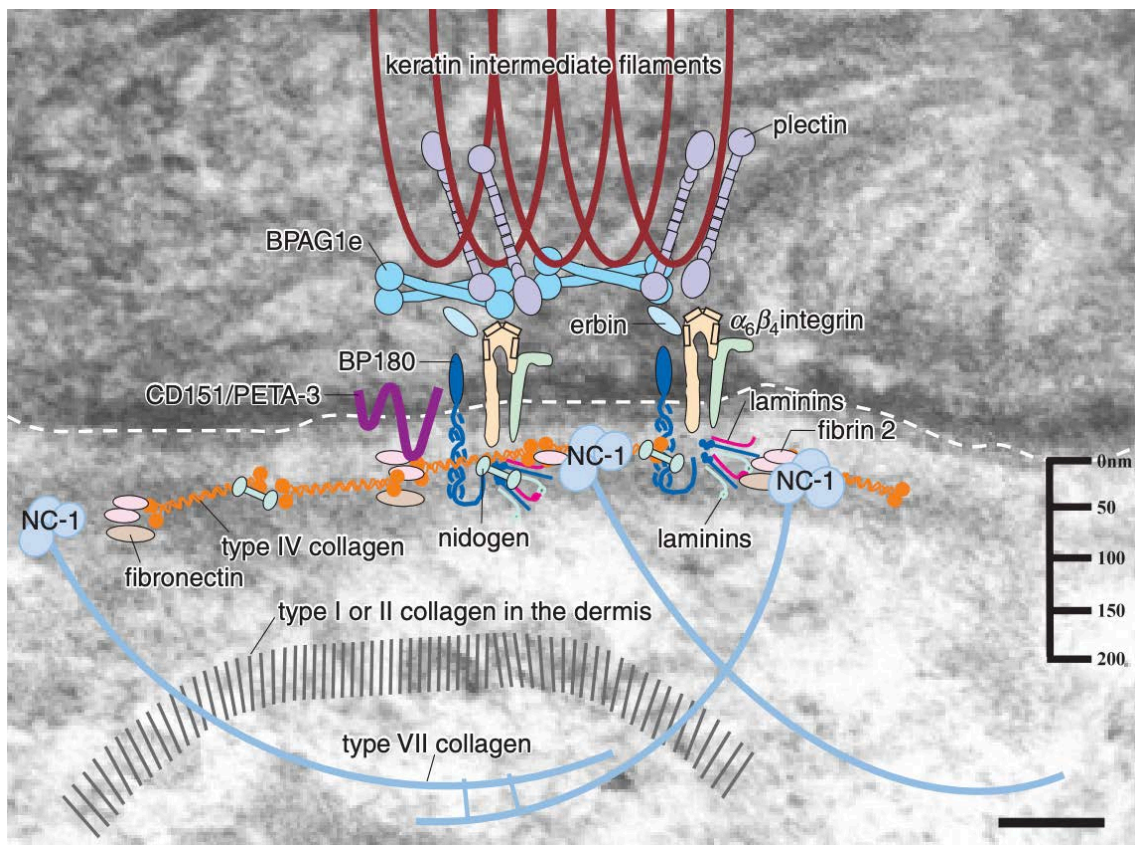


図 2. DEJ 関連タンパクの電子顕微鏡像 (Shimizu, 2017)

真皮表皮境界部には様々な接着因子が存在し、これらのタンパクの先天的遺伝子異常により真皮と表皮の接着が脆弱となる。

## EB の病型診断

異常のある分子の位置により水疱形成部位は表皮内，真皮・基底板接合部の透明層内，基底板下の真皮内のいずれかとなり，それぞれ単純型 EB (EB simplex: EBS)、接合部型 EB (Junctional EB: JEB)、栄養障害型 EB (Dystrophic EB: DEB) の 3 型に大別される (図 3)。臨床症状，免疫組織学的検査，電子顕微鏡的検査により病型を診断する。EB は病型により重症度、合併症、臨床予後や遺伝予後が異なる。そのため、治療方針の決定や遺伝相談などを行うためには、正確な病型診断が必要である。その診断のプロセスにつき以下に述べる。

### 1) 臨床的診断

家系内における同症患者の存在について問診し，遺伝形式を決定する。孤発例の場合は，両親がキャリアである劣性遺伝，あるいは de novo (突然変異) の可能性を考慮する必要がある。さらに発症時期や，成長に伴い皮疹が改善もしくは悪化しているかなどについて詳細に問診を進める。次に皮疹の分布，性状について観察する。稗粒腫や癬痕の有無，爪甲や歯牙異常，手指の癒着や脱毛についても詳細に観察する。嚥下困難や貧血，幽門閉鎖などといった皮膚外症状についても詳しく問診する必要がある。

### 2) 免疫組織学的検査

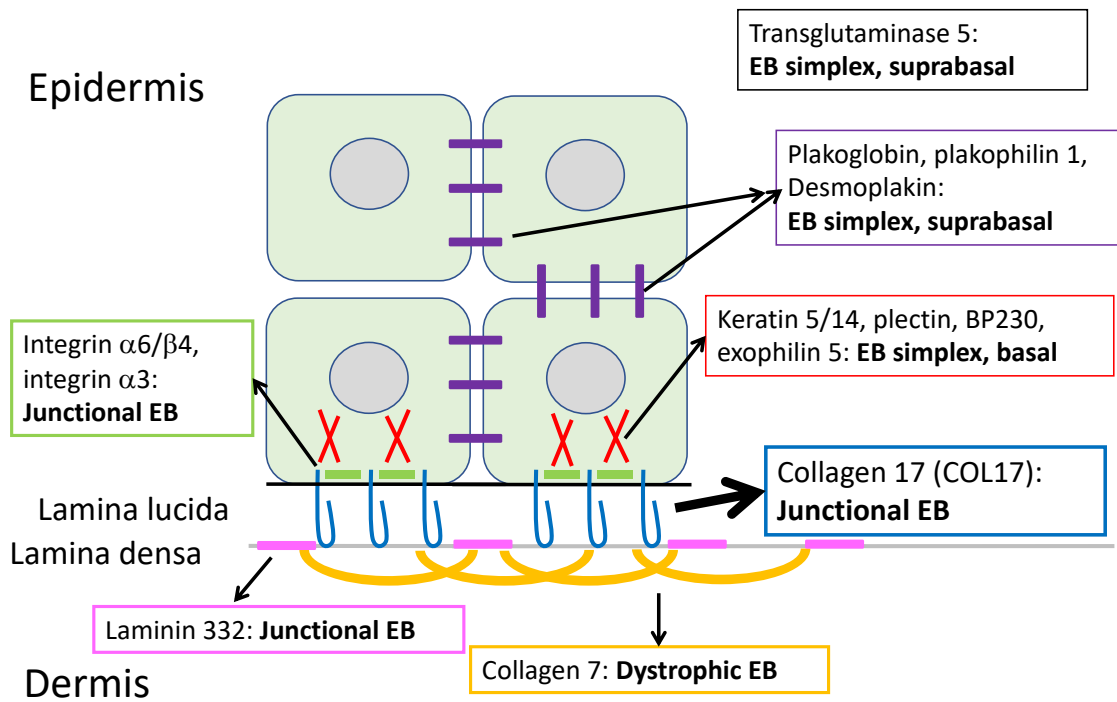
患者皮膚の凍結切片に対し，表皮真皮境界部の様々な構成蛋白に対する抗体を用いて免疫染色を行う。例えば COL7 抗体のみで反応が欠失していれば COL7 が完全に欠損した RDEB と診断することができる (図 4)。また標本内の裂隙の部位から病型を絞ることもできる。例えば COL7 の欠損は認めず，それよりも上方に裂隙を認める場合は，RDEB の可能性は否定され，EBS もしくは JEB を疑い，以降の検査を進めていくことになる。

### 3) 電子顕微鏡的検査

電子顕微鏡的に水疱形成部位の超微細構造を観察することにより，裂隙形成部位を同定することができる。また，ヘミデスモソームや係留線維の減少や幼弱化を観察することにより，重症度を予測することもできる。

### 4) 遺伝子検査

上述した臨床症状，免疫組織学的検査，電子顕微鏡的検査により病型を確定した後に遺伝子検査を行う。遺伝子検査を行うことにより，臨床予後を推定する一助となりえ，また遺伝形式を確定することが可能となる。



Level of skin cleavage	Major EB type	Major EB subtype	Targeted protein(s)
Intraepidermal	EB simplex (EBS)	Suprabasal EBS	Plakophilin 1 Desmoplakin Plakoglobin
		Basal EBS	Keratin 5 Keratin14 Plectin BP230
Intralamina lucida	Junctional EB (JEB)	JEB, generalized	Laminin 332 Collagen XVII Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Integrin $\alpha 3$
		JEB, localized	Laminin 332 Collagen XVII Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Integrin $\alpha 3$
Sublamina densa	Dystrophic EB (DEB)	Dominant DEB	Collagen VII
		Recessive DEB	Collagen VII

図 3. 表皮水疱症の分類

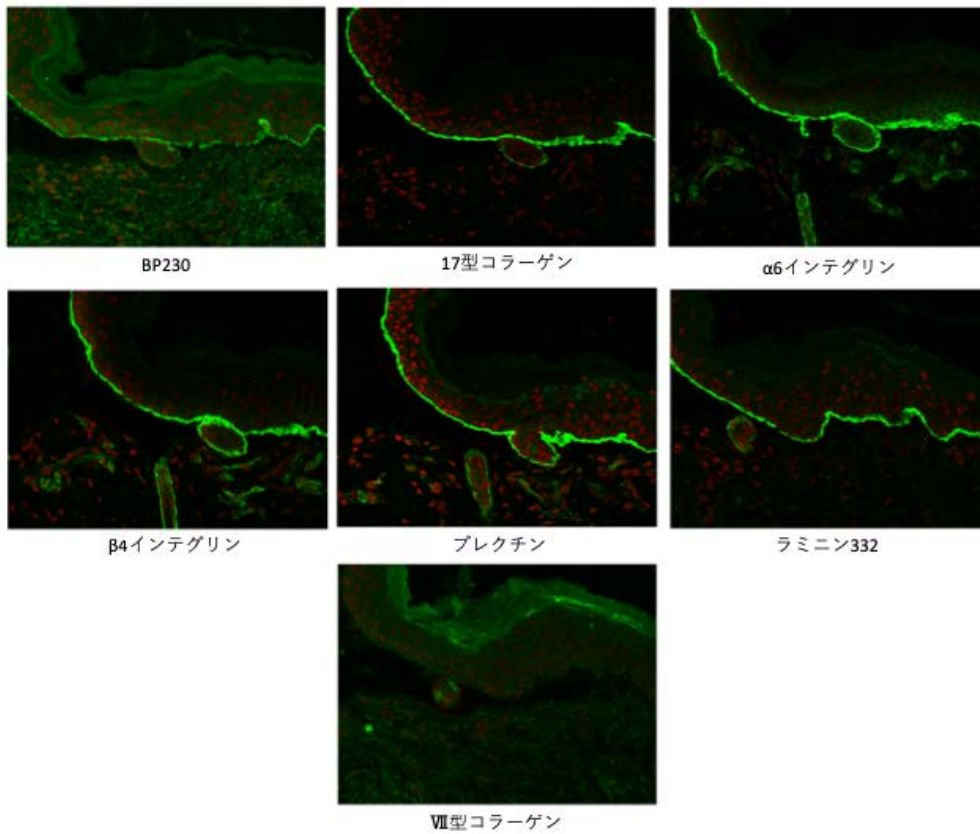


図 4. 凍結皮膚を用いた蛍光免疫抗体法

VII型コラーゲンに対する抗体への反応が欠損している。

## EB の各病型の病態

上述のように EB は、異常のある分子の位置により水疱形成部位は表皮内、真皮・基板接合部の透明層内、基板下の真皮内のいずれかとなり、それぞれ EBS、JEB、DEB の 3 型に大別される (図 3)。

### a. 単純型表皮水疱症 (Epidermolysis Bullosa Simplex; EBS)

表皮基底細胞の細胞骨格であるケラチン 5 または 14 の異常によって生じるものが大半である。水疱形成部位は浅く基板は損傷を受けないため、7-10 日程度で上皮化し、瘢痕や稗粒腫を残さず治癒する。一般に夏季に悪化し冬季に軽減する傾向がある。手掌足底に限局する最も軽症な限局型 EBS (localized type) (図 5a)、躯幹にも生じる中等症汎発型 EBS (generalized other type)、全身皮膚に繰り返し生じる重症汎発型 EBS (generalized severe type) (図 5b)に分けられる。また単純型表皮水疱症の皮疹に加え、遅発性の筋ジストロフィーや幽門閉鎖を合併する病型も存在する (Natsuga et al., 2010)。

電顕的構造変化としては、表皮基底細胞のトノフィラメントの異常により表皮基底細胞の融解がみられ、その結果表皮内水疱が生じる (図 5c)。重症汎発型 EBS では、特徴的なトノフィラメントの異常凝集 (Aggregated keratin fibers) が観察される (図 5d)。

免疫組織学的検査では、劣性遺伝形式をとる幽門閉鎖合併型 EBS 及び筋ジストロフィー合併型 EBS でプレクチンの消失ないし減弱を認める。

優性遺伝形式をとる限局型 EBS、中等症汎発型 EBS、重症汎発型 EBS ではいずれも *KRT5*, *KRT14* 遺伝子のどちらか一方に変異を認める。ケラチン 5 と 14 は二量体を形成するので、いずれのタンパクの異常でも同様の症状が出ると思われる。

劣性遺伝形式をとる幽門閉鎖合併型 EBS 及び筋ジストロフィー合併型 EBS では両方の allele で PLEC 遺伝子に変異が同定される (Natsuga et al., 2010)。

### b. 接合部型表皮水疱症 (Junctional Epidermolysis Bullosa; JEB)

頻度は低いですが、重症例が多い。出生児には水疱が重症でないこともあるが、急速に増悪し生後一年以内に死に至ることも多い。ラミニン 332 が完全欠損する重症汎発型 JEB (図 6a)と、ラミニン 332 の発現が減弱もしくは XVII 型コラーゲンが欠損することによる中等症汎発型 JEB (図 6b)に大別される。そのほか、 $\alpha 6\beta 4$  インテグリンの欠損により幽門閉鎖症合併型 JEB (図 5c)を発症する。



重症汎発型 JEB では、出生児から全身に難治性の水疱、びらんを生じ、その後も軽快することはない。中等症汎発型 JEB は水疱及びびらの形成、頭部の萎縮性脱毛、爪・歯の形成不全を特徴とする。幽門閉鎖合併型 JEB では、出生児から広範な皮膚の潰瘍あるいは欠損を認め、さらにミルクが飲めないなど、先天性幽門閉鎖の症状を伴う。一般的に重症汎発型 JEB 及び幽門閉鎖合併型 JEB の予後は極めて不良である。接合部型表皮水疱症では、水疱の治癒後に、皮膚の萎縮が起こるが、瘢痕や稗粒腫は残さない。

顕微鏡的には表皮基板接合部の透明層に裂隙が形成され、ヘミデスモソームの減少が認められることがある (図 6d)。

免疫組織学的検査では、最重症である重症汎発型 JEB ではラミニン 332 の発現の完全欠損が確認される。中等症汎発型 JEB ではラミニン 332 の発現の減弱、もしくは XVII 型コラーゲンの減弱ないし消失を認める。幽門閉鎖合併型 JEB では、 $\alpha 6\beta 4$  インテグリンの発現が減弱ないし消失する。

接合部型はどの病型においても常染色体劣性遺伝形式をとる。遺伝子診断としては、ラミニン 332 が完全欠損する重症汎発型 JEB ではラミニン 332 をコードする *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* のいずれかの遺伝子において早期終止コドン変異を両方の allele に持つことが基本である。中等症汎発型 JEB では、*LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* いずれかの遺伝子において両 allele にミスセンスと早期終止コドン、ミスセンス変異同士と言った組み合わせとなることが多く、また、XVII 型コラーゲンの欠損をきたすものでは *COL17A1* の早期終止コドン変異が両 allele に認められることが多い。

### c. 栄養障害型表皮水疱症 (Dystrophic Epidermolysis Bullosa; DEB)

水疱は基板より深い真皮内に生じるため、びらは難治で瘢痕を残して治癒する。係留線維の構成タンパクである COL7 の異常が原因であり、遺伝形式により優性型 (Dystrophic DEB; DDEB) と劣性型 (Recessive DEB; RDEB) に分けられる。DDEB は生下時ないし乳児期から全身主に四肢伸側に水疱形成を認め、爪の変形を伴う (図 7a)。RDEB にはさらに COL7 が完全に欠損する重症汎発型 RDEB (generalized severe)、COL7 の減少を認めるが完全欠損はきたさない中等症汎発型 RDEB (generalized intermediate) に分けられる (図 7b)。重症型 RDEB では出生児よりびらの形成と瘢痕治癒を繰り返すため、爪は変形、脱落し、指間は徐々に癒着し棍棒状の手になることもある (図 6c)。食道粘膜もびらんと治癒を繰り返すうちに狭窄し、食物の通過障害をきたす。摂食不良と水疱、びらんからのタンパク漏出が相まって低栄養、低体重、貧血が起こる。またびららを繰り返す皮膚は若年での有棘細胞癌の発生源となる。

電顕では基板直下で水疱が形成され、係留線維の形成不全が特徴的である(図 7d).

免疫組織学的検査において、最重症である重症汎発型 RDEB では COL7 の完全欠損を認める. 中等症汎発型 RDEB では COL7 の発現は減弱しないことが多い.

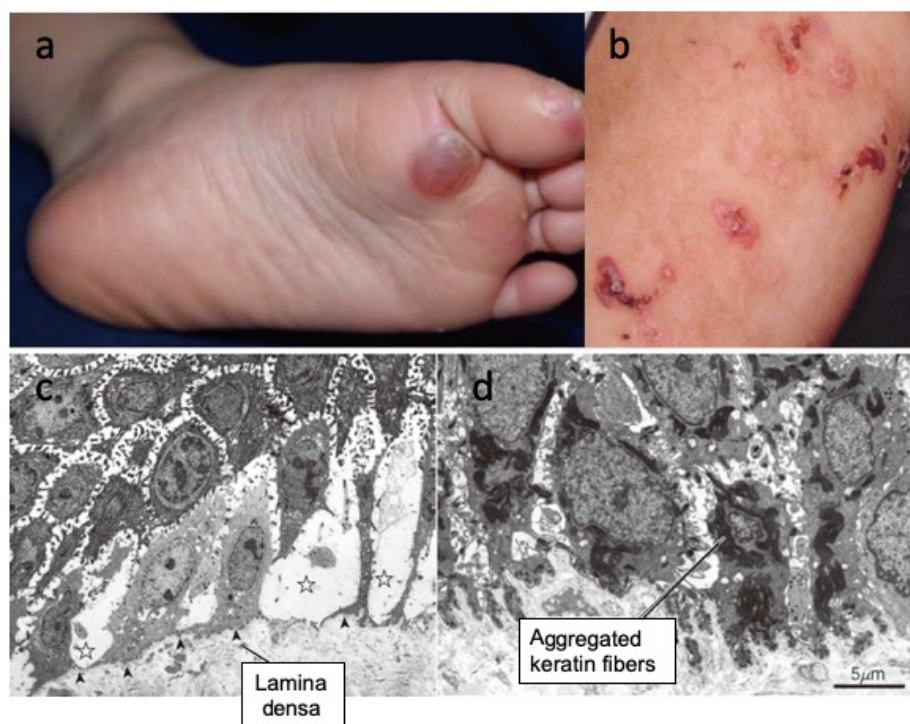


図 5. 単純型表皮水疱症 (EBS) の臨床像と電顕所見 (Shimizu, 2017)

(a) 限局型 EBS, 手足に限局して浅い水疱びらんを形成する. (b) 重症汎発型 EBS, 水疱が環状に配列し全身に散在する. (c) 基底膜上の基底細胞の細胞質が崩壊し, 水疱 (☆) を形成する. (d) 重症汎発型 EBS で見られるケラチン線維の凝集塊.

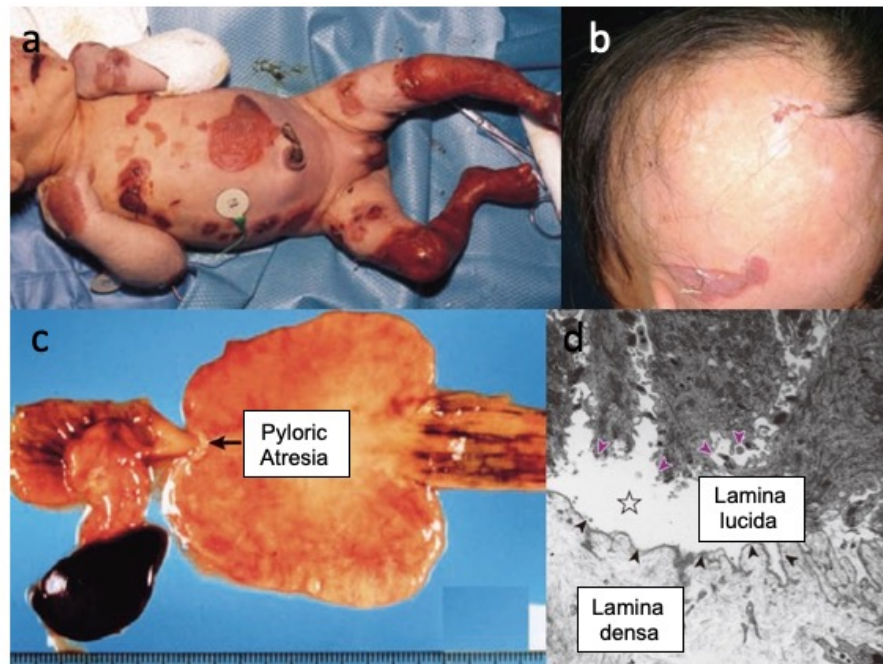


図 6. 接合部型表皮水疱症 (JEB)の臨床像と電顕所見 (Shimizu, 2017)

(a) 重症汎発型 JEB, 生下時から全身に水疱, びらんを認め治癒せず次々と新生拡大する. (b) 中等症汎発型 JEB, 生命予後は良い, 頭部は癩痕性の脱毛を認める. (c) 幽門閉鎖合併型 JEB,  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンの異常により先天性幽門閉鎖を合併する. 生後間もなく死に至る症例も多い. (d) 水疱は表皮基板接合部の透明層で形成されている.



図 7. 栄養障害型表皮水疱症 (DEB)の臨床像と電顕所見

(Shimizu, 2017)

(a) 優性栄養障害型表皮水疱症, 爪の変形を認める. (b) 重症汎発型栄養障害型表皮水疱症, 生下時ないし生後まもなくから全身に水疱, びらんが繰り返し出現する. (c) 繰り返す癒痕治癒により手指, 足趾が棍棒状に癒合している. (d) lamina densa 直下で裂隙を認める. 係留繊維の欠損もしくは著しい減弱を認める.

## RDEB について

RDEB はさらに COL7 が完全に欠損し全く発現していない重症汎発型 RDEB (generalized severe) と COL7 の減少を認めるが完全欠損はきたさない中等症汎発型 RDEB (generalized intermediate) に分けられる (図 8). 重症汎発型では生後まもなく死に至ってしまう症例が多いが、わずかでも COL7 が発現している中等症汎発型では、生命予後は比較的長いことが知られている。またマウスを用いた研究では、10%ほどの COL7 が発現しているだけでも皮膚の脆弱性が改善されたと報告されている (Fritsch et al. 2008). そこで本研究では、重症汎発型 RDEB に COL7 を補充する治療法の開発を行うこととした。

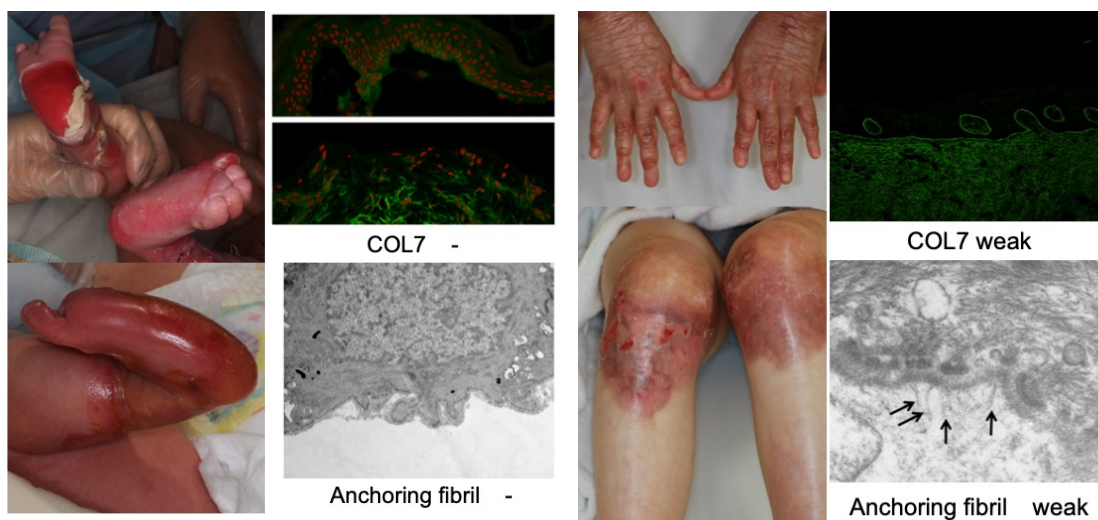


図 8. RDEB の細分類

RDEB の重症汎発型(左)と中等症汎発型(右). COL7 がわずかでも発現していることで、臨床像や予後が大きく異なる。

## COL7 について

コラーゲンは、3本の $\alpha$ 鎖と呼ばれるペプチドがヘリックスを形成し、かつ各々の $\alpha$ 鎖は Gly-X-Y というアミノ酸配列 (X, Y は任意であるがプロリンヒドロキシプロリンが位置することが多い) を取るという特徴を持った一群のタンパク質である。COL7 は、表皮と真皮を強固に接着させる機能を有するタンパク質の一つで、lamina densa 直下に、係留線維 (anchoring fibril) として存在する。COL7 は、2944 個のアミノ酸からなる約 290kDa の前駆体タンパク質が3個重合して三量体となり細胞外に分泌され、C末端側のシステインを介して二つの COL7 分子が互いに向き合ってジスルフィド結合し、アンチパラレルダイマーを形成する (図 9)。Anchoring fibril は半弧状にフックのように存在し、N末端側の NC-1 ドメインを介して基底膜の lamina densa に接着し、表皮と真皮を強固に接着させる機能を有している (図 10)。RDEB の治療として重要なのは、外部から COL7 を投与した際に、それが基底膜の lamina densa 直下に正確に組み込まれ、他のタンパクと正常に相互作用し機能しなければならないことである。つまり投与した COL7 が DEJ に正しく分泌されていること、かつ lamina densa 直下に anchoring fibril が正しく形成されることが治療の目的である。

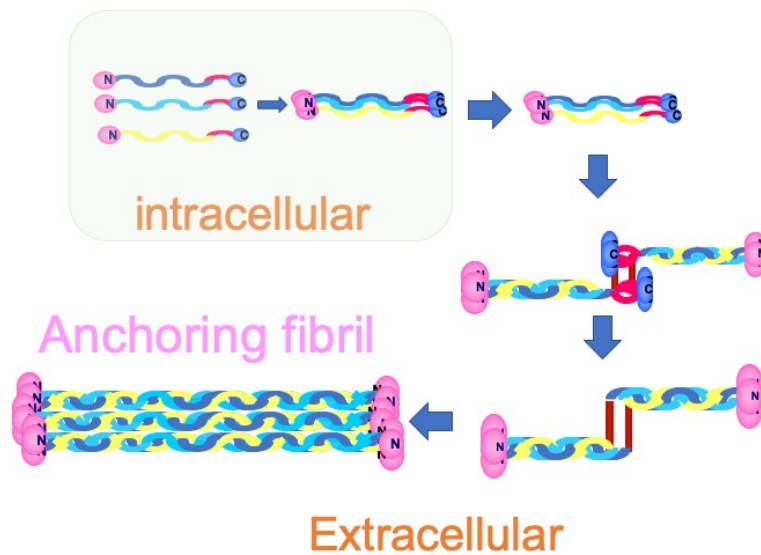


図 9. COL7 が anchoring fibril を形成するまでの模式図

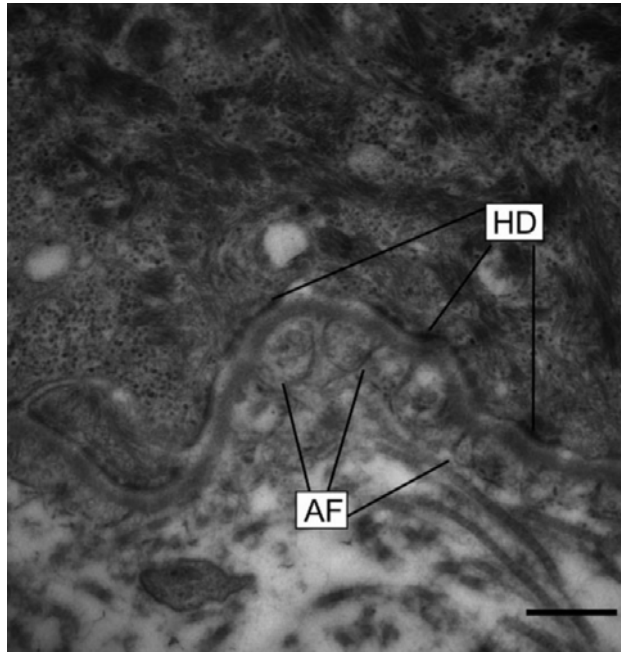


図 10. 健常人での anchoring fibril の観察 (Watanabe et al., 2018)

AF: anchoring fibrils, HD: hemidesmosomes

## 遺伝子編集について

遺伝子編集とは DNA 上の特定部位を切断できるヌクレアーゼを用いて標的の遺伝子配列を削除・置換・挿入する技術である。基本原理は、DNA 上の標的的部位で二本鎖 DNA 切断 (double strand break: DSB) を起こし、次にその切断部位が修復される。修復される際には、数塩基の挿入や欠失を伴って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 (Joung and Sander, 2013) (図 11) が、実際に細胞内で DSB が起きた場合は NHEJ の経路を介し、短鎖の挿入や欠失が生じることが多い (Maruyama et al., 2015)。近年遺伝子編集のツールとして CRISPR/Cas9 システムが開発された。

CRISPR/Cas9 は外来性ウイルスやプラスミドに対しての獲得免疫を与える微生物の免疫システムとして、細菌や古細菌から発見されたものである (Gasiunas et al., 2012)。CRISPR/Cas9 は、gRNA とエンドヌクレアーゼから構成される。エンドヌクレアーゼは化膿性連鎖球菌由来 Cas9 ヌクレアーゼタンパク質であり、Cas9 はハサミのような構造をしており DSB を起こす (Haft et al., 2005)。gRNA は PAM (protospacer adjacent motif) 配列 (5'-NGG: N は全ての塩基) を有する標的配列と相補的になるように設計し、RNA-DNA 結合を介して Cas9-gRNA 複合体形成が動員され、その部分で DSB を起こす (Hsu et al., 2013)。PAM 配列は生物系統や Cas タンパク質の種類により異なっており、使用する Cas タンパク質の種類に応じた gRNA の設計が必要とされる。

遺伝子編集技術を遺伝子治療に応用する場合には、変異を有する DNA 配列から変異を有さない DNA 配列への HR による遺伝子組換えが理想的 (Urnov et al., 2005) であり、実際に様々な疾患の遺伝子治療研究の主流となっているが、細胞内で DSB が起きた後に HR が生じる頻度は極めて低いため (Maruyama et al., 2015)、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。一方で NHEJ を介した経路は HR に比して頻度が高く、数塩基の欠失や挿入が高頻度に誘導される (Maruyama et al., 2015; Yang et al., 2013a; Yang et al., 2013b)。この挿入や欠失を意図的に誘導することで、frameshift 変異を in-frame 化することができれば、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編集後の細胞群をそのまま治療の応用する、より効率の良い遺伝子治療が実現できると考えた。



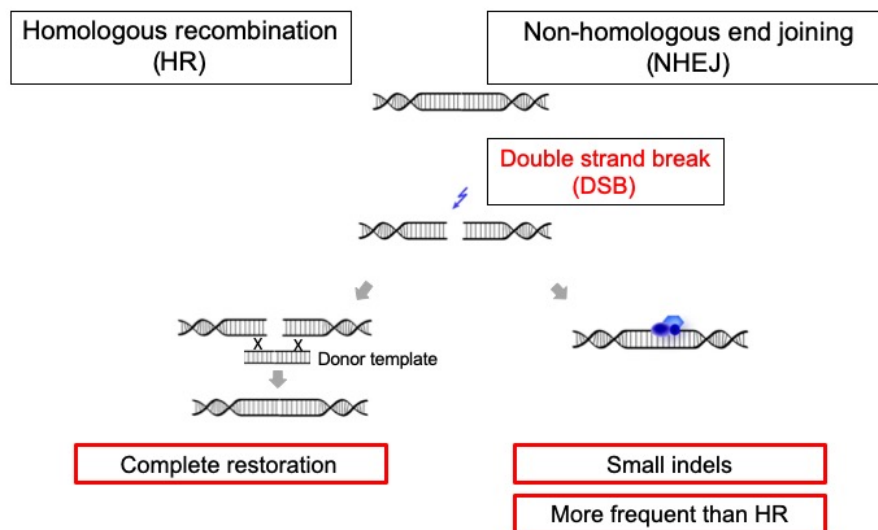


図 11. HR と NHEJ

遺伝子は何らかの原因で二本鎖切断(double strand break: DSB)が生じた際に Homologous recombination (HR)と Non-homologous end joining (NHEJ)のふた通りの修復経路をたどる。HR は鋳型となる相補的な遺伝子配列との相同組換えによって遺伝子修復する経路で遺伝子治療に適しているが、生体内では NHEJ の方が高頻度で生じる。

## RDEB の遺伝子治療について

RDEB に対しても、HR の経路を介した遺伝子編集が試みられており、RDEB 患者由来の induced pluripotent stem cells (iPSCs) を CRISPR/Cas9 や TALENs (transcription activator-like effector nucleases) といった遺伝子編集システムを用いて遺伝子編集する方法 (Osborn et al., 2013; Webber et al., 2016) や *ex vivo* で RDEB 患者由来表皮角化細胞を遺伝子編集した後に、表皮シートを作成して植皮する (Chamorro et al., 2016; Hainzl et al., 2017; Izmiryan et al., 2016) といった治療戦略が試みられている。一方で、RDEB の治療研究では、アミノグリコシド系抗生物質製剤外用で早期終止コドンを読み飛ばしてしまうリードスルー治療 (Woodley et al., 2017) や変異を含む exon もしくは早期終止コドンを含む exon をスキップしてしまう exon skipping (Bremer et al., 2016; Mencía et al., 2018; Turczynski et al., 2016) という戦略も報告されており、正常な COL7 でなくとも機能的な COL7 を高効率に生体内に誘導するというアプローチも報告されている。

日本人の RDEB には頻発する frameshift 変異 (c.5819delC) が存在することが知られており (Sawamura et al., 2005; Shinkuma et al., 2010; Tamai et al., 1999), 我々は c.5819delC を特異的に認識する CRISPR/Cas9 で遺伝子変異部特異的に DSB を起こし、NHEJ の経路介した数塩基の挿入や欠失を意図的に誘導することができれば、frameshift 変異を in-frame 化することができるのではないかと考えた (図 12)。

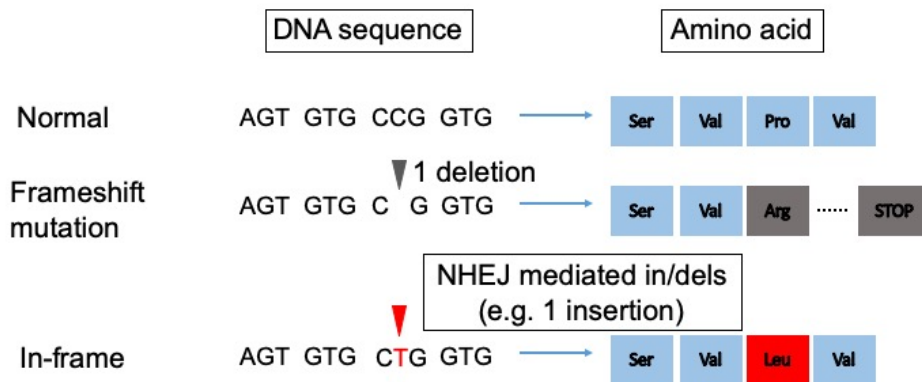


図 12. NHEJ の経路を介した遺伝子治療のイメージ

一塩基の欠失により **frameshift** 変異が生じ、その結果として終始コドンが出現し **PTC** が生じてしまう。その変異部に特異的に **DSB** を起こし、**NHEJ** によって引き起こされる数塩基の挿入・欠失（図では例として一塩基挿入）によりある一定の細胞において **frameshift** 変異が **in-frame** 化すると考えた。

## 本研究の目的

本研究では、日本人の RDEB 患者に頻発する frameshift 変異 (c.5819delC) を特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いて DSB を起こしたのち、NHEJ を介した経路を応用して複数塩基の挿入や欠失を意図的に誘導することで frameshift 変異を in-frame 化する治療法の開発とその有効性を検討した。

# 方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り，北海道大学病院倫理委員会の承認（承認番号：014-0041）を得た上で，参加者から書面による同意を得て施行した．臨床検体の取り扱いおよび臨床研究に関しては，北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け，「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則した．遺伝子組み換え実験は「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規程」に則した．動物実験は「北海道大学動物実験に関する規程」に則した．

## I. 各種試料

### 1. 患者および皮膚の採取

RDEB の重症汎発型 1 名の患者から皮膚を採取した．患者は *COL7A1* 遺伝子の exon70 内の c.5819delC (p.Pro1940Argfs\*65) と exon11 内の c.1474\_1481del8 (p.Glu492His\*54) の複合ヘテロ接合体の変異を持ち，ともに早期終止コドンが出現し，ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により分解された結果，COL7 の完全欠損を認めた（図 13）（Sawamura et al., 2005）．皮膚採取の施行時には文書での同意を得た．皮膚はキシロカイン®注射液 1%エピレナミン（1:100000）（AstraZeneca, Boston, MA, US）含有を用いて局所麻酔し，15 番メスで検体の切除を行い，4-0 PDS® II（Ethicon, Cincinnati, OH, US）で真皮縫合した後，4-0 NYLON（CROWNJUN, Chiba, Japan）で表皮縫合した．採取した皮膚は DNA 抽出，初代培養にそれぞれ使用した．

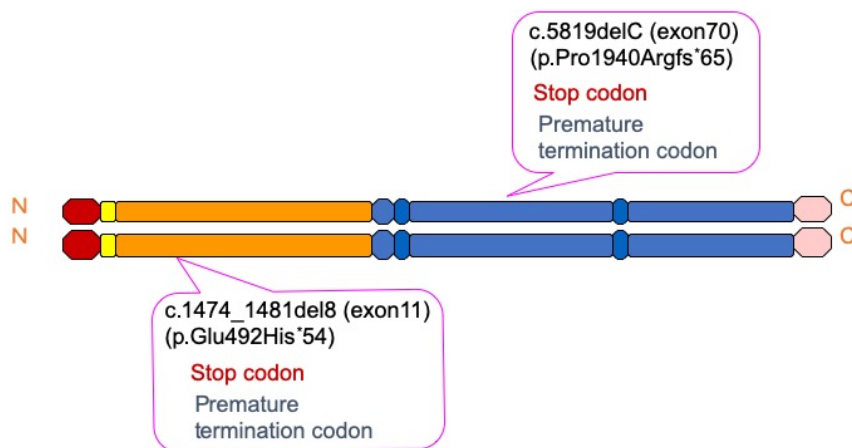


図 13. 本研究に用いた RDEB 患者の遺伝子変異情報

### 2. 線維芽細胞の初代培養

線維芽細胞を初代培養するため、採取した皮膚は phosphate buffered saline (PBS) (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)で洗浄後に脂肪織をきれいに除去し、再度 PBS で洗浄した。1 バイアルのディスパーゼ I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)を 10ml のケラチノサイト培養液 CnT-PR (Cellntec advanced cell systems, Bern, Switzerland)に溶解後、その 2ml に洗浄した皮膚を浸し、4°C で一晩静置した。表皮を鑷子で剥離した後、真皮を 6-well plate に敷きカバーグラスで覆ったのち 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Nacalai tesque)に浸した。37°C, 5%CO<sub>2</sub>の加湿インキュベーターにて培養し、培地は 2 日毎に交換した。30%コンフルエントに達した時点で真皮切片とカバーグラスを除去し、その後も培養を続け 70-80%コンフルエントまで達した時点で継代した。以降の実験には 3-4 継代の線維芽細胞を使用した。以下、健常人から採取した線維芽細胞を normal human dermal fibroblasts (NHDF), RDEB 患者から採取した線維芽細胞を RDEB Fb と記す。

### 3. 動物

動物実験は、承認されたプロトコールの下、北海道大学動物実験委員会のガイドラインに従って行った (承認番号: 15-0158)。m*Col7a1* ノックアウトマウスは Jouni Uitto 教授 (Jefferson University, US)から譲り受け、繁殖したものを使用した。NOD/ShiJic-*scid*Jcl (NOD/SCID)マウスは、CLEA JAPAN (Tokyo, Japan)より購入した。ジェノタイピングは、アルカリ法を用いて 1cm 程度のマウス尾から粗雑な DNA 抽出し鋳型として、GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, US), 特異的プライマーを用いて PCR の後、アガロースゲル電気泳動をして確認した。全てのマウスは sevoflurane (Wako, Tokyo, Japan)を使用し麻酔後に安楽死させて、サンプリングを行った。

### 4. コンストラクトの作成

#### (1). NHDF および RDEB Fb の不死化

遺伝子編集後の細胞を長期間培養し、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するために線維芽細胞を不死化させた。線維芽細胞の不死化は、細胞にヒトパピローマウイルス 16 の E6/E7 タンパク質 (HPV16 E6/E7)を、レンチウイルスを用いて感染させて樹立した。HPV16 E6/E7 の目的遺伝子配列を pLVSIIN-EF1 $\alpha$  Pur vector (Takara Bio, Otsu, Japan)にクローニングした。このベクターと lentiviral packaging DNA mix (Lenti-X HTX Packaging System) (Takara Bio)を TransIT<sup>®</sup> transfection reagent (Takara Bio)を用いて Lenti-X<sup>™</sup> 293T cell (Takara Bio)にトランスフェクションした。

このウイルスベクターを含む培養上清を回収し、フィルター濾過した。RDEB Fb, NHDF はそれぞれ 10% FBS 含有 DMEM を用いて 6 日間培養した。その後、ウイルスベクターを含む上清と 0.8 $\mu$ g/ $\mu$ l のポリブレンを含む培地に交換した。24 時間培養後、培地を交換して更に 48 時間培養し、puromycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) 0.75 $\mu$ g/ml を含む培地に交換、培養を継続して目的遺伝子導入細胞の選択を行なった。

## (2). 皮膚凍結切片の作製

クリオモルド・プラスチック包埋皿 (Sakura, Tokyo, Japan) に皮膚切片を入れ、クリオマウント (Muto pure chemicals, Tokyo, Japan) で充填した。ドライアイス上で急速に凍結し、固定台に乗せて薄切して 5 $\mu$ m 切片を作製し、免疫組織学的解析に使用した。

## (3). 電子顕微鏡観察試料の作製

サンプルを 5% グルタルアルデヒド溶液で固定し、回転ローターを用いて 4 $^{\circ}$ C で一晩攪拌した。緩衝液を除去後にオスミウム溶液を加え、1 時間静置した。オスミウム溶液を除去後に、1% 酢酸ウラン溶液を加え、4 $^{\circ}$ C で 1 時間静置し溶液を除去し、サンプル内部の水分をエタノールから酸化プロピレン、エポキシ樹脂の順で置換した。その後ゼラチンカプセル (Okenshoji, Tokyo, Japan) に包埋し、80 $^{\circ}$ C で 4 日間以上静置し樹脂を硬化させた。

## II. 遺伝子変異配列を特異的に認識する CRISPR/Cas9 の作製と評価

### a. 遺伝子変異配列を特異的に認識する CRISPR/Cas9 の作製

gRNA 発現ベクターは以下の論文で既報告されているものを用いた (Mali et al., 2013; Shinkuma et al., 2016). ZiFiT Targeter (Sander et al., 2010) を用いて c.5819delC を特異的に認識する gRNA の塩基配列 (GAGGAGAGCC TGGAAGTGTG) を選択し、前後に *Hind* III 配列を付加して (図 14), gRNA 発現ベクターとして購入した (Integrated DNA technologies, Coralville, IA, US). *Hind* III を用いて標的部位を pCAG-DsRed ベクター (Addgene plasmid 11151) (Matsuda and Cepko, 2004) に挿入した。Cas9 は pCas9-GFP (Addgene plasmid 44719) を用いた。この際、以後の実験のためにそれぞれ DsRed と GFP で標識されたベクターを用いた。

TTTTAAAGCTTTGTACAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATT CAGTCGAC  
 TGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCT  
 TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTG  
 ACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTT  
 CTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTATGTTTTAAATGGACTATCATATGCTT  
 ACCGTAAC TTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGA  
 CGAAACACC **GAGGAGAGCCTGGAAGTG** TGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG  
 TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC  
 TTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATT **AAAGCTTTTT**  
 HindII

図 14. c.5819delC 遺伝子変異特異的な gRNA の塩基配列

b. 変異 *COL7A1* を有する HEK 293T 細胞の作製

作製した CRISPR/Cas9 が遺伝子変異を特異的に認識し、DSB を起こしていることを確認するためには、遺伝子編集を行った同一細胞内で、変異のない正常 *COL7A1* と変異 *COL7A1* をそれぞれ別々に検出する必要がある。そこで我々は変異 *COL7A1* を有する HEK 293T 細胞を製した。*COL7A1* intron 66 F (TTCTGAGGTCTCAGGGTGCT) と *COL7A1* intron 71 R (GGACAGCAAGAGGTCAGAGG) のプライマーペア (表 1) を用いて変異部 (c.5819delC) を含むように Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) を用いて PCR を施行し、pIRES-puro-GFP vector (Addgene plasmid 16616) (Torrance et al., 2001) に挿入し、変異 *COL7A1* 発現ベクターを作製した (図 15)。その後変異 *COL7A1* 発現ベクターを HEK 293T 細胞に FuGENE HD transfection reagent (Promega) を用いてトランスフェクションし、2µg/ml の puromycin を用いてセレクションを行い、変異 *COL7A1* を有する HEK 293T 細胞を樹立した。これにより、*COL7A1* intron 64 F (GTAGTGTCTTGCAGCCAGA) と *COL7A1* 72 R (GGAAGAGAGAATGCTGGTGG) のプライマーペア (表 1) を用いることで正常 *COL7A1* 遺伝子を、IRES F (GGAGTACTCACCCCAACAGC) と GFP R (GTGAACTTCAAGATCCGCCAC) のプライマーペア (表 1) を用いることで変異 *COL7A1* 遺伝子を検出することが可能になった (図 15)。



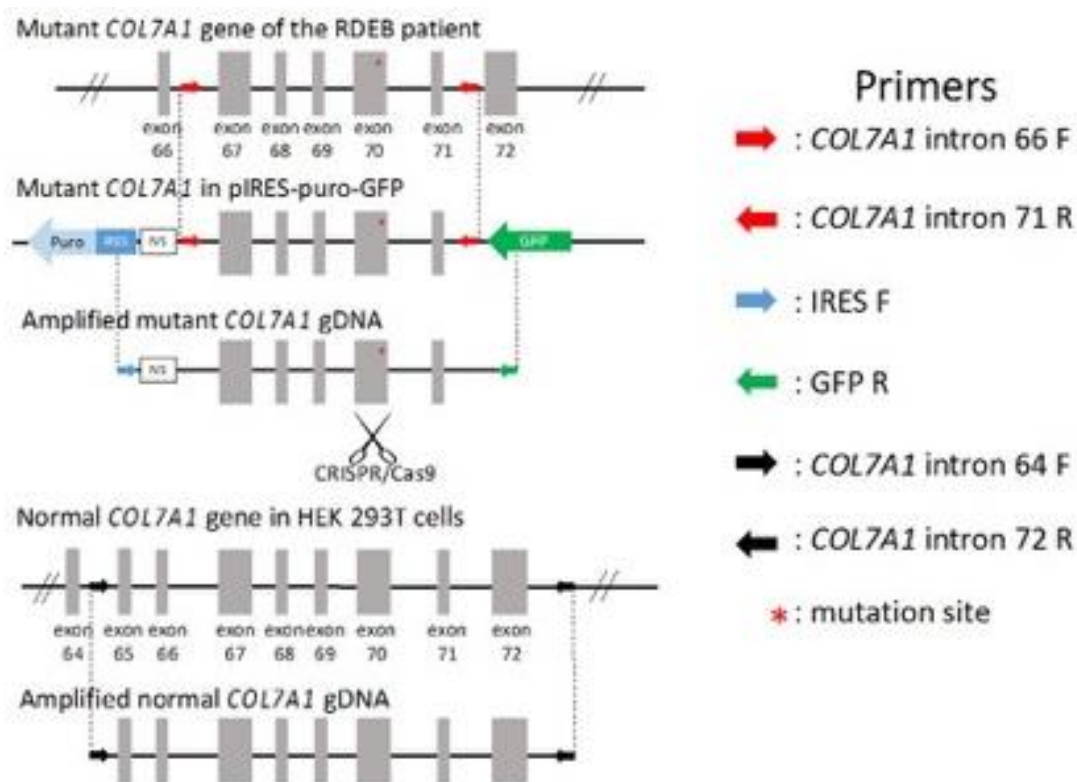


図 15. 変異 *COL7A1* 発現 HEK 293T 細胞の作製

作製した HEK 293T 細胞を, 遺伝子変異配列を特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子編集を行い, 遺伝子抽出を施行した. 抽出した遺伝子に対して IRES F と GFP R のプライマーペアを用いることで変異 *COL7A1* 遺伝子のみを, *COL7A1* intron 64 F と *COL7A1* intron 72 R のプライマーペアを用いることで正常 *COL7A1* 遺伝子のみをそれぞれ検出することができる.

表 1. 本実験に用いたプライマー配列

Gene	Primer sequence
<i>COL7A1</i> intron 66 F	Forward: TTCTGAGGTCTCAGGGTGCT
<i>COL7A1</i> intron 71 R	Reverse: GGACAGCAAGAGGTCAGAGG
<i>COL7A1</i> intron 64 F	Forward: GTAGTGTCTTGCCAGCCAGA
<i>COL7A1</i> intron 72 R	Reverse: GGAAGAGAGAATGCTGGTGG
IRES F	Forward: GGAGTACTCACCCCAACAGC
GFP R	Reverse: GTGAACTTCAAGATCCGCCAC

### c. Surveyor Nuclease Assay

変異 *COL7A1* 変異を有する HEK 293T 細胞に、作製した CRISPR (pgRNA-DsRed) と pCas9-GFP (Addgene plasmid 44719) を Fugene HD を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 加湿インキュベーターで 2 日間培養し、QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて遺伝子を抽出し、図 15 のように特異的なプライマーペアを用いて正常 *COL7A1* と変異 *COL7A1* をそれぞれ解析した。解析には遺伝子の変異や多型を検出する Surveyor Nuclease assay (Guschin et al., 2010) を用いた。それぞれの PCR 産物を熱処理により二本鎖を乖離させ、一本鎖にした後クールダウンを行い再結合させた。この時 Veriti® 96-Well Thermal Cycler を用いて、95°C 10 分→85°C 1 分→75°C 1 分→65°C 1 分→55°C 1 分→45°C 1 分→35°C 1 分→25°C 1 分のようにクールダウンすることで NHEJ に伴う遺伝子変異が誘導されていれば二本鎖中に mismatches 箇所ができる。それぞれの産物に Surveyor Nuclease を加えたのち 37°C で 1 時間おき、2.0% アガロースで泳動して Surveyor Nuclease 処理による二本鎖の切断の有無を、エチジウムブロマイドで染色し、Image Quant LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) の観察で検証した。複数のバンドが観察できれば、遺伝子変異 (NHEJ による挿入や欠失) が含まれていると判定できる。

### III. RDEB Fb の遺伝子編集

作製した遺伝子変異配列を特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いて RDEB Fb の遺伝子編集を行った。遺伝子編集の結果、NHEJ を介して数種類の塩基挿入や欠失が誘導されることが予測された。そのため、事前に不死化した RDEB Fb を遺伝子編集後、シングルセルクローニングによって単一遺伝子変異からなる細胞株を作製した。不死化処理をしていない RDEB Fb は、遺伝子編集後シングルセルクローニングを行わずに培養を継続した。

1µg の pgRNA-DsRed と 1µg の Cas9-GFP を Amaxa® Human Dermal Fibroblast Nucleofector® Kit (Amaxa® nucleofector 2 Device, program U-23) (Lonza, Basel, Switzerland) を用いて 3.6×10<sup>5</sup> 個の RDEB Fb にトランスフェクションした。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 加湿インキュベーターで 48 時間培養した後、細胞を 0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) で剥がした後に BD FACS Aria III (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, US) を用いて DsRed, GFP の両陽性細胞をソーティングした。不死化させた RDEB Fb はソーティング後、20 枚の 10cm dish に 100 個/10ml の細胞数で播種し、10-14 日の培養後に形成したコロニーを、コロニーシリンダーを用いて 24 well plate にそれぞれ継代した。その後コンフルエントに達した時点で 6 well plate, 10cm dish という順で

拡大培養し，単一細胞由来の細胞株を作製した．10cm dish に継代した時点で遺伝子抽出し，遺伝子解析を行なった．

#### IV. RNA の抽出と quantitative reverse-transcription (RT-q)PCR

##### a. RNA 抽出および cDNA への逆転写

培養細胞から全 RNA を，RNeasy® Mini Kit (Qiagen)を用いて細胞ペレットから製品のプロトコールに従って抽出し，DNase/RNase free water に溶出させた．SuperScript® IV 逆転写酵素および Oligo dT プライマー (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)を使用し，製品のプロトコールに従って total RNA 100ng から cDNA を合成した．RNA 100 ng, 50 $\mu$ M Random hexamer 1 $\mu$ l, 10mM dNTP mix 1 $\mu$ l (いずれも Thermo fisher Scientific)を 0.2ml PCR チューブに加え，滅菌水を加えて合計 9  $\mu$ l になるように調整した．65°C 5 分で反応後，氷上で 1 分間急冷した．SuperScript® IV 逆転写酵素 (200 units/ $\mu$ l) 0.2 $\mu$ l, RNase out Recombinant RNase Inhibitor 0.5 $\mu$ l, 5 $\times$ First-Strand Buffer 4 $\mu$ l および 0.1M dithiothreitol 1 $\mu$ l (いずれも Thermo Fisher Scientific)を混合し，23°C 10 分、55°C 15 分、80°C 10 分反応させた．RNase H (1U/ $\mu$ l, Thermo Fisher Scientific)を 1 $\mu$ l 加えて 37°C で 20 分反応させ，cDNA へ逆転写した．

##### b. RT-qPCR

逆転写産物 1 $\mu$ l, 滅菌水 8 $\mu$ l, 10 $\mu$ l の TaqMan gene-expression Master Mix と 1 $\mu$ l の custom TaqMan gene-expression assays (customized for *COL7A1* exon70)と TaqMan gene-expression assays (Hs03928990, *18S rRNA*) (いずれも Thermo Fisher Scientific)を混合し，96well plate (MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate) (Thermo Fisher Scientific)に入れて，StepOne Plus™ リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific)で解析した．反応条件は 50°C 2 分，95°C 2 分，(95°C 15 秒→58°C 15 秒→72°C 1 分)×40 サイクルで行なった．各サンプルにつき technical replicate を 3 とし，*COL7A1* の mRNA 量を *18SrRNA* の mRNA 量で補正した．*COL7A1* のプライマーは変異部の exon70 を含むように設計した (F: GACCGTGGGGAGACTGGAT, R: TGCCTTGATGCCAGCAGTT) (表 2, 図 16)．

表 2. 本実験に用いたプライマー配列

Gene	Primer sequence
Realtime PCR exon70 F	Forward: GACCGTGGGGAGACTGGAT
Realtime PCR exon70 R	Reverse: ATGCCTTGATGCCAGCAGTT



図 16. RT-qPCR のプライマーとプローブの設計

遺伝子編集の結果 splice variant により exon 70 が skip するような変異がある場合には認識されないように設計した (赤字は変異部).

#### V. 遺伝子編集後単一細胞由来 RDEB Fb の免疫組織学的解析

免疫組織学的解析のために培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒドで、10 分間室温で固定した。0.1%Triton X-100 (Sigma Aldrich)/PBS を用いて室温で透過処理を行なった。PBS で 3 回洗浄した後、2.5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich)/PBS で 37°C 30 分ブロッキングを行なった。PBS で 3 回洗浄した後、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。再び PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、核染色を VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories,

Burlingame, CA, US)を用いて施行し、共焦点顕微鏡 (Olympus Fluoview FV1000) (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察した。一次抗体は affinity-purified polyclonal anti-COL7 (David Woodley 教授 (University of Southern California, US)より供与) (Chen et al., 1997)を 200 倍希釈で使用し、二次抗体は Alexa Fluor® 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (A-11008) を 1500 倍希釈で使用した。

## VI. 変異を有する *COL7A1* cDNA の作製と解析

変異を有する *COL7A1* cDNA は、以前に伊藤らが作製した pCMV8 by replacing LacZ with human full-length *COL7A1* cDNA (Ito et al., 2009)を用いて、KOD plus mutagenesis Kit (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて作製した。*COL7* は細胞内で三本鎖を形成して細胞外へ分泌されることが知られているため、変異を有する *COL7A1* cDNA を用いた triple-helix formation assay を行なった。作製した変異 *COL7A1* cDNA 発現ベクターを FuGENE HD を用いて HEK 293T 細胞にトランスフェクションし、37°C, 5%CO<sub>2</sub> の加湿インキュベーターで 48 時間培養した。培養シャーレに RIPA バッファー (Wako)を加え、30 分氷上振盪透した。最後にセルスクレーパーを用いてライセートを回収した。

ライセートを 3-8 % Tris-Acetate Gels (Thermo Fisher Scientific)の各ウェルに挿入し泳動し、泳動完了後 PVDF 膜 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, US)へ転写した。5%スキムミルクでブロッキング後に、Tris Buffered Saline (TBS) で洗浄した。一次抗体を 4°Cで一晩反応させ、TBS に Tween® 20 (Sigma Aldrich)を 0.5%の濃度になるように添加した試薬 (TBS-T)で十分に洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、TBS-T で十分に洗浄した。*COL7* を検出する一次抗体は rabbit anti-COL7 polyclonal antibody (Calbiochem, La Jolla, CA, US)を、二次抗体には HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US)を用いた。二次抗体と反応させたメンブレンを SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific)で発光させ、ImageQuant LAS 4000 を用いてシグナルを検出した。

## VII. 遺伝子編集後 RDEB Fb の western blot 法, フローサイトメトリー法による解析

### 1. western blot 法

遺伝子編集後 RDEB Fb を DMEM で培養し、ライセート採取の 24 時間前に 50µg/ml アスコルビン酸を添加した。RIPA バッファーを培養シャーレに入れ、30 分氷上で振盪し最後にセルスクレーパーを用いてライセートを回収した。泳

動前に 5 分間ボイルした後、ライセートを 3-8 % Tris-Acetate Gels の各ウェルに挿入し泳動し、泳動完了後 PVDF 膜へ転写した。5%スキムミルクでブロッキング後に、Tris Buffered Saline で洗浄した。一次抗体を 4°Cで一晩反応させ、TBS-T で十分に洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、TBS-T で十分に洗浄した。COL7 を検出する一次抗体は rabbit anti-COL7 polyclonal antibody を、二次抗体には HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody を用いた。二次抗体と反応させたメンブレンを SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate で発光させ、ImageQuant LAS 4000 を用いてシグナルを検出した。

## 2. フローサイトメトリー法

遺伝子編集後の RDEB Fb には様々な挿入や欠失といった遺伝子変異が誘導され、その中の一定の割合で frameshift 変異が in-frame 化していることが推測された。その割合を解析するためフローサイトメトリー法による解析を行なった。細胞を 0.25% Trypsin-EDTA で剥がしたのち、Fix & Perm Fixation Medium A (Thermo Fisher Scientific)を用いて室温暗所で 20 分間固定した。PBS で 3 回洗浄した後、Fix & Perm Fixation Medium B (Thermo Fisher Scientific)と一次抗体を用いて 4°C暗所で一晩透過処理した。PBS で 3 回洗浄した後、Fix & Perm Fixation Medium B と二次抗体を混合して室温暗所で 1 時間静置し、フローサイトメトリーを用いて解析した。抗体は V. の免疫組織学的解析に用いたものと同じで、一次抗体は affinity-purified polyclonal anti- COL7 (Chen et al., 1997)を 200 倍希釈で使用し、二次抗体は Alexa Fluor® 488Goat anti-rabbit IgG (H+L) (A-11008) を 1500 倍希釈で使用した。

## VIII. 免疫不全マウスへの皮内投与実験

最初に 4 週齢の NOD/SCID マウスの背部の毛を剃毛し、麻酔下でそれぞれのマウスの背部皮膚に 5mm のパンチメスを用いて全層皮膚欠損の創傷を作製した。マウスの創傷周囲 4 箇所を 200 $\mu$ l PBS で希釈した  $5 \times 10^6$  個の遺伝子編集後 RDEB Fb を、24G 針を用いて皮内投与した。投与の 2 週間後に皮膚生検を行い、凍結皮膚切片を作製した。切片はメタノール/アセトン (1:1)で 20°C 10 分固定し、PBS で 3 度洗浄した。2.5% BSA/PBS で 37°C 30 分ブロッキングを行い、一次抗体と 37°C 1 時間反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体を 1 時間反応させた。再度 PBS で 3 度洗浄した後 VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI を用いて核染色を行い、共焦点顕微鏡 (Olympus Fluoview FV1000)で観察した。

また遺伝子編集後 RDEB Fb が長期間安定して COL7 を発現可能か確認するために投与後 2 週間, 4 週間, 8 週間時点で経時的に皮膚を採取し、免疫組織学的解析を行なった。

一次抗体には mouse COL7 (mCol7)には反応しない human COL7 (hCOL7) 抗体 (Vorobyev 先生 (University of Lubeck, Germany)より 供与) (Vorobyev et al., 2015)を 80 倍希釈で用い, 二次抗体には Alexa Fluor® 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (A-11008)を 100 倍希釈で用いた。本実験はマウスを安楽死させ, 創傷部位を含む上皮化皮膚を採取し, 以降の実験を行った。

### IX. *mCol7a1* ノックアウトマウス植皮実験

COL7 は生体内で DEJ 下に anchoring fibril を形成することが知られており, 遺伝子編集後 RDEB Fb の anchoring fibril の形成能の解析を行った。Anchoring fibril が投与したヒト細胞由来であることを確認するため, 生来 anchoring fibril を有していない *mCol7a1* ノックアウトマウスを用いて実験を行なった。線維芽細胞の投与から anchoring fibril の形成までに要する期間はまだ一定の見解は得られていないが, 6-8 週後とされている (Georgiadis et al., 2016; Jacków et al., 2016)。しかし, *mCol7a1* ノックアウトマウスは新生仔致死を呈するため, 長期間観察することは困難であった。そこで, 我々は *mCol7a1* ノックアウトの皮膚を NOD/SCID マウスの背部に植皮し, 同部位を用いて実験を行なった。生後 5 日の *mCol7a1* ノックアウトマウスの皮膚を全層剥離採皮した。NOD/SCID マウスの背部の毛を 15 番メスで剃り鑷子で把持して植皮片と同面積大の創を NOD/SCID マウスの背部に作成した。植皮片を切開創に乗せ 4-0 NYLON (CROWNJUN, Chiba, Japan) にて辺縁を 6 箇所縫合し, ガーゼにバラマイシン軟膏をつけてテープで圧迫固定した。固定による運動障害を防ぐためマウスの足の基部のテープに切開を入れた。14 日後に植皮片の生着を確認した。

植皮の 14 日後に植皮部に 500 $\mu$ l PBS で希釈した遺伝子編集後 RDEB Fb  $5 \times 10^6$  個を, 24G 針を用いて 4 箇所に分けて皮内投与し, 投与の 8 週後に皮膚生検を施行した。採取した検体を用いて組織学的解析, 免疫組織学的解析, 電子顕微鏡的解析を行なった。

## 実験結果

### 1. *COL7A1* 遺伝子の c.5819delC を特異的に認識する CRISPR/Cas9 の作製と評価

ZiFiT Targeter (Sander et al., 2010)を用いて、図 17 のように遺伝子変異特異的な gRNA を設計した。作製した変異 *COL7A1* 遺伝子を有する HEK 293T 細胞を、遺伝子変異特異的に認識する CRISPR/Cas9 で遺伝子編集し、変異 *COL7A1* と正常 *COL7A1* をそれぞれ別々に解析した (図 15)。Surveyor nuclease assay では変異 *COL7A1* でのみ DSB が生じていることがわかった (図 18)。またサンガー法でのシーケンス波形から、TIDE (tracking of indels by decomposition) 法 (Brinkman et al., 2014)を用いて、NHEJ で誘導された挿入や欠失の頻度を解析したところ、変異 *COL7A1* では 77.2%で挿入や欠失が生じていたのに対し、正常 *COL7A1* では 4.0%と低値であった。さらに、変異 *COL7A1* に誘導された挿入や欠失のうち 65.0%で frameshift 変異が in-frame 化するような変異が生じていた (図 19)。この結果から、作製した CRISPR/Cas9 は正常 *COL7A1* を切断することなく、変異 *COL7A1* の変異配列のみを認識して DSB を起こし、高頻度で frameshift 変異を in-frame 化するような変異を誘導していることがわかった。

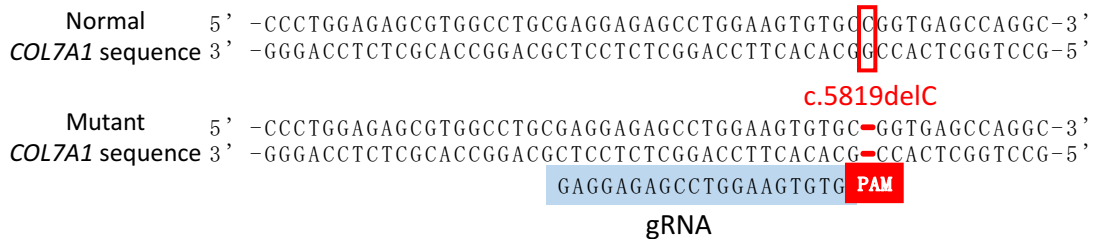


図 17. c.5819delC 特異的な CRISPR/Cas9 の作製



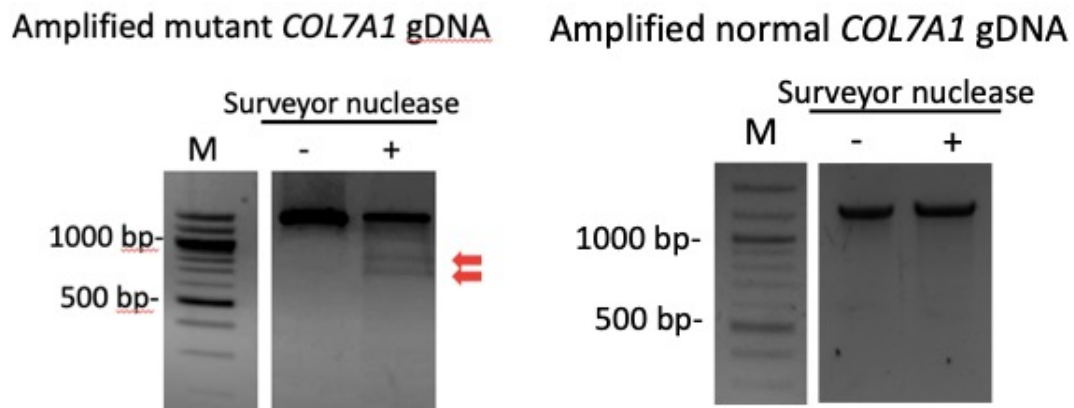


図 18. Surveyor nuclease assay

変異 *COL7A1* (左)のみで切断バンドを認め(赤矢印), 作製した CRISPR/Cas9 は変異 *COL7A1*の変異配列のみを認識してDSBを起こしていることがわかった。

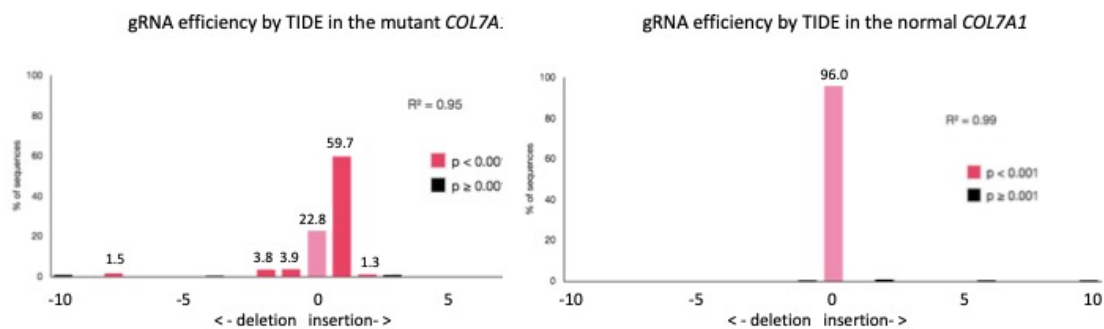


図 19. TIDE analysis の結果

正常 *COL7A1*ではほとんど挿入や欠失が誘導されていない (右)のに対し, 変異 *COL7A1*では 77.2%で挿入や欠失が生じていた (左). そのうち 65%が frameshift 変異を in-frame 化するような挿入や欠失であった。

## 2. 遺伝子変異特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いた RDEB Fb の遺伝子編集

RDEB Fb に, 作製した遺伝子変異特異的に認識する pgRNA\_DsRed と pCas9\_GFP をトランスフェクションし, GFP および DsRed 両陽性細胞のみをフローサイトメトリーでソーティングした (図 20). 事前に不死化させた RDEB Fb を遺伝子編集後にシングルセルクローニングし, 50 の細胞株を作製した (図 2

1). 作製した細胞株を解析したところ、28 の細胞株で NHEJ が生じており (56%, 数塩基の欠失は 16, 数塩基の挿入は 8, 欠失・挿入は 4 の細胞株で生じていた), そのうち 17 の細胞株で frameshift 変異が in-frame 化していた (図 21, 22). その中から以下の変異を有する 3 種類の細胞株を用いて更なる解析を行った.

reframed: c.5815\_5818delGTGCinsTGTG p.Val1939\_Pro1940delinsCysAla (reframed#1), c.5813\_5819delGTGTGCCinsGTGCp.Val1939\_Pro1940delinsAla (reframed#2), c.5813\_5818delGTGTGCinsTGTG p.Ser1938Metfs\*27 (non-reframed)

また、遺伝子編集後の細胞において pgRNA-DsRed, Cas9-GFP のゲノムへの組み込みの有無やプラスミド遺伝子の残存の有無について解析し、実臨床で治療応用する場合の安全性を検討した. 実際には、ソーティング直後の RDEB Fb とソーティング後 7 日間培養した RDEB Fb を用いて、フローサイトメトリー法による GFP および DsRed の発現の有無と PCR 法を用いたプラスミド遺伝子のゲノムへの組み込みの有無を確認した (図 23). PCR 法では表 3 に示す GFP specific プライマーペア (F: CCACCCTCGTGACCACCCTG, R: CTCAGGGCGGACTGGGTGCTC), DsRed specific プライマーペア (F: GCTCAA AAGAACAGCACGGCG, R: GATTGCTTTGGCGTCAACTCC), GFP specific プライマーペア (F: CGTGAACGGCCACGAGTTCG, R: CCGTCCTTCAGCTTCAGGGC)を用いて培養 7 日後の RDEB Fb ではゲノムに取り込まれていないことを確認した. またフローサイトメトリー法で 7 日後には DsRed, GFP は共に発現していないことを確認した.

表 3. 本実験で使用したプライマー配列

Gene	Primer sequence
GFP specific F	Forward: CCACCCTCGTGACCACCCTG
GFP specific R	Reverse: CTCAGGGCGGACTGGGTGCTC
DsRed specific F	Forward: GCTCAA AAGAACAGCACGGCG
DsRed specific R	Reverse: GATTGCTTTGGCGTCAACTCC
pCas9 specific F	Forward: CGTGAACGGCCACGAGTTCG
pCas9 specific R	Reverse: CCGTCCTTCAGCTTCAGGGC

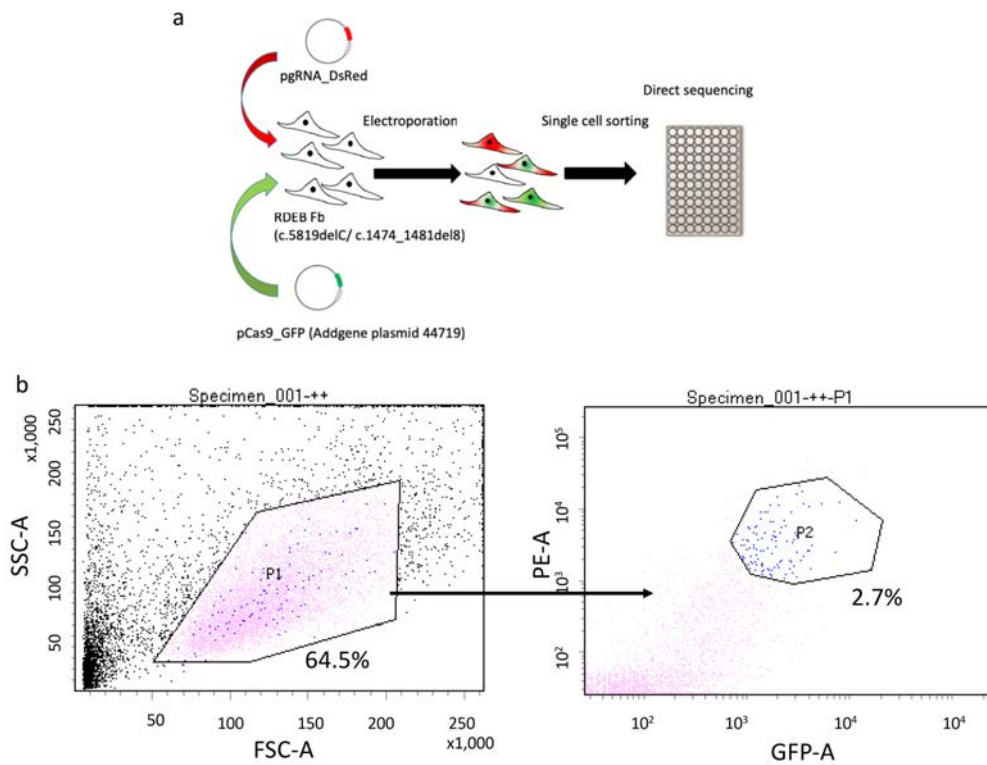


図 20. RDEB Fb の遺伝子編集と DsRed, GFP 両陽性細胞  
のソーティング

RDEB Fb に pgRNA\_DsRed と pCas9\_GFP をエレクトロポレーションでトランスフェクションしたのち、両陽性細胞のみをソーティングした。

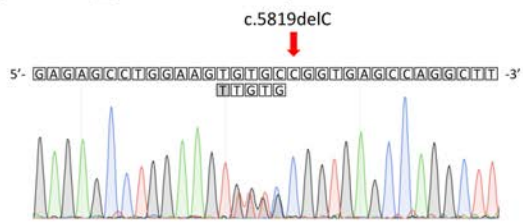
Normal seq.		CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGAAGTGTGCCGGTGGAG	
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Gly Ser Val Pro Val Glu	
c.5819delC		CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGAAGTGTGC—GGTGGAG	p.Pro1940Argfs*65
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Gly Ser Val Arg · fs · Ter	
<b>Frameshift</b>		<b>Sequence</b>	<b>Amino acid change</b>
22x	unchanged	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGAAGTGTGC—GGTGGAG	p.Pro1940Argfs*65
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Gly Ser Val Arg · fs · Ter	
Deletions			
7x	-1	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGA—TGTGC—GGTGGAG	p.Ser1938Metfs*27
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Gly Met · fs · Ter	
4x	-2	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGA—GTGC—GGTGGAG	p.Val1939_Pro1940delinsAla
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Gly Ser Ala Val Glu	
3x	-3	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGA—GTGC—GGTGGAG	p.Ser1938Valfs*66
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Gly Val · fs · Ter	
1x	-4	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTG—TGTGC—GGTGGAG	p.Gly1937Valfs*27
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Val · fs · Ter	
1x	-5	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCT—TGTGC—GGTGGAG	p.Gly1937_Pro1940delinsCysAla
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Cys Ala Val Glu	
Insertions			
8x	+1	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGAAGTTGTGC—GGTGGAG	p.Val1939_Pro1940delinsCysAla
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Gly Ser Cys Ala Val Glu	
Indels			
4x	-2	CGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGCGA—GTGC—GGTGGAG	p.Gly1937_Pro1940delinsAlaSerAla
		Arg Gly Leu Arg Gly Glu Pro Ala Ser Ala Val Glu	

— : Deletion sequence — : Mutation site fs: Frameshift

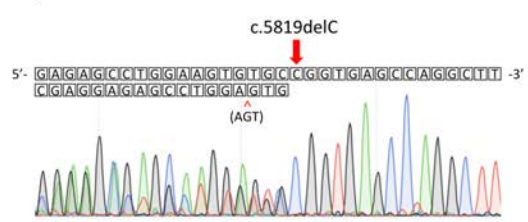
## 図 21. 遺伝子編集後 RDEB Fb の解析結果

事前に不死化させた RDEB Fb を用いて単一細胞からシングルセルクローニングを行い、細胞株を作製した。28/50 の細胞株で NHEJ が生じており、そのうち 17 の細胞株で frameshift 変異が in-frame 化していた (赤字)。

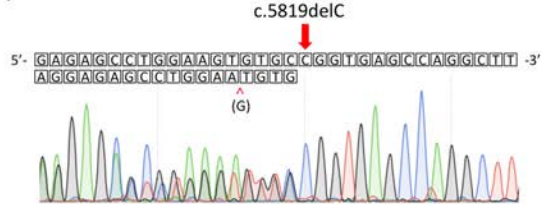
p.Val1939\_Pro1940delinsCysAla



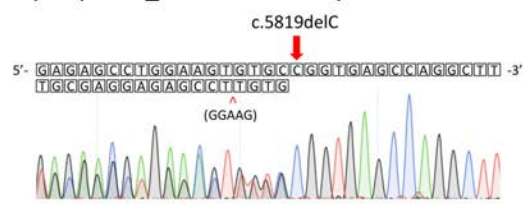
p.Ser1938Valfs\*66



p.Ser1938Metfs\*27



p.Gly1937\_Pro1940delinsCysAla



p.Val1939\_Pro1940delinsAla

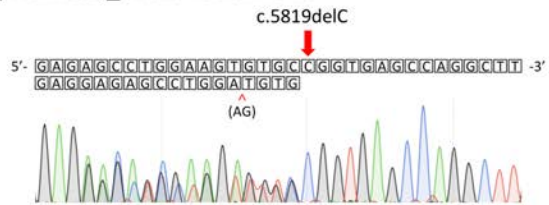


図 22. 各細胞株のサンガー法の結果

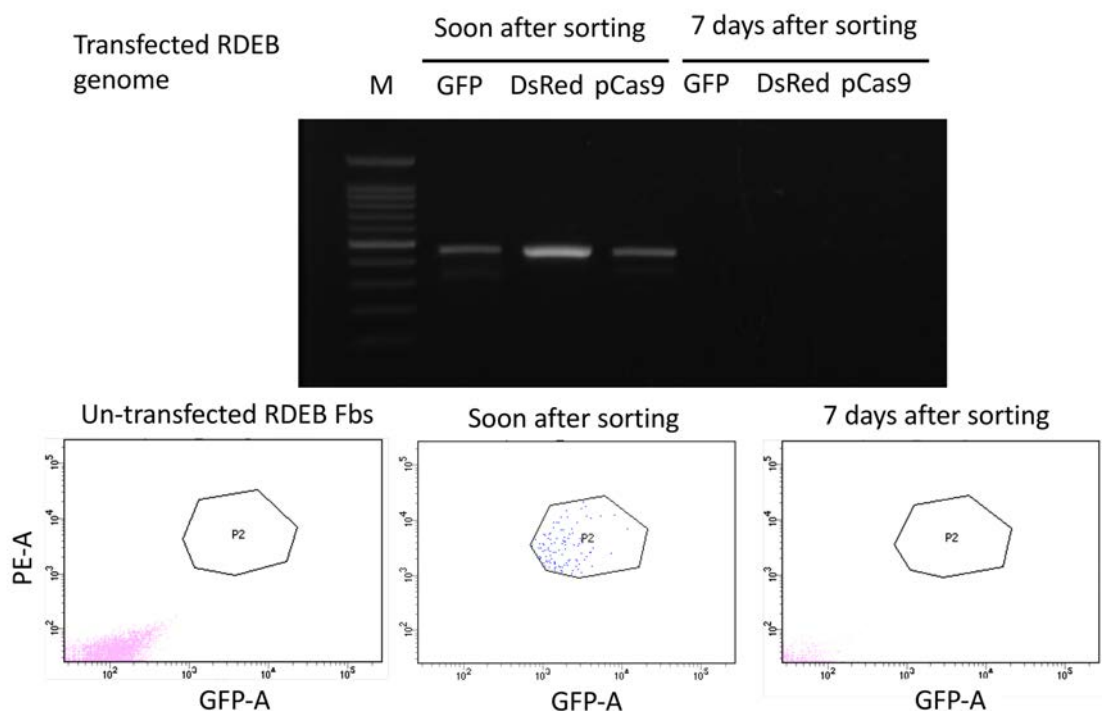


図 23. ソーティング直後と 7 日後の PCR 法と

### フローサイトメトリー法での解析

ソーティング直後に抽出した遺伝子からは PCR 法で GFP, DsRed, pCas9 が増幅されていたが, 7 日培養後に抽出した遺伝子からは増幅が認められなかった. また, フローサイトメトリー法では, 7 日後に GFP, DsRed はともに発現しなくなっていた.

### 3. オフターゲット効果についての解析

作製した CRISPR/Cas9 がオフターゲット効果を確認するため, ZiFiT Targeter (Sander et al., 2010; Sander et al., 2013) と CRISPR RGEN Tools (Bae et al., 2014) を用いてオフターゲットサイトを選択した (表 4. 選択した 24 のオフターゲットサイトについて PCR 法で増幅した後, 作製した細胞株に関してはサンガー法を用いて, 遺伝子編集後そのまま培養継続した細胞群に関しては Surveyor nuclease assay を用いて解析を行った (図 24). 選択した全てのオフターゲットサイトにおいてオフターゲット効果は認められなかった.

Target site	gRNA sequence	PAM	Chr	In genes
On target	GAGGAGAGCCTGGAAGTGTG	CGG	Chr.3	<i>COL7A1</i>
Normal allele	GAGGAGAGCCTGGAAGTGTG	CCG	Chr.3	<i>COL7A1</i>
Off target_1	GAGGAGAGCCTGGATGTCTG	GGG	Chr.14	<i>CLMN</i>
Off target_2	GAGGAGAGCCTGGCAGTTTG	GGG	Chr.3	<i>IQSEC1</i>
Off target_3	GGGGAGAGCCTGGAAGGGTG	GGG	Chr.16	<i>MGRN1</i>
Off target_4	GAGGAGTACCTGGCAGTGTG	AGG	Chr.6	<i>AIG1</i>
Off target_5	GAGGAGTACCTGGCAGTGTG	AGG	Chr.15	<i>PCDH15</i>
Off target_6	GGGGAGAGCTTGGAAGCTGTG	GGG	Chr.5	<i>PDZD2</i>
Off target_7	GAGGAGAGCCTGGTGGTGGG	GGG	Chr.6	<i>UST</i>
Off target_8	GAGGAGAGCCTGGTTGTGTA	GGG	Chr.2	<i>CNANAP5</i>
Off target_9	GAGCAGAGCCTGGTAGTGTA	GGG	Chr.5	<i>F2R</i>
Off target_10	CAGGTGAGCCCGGAAGTGTG	GGG	Chr.17	<i>RPTOR</i>
Off target_11	GAGGAGAGCCTGGAGGAGAG	GGG	Chr.4	<i>SORBS2</i>
Off target_12	GATGAGAGCCTGGGAATGTG	GGG	Chr.1	<i>PTAFR</i>
Off target_13	GAGCAGAGCTTGGAAGGGTG	GGG	Chr.22	<i>AK093107</i>
Off target_14	GAGGAGAGCCTGTATTTGTG	GGG	Chr.11	<i>TMPRSS13</i>
Off target_15	GAGGAGAACCTGGTAGGGTG	GGG	Chr.17	<i>MMLT6</i>
Off target_16	CAGAATAGCCTGGAAGTGTG	TGG	Chr.9	<i>NHIB</i>
Off target_17	GAGGAGGGCTGGGAAGTGTG	TGG	Chr.19	<i>MED25</i>
Off target_18	GATGAGAGCTTGGAAGCGTG	TGG	Chr.16	<i>ZNF423</i>
Off target_19	GAGGAGAGCTTGGAATGTG	TGG	Chr.6	<i>FAM65B</i>
Off target_20	CAGGAGAGCCTGGAAGAGGG	GGG	Chr.11	<i>DNHD1</i>
Off target_21	GAGCTGAGCCTGGAAGCGTG	TGG	Chr.15	<i>RBPM2</i>
Off target_22	GAGGGCAGCCTGGAAATGTG	TGG	Chr.17	<i>RBFOX3</i>
Off target_23	GAGGAGAGACTCGAAGTGAG	CGG	Chr.1	<i>CACNA1E</i>
Off target_24	GAGGTGAGCCAGGAAGGGTG	CGG	Chr.16	<i>HEATR3</i>

表 4. 選択したオフターゲットサイト

(赤字は gRNA との相違塩基)

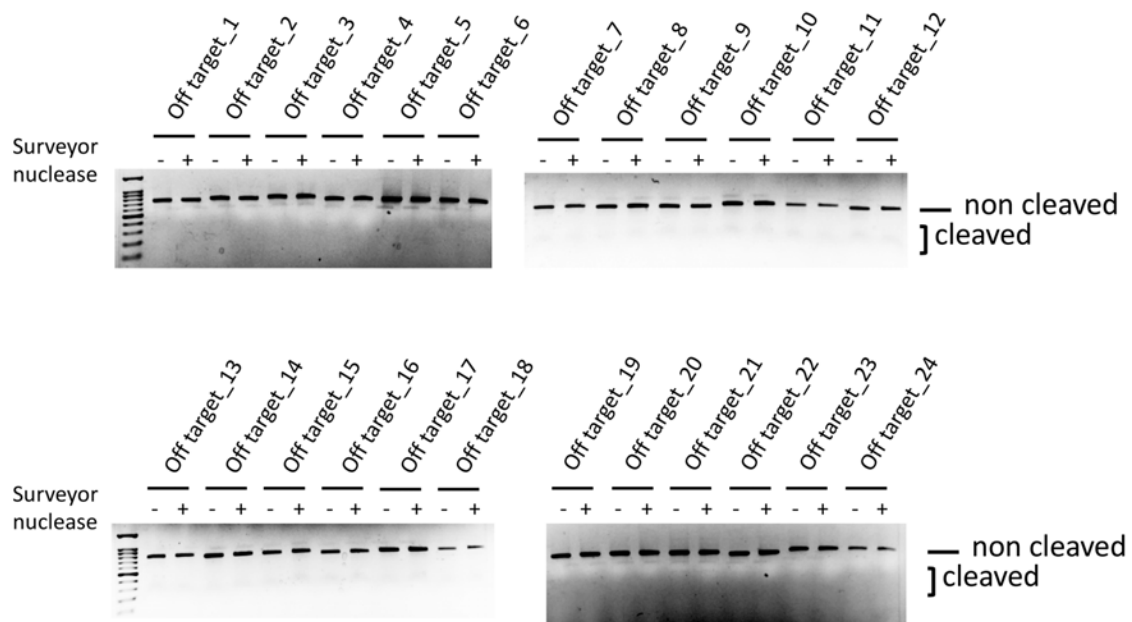


図 24. オフターゲット効果の解析

Surveyor nuclease assay での解析で、選択した 24 のオフターゲットサイトでオフターゲット効果は認められなかった。

#### 4. *COL7A1* cDNA を用いた三本鎖形成能の解析

*COL7* は表皮角化細胞や線維芽細胞の細胞内で三本鎖を形成し、細胞外へと分泌されることが知られている (Chung and Uitto, 2010). そこで我々は in-frame 化した *COL7* による三本鎖形成能を解析するために、3. で選択した 3 種類の遺伝子変異を有する *COL7A1* cDNA を作製し、western blot 法を行った. western blot 法では、NHDF をポジティブコントロール、c.5819delC (RDEB) cDNA をネガティブコントロールとした. NHDF, c.5815\_5818delGTGCinsTGTG (reframed#1), c.5813\_5819delGTGTGCCinsGTGC (reframed#2) では 290-kDa (monomer) と 900-kDa (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. 一方で c.5819delC (RDEB) と c.5813\_5818delGTGTGCinsTGTG (non-reframed) では 900-kDa のバンドを同定できなかった (図 25).



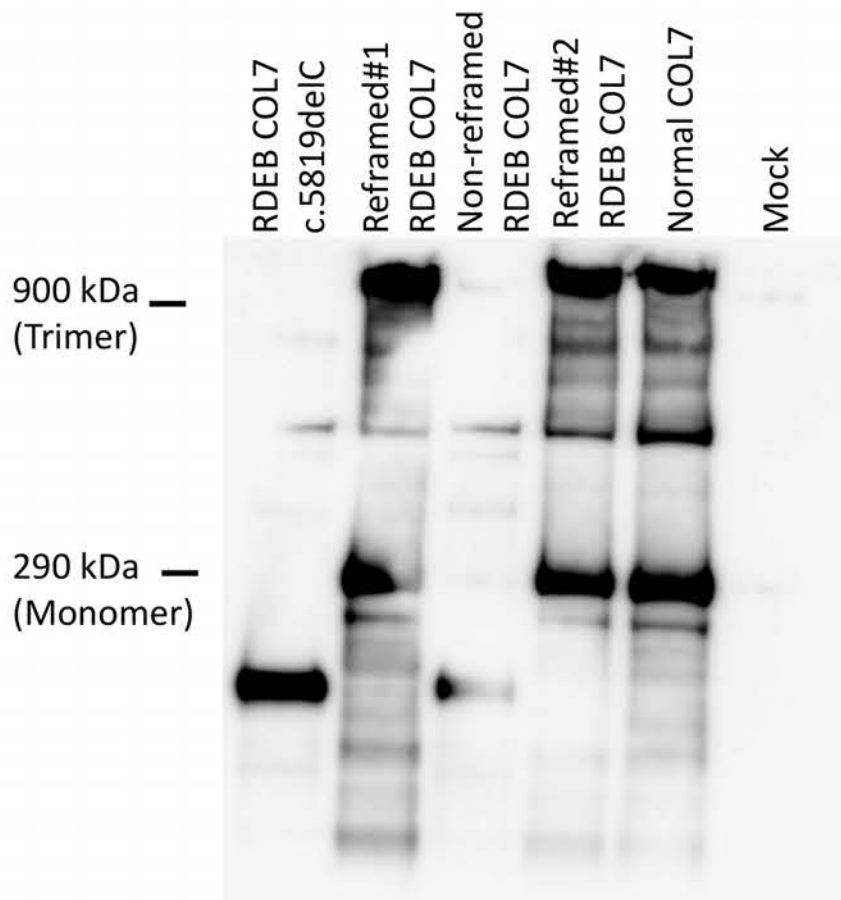


図 25. 三本鎖形成能の解析

Reframed#1, Reframed#2, Normal COL7 では 900kDa (trimer) にバンドを認めるが, RDEB COL7 c.5819delC と Non-reframed RDEB COL7 ではバンドを認めなかった.

### 5. 3. で作製した細胞株の *COL7A1* の mRNA とタンパク発現の解析

NHEJ を介した遺伝子編集により in-frame 化した COL7 が三本鎖を形成し, 細胞外へ分泌されることが確認でき, 次に実際に mRNA とタンパクレベルでの発現を確認するために RT-qPCR 法と免疫組織学的解析を行った. RT-qPCR 法は変異部である exon70 を含むようにプローブとプライマーを作製した (表 2, 図 16). *COL7A1* の mRNA は遺伝子編集前の RDEB Fb や in-frame 化していない RDEB Fb と比較して発現量が増加していた (図 26). また免疫組織学的解析では, in-frame 化することで COL7 の染色を認めるようになった (図 27).

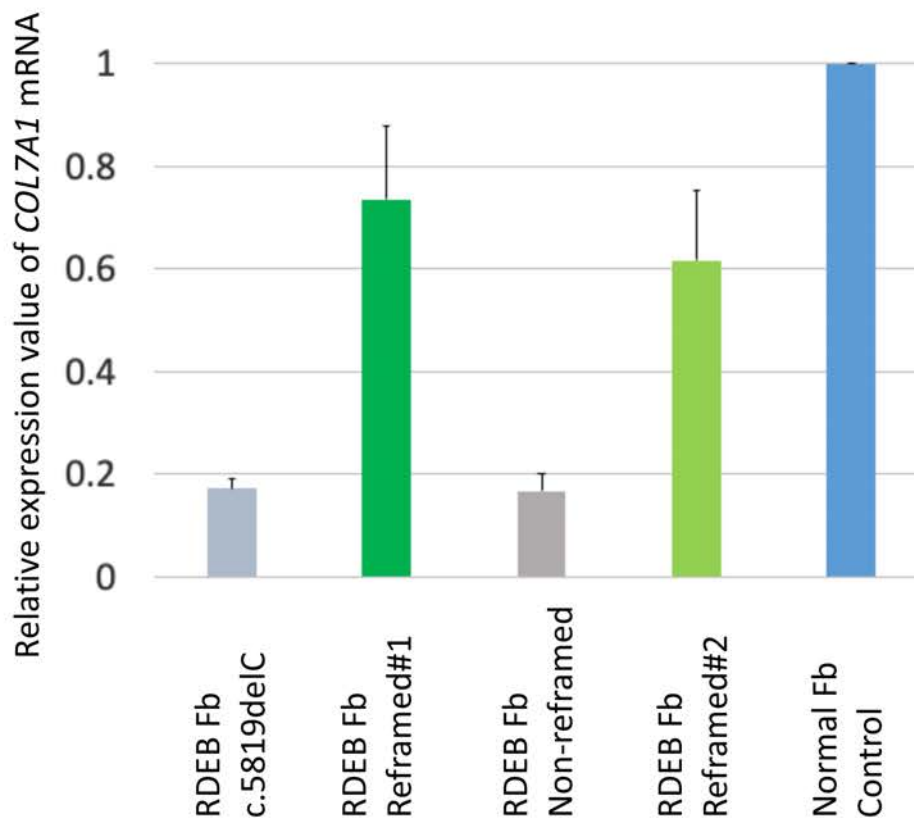


図 26. *COL7A1* mRNA 発現量の解析

RDEB Fb や Non-reframed RDEB Fb と比して reframed RDEB Fb では *COL7A1* mRNA の発現量が増加していた。

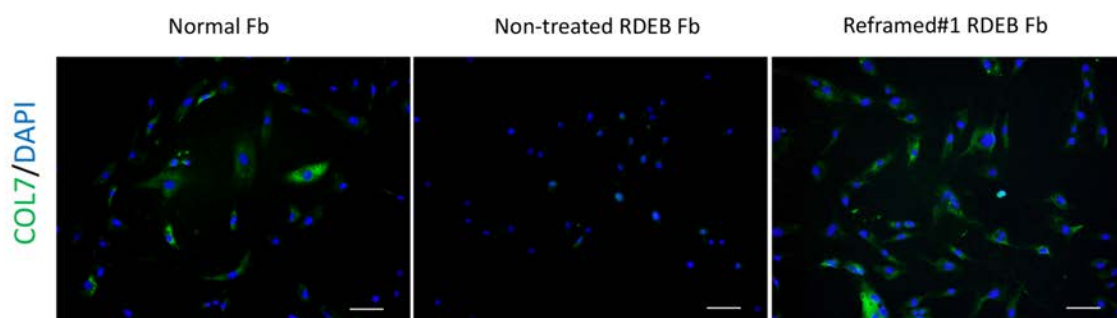


図 27. 免疫組織学的解析

RDEB Fb では COL7 の発現を全く認めなかったが, reframed RDEB Fb では COL7 が検出された. Scale bar = 50  $\mu$ m

### 6. 3. で作製した細胞株の *in vivo* での解析

*in-frame* 化した COL7 が *in vivo* で正しく DEJ に発現していることを検証した。5mm のパンチメスを用いて全層皮膚欠損の創傷を作製した NOD/SCID マウスに *in-frame* 化した細胞株を皮内投与し、上皮化部位における hCOL7 の発現の有無を、細胞投与から 2 週間後に免疫組織学的に解析した。一次抗体は hCOL7 にのみ反応し、mCol7 には反応しない hCOL7 抗体 (Vorobyev et al., 2015) を用いた免疫組織学的解析を行ったところ、*in-frame* 化した細胞の投与群では DEJ に hCOL7 の線状沈着を認めた。一方で、RDEB Fb 投与群では陰性であった (図 28)。

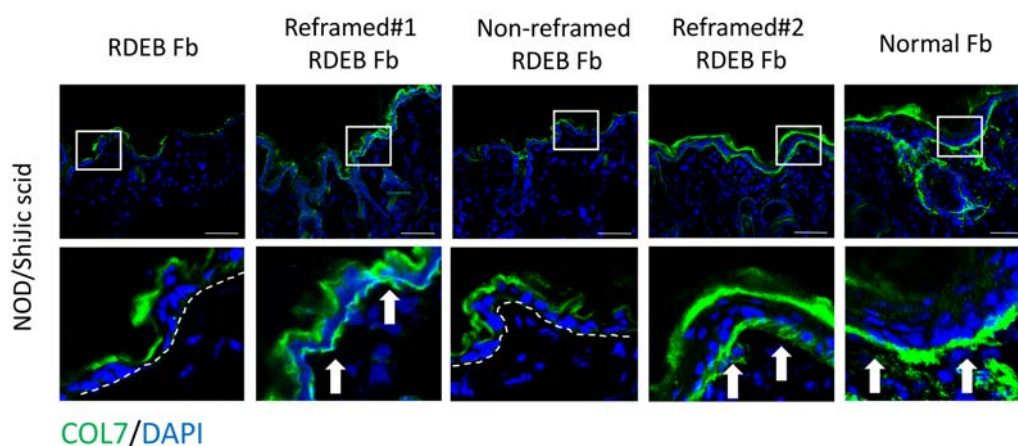


図 28. *In-frame* 化した細胞株の *in vivo* 解析

Reframed#1, Reframed#2, Normal Fb 投与群では DEJ に COL7 の線状沈着を認めた (白矢印)。一方で RDEB Fb, Non-reframed RDEB Fb 投与群では陰性であった (白点線)。Scale bar = 50  $\mu$ m

### 7. NHEJ の経路を介した治療法の実臨床での有用性についての解析

以上の実験結果から、RDEB Fb に対して遺伝子変異特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子編集し、NHEJ の経路を介して高頻度に *in-frame* 化した細胞を得ることができた。また *in-frame* 化した細胞では mRNA, タンパクレベルで COL7 を発現するようになり、*in vivo* でも COL7 が DEJ に正しく発現することを確認した。

本戦略を実臨床で応用する場合、もし、遺伝子編集後の細胞集団をそのまま皮内投与することができれば大変な利点となる。それを検討するために、遺伝子編集後の細胞集団を選択マーカーの使用やシングルセルクローニングの手技を経ずに治療に応用できるか *in vitro* 及び *in vivo* の系で解析した。exon 70 を含む

ように設計したプライマー、プローブ（表 2, 図 16）を用いた RT-qPCR 法では、遺伝子編集前と比較して *COL7A1* mRNA の発現が増加していた（図 29）。またセルライゼートを用いた western blot 法では、RDEB Fb では発現を認めなかったが、遺伝子編集後の細胞群では COL7 の発現を認め、概算量としては NHDF と比較して約 36% の発現が認められた（図 30）。実際に遺伝子編集後の RDEB Fb 内での COL7 発現細胞の割合を確認するため、フローサイトメトリー法を用いて解析したところ、約半数が COL7 陽性細胞になっていることがわかった（図 31）。以上の結果から今回の治療戦略では、遺伝子編集後の RDEB を選択やシングルセルクローニングの手順を経なくとも治療応用するに十分な COL7 が発現することが示唆された。シングルセルクローニングを行っていない遺伝子編集後の RDEB Fb 集団による治療効果を検証するために、これらの細胞集団を NOD/SCID マウスの背部に皮内投与し、経時的な COL7 の発現解析を、免疫組織学的手法を用いて行なった。その結果、遺伝子編集後の細胞集団でも投与後 2 週から 8 週までの長期にわたって DEJ に hCOL7 が線状に沈着することが確認できた（図 32）。

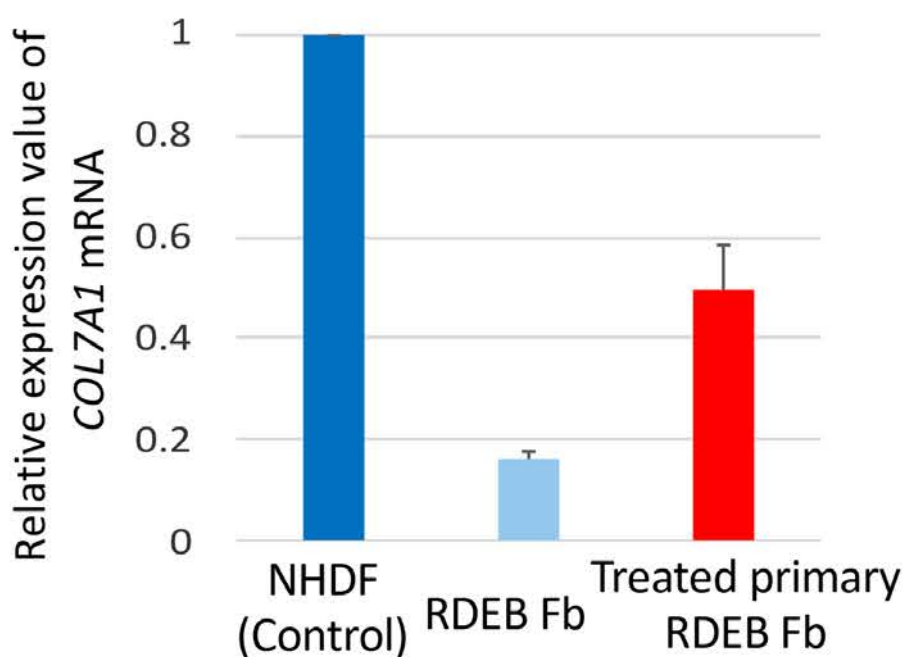


図 29. 遺伝子編集後 RDEB Fb の *COL7A1* mRNA の発現量の解析  
 遺伝子変異を有し、in-frame 化が起きている exon を含むように行った RT-qPCR 法では、治療前 RDEB Fb と比較して COL7 の発現量増加を認めた。

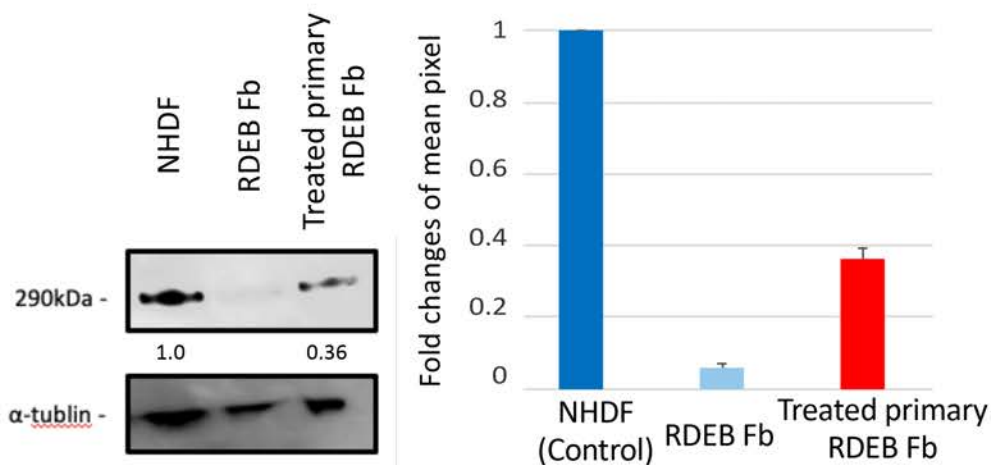


図 30. 遺伝子編集後 RDEB Fb の COL7 発現量の比較

セルライゼートを用いた western blot 法では，治療前 RDEB Fb ではバンドを認めなかったが遺伝子編集後には 290kDa にバンドを認めるようになった．また実験を 3 度繰り返し， $\alpha$ -tublin で補正した発現量比較では，NHDF と比較して約 36%の発現量が認められた．

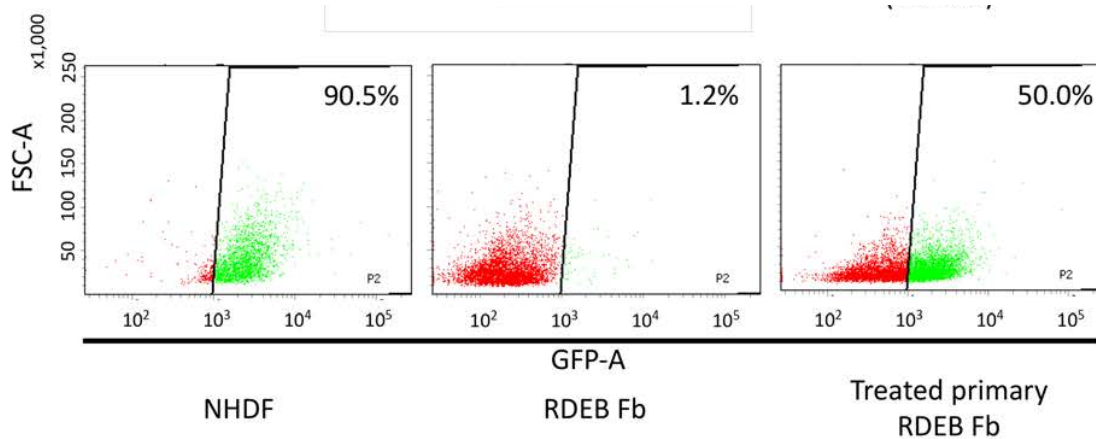


図 31. 遺伝子編集後 RDEB Fb に含まれる

### COL7 陽性細胞比率の解析

遺伝子編集後の RDEB Fb を COL7 抗体を用いて染色してからフローサイトメトリー法で解析した．約 50%の細胞が COL7 発現細胞になっていた．

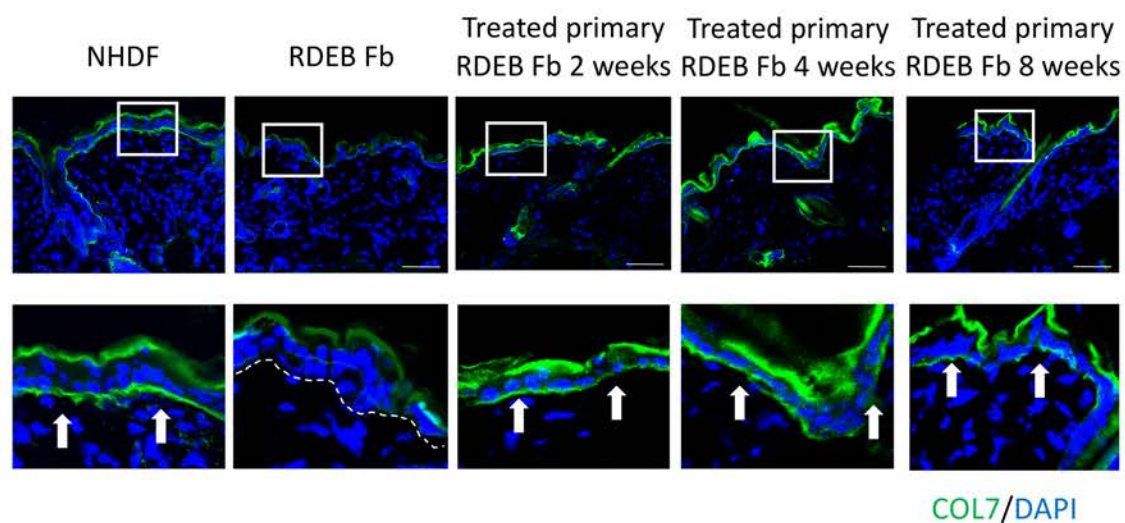


図 32. 遺伝子編集後 RDEB Fb の *in vivo* 解析

NOD/SCID マウスの背部に創を作製し，周囲に線維芽細胞を皮内投与し，上皮化した皮膚での hCOL7 の発現を確認した．遺伝子編集後の RDEB Fb 投与群では 2 週間から 8 週間までの長期にわたって安定して hCOL7 が発現していることを確認した． Scale bar = 50  $\mu$ m

#### 8. NHEJ の経路を介した RDEB Fb は anchoring fibril 形成能を有する

最後に，実際に発現した COL7 の機能面での解析として，生体内で anchoring fibril (係留線維)の形成能を検証した．投与した細胞から分泌された hCOL7 由来の anchoring fibril が形成されていることを確認するため，生来 anchoring fibril を有していない *mCol7a1* ノックアウトマウスを用いて実験を行った．細胞投与から anchoring fibril の形成までに要する期間に一定の見解はないが，6 週から 8 週要するとする報告が多い (Georgiadis et al., 2016; Jacków et al., 2016)．生後 5 日目の *mCol7a1* ノックアウトマウスの皮膚を NOD/SCID マウスの背部に植皮し，その植皮部に細胞を投与し，投与後 8 週の皮膚を用いて解析を行った (図 33)．組織学的解析では，細胞投与群では表皮真皮が強固に接着しており (図 34)，免疫組織学的解析では DEJ に hCOL7 が線状に沈着していた (図 35)．また電子顕微鏡的解析では，DEJ 下に anchoring fibril の形成を認めた (図 36)．周囲のマウス組織から分泌された mCol7 による影響を否定するために，免疫組織学的に mCol7 が陰性であること，ネガティブコントロールとして植皮部細胞非投与群を用いた検体では，DEJ の下に anchoring fibril の形成を認めないことを確認した (図 34, 35, 36)．



図 33. *mCol7a1* ノックアウトマウスの植皮実験

*mCol7a1* ノックアウトマウスは先天的に皮膚が脆弱で手掌や前腕に水疱を伴っていることが多く (左), 新生仔致死に至る. 生後 5 日の *mCol7a1* ノックアウトマウスを安楽死させた後に全層皮膚採取し, NOD/SCID マウスの背部に植皮した (中央). 14 日の圧迫固定後生着を確認した (右).

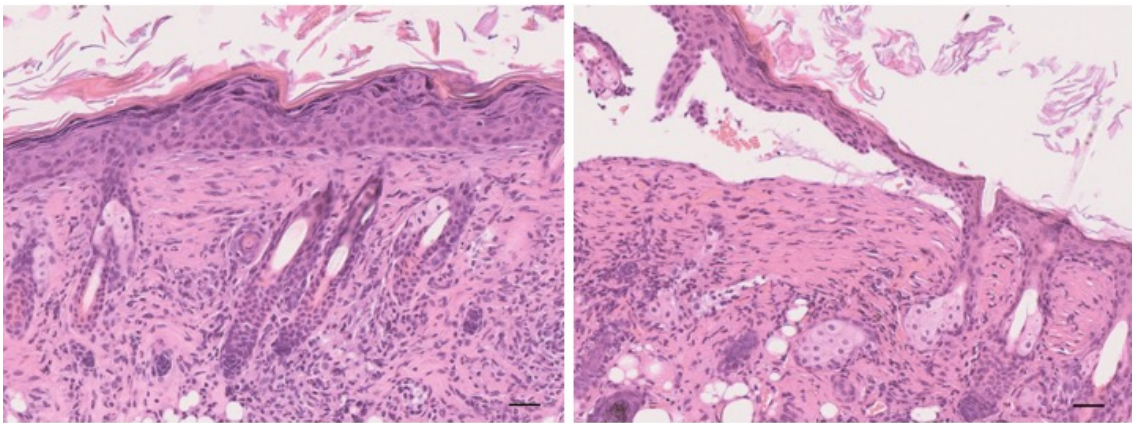


図 34. 植皮後細胞投与群と非投与群の組織学的解析

細胞投与群では真皮と表皮が強固に接着している (左)のに対し, 非投与群では真皮と表皮間に裂隙を認めた (右). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

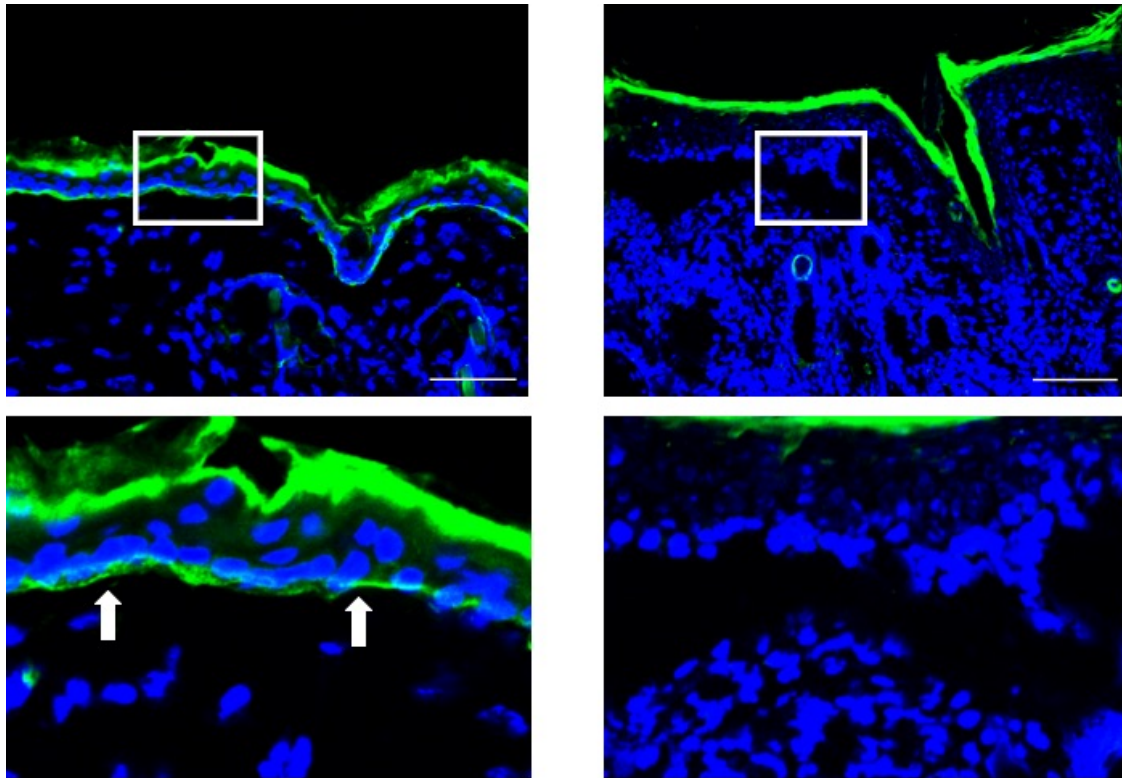


図 35. 植皮後細胞投与群と非投与群の免疫組織学的解析

細胞投与群では DEJ に hCOL7 が線状に沈着していた (左上, 左下) が, 非投与群では hCOL7 は陰性であった (右上, 右下). Scale bar = 50  $\mu$ m



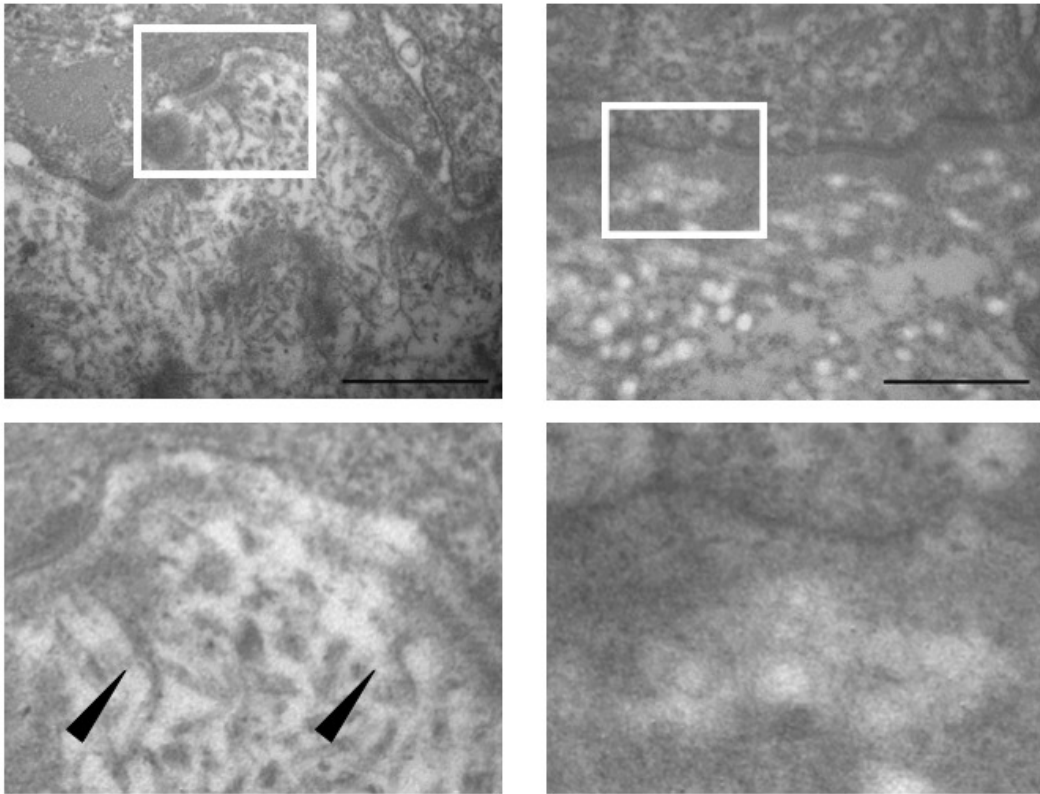


図 36. 植皮後細胞投与群と非投与群の電子顕微鏡学的解析

細胞投与群では DEJ 下に anchoring fibril の形成を認めた。(左上、左下、黒矢印)、一方で非投与群では DEJ 下に anchoring fibril 様の構造物は認めなかった。Scale bar = 500 nm

## 考察

これまで NHEJ を介した遺伝子編集の手法は、意図的に数塩基の挿入や欠失を導入することで、遺伝子をノックアウトする目的で用いられることが多かった (Lee et al., 2010; Perez et al., 2008; Shinkuma et al., 2016; Söllü et al., 2010). しかし近年、筋ジストロフィーに対して、遺伝子編集システムである TALENs (transcription activator-like effector nucleases) を用いて frame shift 変異を in-frame 化する戦略 (Ousterout et al., 2013) や早期終止コドンの出現する exon を exon skipping させるような戦略 (Iyombe-Engembe et al., 2016; Young et al., 2016) が報告されている. 今回我々は RDEB Fb に対して、遺伝子変異配列を特異的に認識する CRISPR/Cas9 システムを用いて NHEJ を介して意図的に数塩基の挿入や欠失を誘導することで、frameshift 変異を in-frame 化する遺伝子治療法を開発した.

RDEB の治療について、先天的に欠損している COL7 を後天的に補充する方法としてはこれまで様々な手法が試みられている (Hainzl et al., 2017; Izmiryan et al., 2018; Jacków et al., 2016; Murauer et al., 2011; Osborn et al., 2013; Woodley et al., 2004; Wu et al., 2017). 1 つは全長 COL7A1 cDNA を作製し、レトロウイルスベクターなどを用いて *ex vivo* で表皮幹細胞や線維芽細胞に遺伝子導入した上で患者に戻す方法である (Jacków et al., 2016; Sibrashvili et al., 2016; Woodley et al., 2004). レンチウイルスなどのウイルスベクターを用いると、培養細胞や生体に効率的に外来遺伝子を導入できるために、遺伝子導入効率はエレクトロポレーションなどの物理化学的な方法よりも優れており、遺伝子治療において有効なツールであるが、ウイルスベクターがランダムに染色体に取り込まれることにより近傍のがん原遺伝子が活性化することによるがん化のリスクや、搭載可能な遺伝子の大きさの制限といった問題がある (Yin et al., 2014). COL7 は 2944 個のアミノ酸からなる約 290kDa のポリペプチド鎖が三本重合した三量体であり、mRNA のサイズは約 9kb と巨大な分子であることからウイルスベクターに搭載することは容易ではない. もう 1 つの戦略は、HR の経路を介して、変異のある DNA から正常な DNA へと遺伝子編集する方法で、Zinc finger や TALENs, CRISPR/Cas9 が用いた方法が報告されている (Hainzl et al., 2017; Izmiryan et al., 2018; Osborn et al., 2013). HR を介した遺伝子編集は、正常の DNA へと遺伝子を組換える方法であり、理想的な手法に思えるが、実際の患者由来細胞での応用には、その頻度はそれほど高くはなく、それゆえ大量の細胞に対して CRISPR/Cas9 をトランスフェクションして遺伝子編集した後に、HR を介して正しく遺伝子組換えさ

れた細胞のみを、抗生剤カセットなどの選択マーカーを用いて選択する必要がある。また、選択された少数の細胞を、治療十分量まで増殖することも考慮すると、分裂回数が有限である患者由来細胞での応用は困難であり、実際に我々の研究でも遺伝子編集後の細胞のシングルセルクローニングには、不死化させた RDEB Fb を使用せざるを得なかった。増殖能の高い細胞として iPSCs などを利用する方法が開発されつつあり、実際に DEB 患者由来 iPSCs で HR を介した遺伝子治療をした報告もある (Sebastiano et al., 2014)。確かに iPSCs を用いた方法は、iPSCs 自体が表皮角化細胞にも線維芽細胞にも分化するという点では RDEB の治療に用いるにあたって大きな利点があるが、iPSCs の腫瘍化の可能性 (Miura et al., 2009) や、表皮角化細胞や線維芽細胞への分化に関してはまだ不明な部分が多い。我々の開発した治療戦略は患者由来の線維芽細胞を遺伝子編集後に、直接皮膚に投与することができ、遺伝子操作や培養に要する時間を最小限にすることが可能である。一方で、COL7A1 遺伝子のナンセンス変異に対してアミノグリコシド系抗生剤含有軟膏の外用によって、早期終始コドンを読み飛ばすリードスルー治療 (Woodley et al., 2017) や、Antisense Oligonucleotide を用いて早期終始コドンを含む exon を読み飛ばす exon skipping (Bremer et al., 2016) といった戦略も研究が進められている。今回我々は frameshift 変異を in-frame 化する戦略を試みたが、遺伝子変異の種類や場所に応じてそれぞれに適切な治療戦略を選択することができることは患者にとって大変な利益につながるものであると考えられる。

今回我々は、pCas9\_GFP と pgRNA\_DsRed を、ウイルスベクターを用いずに RDEB Fb にトランスフェクションし、フローサイトメトリー法を用いて両陽性細胞をソーティングする手法を用いた。実際の臨床応用を想定した場合、フローサイトメトリーの工程を経ない方法が望ましい。しかし、実際にフローサイトメトリー法でソーティングしてきた細胞群は全体の 2.7% と非常に低く (図 20)、遺伝子編集後の細胞群をソーティングを経ずにマウスに投与することも試みたが、上皮化した皮膚からは hCOL7 は確認できなかった。そのため我々は pCas9 と pgRNA を安定発現ではなく、一過性の発現で用いることで細胞への影響を極力小さくする手法をとった。実際にソーティングの 7 日後の細胞群で、GFP と DsRed が発現していないことをフローサイトメトリーで確認し、また GFP, DsRed, Cas9 がすでに細胞内に存在していないことを PCR 法で確認することができた (図 23)。これらの工程を経ない方法は今後トランスフェクションの効率の向上に伴って可能になってくるものと考えられる。我々の戦略では、遺伝子編集後の RDEB Fb において約半数が COL7 発現細胞になっており、非常に高効率な遺伝子治療戦略であることが示された。そして、遺伝子編集後の RDEB

Fb をモデルマウスに投与した際、COL7 が正しい部位に発現し、anchoring fibril を形成することを確認し、その治療の有効性を証明し得た。

NHEJ を介した遺伝子編集により in-frame 化した細胞は、c.5815\_5818delGTGCinsTGTG や c.5813\_5819delGTGTGCCinsGTGC (p.[Val1939Cys; Pro1940Ala]や p.Val1939\_Pro1940delinsAla)といった変異を有している。COL7 はコラーゲン領域により三重らせん構造を形成し、その両端に非コラーゲン領域 (NC-1 ドメインと NC-2 ドメイン)を有する。コラーゲン領域は、数カ所で Gly-X-Y の繰り返し構造が中断されており、中でも Pro<sup>1940</sup>-Arg<sup>1978</sup> の 39 個のアミノ酸の挿入による中断が最大である。これらがヒンジ領域と呼ばれ、 $\alpha$ ヘリックスコイルドコイルドメインを形成し、COL7 の三本鎖形成に寄与していると考えられている (McAlinden et al., 2003)。我々が in-frame 化して変異を有している部分は Val<sup>1939</sup> と Pro<sup>1940</sup> で、このヒンジ領域に近接していたが、三本鎖形成能を有しており、実際に生体内でも COL7 の機能を有していることを確認した。これらの結果から、遺伝子編集により in-frame 化する効率は十分に高く、また in-frame 化した細胞から分泌された COL7 も機能的なものであることがわかった。

遺伝子編集の技術の発達により、HR を用いた遺伝子治療がより高効率になっていくことが期待される。しかし、我々の研究から、数個のアミノ酸変異が残っていても機能的な COL7 が供給できることが示唆された。CRISPR/Cas9 などの遺伝子編集システムを用いて DSB を起こした後には、HR よりも高確率で NHEJ が生じており、HR で遺伝子修復した細胞以外にも多くの NHEJ で機能修復した細胞が含まれていることが推測される。我々の研究から得られた知見により、frameshift 変異で発症する RDEB の場合、CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子編集した RDEB Fb をそのまま治療に応用できる可能性が強く示唆された。

## 総括および結論

本研究では以下の新知見を得た.

- 遺伝子変異特異的に認識する CRISPR/Cas9 を作製した.
- NHEJ を介した遺伝子編集で frameshift 変異を in-frame 化させた.
- in-frame 化した COL7 はわずかなアミノ酸置換や挿入や欠失を伴うが, COL7 の機能を有しており, 正しく DEJ に発現することを確認した.
- NHEJ を介して frameshift 変異を in-frame 化させる遺伝子編集は高頻度で起こるため, 遺伝子編集後に抗生剤による選択やシングルクローニングといった操作を経なくても治療に応用できることを確認した.

結論として, 我々は, 高頻度で機能的なタンパクを発現できる方法として, NHEJ を介した遺伝子治療が新たな遺伝子治療戦略となりうると考える.

## 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えてくださり，多くの御指導と御助言を賜りました，北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 清水 宏教授に深甚なる謝意を表します．また直接御指導いただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 新熊悟准教授（元北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 助教）に心より深謝いたします．そして本研究にご協力いただきました表皮水疱症の患者様に深く御礼申し上げます．最後に，北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の教室員，技術員，秘書各位に心より御礼申し上げます．

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Bae, S., Kweon, J., Kim, H.S., and Kim, J.S. (2014). Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat Methods* *11*, 705-706.

Bremer, J., Bornert, O., Nyström, A., Gostynski, A., Jonkman, M.F., Aartsma-Rus, A., van den Akker, P.C., and Pasmooij, A.M. (2016). Antisense Oligonucleotide-mediated Exon Skipping as a Systemic Therapeutic Approach for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther Nucleic Acids* *5*, e379.

Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M., and van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* *42*, e168.

Bremer, J., Bormert, O., Nystrom, A., Gostynski, A., Jonkman, M.F., Aartsma-Rus, A., van den Akker, P.C., Pasmooji, A.M. (2016). Antisense Oligonucleotide-mediated Exon Skipping as a Systemic Therapeutic Approach for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther Nucleic Acids* *5*, e379.

Chamorro, C., Mencía, A., Almarza, D., Duarte, B., Büning, H., Sallach, J., Hausser, I., Del Río, M., Larcher, F., and Murillas, R. (2016). Gene Editing for the Efficient Correction of a Recurrent COL7A1 Mutation in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Keratinocytes. *Mol Ther Nucleic Acids* *5*, e307.

Chen, M., Petersen, M.J., Li, H.L., Cai, X.Y., O'Toole, E.A., and Woodley, D.T. (1997). Ultraviolet A irradiation upregulates type VII collagen expression in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* *108*, 125-128.

Chung, H.J., and Uitto, J. (2010). Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* *28*, 93-105.



Dang, N., and Murrell, D.F. (2008). Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* *17*, 553-568.

Fine, J.D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R.A., Bauer, E.A., Bauer, J.W., Has, C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M.F., *et al.* (2014). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol* *70*, 1103-1126.

Fritsch, A., Loeckermann, S., Kern, J.S., Braun, A., Bosl, M.R., Bley, T.A., Schumann, H., von Elverfeldt, D., Paul, D., Erlacher, M., *et al.* (2008). A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J Clin Invest* *118*, 1669-79.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E2579-2586.

Georgiadis, C., Syed, F., Petrova, A., Abdul-Wahab, A., Lwin, S.M., Farzaneh, F., Chan, L., Ghani, S., Fleck, R.A., Glover, L., *et al.* (2016). Lentiviral Engineered Fibroblasts Expressing Codon-Optimized COL7A1 Restore Anchoring Fibrils in RDEB. *J Invest Dermatol* *136*, 284-292.

Guschin, D.Y., Waite, A.J., Katibah, G.E., Miller, J.C., Holmes, M.C., and Rebar, E.J. (2010). A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol Biol* *649*, 247-256.

Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., and Nelson, K.E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* *1*, e60.

Hainzl, S., Peking, P., Kocher, T., Muraue, E.M., Larcher, F., Del Rio, M., Duarte, B., Steiner, M., Klausegger, A., Bauer, J.W., *et al.* (2017). COL7A1

Editing via CRISPR/Cas9 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther* 25, 2573-2584.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., *et al.* (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31, 827-832.

Ito, K., Sawamura, D., Goto, M., Nakamura, H., Nishie, W., Sakai, K., Natsuga, K., Shinkuma, S., Shibaki, A., Uitto, J., *et al.* (2009). Keratinocyte/fibroblast-targeted rescue of Col7a1-disrupted mice and generation of an exact dystrophic epidermolysis bullosa model using a human COL7A1 mutation. *Am J Pathol* 175, 2508-2517.

Iyombe-Engembe, J.P., Ouellet, D.L., Barbeau, X., Rousseau, J., Chapdelaine, P., Lague, P., and Tremblay, J.P. (2016). Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. *Mol Ther Nucleic Acids* 5, e283.

Izmiryan, A., Danos, O., and Hovnanian, A. (2016). Meganuclease-Mediated COL7A1 Gene Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 136, 872-875.

Izmiryan, A., Ganier, C., Bovolenta, M., Schmitt, A., Mavilio, F., and Hovnanian, A. (2018). Ex Vivo COL7A1 Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Using CRISPR/Cas9 and Homology-Directed Repair. *Mol Ther Nucleic Acids* 12, 554-567.

Jacków, J., Titeux, M., Portier, S., Charbonnier, S., Ganier, C., Gaucher, S., and Hovnanian, A. (2016). Gene-Corrected Fibroblast Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa using a Self-Inactivating COL7A1 Retroviral Vector. *J Invest Dermatol* 136, 1346-1354.

Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 49-55.

Lee, H.Y., Choi, C.S., Birkenfeld, A.L., Alves, T.C., Jornayvaz, F.R., Jurczak, M.J., Zhang, D., Woo, D.K., Shadel, G.S., Ladiges, W., *et al.* (2010). Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance. *Cell Metab* *12*, 668-674.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* *339*, 823-826.

Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., and Ploegh, H.L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol* *33*, 538-542.

Matsuda, T., and Cepko, C.L. (2004). Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16-22.

McAlinden, A., Smith, T.A., Sandell, L.J., Ficheux, D., Parry, D.A., Hulmes, D.J. (2003). Alpha-helical coiled-coil oligomerization domains are almost ubiquitous in the collagen superfamily. *J Biol Chem* *278*, 42200-7.

Mencía, Á., Chamorro, C., Bonafont, J., Duarte, B., Holguin, A., Illera, N., Llamas, S.G., Escámez, M.J., Hausser, I., Del Río, M., *et al.* (2018). Deletion of a Pathogenic Mutation-Containing Exon of COL7A1 Allows Clonal Gene Editing Correction of RDEB Patient Epidermal Stem Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* *11*, 68-78.

Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., *et al.* (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* *27*, 743-745.

Murauer, E.M., Gache, Y., Gratz, I.K., Klausegger, A., Muss, W., Gruber, C., Meneguzzi, G., Hintner, H., and Bauer, J.W. (2011). Functional correction of

type VII collagen expression in dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* *131*, 74-83.

Natsuga, K., Nishie, W., Akiyama, M., Nakamura, H., Shinkuma, S., McMillan, J.R., Nagasaki, A., Has, C., Ouchi, Takashi., Ishiko, Akira., *et al.* (2010) : Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex, *Hum Mutation* *31*, 308-16.

Osborn, M.J., Starker, C.G., McElroy, A.N., Webber, B.R., Riddle, M.J., Xia, L., DeFeo, A.P., Gabriel, R., Schmidt, M., von Kalle, C., *et al.* (2013). TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther* *21*, 1151-1159.

Ousterout, D.G., Perez-Pinera, P., Thakore, P.I., Kabadi, A.M., Brown, M.T., Qin, X., Fedrigo, O., Mouly, V., Tremblay, J.P., and Gersbach, C.A. (2013). Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther* *21*, 1718-1726.

Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.L., *et al.* (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* *26*, 808-816.

Sander, J.D., Maeder, M.L., Reyon, D., Voytas, D.F., Joung, J.K., and Dobbs, D. (2010). ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Res* *38*, W462-468.

Sander, J.D., Ramirez, C.L., Linder, S.J., Pattanayak, V., Shores, N., Ku, M., Foden, J.A., Reyon, D., Bernstein, B.E., Liu, D.R., *et al.* (2013). In silico abstraction of zinc finger nuclease cleavage profiles reveals an expanded landscape of off-target sites. *Nucleic Acids Res* *41*, e181.

Sawamura, D., Goto, M., Yasukawa, K., Sato-Matsumura, K., Nakamura, H., Ito, K., Tomita, Y., and Shimizu, H. (2005). Genetic studies of 20

Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Hum Genet* *50*, 543-546.

Sebastiano, V., Zhen, H.H., Haddad, B., Derafshi, B.H., Bashkirova, E., Melo, S.P., Wang, P., Leung, T.L., Siprashvili, Z., Tichy, A., *et al.* (2014). Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med* *6*, 264ra163.

Shimizu, H. (2017). *Shimizu's Dermatology*. (MA, US: WILEY Blackwell)

Shinkuma, S. (2015). Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. *Clin Cosmet Investig Dermatol* *8*, 275-284.

Shinkuma, S., Guo, Z., and Christiano, A.M. (2016). Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 5676-5681.

Shinkuma, S., McMillan, J.R., and Shimizu, H. (2011). Ultrastructure and molecular pathogenesis of epidermolysis bullosa. *Clin Dermatol* *29*, 412-419.

Shinkuma, S., Natsuga, K., Nishie, W., and Shimizu, H. (2010). Epidermolysis bullosa in Japan. *Dermatol Clin* *28*, 431-432.

Siprashvili, Z., Nguyen, N.T., Gorell, E.S., Loutit, K., Khuu, P., Furukawa, L.K., Lorenz, H.P., Leung, T.H., Keene, D.R., Rieger, K.E., *et al.* (2016). Safety and Wound Outcomes Following Genetically Corrected Autologous Epidermal Grafts in Patients With Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *JAMA* *316*, 1808-1817.

Söllü, C., Pars, K., Cornu, T.I., Thibodeau-Beganny, S., Maeder, M.L., Joung, J.K., Heilbronn, R., and Cathomen, T. (2010). Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion. *Nucleic Acids Res* *38*, 8269-8276.

Tamai, K., Murai, T., Mayama, M., Kon, A., Nomura, K., Sawamura, D., Hanada, K., Hashimoto, I., Shimizu, H., Masunaga, T., *et al.* (1999). Recurrent COL7A1 mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on clinical severity. Japanese Collaborative Study Group on Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* *112*, 991-993.

Torrance, C.J., Agrawal, V., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2001). Use of isogenic human cancer cells for high-throughput screening and drug discovery. *Nat Biotechnol* *19*, 940-945.

Turczynski, S., Titeux, M., Tonasso, L., Décha, A., Ishida-Yamamoto, A., and Hovnanian, A. (2016). Targeted Exon Skipping Restores Type VII Collagen Expression and Anchoring Fibril Formation in an In Vivo RDEB Model. *J Invest Dermatol* *136*, 2387-2395.

Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., and Holmes, M.C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* *435*, 646-651.

Vorobyev, A., Ujiie, H., Recke, A., Buijsrogge, J.J.A., Jonkman, M.F., Pas, H.H., Iwata, H., Hashimoto, T., Kim, S.C., Hoon Kim, J., *et al.* (2015). Autoantibodies to Multiple Epitopes on the Non-Collagenous-1 Domain of Type VII Collagen Induce Blisters. *J Invest Dermatol* *135*, 1565-1573.

Watanabe, M., Natsuga, K., Shinkuma, S., Shimizu, H. (2018). Epidermal aspects of type VII collagen: Implications for dystrophic epidermolysis bullosa and epidermal bullosa acquisita. *J Dermatol* *45*, 515-21.

Webber, B.R., Osborn, M.J., McElroy, A.N., Twaroski, K., Lonetree, C.L., DeFeo, A.P., Xia, L., Eide, C., Lees, C.J., McElmurry, R.T., *et al.* (2016). CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *NPJ Regen Med* *1*.

Woodley, D.T., Cogan, J., Hou, Y., Lyu, C., Marinkovich, M.P., Keene, D., and Chen, M. (2017). Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Clin Invest* *127*, 3028-3038.

Woodley, D.T., Keene, D.R., Atha, T., Huang, Y., Ram, R., Kasahara, N., and Chen, M. (2004). Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Molecular Ther* *10*, 318-326.

Wu, W., Lu, Z., Li, F., Wang, W., Qian, N., Duan, J., Zhang, Y., Wang, F., and Chen, T. (2017). Efficient in vivo gene editing using ribonucleoproteins in skin stem cells of recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 1660-1665.

Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., and Jaenisch, R. (2013a). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* *154*, 1370-1379.

Yang, L., Guell, M., Byrne, S., Yang, J.L., De Los Angeles, A., Mali, P., Aach, J., Kim-Kiselak, C., Briggs, A.W., Rios, X., *et al.* (2013b). Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res* *41*, 9049-9061.

Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., and Anderson, D.G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet* *15*, 541-555.

Young, C.S., Hicks, M.R., Ermolova, N.V., Nakano, H., Jan, M., Younesi, S., Karumbayaram, S., Kumagai-Cresse, C., Wang, D., Zack, J.A., *et al.* (2016). A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle Cells. *Cell Stem Cell* *18*, 533-540.