



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
Description	配架番号 : 2487
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13696号
Issue Date	2019-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74967
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shota_Takashima_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 高島 翔太

	主査	准教授	矢部一郎
審査担当者	副査	教授	石田 晋
	副査	教授	畠山鎮次
	副査	教授	廣瀬哲郎

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)

劣性栄養障害型表皮水疱症（RDEB）などの重症遺伝性皮膚疾患において近年遺伝子編集システムを用いた遺伝子治療の研究が行われている。遺伝子編集システムを用いて DNA 上の特定部位に二本鎖 DNA 切断（DSB）を起こすと、相同組換え修復（HR）と、非相同末端再結合（NHEJ）の二つの経路を辿る。実際に細胞内で DSB が生じた場合には、NHEJ が高頻度で生じることが知られている。RDEB に対する遺伝子編集技術を用いた先行治療研究では、その多くが、HR を介して正常なアリルへと遺伝子組換えするという手法を用いている。本研究では、NHEJ の数塩基の挿入欠失を伴う修復経路の性質に着目し、frameshift 変異部に意図的に誘導することで frameshift 変異を in-frame 化することを試みた。その結果、in-frame 化は高頻度で生じ、またそれらの細胞から分泌された COL7 が機能的であるという結果を得た。

審査にあたり、副査の廣瀬教授から、今回着目した変異にしか適応できないのかという質問があり、申請者は「CRISPR/Cas9 の設計の条件として PAM 配列の存在が必要であるため、必ずしも全ての frameshift 変異に特異的な CRISPR/Cas9 を作製できるわけではない。しかしながら、PAM 配列と guide RNA の結合部の計 23 塩基のどこかに frameshift 変異を含むように設計することで多くの変異に対応できると考えており、少なくとも今回着目した変異は日本の RDEB 患者において高頻度に認められている変異なので、多くの患者さんに還元できる治療法であると考えている。」と回答した。

主査の矢部准教授からは、従来有していないタンパク質を投与することで toxic な部分や免疫原性になることはないのかという質問をいただいた。申請者は「これまで COL7 を有していない RDEB 患者に様々な方法で後天的に COL7 を補充する方法が研究されているが、今の所大きな問題は生じていない。わずかな変異を伴った COL7 だが、リードスルー治療やエクソンスキップなどの手法も研究されている。我々も投与後のマウスを観察した限りでは腫瘍化などは認めていない。しかし、臨床応用に向けては非常に重要な点だと思うので今後検討したい。」と回答した。また、核酸医薬を用いている研究について質問をいただき、海外の研究室では antisense-oligonucleotide を用いて PTC を含む exon をスキップするような戦略も試みられている旨を回答した。

副査の石田教授からは、臨床写真では繊維化や炎症細胞浸潤がかなり生じていて、この状態に欠損している COL7 を補充することが治療として有効なのかと質問をいただいた。申

請者は「RDEB 患者さんは生直後から全身にびらんや水疱の形成と治癒を繰り返すことで徐々に手足が癒着してしまうことが多く、そのような点でも生後すぐ投与することが理想的だと考えている。また免疫原性になる点に関しても、生直後の投与が解決方法になりうるのではないかと考えている。」と回答した。

副査の畠山教授からは、植皮を用いた実験系では、マウス特異的な抗体で染めて周囲のマウス組織由来であることを否定する必要があるとご意見をいただいた。申請者は「マウス Col7 の抗体は市販のものや海外の研究室で用いられているものをいくつか使用したが、ヒト COL7 にも反応してしまったため今回提示していないが、少なくとも非投与群においてマウス Col7 が発現していないことは確認した。」と回答した。また、矢部准教授と同様に、免疫原性が問題になり、臨床応用するにあたってはそのあたりの副作用が問題になるのではとご意見をいただいた。今後も表皮水疱症の病態解析や治療法の研究を続けていくつもりなので、今後の課題にしたいと回答した。

この論文は、frameshift 変異を持った *COL7A1* を、HR を介して完全に正常な遺伝子配列に修復しなくとも、NHEJ を介して in-frame 化することで高効率で機能的な COL7 を発現することができるということを示した最初の論文である。この成果は表皮水疱症だけでなく多くの frameshift 変異によって発症する疾患の治療選択肢となることが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。