

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01572

研究課題名(和文) 復帰変異モザイク表皮水疱症モデルマウスの作製と新規遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of epidermolysis bullosa model mouse with revertant mosaicism and its treatment

研究代表者

清水 宏 (Shimizu, Hiroshi)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：00146672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：17型コラーゲンタンパクを欠損する表皮水疱症患者では、ほぼ全例で復帰変異モザイクを有することが知られている。この復帰変異モザイクは、遺伝子を人工的に加工することなく自然に遺伝子異常が修復される現象であるが、そのメカニズムは明らかにされていない。我々は本研究において、復帰変異モザイクを発症し得る表皮水疱症モデルマウスの作製にした。現在、このマウスを用いて、一部の細胞において復帰変異モザイクを誘導することに成功し、これらの細胞について解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、表皮水疱症などの遺伝性皮膚疾患で、後天的に一部の皮膚が正常化する現象(復帰変異モザイク)が報告された。そのような部位では、遺伝子異常が正常化した表皮細胞が観察されるが、この現象は尋常性魚鱗癬や先天性免疫不全などでも報告されている。現在、この復帰変異モザイク現象が生じた皮膚から採取した表皮細胞を増幅培養し自家移植する再生医療が開発されるなど、本現象は、先天性疾患に対する自家細胞を用いた根本的な再生医療の可能性をもたらす画期的な自然現象である。もしこの現象のメカニズムを解明できれば、遺伝子異常によって生じる様々な疾患の治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Almost all patients with epidermolysis bullosa lacking type XVII collagen are known to have revertant mosaic spots. This revertant mosaicism is a phenomenon in which gene abnormalities are naturally repaired without any artificial modification of the gene, but the mechanism is not clear. In this study, we developed a mouse model of epidermolysis bullosa that could develop revertant mosaicism. Using this mouse, we have succeeded in inducing revertant mosaic cells, and we are now analyzing these cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：復帰変異モザイク 表皮水疱症 17型コラーゲン 細胞療法 遺伝子編集

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症 (epidermolysis bullosa, EB) は全身の皮膚に水疱、びらんを生じる遺伝性疾患である (図 1 左)。根治療法はなく、感染症や悪性腫瘍により若年期に死に至る。重篤な臨床症状から、患者支援団体が世界中で設立されるなど、一般社会でも非常に注目されており、その治療法の開発は喫緊の課題である。

我々は、表皮水疱症の中でも表皮-真皮接着タンパクである 17 型コラーゲン (COL17) の遺伝子異常により発症する接合部型 EB (junctional EB, JEB) に注目した。近年、EB などの遺伝性皮膚疾患で、後天的に一部の皮膚が正常化する現象 (復帰変異モザイク) が報告されている (図 2)。そのような部位では、遺伝子異常が正常化した表皮細胞が観察されるが、特に EB の中では、COL17 異常による成人 JEB の大多数で復帰変異モザイクがみられる (Pasmooij AM et al. J Invest Dermatol 2012)。この現象は尋常性魚鱗癬や先天性免疫不全などでも報告されており、多くは体細胞分裂時の染色体組換え (体細胞組換え) によって生じるとされる (Suzuki S et al. J Invest Dermatol 2016, Nomura T et al. J Dermatol Sci 2020)。復帰変異モザイクは先天性疾患に対する自己細胞を用いた根本的な治療可能性をもたらす画期的な自然現象であるが、復帰変異を生じた細胞を周囲の自己細胞と区別することが非常に困難である。そのため、復帰変異を起こした 1 個の細胞が、どのように生体内で細胞競合に打ち勝って増殖し、臨床的な正常皮膚領域を形成するかについては数理モデル等を用いた推測以上の研究が行われていない。

我々は以前に、Col17 を欠損させた JEB のモデルマウスの作成に成功しており、疾患の病態解明や老化研究、あるいは EB の治療を目指した研究へ応用してきた (Nishie W et al. Nat Med 2017, Fujita Y et al. PNAS 2010, Tanimura S et al. Cell Stem Cells 2011)。いっぽう、近年遺伝子編集技術として応用が進んでいる CRISPR/Cas9 は、遺伝子上の任意の配列に対して二本鎖切断を誘導し、相同組換えあるいは非同相末端結合を生じさせるものであり、EB に対しても遺伝子治療へ応用可能であることを我々は示している (Shinkuma S et al. PNAS 2016)。

そこで我々は、EB のモデルマウスに対して CRISPR/Cas9 を用いて DNA 二本鎖切断を生じさせることで、復帰変異モザイクを人工的に誘導し、EB をはじめとする常染色体劣性遺伝疾患の根本的治療に結びつけることができないかと考えた。さらに復帰変異した細胞を可視化することで、生体内での正常化した細胞の挙動を明らかにし、臨床応用へ繋げうる基礎的知見を得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

表皮水疱症 (EB) などの遺伝性皮膚疾患において復帰変異モザイクが生じる部位はごく一部であるため、限られた皮膚のみが正常化する。復帰変異モザイクを自在に誘導し、さらにその範囲を拡大できれば、全身を正常皮膚が覆うため、根治的な治療になり得る。そこで本研究では、復帰変異モザイク EB モデルマウスを作製し、以下の事項を明らかにする。

(1) 復帰変異モザイク (染色体組換え) を誘導する CRISPR/Cas9 の作製

劣性遺伝形式を有する疾患の多くは、複合ヘテロ接合体変異によって生じる。ある原因遺伝子の二本のアリルにおいて、5' 側 (上流) と 3' 側 (下流) の異なる部位に遺伝子変異を有している場合、これらの変異部の間で CRISPR/Cas9 を用いて DNA 二本鎖切断を誘導し、染色体組換えが生じうるか確認する。

(2) EB モデルマウスを用いた in vivo 染色体組換え遺伝子治療の検討

復帰変異モザイク部位で蛍光を発する世界初の EB モデルマウスを作製し、(1) で作製した CRISPR/Cas9 をモデルマウスに投与、生体内での染色体組換えの有無を確認する。

3. 研究の方法



図 1 EB 患者 (左) と EB モデルマウス (右)

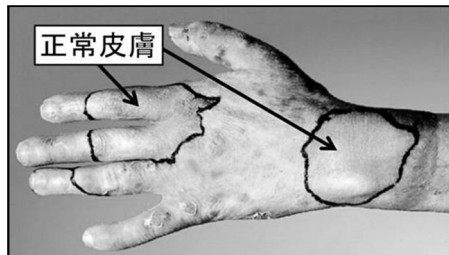


図 2 EB 患者に生じた復帰変異モザイク皮膚 後天的に一部の皮膚で遺伝子異常が正常化する。

(1) 復帰変異モザイク EB モデルマウスの作製 (図 3)

COL17 が欠損する表皮水疱症患者では、ほぼ全例で復帰変異モザイクを有する (Pasmooij AM, J Invest Dermatol 2012)。申請者らは下記の手法を用いて、復帰変異モザイクを生じた部位で GFP 蛍光を発する世界初のモデルマウスを作製する。

Col17 ヘテロ欠損マウスの作製 Col17 遺伝子の各々のアリルにおいて exon 2 および exon 3 を欠損した Col17 ヘテロ欠損マウスを作製する。

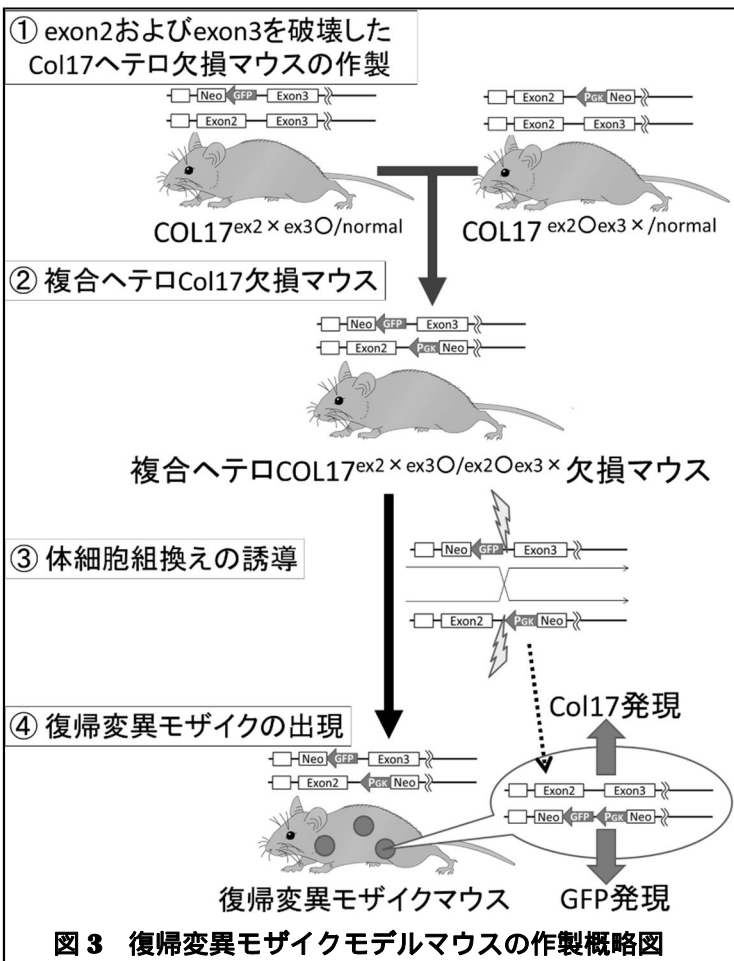
複合ヘテロ Col17 欠損マウスの作製 で作製したマウスを交配し、複合ヘテロ Col17 欠損マウスを作製する。

体細胞組換えの誘導 自然発症および 2) の実験で作製した CRISPR/Cas9 を用いて体細胞組換えを誘導する。

復帰変異モザイクの出現 exon 2 および exon 3 の破壊に用いる neomycin cassette に GFP のプロモーターと GFP 遺伝子がそれぞれ別々に組み込まれており、体細胞組換えにより復帰変異モザイクが生じた場合、GFP が発現するため、復帰変異モザイクを生体レベルで同定可能になる。

(2) CRISPR/Cas9 nuclease および CRISPR/Cas9 nickase を用いた染色体組換え誘導法の確立

染色体組換えは、二本鎖切断を受けた DNA の相同組換えにより生じる。二本鎖切断後にヌクレアーゼ等の働きにより 3' 突出末端が作り出される。さらに相補基配列をもつ別の二重鎖 DNA に割り込んでヘテロ二重鎖を形成し、相同組換えが生じる (図 4)。つまり、3' 突出末端の形状が相同組換えに重要である。



CRISPR/Cas9 を利用して DNA に二本鎖切断を導入するためには、ゲノムを認識するガイド RNA と切断酵素である Cas9 が必要である。我々は、これらの遺伝子にそれぞれ GFP と RFP 遺伝子を共発現するベクターを作製し、90%の効率を有する遺伝子編集に成功した (Shinkuma et al. PNAS, 2016)。従来の Cas9 nuclease は DNA を二本鎖とも切断するが、Cas9 の変異体 (D10A) である Cas9 nickase は、一本鎖のみを切断する。そのため、二種の CRISPR/Cas9 nickase を用いることにより様々な 3' 突出末端を作製できる。本研究では、Cas9 nickase を用いて様々な 3' 突出末端を作製し、染色体組換え誘導を行う。

染色体組換え効率を測定する実験系の樹立

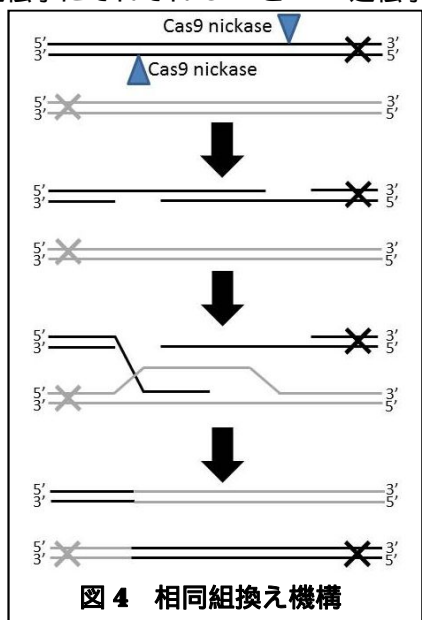
相同遺伝子にそれぞれ CMV プロモーターと GFP 遺伝子を組み込んだ cell line を作成する。これらの組み込まれた遺伝子の間の部位で染色体組換えが生じた場合、GFP 陽性細胞に形質転換する。

ゲノム編集による染色体組換え効率の評価

CMV プロモーターと GFP 遺伝子の間に存在する遺伝子配列を認識する CRISPR/Cas9 nuclease および様々な 3' 突出末端ができるよう設計した CRISPR/Cas9 nickase を で作製した細胞に transfection し、フローサイトメトリーを用いて染色体組換え効率 (GFP 陽性細胞数) を評価する。

EB 患者細胞を用いた遺伝子編集による染色体組換え実験

申請者らはすでに複合ヘテロ接合体変異を有する表皮水疱症患者由来線維芽細胞や表皮角化細胞を複数有しており、その一部は HPV 遺伝子導入により不死化されている。これらの患者細胞



に対し、それぞれの変異の間に存在する intron 領域をターゲットとする CRISPR/Cas9 を用いて染色体組換えを誘導する。免疫染色法を用いることにより、原因タンパクが陽性となった細胞を回収し、遺伝子を抽出する。さらに二つの変異部を含むように PCR を行い、TA クローニング法を用いて染色体組換えの有無について解析を行う。

4. 研究成果

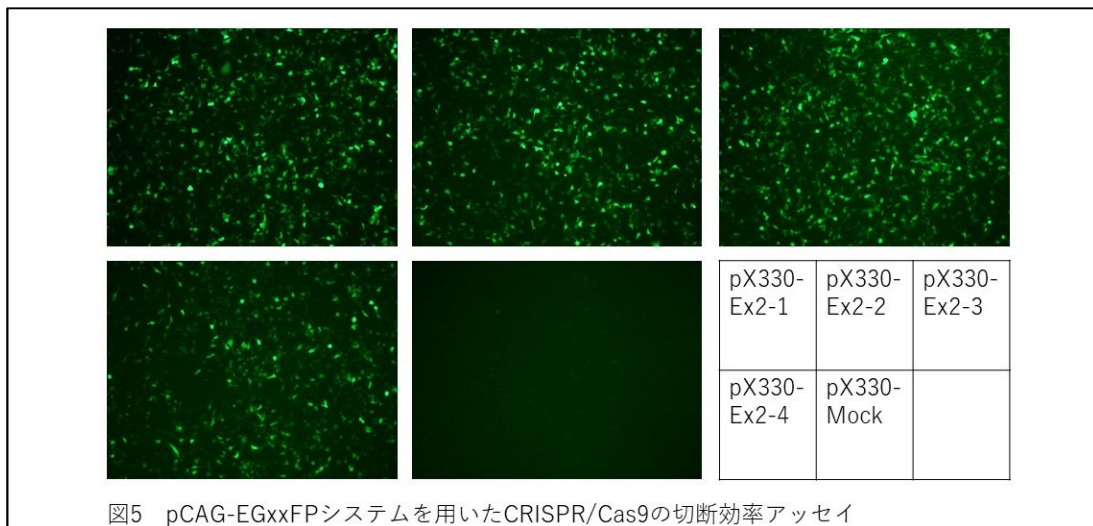
(1) 復帰変異モザイク EB モデルマウスの作製

gRNA の設計と CRISPR/Cas9 の作製

CRISPRdirect を用いて CRISPR/Cas の gRNA 配列を予測した。Col17a1 遺伝子の exon2 および exon3 をターゲットとする候補 gRNA をそれぞれ 4 つずつ設計した。次に、CRISPR/Cas9 を作製するため、この候補 gRNA を pX330 プラスミドに組み込み、pX330-sgRNA を作製した。

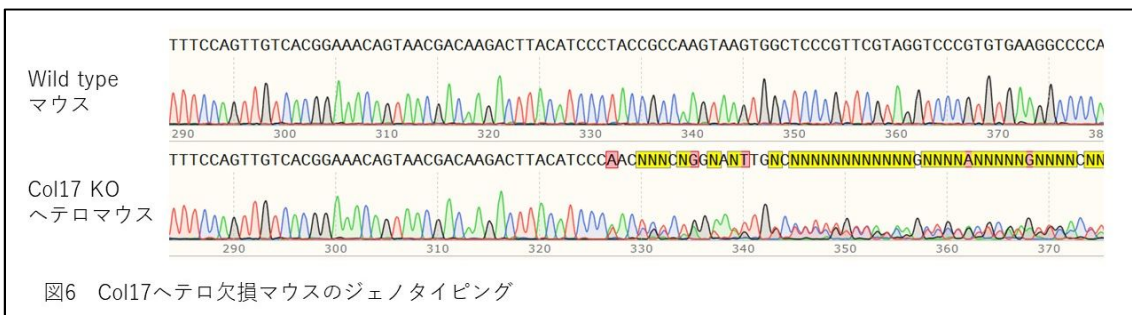
pCAG-EGxxFP システムを用いた CRISPR/Cas9 の切断効率アッセイ

pCAG-EGxxFP (Mashiko et al., Sci Rep 3: 3355, 2013) を用いて上記で作成した pX330-sgRNA の切断効率を確認した (図 5)



Col17 ヘテロ欠損マウスの作製

活性の高い pX330 ベクターを受精卵の前核に注入し、F0 マウスを作製した。これらのマウスから DNA を抽出し遺伝子検索を行ったところ、Col17a1 遺伝子の exon2 および exon3 の部分に遺伝子変異を有する Col17 ヘテロ欠損マウスを作製することに成功した (図 6)



複合ヘテロ Col17 欠損マウスの作製

Col17a1 遺伝子の exon2 および exon3 の部分に遺伝子変異を有する Col17 ヘテロ欠損マウスを交配し、複合ヘテロ Col17 欠損マウスの作製した (図 7)。表皮真皮境界部で裂隙を形成し、さらに Col17 の発現量が低下していることをウェスタンブロット法と免疫蛍光染色法で確認し、複合ヘテロ Col17 欠損マウスが接合部型表皮水疱症のモデルマウスであることを証明した。



(2) CRISPR/Cas9 nuclease を用いた染色体組換え誘導法の確立

複合ヘテロ Col17 欠損マウス由来の表皮角化細胞の作製

細胞ディッシュに細胞外マトリックスでコーティングすることにより、複合ヘテロ Col17 欠損マウスの初代表皮角化細胞の培養に成功した。

フローサイトメトリーを用いた表皮角化細胞の Col17 発現量解析

複合ヘテロ Col17 欠損マウス由来の表皮角化細胞や野生型マウス由来の表皮角化細胞の Col17 発現量を評価することに成功した (図 8)

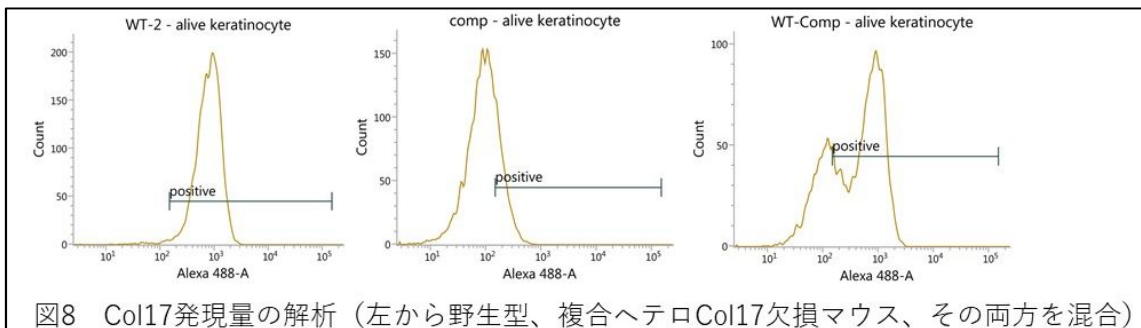


図8 Col17発現量の解析 (左から野生型、複合ヘテロCol17欠損マウス、その両方を混合)

TIDE 解析を用いた Col17a1 遺伝子の intron2 をターゲットとする CRISPR/Cas9 の切断効率アッセイ

Col17a1 遺伝子の intron2 をターゲットとする CRISPR/Cas9 を作製し、TIDE 解析を用いて、切断効率を確認した。

複合ヘテロ Col17 欠損マウス由来の表皮角化細胞を用いた染色体組換え実験

複合ヘテロ Col17 欠損マウス由来の表皮角化細胞に対して、Col17a1 遺伝子の intron2 をターゲットとする CRISPR/Cas9 を遺伝子導入し、さらにフローサイトメトリーで Col17 の発現量を解析したところ、一部の細胞で Col17 発現量が増加していることを確認し得た (図 9)

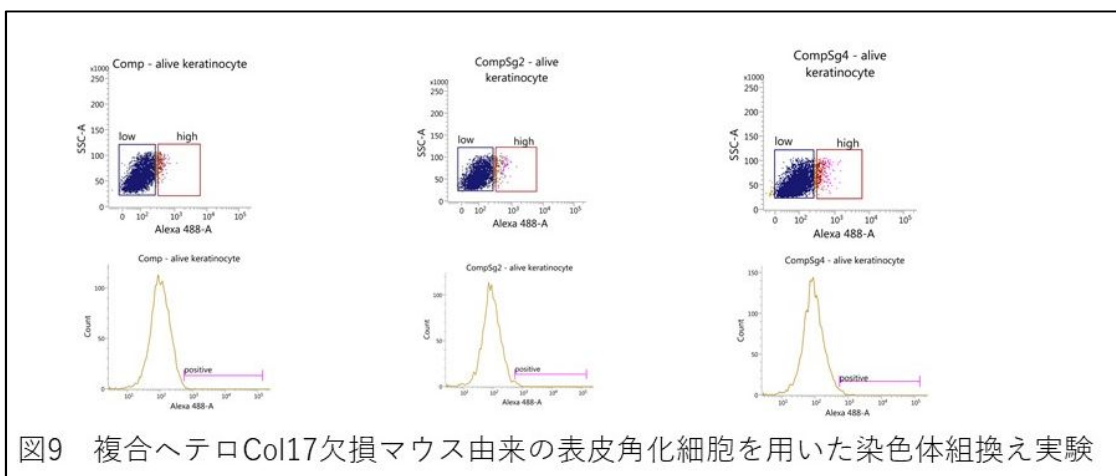


図9 複合ヘテロCol17欠損マウス由来の表皮角化細胞を用いた染色体組換え実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama Chihiro, Fujita Yasuyuki, Matsumura Wakana, Ujiie Inkin, Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Nomura Toshifumi, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 91
2. 論文標題 The development of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem/stromal cells from normal human and RDEB epidermal keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 301 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jderm.2018.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Mika, Natsuga Ken, Shinkuma Satoru, Shimizu Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Epidermal aspects of type VII collagen: Implications for dystrophic epidermolysis bullosa and epidermolysis bullosa acquisita	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 515 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura Wakana, Fujita Yasuyuki, Nakayama Chihiro, Shinkuma Satoru, Suzuki Shotaro, Nomura Toshifumi, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 89
2. 論文標題 Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 263 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jderm.2017.11.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Nomura Toshifumi, Ujiie Hideyuki, Natsuga Ken, Iwata Hiroaki, Nakamura Hideki, Vorobyev Artem, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Efficient Gene Reframing Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa with CRISPR/Cas9.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1711 ~ 1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinkuma Satoru, Nakamura Hideki, Maehara Manami, Takashima Shota, Nomura Toshifumi, Fujita Yasuyuki, Hasegawa Satoshi, Matsumura Kazuko, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 99
2. 論文標題 Electron Microscopic and Immunohistochemical Findings of the Epidermal Basement Membrane in Two Families with Nail-patella Syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Dermato-Venereologica	6. 最初と最後の頁 1110 ~ 1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Nomura Toshifumi, Nakamura Hideki, Shimizu Hiroshi
2. 発表標題 Efficient reframed gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9.
3. 学会等名 The 7th International Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujita Yasuyuki
2. 発表標題 Emerging cell therapies in epidermolysis bullosa.
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Cutaneous Biology Research Institute. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumura Wakana, Fujita Yasuyuki, Nakamura Hideki, Nishie Wataru, Shinkuma Satoru, Ujiie Inkin, Nakayama Chihiro, Takashima Shota, Sawamura Daisuke, Inoie Masukazu, Shimizu Hiroshi
2. 発表標題 Long lasting epithelization after cultured epidermal autograft with revertant mosaicism in recessive dystrophic epidermolysis bullosa.
3. 学会等名 DebRA International 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Nomura Toshifumi, Ujiie Hideyuki, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 The 73rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田靖幸
2. 発表標題 表皮水疱症と歩む：最近のトピックス
3. 学会等名 第116回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nguyen Hong Ha, Shinkuma Satoru, Ansai Osamu, Kabata Yudai, Takashima Shota, Mori Masashi, Ikawa Masahito, Shimizu Hiroshi, Abe Riichiro
2. 発表標題 Frameshift mutations in different exons of Col17a1 lead to distinctive phenotype of junctional epidermolysis bullosa model mice.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	新熊 悟 (Shinkuma Satoru) (00613788)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩田 浩明 (Iwata Hiroaki) (20397334)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究分担者	西江 渉 (Nishie Wataru) (20443955)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	乃村 俊史 (Nomura Toshifumi) (50399911)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	藤田 靖幸 (Fujita Yasuyuki) (80374437)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	